

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

ALICE SATIKO UTIYAMA

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO EFETOR Phapa-4574965 DE *Phakopsora pachyrhizi* NA INTERAÇÃO COM *Glycine max.*

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2024**

ALICE SATIKO UTIYAMA

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO EFETOR Phapa-4574965 DE *Phakopsora pachyrhizi* NA INTERAÇÃO COM *Glycine max*.

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Aluizio Borém de Oliveira

Coorientadora: Francismar Corrêa Marcelino-Guimaraes

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

U89c
2024
Utiyama, Alice Satiko, 1995-
Caterização funcional do efetor Phapa-4574965 de
Phakopsora pachyrhizi na interação com *Glycine max* / Alice
Satiko Utiyama. – Viçosa, MG, 2024.
1 tese eletrônica (61 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Aluizio Borém de Oliveira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Agronomia, 2024.

Referências bibliográficas: f. 49-61.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.445>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Soja - Resistência à doenças e pragas - Aspectos genéticos. 2. Ferrugem da soja (Doença). 3. Interação genótipo-ambiente. I. Oliveira, Aluizio Borém de, 1959-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. III. Título.


CDD 22. ed. 632.492

ALICE SATIKO UTIYAMA


CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO EFETOR Phapa-4574965 DE *Phakopsora pachyrhizi* NA INTERAÇÃO COM *Glycine max*.

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 15 de maio de 2024

Documento assinado digitalmente
 ALICE SATIKO UTIYAMA
Data: 31/07/2024 20:35:40-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Alice Satiko Utiyama
Autora

Documento assinado digitalmente
 ALUIZIO BOREM DE OLIVEIRA
Data: 01/08/2024 07:00:34-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Aluízio Borém de Oliveira
Orientador

A Deus, à minha querida mãe, Terezinha
Satiko Utiyama, ao meu querido irmão, Sérgio
Kenji Utiyama, aos envolvidos e aqueles para
os quais este trabalho será profícuo.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço a Deus, por jamais me abandonar durante as adversidades e prontamente atender às minhas preces, não por ser merecedora de tais graças, mas para me moldar e fortalecer em minhas fraquezas. Ao Senhor tenho gratidão eterna pelas vivências, oportunidades, conquistas, por minha vida e minha preciosa família; bênçãos estas a mim confiadas em sua condução sábia da vida. Muito obrigada, Querido Senhor!

Agradeço à minha querida mãe, Terezinha Satiko Utiyama, pelo apoio em minhas escolhas e por me guiar durante minhas intempéries de incertezas. Detentora de grande determinação, amor e inspiração para meu eu de cada amanhã, seu suporte e força motivam-me a continuar firme a cada passo adiante. Muito obrigada, Querida Mãe!

Agradeço ao meu querido irmão, Sérgio Kenji Utiyama, por fortalecer o meu eu com sua fé inabalável em minhas capacidades e me inspirar na busca de novos horizontes. Detentor de grande perseverança, sabedoria e inspiração para meu eu de cada amanhã, seu suporte e confiança motivam-me a continuar forte a cada passo adiante. Muito obrigada, Querido Irmão!

Agradeço ao meu querido pai, Sérgio Yutaka Utiyama (*in memoriam*), por prover auxílio à sua maneira e instigar minha mente ao extremo em adversidades. Seu exemplo profissional inspirou-me a buscar a melhor maneira de trabalhar e alcançar meus objetivos. Muito obrigada, Querido Pai!

Agradeço ao Dr. Aluizio Borém de Oliveira por aceitar ser meu orientador e prover todo tipo de apoio, tanto profissional quanto pessoal, agregando sabedoria e experiência ao perfil profissional que almejo ser.

Agradeço à Dr^a. Francismar Corrêa Marcelino-Guimaraes por aceitar ser minha co-orientadora e, com seu amplo conhecimento, me auxiliar em todos os processos da pesquisa e até adversidades pessoais.

Agradeço ao Dr. Luciano Gomes Fietto por disponibilizar seu conhecimento para resolução dos desafios da pesquisa, demonstrando sempre disposição em me auxiliar com sua sabedoria e paciência.

Agradeço à Dr^a. Thays Vieira Bueno por sua dedicação em me apoiar, tanto profissional quanto pessoalmente, auxiliando-me sempre com muita disposição, esforço, didática e sabedoria.

Agradeço ao Laboratório de Biotecnologia Molecular, da Universidade Federal de Viçosa; e ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal, da Embrapa Soja, e suas respectivas equipes, por

cederem o espaço, equipamentos e materiais para realização desta pesquisa. Em especial, agradeço à Dr^a. Silvana R. R. Marin, Dr^a. Márcia K. Kuwahara e Dr^a. Adriana B. Dos Santos por estarem sempre à disposição para orientar e compartilhar sua sabedoria em reflexões profissionais e pessoais.

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa, à Embrapa Soja, e seus respectivos funcionários por cederem local, equipamentos, materiais, seu tempo e conhecimento para me auxiliar em cada etapa deste estudo.

Agradeço ao Laboratório de Anatomia Vegetal, da Universidade Federal de Viçosa, em especial à Dr^a. Luzimar Campos Da Silva, ao Me. Michel Filiphy Silva Santos, à Dr^a. Aurora Yoshiko Sato Dias e Dr^a. Rosana Gonçalves Pires Matias, por cederem o espaço, equipamentos e materiais, além de seu tempo e conhecimento para realização e compreensão desta pesquisa.

Agradeço ao Laboratório de Fisiologia Vegetal, da Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Dr. Pedro Augusto Braga dos Reis e Dr. Fredy Davi Albuquerque Silva, por cederem o espaço, equipamentos e materiais, além de seu tempo e conhecimento para realização e compreensão desta pesquisa.

Agradeço ao Núcleo de Análise de Biomoléculas (NUBIOMOL), da Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Dr. Edvaldo Barros, pelo espaço, equipamentos e materiais, além de seu tempo e conhecimento para e compreensão desta pesquisa.

Agradeço ao Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM), da Universidade Federal de Viçosa, em especial à Dr^a. Karla Veloso Gonçalves Ribeiro e Dr^a. Cristiane do Carmo Cesário, pelo espaço e equipamento, além de seu tempo e conhecimento para e compreensão desta pesquisa.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, da Universidade Federal de Viçosa e sua equipe pela oportunidade de enriquecer meu saber neste programa através da vasta sabedoria compartilhada pelos docentes.

Agradeço a oportunidade e suporte financeiro com o qual o presente estudo foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

"Fortis Fortuna Adiuvat." (Autor desconhecido)

RESUMO

UTIYAMA, Alice Satiko, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2024. **Caracterização funcional do efector Phapa-4574965 de *Phakopsora pachyrhizi* na interação com *Glycine max*.** Orientador: Aluizio Borém de Oliveira. Coorientadora: Francismar Corrêa Marcelino-Guimarães.

Uma das principais doenças que afeta a cultura da soja no Brasil é a Ferrugem Asiática da Soja (ASR – *Asian Soybean Rust*). Quando em alta severidade, essa doença, causada pelo fungo biotrófico obrigatório *Phakopsora pachyrhizi*, pode causar perdas de produtividade de até 90%. Muitas são as estratégias existentes para o manejo da doença, desde o uso de fungicidas, de variedades contendo genes de resistência, até o vazio sanitário e o emprego de cultivares precoces. No entanto, com o uso intensivo de fungicidas e cultivares resistentes aliados à elevada variabilidade genética e eficiente adaptação do patógeno, tais medidas perdem eficácia ou não são capazes de controlar as variantes do fungo. Com o intuito de encontrar novas metodologias duradouras e sustentáveis para incrementar o manejo da ASR, pesquisas têm concentrado na interação planta-patógeno, visando compreender os componentes e mecanismos envolvidos no ataque do patógeno, defesa do hospedeiro e suas interações. No caso das plantas, seu sistema imune inato pode ser dividido em duas linhas de defesa. A primeira (Imunidade Desencadeada por PAMPs - PTI) é ativada com o reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) liberados pelos microrganismos e patógenos. Em contrapartida, os patógenos se adaptam para suprimir as respostas de defesa associadas PTI e favorecer a infecção por meio da secreção de proteínas efetoras. Quando o hospedeiro possui proteínas R capazes de reconhecer esses efetores, consegue elevar sua amplitude de defesa e reduzir a infecção por meio de sua segunda linha de defesa (Imunidade Desencadeada por Efetores - ETI), que se sustenta até a presença de outra proteína efectora irreconhecível pela proteína R atual, caracterizando a co-evolução entre patógeno e hospedeiro. Frente ao exposto, as proteínas efetoras possuem grande influência no sucesso da infecção e desenvolvimento dos fitopatógenos. Deste modo, esta tese visa caracterizar funcionalmente a proteína efectora Phapa-4574965 de *P. pachyrhizi* e suas interações com as células hospedeiras, buscando identificar seus possíveis interactores na soja. Foram empregadas metodologias para o estudo da interação proteína-proteína como os ensaios “Pull-down” e Y2H, análise do seu perfil de expressão durante a infecção por qPCR, e de sua localização subcelular em células vegetal por meio de co-expressão transiente e imunolocalização, analisados em microscopia confocal. O gene *Phapa-4574965* expressou-se significativamente nos tempos 12, 24 e 48 horas após a inoculação do patógeno. Possíveis interações foram observadas entre Phapa-4574965 e proteínas de soja atuantes tanto de forma direta no sistema de defesa da planta quanto através da produção e metabolismos

energéticos, com destaque nas proteínas “Alanine Transaminase”, “NAD-dependent epimerase/dehydratase domain-containing protein”, “Cysteine Proteinase” e “Aminomethyltransferase”. Phapa-4574965 apresentou localização nuclear e citoplasmática em células de *N. benthamiana*, além de mitocondrial, que se correlaciona com a “Aminomethyltransferase” da soja e a predição de localização de Phapa-4574965. Os resultados gerados pelo presente estudo fornecem informações adicionais para auxiliar futuros estudos para enriquecer a compreensão da interação soja-*P. pachyrhizi* e elaborar de novas estratégias que facilitem o manejo de ASR.

Palavras-chave: Ferrugem asiática da soja, efector fitopatogênico, interação soja- *P. pachyrhizi*.

ABSTRACT

UTIYAMA, Alice Satiko, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2024. **Functional characterization of the Phapa-4574965 effector from *Phakopsora pachyrhizi* in interaction with *Glycine max*.** Adviser: Aluizio Borém de Oliveira. Co-adviser: Francismar Corrêa Marcelino-Guimarães.

One of the main diseases that affects soybean crop in Brazil is Asian Soybean Rust (ASR – *Asian Soybean Rust*). When in high severity, this disease, caused by the obligate biotrophic fungus *Phakopsora pachyrhizi*, can cause yield losses of up to 90%. There are many strategies to control the disease, from the use of fungicides, varieties containing resistance genes, to sanitary void and the use of early cultivars. However, with the intensive use of fungicides and resistant cultivars combined with the high genetic variability and efficient adaptation of the pathogen, such methods lose effectiveness or are not capable to control fungal variants. To find new lasting and sustainable methodologies to improve the management of ASR, research has focused on plant-pathogen interaction, aiming to understand the components and mechanisms involved in pathogen attack, host defense and their interactions. In the case of plants, their innate immune system can be divided into two defense lines. The first (PAMP-Triggered Immunity - PTI) is activated with the recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) released by microorganisms and pathogens. In contrast, pathogens are adapted to suppress PTI-associated defense responses and favor infection through the secretion of effector proteins. When the host has R proteins capable to recognize these effectors, it can increase its defense amplitude and reduce infection through its second defense line (Effector-Triggered Immunity - ETI), which is sustained until the presence of another unrecognizable effector protein by the current R protein, characterizing the co-evolution between pathogen and host. In view of the above, effector proteins have a great influence on the infection success and phytopathogens development. Therefore, this study aims to functionally characterize the effector protein Phapa-4574965 of *P. pachyrhizi* and their interactions with host cells, seeking to identify their possible interactors in soybeans. Methodologies were used to study protein-protein interaction, such as the Pull-down and Y2H assays, expression profile analysis during infection by qPCR, and its subcellular localization in plant cells through transient co-expression and immunolocalization analyzed using confocal microscopy. The *Phapa-4574965* gene was significantly expressed at 12, 24 and 48 hours after pathogen inoculation. Possible interactions were observed between Phapa-4574965 and soybean proteins acting both directly in the plant's defense system and through energy production and metabolism, with emphasis on the proteins Alanine Transaminase, NAD-

dependent epimerase/dehydratase domain-containing protein, Cysteine Proteinase and Aminomethyltransferase. Phapa-4574965 showed nuclear and cytoplasmic localization in *N. benthamiana* cells, in addition to mitochondrial, which correlates with the soybean' "Aminomethyltransferase" and the localization prediction of Phapa-4574965. The results generated by the present study provide additional information to assist future studies to enrich the understanding of the soybean-*P. pachyrhizi* interaction and develop new strategies that facilitate the management of ASR.

Keywords: Asian soybean rust, phytopathogenic effector, soybean-*P. pachyrhizi* interaction.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1. Análise do perfil de expressão gênico dos candidatos a efetores durante a interação com o hospedeiro	17
2.1.1. Análise qPCR	17
2.2. Identificação de interactores provenientes da soja relacionadas com o efector de <i>P. pachyrhizi</i>	17
2.2.1. Material Vegetal e inoculação	17
2.2.2. Ensaio “Pull-down”	19
2.2.3. Validação da interação pelo ensaio de Duplo Híbrido de levedura	20
2.2.3.1. Clonagem dos modelos gênicos das proteínas de soja selecionadas	20
2.2.3.2. Teste de transativação	21
2.2.3.3. Validação do resultado do “Pull-down” através do ensaio de duplo híbrido de leveduras	22
2.2.3.4. Ensaio de ativação de genes repórteres para validação de interação proteína-proteína	23
2.3. Localização subcelular do efector de <i>P. pachyrhizi</i> em células vegetais	24
2.3.1. Colocalização subcelular de proteínas	24
2.3.2. Imunolocalização	26
2.3.2.1. Material vegetal, coleta e preparo das amostras	26
3. RESULTADOS	29
3.1. Análise do perfil de expressão gênico dos candidatos a efetores durante a interação com o hospedeiro	29
3.2. Varredura de proteínas de soja por “Pull-down”	30
3.3. Ensaio de Duplo Híbrido de Levedura	33
3.4. Identificação da localização subcelular de Phapa-4574965 em <i>Nicotiana benthamiana</i>	35
3.5. Identificação da localização subcelular de Phapa-4574965 em <i>Glycine max</i>	38
4. DISCUSSÃO	41
5. CONCLUSÃO	48
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o agronegócio tem uma contribuição significativa para a economia do país, tendo uma participação de 24,1% no PIB brasileiro. A soja vem a ser uma das principais *commodities* que contribui com este cenário, sendo a soja em grão o principal produto exportado pelo país (CEPEA, 2023; CNA, 2023). Inclusive, na safra 2022/2023, o Brasil foi colocado como maior produtor mundial de soja, com uma produção acima de 154 milhões de toneladas (EMBRAPA SOJA, 2023). Com tal importância da cultura para o país, fatores negativos como a ocorrência de doenças são limitantes na produtividade da soja. Uma das principais doenças e a que mais preocupa os produtores de soja é a Ferrugem Asiática da Soja (ASR – *Asian Soybean Rust*), causada pelo patógeno *Phakopsora pachyrhizi*.

Ao se desenvolver nas folhas de soja, a *P. pachyrhizi* se manifesta inicialmente como lesões que aumentam em tamanho e quantidade, levando assim ao amarelecimento e desfolha precoce da planta. Devido a estes sintomas, quando em alta severidade, a ASR pode causar perda de produtividade de até 90%, justificando tal preocupação dos produtores com o controle desta doença (Yorinori et al., 2005; Reis et al., 2006; Hartman et al., 2015; Godoy et al., 2016). Desta forma, diferentes métodos de manejo são utilizados em associação para conter o avanço da doença. Para elevar a eficácia do manejo da ASR, inúmeras pesquisas são realizadas, podendo-se citar, dentre elas, o estudo da interação planta-patógeno (Dodds & Rathjen, 2010; Dalio et al., 2014; Chicowski et al., 2024).

De modo eficiente, os fungos biotróficos adaptaram-se para utilizar as células hospedeiras vivas como fonte de energia. De forma distinta a outros fungos biotróficos, o fungo *P. pachyrhizi* penetra na célula da planta diretamente pela epiderme por meio de seu apressório, formando posteriormente sua estrutura de alimentação especializada, denominada haustório, no interior da célula do mesófilo através da invaginação da membrana plasmática da célula vegetal, evitando assim seu rompimento. Deste modo, a superfície de contato entre estes dois organismos é elevada, aumentando o fluxo de nutrientes e água, favorecendo o desenvolvimento da *P. pachyrhizi* sem matar a célula da planta (Bunchanan et al., 2015).

Além de ser uma estrutura de alimentação, o haustório também auxilia na supressão do sistema de defesa da soja ao ser responsável por produzir e secretar, no meio apoplástico e citoplasmático da célula hospedeira, um arsenal de efetores que

interagem entre si ou com componentes da soja para modular seu metabolismo. Em contrapartida, a planta hospedeira dispõe de duas vias de defesa que monitoram locais distintos da célula e ativam inúmeras rotas do sistema imune inato de forma associada (Jones & Dangl, 2006; Bentham et al., 2020; Yuan et al., 2021; Chicowski et al., 2023; Qi et al., 2023). A primeira envolve o reconhecimento de moléculas provenientes de microrganismos ou patógenos, como moléculas estruturais ou enzimáticas, denominados MAMPs ou PAMPs (*Microbial- or Pathogen-Associated Molecular Patterns*), através dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs - *Pattern Recognition Receptors*) no meio extracelular. Tal reconhecimento ativa a imunidade desencadeada por PAMPs, chamada de PTI (*PAMP-Triggered Immunity*), levando a inúmeras respostas de defesa como produção de espécies reativas de oxigênio e o acúmulo de calose. (Dalio et al., 2014; Bunchanan et al., 2015). Para conseguir suprimir esse sistema de defesa, espécies patogênicas produzem e secretam na célula hospedeira moléculas efetoras. Tais proteínas de virulência favorecem assim a infecção e desenvolvimento do patógeno através da manipulação do hospedeiro, resultando na suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS - *Effector-Triggered Susceptibility*) (Toruño et al., 2016). Quando a planta possui genes de resistência (*R*) que codificam proteínas R (NLR - *Nod-Like Receptor*), com capacidade de reconhecer efetores de avirulência no meio intracelular, o segundo sistema de defesa é ativado, promovendo assim a imunidade desencadeada por efetores (ETI - *Effector-Triggered Immunity*) (Maia, 2013; Möller, 2014; Petre et al., 2014; Cui et al., 2015; Kourelis & Van Der Hoorn, 2018). Com o sistema imune da planta reestabelecido, as respostas de defesa são amplificadas e a morte celular localizada é ativada através de reações de hipersensibilidade, com o objetivo de comprometer o desenvolvimento do patógeno. Além disso, a sinalização de defesa entre as células vizinhas também se eleva, desencadeando assim uma resistência sistêmica adquirida (SAR - *Systemic Acquired Resistance*) (Mur et al., 2008; Coll et al., 2011). A imunidade desencadeada por efetores permanece eficaz até que a proteína R perca a capacidade de reconhecer tal efector, promovendo novamente a suscetibilidade desencadeada por efetores e assim sucessivamente. Assim, um processo co-evolutivo entre patógeno e hospedeiro é estabelecido de forma constante (Dalio et al., 2014; Bunchanan et al., 2015).

O arsenal de efetores que o patógeno dispõe e sua forma complexa de orquestrá-los para manipular o hospedeiro a seu favor torna o estudo dessas moléculas imprescindível para compreender tal sistema interativo patógeno hospedeiro. Para estes estudos, inicialmente é necessário identificar genes candidatos a efector por meio do emprego de ferramentas de bioinformática para predição *in silico*, associada com

estudos de expressão ao longo do ciclo infeccioso. Recentemente, o genoma de referência de *P. pachyrhizi* para três isolados (MT2006, UFV02 e K8108) foi disponibilizado a toda comunidade científica, contando com sequenciamento, montagem e anotação destes três genomas, sendo de grande auxílio para na identificação de candidatos a efetor deste fitopatógeno. Este genoma é, atualmente, um dos maiores genomas fúngicos (1,25 Gb) já sequenciados, contendo dois haplótipos com cerca de 93% de elementos transponíveis (ET). A elevada expressão de ET nas fases iniciais da infecção de *P. pachyrhizi* indica sua contribuição na alta variabilidade genética observada entre os isolados (Gupta et al., 2023).

A partir da predição dos candidatos a efetores, ensaios *in silico* e *in vivo*, em plantas não-hospedeiras e hospedeiras, podem ser conduzidos a fim de caracterizar suas possíveis funcionalidades distintas, como a capacidade de supressão e/ou ativação de respostas de defesa, o perfil de expressão do efetor na célula hospedeira, a localização subcelular na célula vegetal, identificação de proteínas do hospedeiro com as quais interage e avaliação de sua atividade e suas consequências na planta (Kamoun, 2009; Lorrain et al., 2019).

Em *P. pachyrhizi*, grupos de genes efetores candidatos distintos relatados em estudos de diferentes grupos de pesquisa apresentaram a capacidade de suprimir respostas de defesa associadas a PTI e ETI em diferentes hospedeiros (*Nicotiana tabacum*, *Nicotiana benthamiana*, *Arabidopsis thaliana* Col-0, tomate, pimenta e soja) (Kunjeti et al., 2016; Qi et al., 2016, 2018, 2023; De Carvalho et al., 2017; Bueno et al., 2022; Chicowski et al., 2023, 2024).

Adicionalmente, muitos efetores de *P. pachyrhizi* tiveram suas localizações subcelulares observadas. No estudo de De Carvalho et al. (2017), seis candidatos do grupo de efetores estudados apresentaram localização tanto no citoplasma quanto núcleo. Qi et al. (2018), ao analisar 82 *PpEC*, observou quatro diferentes localizações, sendo elas citosol, núcleo, citosol e núcleo, e nucléolo. Inclusive, deste grupo, observou-se que *PpEC23* forma dímeros no citoplasma celular da planta e, quando interagindo com GmSPL12I, apresenta-se no núcleo, coincidentemente o mesmo local subcelular observado quando analisado apenas GmSPL12I, sugerindo que o interactor possa estar recrutando *PpEC23* para o núcleo (Qi et al., 2016). Recentemente, o estudo de *PpEC15* demonstrou que este efetor atua no núcleo e no citosol e que modificações em seu motif catalítico influencia minimamente em sua localização subcelular. Quando observado durante a interação com os interactores de soja, *PpEC15-GmNAC83* foi observado no citoplasma, *PpEC15-GmPCRF* no cloroplasto. Ambas as interações também foram

fortemente observadas no núcleo, consistindo com os dados de localização subcelular de cada interactor. Quando em interação com *GmDAHP*, esta é observada no núcleo e cloroplasto. Ao observar *GmDAHP* localizado entorno do núcleo, uma vez que sua localização é no cloroplasto e que *PpEC15* é capaz de clivar *GmDAHP*, é possível que este efector seja importado para o cloroplasto e interfira na estabilidade de *GmDAHP* ou em seus processos intracelulares, causando seu aglomerado nas proximidades do núcleo (Chicowski et al., 2023).

Já pesquisas proteômicas de efetores de *P. pachyrhizi* puderam avaliar suas funcionalidades estruturais e identificar proteínas hospedeiras aos quais eles interagem. O efector *PpEC23* demonstrou que necessita de dois de seus domínios, CM2 e CTLC, para autointeração, indicando não ser funcional como um monômero, e para interação com o fator de transcrição *GMSPL12l*, possivelmente manipulando-o para suprimir a imunidade do hospedeiro (Qi et al., 2016). Outros efetores do fungo, como *PpEC48*, demonstraram afinidade interativa com *SCRPs* (*Small Cysteine-Rich Proteins*) em células de soja, inclusive com *PpEC23*, através de seu domínio rico em histidina, sendo assim considerado “*Metaeffector*” por ser um efector com interação com outros efetores (Qi et al., 2023). O efector *Phapa-7431740* revelou interação com uma proteína importante para a defesa basal da soja, *GmβGLU*, suprimindo, inclusive, sua atividade *in vitro*. Tanto *Phapa-7431740* quanto *GmβGLU* foram identificados no transcriptoma de soja inoculada com *P. pachyrhizi* em 6, 12 e 24 horas após a inoculação (hpi). Em interações compatíveis, *GmβGLU* foi pouco induzido nos estágios iniciais da infecção, enquanto em interações incompatíveis, foi altamente expresso durante todo o período infeccioso (Bueno et al., 2022). O compilado dessas informações indica a importância de *GmβGLU* na defesa da soja e sugere a hipótese quanto à interação do efector *Phapa-7431740* com esta proteína para auxiliar o patógeno. Recentemente, *PpEC15*, uma protease aspártica com motif de clivagem específico, demonstrou interação com proteínas de soja *PCRf* (*Peptide-Chain Release Factor*), fator de transcrição *NAC83* (*NAC domain-containing protein 83*) (*NAM*, *ATAF* e *CUC*) e *DAHP* (*3-deoxy-7-phosphoheptulonate*) sintase, que estão envolvidos na defesa do hospedeiro, possivelmente como reguladores positivos. Para *DAHP* sintase, especificamente, foi observado sua clivagem por *PpEC15* (Chicowski et al., 2023).

Para este estudo, utilizou-se proteínas efetoras correspondentes aos genes *de_novo_3326* e *de_novo_386*, identificados como transcritos induzidos durante a interação com a soja em um estudo de microdissecção a laser da lesão seguido de sequenciamento (De Carvalho et al., 2017). O modelo gênico *Phapa-4574965*, correspondente ao *de_novo_3326*, possui uma sequência de 1.361 bp (*Base Pair*)

dividido em 5 éxons e 4 íntrons. Sua CDS (Coding Sequence) possui 795 bp, codificando uma proteína de 264 aa com aproximadamente 29,82 kDa (Kilodalton) de massa e 11 (4,1%) resíduos de cisteína, além de um domínio GILT (GAMMA-INTERFERON INDUCIBLE LYSOSOMAL THIOL REDUCTASE).

Já o modelo gênico *Phapa-4560229*, correspondente ao *de_novo_386*, possui uma sequência de 1.090 bp dividido em 4 éxons e 3 íntrons. Sua CDS possui 816 bp, codificando uma proteína de 272 aa com aproximadamente 27,1 kDa de massa, um peptídeo sinal de 16 aminoácidos predito por SignalP e 10 (3,7%) resíduos de cisteína.

Em um estudo prévio, os efetores *Phapa-4574965* e *Phapa-4560229* apresentaram capacidade de suprimir respostas de defesa associadas a PTI e ETI em folhas de *N. benthamiana* e se apresentaram conservados em diversas espécies de ferrugens e outros organismos. Inclusive, *Phapa-4574965* apresenta alta expressão em estruturas de infecção de *P. pachyrhizi*, e possui em sua constituição o domínio GILT, que está relacionado com a entrada de patógenos e produção de ROS em mitocôndrias de células humanas (Bogunovic, 2008; Ceresa, 2012; Hastings & Cresswell, 2011; Nguyen et al., 2016; West & Cresswell, 2013).

Deste modo, realizar a caracterização funcional de genes efetores de *P. pachyrhizi*, expressos durante a infecção, foi o objetivo do presente estudo, focando na identificação de possíveis proteínas alvo da soja que estejam relacionadas relacionados com efetores de *P. pachyrhizi*, bem como a localização subcelular da atividade efetora na célula da planta. Com tais dados, espera-se compreender o envolvimento do efector com os processos biológicos do hospedeiro, gerando assim resultados que possam incrementar os métodos de controle da ASR e auxiliar a comunidade de pesquisa de interação planta-patógeno.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Análise do perfil de expressão gênico dos candidatos a efetores durante a interação com o hospedeiro

2.1.1. Análise qPCR

A análise do perfil de expressão dos genes *Phapa-4574965* e *Phapa-4560229* foi realizada utilizando pares de primers específicos e cDNA de genótipo suscetível de soja (BRS184) infectado com isolado LPF16.1M de *P. pachyrhizi*, ambos armazenados no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da EMBRAPA Soja. Através de diluições seriadas de cDNA, ajustou-se um modelo de regressão entre as quantidades de alvo nas amostras e os valores de Ct correspondentes, visando estimar a eficiência de amplificação de cada primer. O perfil de expressão foi monitorado nos tempos 0, 6, 12, 24 e 48 hpi via qPCR. O gene endógeno *CytB* (Grasso et al., 2006) foi utilizado como gene normalizador e o tempo 0 hpi como calibrador. A reação foi realizada em triplicata biológica e técnica. Utilizou-se o equipamento 7900HT Fast Real-Time PCR System (*Applied Biosystems*®), com o kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (*Invitrogen*®). As condições de amplificação seguiram as seguintes determinações: 95°C por 10 min., 40 ciclos de 94°C por 15 s. e 60°C por 1 min., seguida pela determinação da curva de dissociação (*melting*) para determinar a especificidade das amplificações. Por meio *software* REST® (Pfaffl et al., 2002), os níveis de expressão dos genes alvos foram determinados pela quantificação relativa.

2.2. Identificação de interactores provenientes da soja relacionadas com o efetor de *P. pachyrhizi*

2.2.1. Material Vegetal e inoculação

Para identificação das proteínas da soja com às quais *Phapa-4574965* interage, foi instalado o experimento em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições biológicas, sendo cada vaso uma repetição. Foi utilizado dois acessos de soja, sendo eles o genótipo suscetível (cultivar BRS 184) e resistente (contendo o

gene *Rpp5* – *PI200487*), nos tratamentos inoculado e falso inoculado (MOCK) com o fungo, em diferentes tempos de coleta após a infecção (0, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 hpi). As sementes foram semeadas em vasos de plástico (1 kg) preenchidos com solo autoclavado e peneirado, possuindo duas plantas/vaso, e permaneceram em uma câmara climática para crescimento de plantas (FITOTRON®) sob condições ideais de 50% de umidade, temperatura de 28 °C durante o dia e 25 °C durante a noite, e 12h/12h (luz/escuro).

O isolado monospórico LPF16.1M, o qual apresenta reação HR quando inoculado ao acesso contendo o gene *Rpp5*, foi utilizado para inoculação. Para o preparo do inóculo, foi utilizado água estéril e solução 0,01% (v/v) de Tween® 20 (0,04%), juntamente com os urediniósporos do isolado LPF16.1M de *P. pachyrhizi*. A determinação da concentração da solução inóculo foi feita através da contagem de urediniósporos por meio da Câmara de Neubauer, ajustando a solução para uma concentração de 4×10^4 urediniósporos/mL. Uma alíquota da suspensão do inóculo foi transferida para um meio ágar-água (1%) e incubada por 24h, a fim de verificar a viabilidade dos urediniósporos através da porcentagem calculada de urediniósporos germinados observados em microscópio eletrônico (Darben, 2013).

Ao atingirem o estágio vegetativo V2-V3, de acordo com o sistema de escala determinado por Fehr e Caviness (1977), o segundo trifólio foi inoculado com a solução inóculo. Após a inoculação, a planta permaneceu coberta por um saco plástico transparente úmido por 48 h, a fim de manter uma câmara úmida para favorecer a infecção. O saco foi retirado no momento da coleta ou após o decorrer do tempo necessário, mantendo-se nas condições de cultivo já citadas até o momento da coleta. Foram realizadas coletas em diferentes tempos após a inoculação, sendo eles 0, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 hpi.

Os tecidos vegetais foram triturados em nitrogênio líquido e suas proteínas totais foram extraídas por meio de tampão de extração [Tris 50 mM (pH 7.5), Sacarose 250 mM, Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) 10 mM, Triton X-100 1 %, Dithiothreitol 1 mM e Coquetel de inibidor de Protease (2 μ L/mL)]. Os extratos proteicos vegetais foram submetidos à três centrifugações à 16.000 x g por 10 min. a 4 °C, e o sobrenadante foi armazenado em ultrafreezer (-80°C).

2.2.2. Ensaio “Pull-down”

Para os ensaios “Pull-down”, foi utilizado a proteína Phapa-4574965, sintetizada por meio do serviço MonoExpress™ Premium (Rabbit) (Genscript, Piscataway, NJ). A síntese consiste na clonagem do modelo gênico *Phapa-4574965* no vetor de expressão pET-30a(+) e sua expressão avaliada. Para confirmar o sucesso da clonagem, posterior a expressão e purificação da proteína, estas foram avaliadas por meio de SDS-PAGE e *Western-blot*. Realizou-se o teste de diluição do anticorpo policlonal de Phapa-4574965 (anti-4574965), sintetizado por meio do serviço MonoExpress™ Premium (Rabbit) (Genscript, Piscataway, NJ), a fim de identificar a concentração ideal a ser utilizada para ensaios futuros. Por meio de SDS-PAGE seguido de *Western-Blot*, foram testadas as diluições 1:2000, 1:5000 e 1:10000 (anti-4574965:PBS-T), sendo possível identificar Phapa-4574965 na concentração 1:5000.

Para o ensaio, foram utilizados *beads* magnéticas Pierce™ NHS-Activated Magnetic Beads (ThermoFisher), seguindo o protocolo do fabricante. Inicialmente, as *beads* foram ressuspendidas por vórtex e transferidas para um tubo tipo Eppendorf, onde foi incubado com a solução proteica Phapa-4574965 para imobilização da proteína na *bead* através da cauda de histidina presente nesta proteína. Como controle, as *beads* foram incubadas em solução PBS. A incubação foi realizada por 30 min., em temperatura ambiente sob agitação leve. Posteriormente, o complexo *bead*_Phapa-4574965 e as *beads* controle foram incubados em 3.000 µg de proteínas dos extratos proteicos totais obtidos no item 2.2.1. por aproximadamente 19 h, em temperatura ambiente sob agitação leve. Foram utilizados extratos proteicos de folhas de soja BRS 184 (suscetível) e Rpp5 (resistente) inoculadas com o isolado monospórico LPF16.1M de *P. pachyrhizi*. Após a incubação, o complexo *bead*_Phapa-4574965_interactor e *beads* controle foram lavados com a solução de lavagem, de modo que o sobrenadante sem o complexo seja retirado e descartado com auxílio de um ímã. Em seguida, as amostras foram eluídas com tampão de eluição e o sobrenadante contendo o complexo efetor-interactor e o controle foram recuperados com auxílio de um ímã, para separação da *bead* do mesmo.

Tais amostras foram analisadas para confirmação em SDS-PAGE seguido por *Western-Blot* por meio do anticorpo policlonal de Phapa-4574965 (anti-4574965). Por fim, a solução proteica foi preparada por meio do protocolo de digestão do Laboratório de Espectrometria de Massas (LNBio) para identificação dos interactores por meio da espectrometria de massas (Shevchenko et al., 2006).

A espectrometria de massa das amostras foi executada em espectrômetro de massa de alta resolução (Q-ToF MAXIS 3G - Bruker Daltonics) pelo Centro Analítico de Instrumentação da Universidade de São Paulo – Central Analítica. Os dados brutos obtidos foram processados pelo Núcleo de Análise de Biomoléculas da Universidade Federal de Viçosa. Tais dados foram convertidos em arquivos mzXML (*Extensible markup language*) usando a ferramenta msconvert do software CompassXport, versão 3.0 (Bruker Daltonics, Alemanha). Os valores da razão massa/carga (m/z) foram codificados usando a precisão de 64 bits nesta conversão. Posteriormente, o software PEAKS versão 7 processou os arquivos mzXML e o método PEAKS DB (Ma et al., 2003) foi empregado para identificar as proteínas presentes nas amostras.

2.2.3. Validação da interação pelo ensaio de Duplo Híbrido de levedura

Para investigar a interação proteína-proteína presente na interação das proteínas de soja com o efetor Phapa-4574965 e ausente em seu controle negativo, identificada pelo ensaio “*Pull-down*” e espectrometria de massa, foi realizado o ensaio de duplo híbrido de levedura. A região codante (CDS) do modelo gênico de cada proteína candidata de soja foi obtida a partir do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para a clonagem, *primers* específicos para cada modelo gênico de soja foi projetado de modo a clonar sua CDS completa, com ausência de peptídeo sinal em caso de proteínas secretadas.

2.2.3.1. Clonagem dos modelos gênicos das proteínas de soja selecionadas

As proteínas de soja identificadas pelo ensaio “*Pull-down*” e espectrometria de massa tiveram seus modelos gênicos amplificados com *primers* específicos (Tabela 1) a partir de cDNA de soja disponível no Laboratório de Biotecnologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa. Os modelos gênicos amplificados foram clonados por meio de enzimas de restrição no vetor de entrada pENTR™11 (Invitrogen®). Posteriormente, os modelos gênicos das proteínas de soja dos clones, crescidos em meio seletivo e confirmados por PCR, foram recombinados para os vetores de destino pDEST32 (LEU2, CEN, Gentamicina®, Invitrogen®) e pDEST22 (TRP1, CEN, Ampicilina®, Invitrogen®) por meio do sistema Gateway com a enzima LR clonase

(Invitrogen®). Por fim, os clones crescidos em meio seletivo foram confirmados através de PCR e sequenciamento de seu plasmídeo.

Tabela 1 – **Oligonucleotídeos**. Oligonucleotídeos específicos para amplificação e clonagem dos modelos gênicos das proteínas de soja e amplificação dos vetores de destino.

Oligonucleotídeos	Sequência (5'-3')
Fw-Lipoxygenase	GCTAGGGTACCATTTTCCATTTCGGGCACAAG
Rv-Lipoxygenase	GCTAGCTCGAGATTTAGATAGAGATACTGTT
Fw-Alanine	GCTAGGGATCCATCCACCAAAGCCTTTAGAC
Rv-Alanine	GCTAGCTCGAGATTTACAACCTTGAATAACC
Fw-NAD	GCTAGGGATCCATGCAAGAGTGGTGGCACTC
Rv-NAD	GCTAGCTCGAGATTTATACGCTAACAAGACT
Fw-CBBY	GCTAGGGATCCATGCAGCTGCAAGTAGCATC
Rv-CBBY	GCTAGCTCGAGATCTAGCTCACGTATTGCTT
Fw-Aminomethyltransferase	GCTAGGGATCCATAGGGGGGGCTTGTGGCAA
Rv-Aminomethyltransferase	GCTAGCTCGAGATTCAGGAAGGCTTATAGTA
Fw-Fructose	GCTAGGTCGACGTTGCAATGGCAGCAGCA
Rv-Fructose	GCTAGGCGGCCGCATTTAAGCCAAGTACTTTTC
Fw-Cys-proteinase	GCTAGGGATCCATCTAGACATGTGCGATAATC
Rv-Cys-proteinase	GCTAGCTCGAGATTTAAGCACTGCTGACCTT
Fw-Linoleate 9S	GCTAGGGATCCATTTCTTTTCGGGCAAAG
Rv-Linoleate 9S	GCTAGCTCGAGATTTAGATAGAGATACTGTT
Fw-pDEST22	AACCGAAGTGCGCCAAGTGTCTG
Rv-pDEST22	AGCCGACAACCTTGATTGGAGAC
Fw-pDEST32	TATAACGCGTTTGAATCACT
Rv-pDEST32	AGCCGACAACCTTGATTGGAGAC

2.2.3.2. Teste de transativação

Para verificar se o efector (modelo gênico Phapa-4574965) é capaz de ativar sozinho o gene repórter, realizou-se o ensaio preliminar de transativação. Primeiramente, realizou-se a clonagem do efector Phapa-4574965 no vetor pDEST32 (contendo o domínio BD – *DNA-Binding Domain*) por meio do sistema GATEWAY®, confirmando-o, posteriormente, por meio de PCR e sequenciamento. Através do método

de acetato de lítio/polietilenoglicol, transformou-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* AH109 (MATa, trp1-901, leu2-3,112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UASGAL2TATA-ADE2, URA3::MELUAS-MEL1TATAlacZ) com os vetores de interesse BD-4574965 e o vetor pDEST22 vazio. Após a transformação, a levedura foi incubada em placas com meio de seleção *Synthetic Dropout* (SD) na ausência de leucina e triptofano (SD-LEU-TRP).

Para o ensaio de transativação do gene repórter *HIS3*, utilizou-se as colônias AH109 transformadas e conduziu-se o ensaio de acordo com o manual Clontech®, adotando-se concentrações de 0; 2,5; 10; 20; 50 e 100mM 3-AT (3-amino-1,2,4-triazol) no meio seletivo SD na ausência de leucina e histidina (SD-LEU-HIS).

2.2.3.3. Validação do resultado do “*Pull-down*” através do ensaio de duplo híbrido de leveduras

Para o ensaio de duplo híbrido de leveduras, leveduras AH109 transformadas com os vetores pDEST32/pDEST22 contendo o efector Phapa-4574965, presentes no Laboratório de Biotecnologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, foram inoculadas em meio de seleção SD na ausência de leucina (SD-LEU) e incubadas por “*overnight*” a 28 °C e 180 rpm. Posteriormente, o inóculo foi centrifugado a 5.000 rpm por 4 min. e o *pellet* submetido à três processos de lavagem. A primeira lavagem consiste na ressuspensão do pellet H₂O destilada autoclavada e centrifugação a 5.000 rpm por 4 min., seguido de duas lavagens em acetato de lítio e centrifugações a 10.000 rpm por 30 s. Após as lavagens, o *pellet* foi ressuscitado em mix de transformação (240 μ L de PEG 3350 50 % (m/v), 36 μ L de acetato de lítio 1 M, 5 μ L de DNA fita simples de esperma de salmão (ssDNA) (10 μ g/mL) previamente fervido por 5 minutos e 50 μ L de DNA (2-5 μ g de DNA das proteínas de soja em estudo, completando com H₂O destilada autoclavada) e mantido a 30 °C por 30 min., e depois a 42 °C por 20 min. A transformação foi submetida a centrifugação de 8.000 rpm por 15 min. e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuscitado em H₂O destilada autoclavada e centrifugado a 8.000 rpm por 15 min., sendo por fim ressuscitado em 200 μ L de H₂O destilada autoclavada, plaqueado em meios SD seletivos, com ausência de leucina (LEU), triptofano (TRP) e histidina (HIS) (SD-LEU-TRP-HIS) e outro com ausência apenas de LEU e TRP (SD-LEU-TRP) para confirmação da transformação, e incubados a 28 °C por quatro dias.

2.2.3.4. Ensaios de ativação de genes repórteres para validação de interação proteína-proteína

Para validar a interação observada no ensaio “*Pull-down*”, os clones identificados no ensaio de duplo híbrido de leveduras com as proteínas da soja, possíveis alvos do efector Phapa-4574965, foram isolados em meio seletivo SD-LEU-TRP para realização de ensaios de ativação de dois genes repórteres distintos. Um deles trata-se do gene repórter *lacZ*, responsável por codificar a enzima β -galactosidase. Quando há a interação entre as proteínas de estudo, a β -galactosidase é codificada e, na presença do substrato X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo), produz um precipitado de coloração azul que se destaca no *background*. O segundo gene repórter é o *HIS3*, que codifica a enzima Imidazolglicerol-fosfato desidratase (His3p). Com a expressão desse gene, linhagens de leveduras auxotróficas para histidina são capazes de crescerem em meio deficiente de histidina. Como esta enzima possui como inibidor competitivo o 3-AT, a intensidade da interação dos híbridos é refletida na expressão de His3p e, por consequência, na sobrevivência das leveduras em concentrações elevadas de 3-AT.

Para verificar a ativação do gene repórter *lacZ*, transferiu-se as leveduras para a membrana de nitrocelulose sobre meio sólido seletivo SD-LEU-TRP e incubou-se a 28 °C por quatro dias. Posteriormente, a membrana foi submersa em nitrogênio líquido, garantindo assim a ruptura da parede celular, e posicionada sobre papel filtro embebido em tampão Z (Na₂HPO₄ 60 mM, NaH₂PO₄ 40 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ 1 mM pH7,0) com adição de X-gal (0,5 mg/mL). Incubou-se a membrana a 28 °C até a identificação do precipitado azul. Para avaliar a ativação do gene repórter *HIS3*, transferiu-se as leveduras para meio seletivo SD-LEU-TRP-HIS com concentrações variadas de 0 a 10 mM de 3-AT, e de OD₆₀₀ de 0,01 a 1,0, incubando-as a 28 °C por sete dias.

Em ambos os ensaios, utilizou-se a proteína GmbZIPE2 (BD-E2 + AD-E2) (BD – *DNA-Binding Domain*; AD - *Transcription-Activation Domain*) como controle positivo, uma vez que já é sabido sua interação (Alves, 2013). Os plasmídeos vazios (BD-vazio + AD-vazio), o plasmídeo BD contendo o efector Phapa-4574965 junto ao plasmídeo AD vazio (BD-4574965 + AD-vazio) e o plasmídeo BD vazio junto ao plasmídeo AD contendo Phapa-4574965 (BD-vazio + AD-4574965) foram utilizados como controles negativos.

2.3. Localização subcelular do efetor de *P. pachyrhizi* em células vegetais

2.3.1. Colocalização subcelular de proteínas

Para determinar a localização subcelular de Phapa-4574965, sua sequência gênica foi clonada na porção C-terminal do vetor pSITE, a fim de criar uma fusão proteica com o gene repórter GFP (*Green Fluorescent Protein*) (Martin et al., 2009).

Como controle, *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 carreando proteínas específicas para cada organela (núcleo, mitocôndria, plastídio e peroxissomo) previamente identificadas (Nelson et al., 2007), possuindo em sua construção um marcador FP (*Fluorescent Protein*) mCherry, gentilmente cedidas por J. Jones e E. Fontes, foram utilizadas para coexpressão transiente em células foliares de *N. benthamiana*. A escolha do marcador mCherry para cada combinação com Phapa-4574965 para realização da coexpressão transiente foi feito, inicialmente, seguindo a predição *in silico* (Tabela 3).

Tabela 3 – **Combinações para coexpressão transiente.** Coexpressão transiente de Phapa-4574965 com diferentes marcadores de organelas vegetais.

Proteína de estudo (GFP)	Marcador de organela (mCherry)
Phapa-4574965	Plastídio
	Peroxisomo
	Mitocôndria
	Núcleo

2.3.1.1. *Material vegetal*

A *N. benthamiana*, uma planta modelo para estudos de interação planta-patógeno, principalmente devido à sua susceptibilidade a uma grande gama de agentes fitopatogênicos (Goodin et al. 2008), foi cultivada em uma câmara climática para crescimento de plantas sob condições ideais de 80% de umidade, 22°C de temperatura e 16h/8h (luz/escuro) por aproximadamente quatro semanas.

2.3.1.2. *Infiltração*

Inicialmente, foi preparado um pré-inóculo das culturas transformadas de *A. tumefaciens* em meio seletivo YEP líquido e incubado por 48 h à 28°C sob agitação. Depois, o inóculo foi ajustado para uma concentração de 1:100 de pré-inóculo em meio seletivo YEP líquido e incubado por aproximadamente 16 h à 28°C sob agitação.

Posteriormente, a solução bacteriana obtida foi submetida a três centrifugações a 8.000 rpm por 5 min, sendo ressuspensa entre cada centrifugação em 1,0 mL de solução de infiltração [Tampão MgCl₂ 10mM, MES (ácido 2-morfolino etano sulfônico) 5mM (pH 5,3), acetoseringona 150 mM]. Ao fim da terceira centrifugação, a solução bacteriana foi ressuspensa em 2,0 mL de solução de infiltração e feito o ajuste da concentração bacteriana para uma OD₆₀₀=0,3. A solução bacteriana foi incubada por 1 h no escuro à temperatura ambiente, para que os genes de virulência da *A. tumefaciens* fossem ativados e, assim, os genes de interesse possam ser translocados para as células vegetais.

A solução bacteriana contendo Phapa-4574965 + GFP foi co-infiltrada com a solução contendo a proteína marcadora + mCherry na face abaxial de folhas de *N. benthamiana* com auxílio de uma seringa de 1,0 mL sem agulha, demarcando-se em seguida a circunferência de infiltração para melhor identificação da área infiltrada no momento da coleta foliar. Foram infiltrados, em triplicata, os controles (solução de infiltração, vetor vazio pSITE e eGFP) e os tratamentos (Phapa-4574965 + marcador). As plantas tratadas permaneceram na câmara de crescimento por 72 h.

2.3.1.3. *Microscopia Confocal*

Decorrido as 72 h após a infiltração, foi realizada a coleta dos discos foliares infiltrados e feito seu preparo em lâminas para serem analisados por meio do microscópio confocal LSM 510 META (Zeiss), realizando a captura das imagens nos respectivos filtros de fluorescência.

2.3.2. Imunolocalização

2.3.2.1. Material vegetal, coleta e preparo das amostras

Para os ensaios de imunolocalização de Phapa-4574965, foi instalado o experimento em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições biológicas, sendo cada vaso uma repetição. Foi utilizado dois acessos de soja, sendo eles o genótipo suscetível (cultivar BRS 184) e resistente (contendo o gene *Rpp2*, *Rpp4* e *Rpp5*), nos tratamentos inoculado e falso inoculado (MOCK) com o fungo, em diferentes tempos de coleta após a infecção (0, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 hpi). As sementes foram semeadas em vasos de plástico (8 kg) preenchidos com solo autoclavado e peneirado, possuindo duas plantas/vaso, e permaneceram em casa de vegetação sob condições ideais de temperatura de 28 °C e nebulização das 19:00 às 07:00 h com duração de 20 seg/nebulização.

Utilizou-se o isolado monospórico LPF16.1M, o qual apresenta reação HR quando inoculado ao acesso contendo o gene *Rpp5*. Para o preparo do inóculo, foi utilizado água estéril e solução 0,01% (v/v) de Tween[®] 20 (0,04%), juntamente com os urediniósporos do isolado LPF16.1M de *P. pachyrhizi*. A determinação da concentração da solução inóculo foi feita através da contagem de urediniósporos por meio da Câmara de Neubauer, ajustando a solução para uma concentração de 4×10^4 urediniósporos/mL. Uma alíquota da suspensão do inóculo foi transferida para um meio ágar-água (1%) e incubada por 24h, a fim de verificar a viabilidade dos urediniósporos através da porcentagem calculada de urediniósporos germinados observados em microscópio eletrônico (Darben, 2013).

Ao atingirem o estágio vegetativo V2-V3, de acordo com o sistema de escala determinado por Fehr e Caviness (1977), o segundo trifólio foi inoculado com a solução inóculo. Após a inoculação, a planta permaneceu coberta por um saco plástico transparente úmido por 48 h, a fim de manter uma câmara úmida para favorecer a infecção. O saco foi retirado no momento da coleta ou após o decorrer do tempo necessário, mantendo-se nas condições de cultivo já citadas até o momento da coleta. Foram realizadas coletas dos discos foliares a partir do folíolo inoculado com auxílio de um perfurador foliar em diferentes tempos após a inoculação, sendo eles 0, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 hpi.

Seguindo o protocolo descrito por Marques & Soares (2021), os discos foliares foram imediatamente submersos em solução de fixação [paraformaldeído 4% em

tampão cacodilato de sódio a 0,1 M (pH 7,2)], sendo mantidos em condições de vácuo por 24 h. Decorrido este tempo, os discos fixados foram lavados duas vezes em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M (pH 7,2), mantendo-os na solução tampão por 30 min. a cada lavagem. Após a etapa de fixação, as amostras foram desidratadas em série etílica ascendente (solução etanol 30, 50, 70 e 100%), mantendo-as em cada solução por 30 min.

Com o material desidratado, prosseguiu-se para a etapa de imobilização em resina LR White (Sigma-Aldrich). Inicialmente, realizou-se uma pré-infiltração na resina, mantendo o disco foliar em solução 1:1 de LR White e etanol absoluto por “*overnight*”. Depois, o disco foliar foi transferido para uma solução LR White, ficando em agitação por 24 h. As amostras foram mantidas em solução LR White à 4°C até o momento da polimerização do material. Por fim, o material vegetal foi transferido para uma cápsula de gelatina, atentando-se à orientação do material. A polimerização da resina foi realizada em estufa na ausência de oxigênio, à 60°C por 24 h.

As lâminas utilizadas foram previamente preparadas em solução adesiva poly-L-lisina (Sigma-Aldrich), com intuito de tornar a superfície da lâmina mais aderente para evitar a perda da amostra durante os processos de imunologia. Para isso, as lâminas foram mergulhadas em 1% de ácido clorídrico (HCl) em etanol 100%. Depois, as lâminas passaram por 3 lavagens com água deionizada e secaram em estufa. Uma vez secas, as lâminas foram mergulhadas em solução 1:10 poly-L-lisina (Sigma-Aldrich) em água destilada por 5 min., passando, posteriormente, por 3 lavagens e finalizando com a secagem em estufa à 60°C por 10 min., permanecendo protegidas até o momento de seu uso.

Ao obter as amostras imobilizadas em resina, foram realizados os cortes da amostra por meio de micrótomo rotativo. Secções de 3 µm foram retirados da amostra e posicionados na lâmina adesiva. Após a confecção das lâminas com as amostras, estas passaram pelo processo de imunologia. O anticorpo primário utilizado foi o anticorpo policlonal Phapa-4574965 (anti-4574965), sintetizado e purificado por meio do serviço MonoExpress™ Premium (Rabbit) (Genscript, Piscataway, NJ). Inicialmente, as lâminas foram incubadas em solução bloqueio por 01:30 h. Após este tempo, as lâminas passaram por 3 lavagens em tampão PBS-T e foram incubadas em solução 1:200 de anticorpo primário (anti-4574965) em tampão PBS-T por 2 h. Depois, as lâminas passaram por 3 lavagens em tampão PBS e foram incubadas em solução 1:100 de anticorpo secundário (*Goat Anti-Rabbit IgG-FITC* - Sigma) em tampão PBS-T por 1 h. Por fim, as lâminas passaram por 3 lavagens em tampão PBS-T e foram incubadas em

solução MitoTracker™ Red CMXRos 100 nm (Invitrogen®) por 20 min, para pigmentação das mitocôndrias. Após estes procedimentos, as lâminas foram analisadas por meio do microscópio confocal LSM 510 META (Zeiss), realizando a captura das imagens nos respectivos filtros de fluorescência.

3. RESULTADOS

3.1. Análise do perfil de expressão gênico dos candidatos a efetores durante a interação com o hospedeiro

A partir da análise qPCR do genótipo suscetível (BRS184) infectado com *P. pachyrhizi*, analisou-se a expressão dos genes *Phapa-4574965* e *Phapa-4560229*.

O gene *Phapa-4560229* não apresentou expressão significativa nos tempos 6, 12 e 24 hpi, sendo inclusive down-regulado em 48 hpi (Figura 1). O gene *Phapa-4574965* expressou-se significativamente nos tempos 12, 24 e 48 hpi (Figura 1). Observou-se que sua expressão se eleva até 12 hpi, seguindo para uma diminuição em 24 hpi e atingindo seu pico máximo de expressão em 48 hpi.

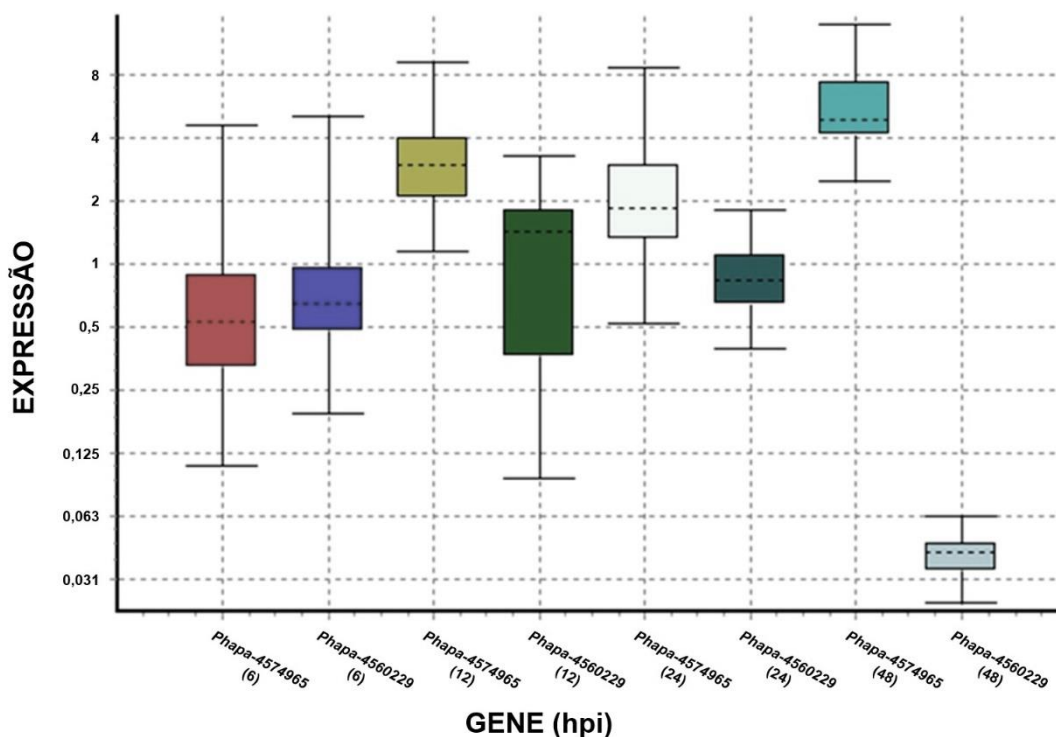


Figura 1 – Perfil de expressão dos genes *Phapa-4574965* e *Phapa-4560229*. Expressão relativa dos genes *Phapa-4574965* e *Phapa-4560229* durante o ciclo infeccioso do isolado LPF16.1M, de *P. pachyrhizi*, em genótipo suscetível de soja (BRS184). O gene endógeno *CytB* foi utilizado como normalizador e a expressão de 0 hpi foi utilizada como calibrador. Os níveis de expressão gênica são relativos ao nível de expressão em 0 hpi. As caixas e a linha pontilhada representam, respectivamente, a amplitude interquartil e a expressão gênica mediana.

Fonte: Adaptado de REST (2009).

3.2. Varredura de proteínas de soja por “Pull-down”

Com os dados obtidos através do “Pull-down” e a análise de espectrometria de massa, foram selecionadas oito proteínas (Tabela 2) que não foram identificadas no ensaio utilizando o controle PBS e extrato proteico de folhas de soja resistente (*Rpp5*) inoculadas com *P. pachyrhizi*, mas que foram detectadas apenas nas amostras Phapa-4574965 e extrato proteico de folhas de soja resistente (*Rpp5*) e/ou suscetível (BRS184), ambas inoculadas com *P. pachyrhizi*.

Tabela 2 – **Proteínas de soja selecionadas.** Características das proteínas de soja identificadas por “Pull-down” e espectrometria de massas.

Phapa-4574965 + BRS Inoc ^{1, *}	Phapa-4574965 + Rpp5 Inoc ^{2, *}	Nome proteico	Tamanho (aminoácido)	Gene Ontology (Componente celular)
A0A0R0G554 A0A0R0G554_SOYBN	A0A0R0G554 A0A0R0G554_SOYBN	Lipoxygenase (EC 1.13.11.-) (LOX)	853	cytoplasm [GO:0005737]
	A8IKE9 A8IKE9_SOYBN	Alanine transaminase (EC 2.6.1.2) (AAT)	480	
I1JR38 I1JR38_SOYBN	I1JR38 I1JR38_SOYBN	NAD-dependent epimerase/dehydratase domain-containing protein (NAD)	378	cytosol [GO:0005829]
I1KC82 I1KC82_SOYBN	I1KC82 I1KC82_SOYBN	CBBY-like protein	335	
	I1MR41 I1MR41_SOYBN	Aminomethyltransferase (EC 2.1.2.10) (Glycine cleavage system T protein) (AMT)	407	mitochondrion [GO:0005739]
	I1N2R6 I1N2R6_SOYBN	Fructose-bisphosphatase (EC 3.1.3.11) (D-fructose-1,6-bisphosphate 1-phosphohydrolase) (FBP)	410	cytoplasm [GO:0005737]; cytosol [GO:0005829]
K7MNM4 K7MNM4_SOYBN	K7MNM4 K7MNM4_SOYBN	Cysteine proteinase (CP)	446	
	P38417 LOX4_SOYBN	Linoleate 9S-lipoxygenase-4 (EC 1.13.11.58) (Lipoxygenase-4) (L-4) (VSP94)	853	cytoplasm [GO:0005737]

¹Interação Phapa-4574965 e extrato proteico de soja BRS 184 (susceptível) inoculada com *P. pachyrhizi*.

²Interação Phapa-4574965 e extrato proteico de soja Rpp5 (resistente) inoculada com *P. pachyrhizi*.

*Acesso Proteico em UniProtKb (<https://www.uniprot.org>).

A Lipoxygenase (*non-heme iron-containing oxido-reductase*) (LOX) trata-se de uma enzima dioxygenase responsável por catalisar a reação de adição de oxigênio em ácidos graxos poliinsaturados, como o ácido linoleico e linolênico para a produção de hidroperóxidos de ácidos graxos insaturados. Nas plantas, diferentes isoformas de LOX são expressas em fases e tecidos distintos, podendo ser classificada em dois grupos de acordo com especificidade posicional da oxigenação do ácido linoléico: 9-LOX (ao qual Linoleate 9S-lipoxygenase-4 pertence) e 13-LOX, derivando, respectivamente, os grupos de compostos (9S)-hidroperoxi- e (13S)-hidroperoxi- (Thakur & Udayashankar, 2019; Viswanath et al., 2020).

A Alanina aminotransferase (AAT) é uma enzima dependente de piridoxal fosfato responsável pela catalização da transferência reversível do grupo amino de glutamato para piruvato, formando assim 2-oxoglutarato e alanina que para síntese de piruvato e glutamato. Ela atua em diversas partes da planta e tem sido estudada em diferentes espécies de plantas, como na *Glycine max* (Rocha et al., 2010). Sua expressão é regulada pela hipóxia, luz e níveis de nitrogênio, estando assim relacionado com a tolerância a estresse hipóxico e aumento da eficiência de uso de nitrogênio em situações de baixo nível de nitrogênio (McAllister et al., 2013; Kishorekumar et al., 2020).

A “NAD-dependent epimerase/dehydratase” (NAD) é membro de uma família de proteínas com atividade catalítica, envolvida com diversos processos biológicos como regulação positiva da tradução e transcrição e processamento de rRNA. Esta é uma proteína que desempenha um papel importante na biossíntese de polissacarídeos extracelulares, processos metabólicos de carboidratos, como formação de derivados de carboidratos ao adicionar resíduos de carboidratos a outras moléculas, estando, inclusive, relacionado com a estrutura da parede celular (Seifert, 2004; Cao et al., 2013; Zeng et al., 2014).

CbbY trata-se de uma fosfatase seletiva de açúcar pertencente à superfamília “HAD hydrolase” e codificada por *cbb* operon (*Calvin-Benson-Bassham cycle operon*), estando conservado em algas, plantas e bactérias fotossintéticas. A CbbY é altamente seletiva para XuBP (*Xylulose 1,5-Bisphosphate*), um inibidor de RuBisCO, transformando-o em Xu5P (*Xylulose 5-Phosphate*) que posteriormente pode ser reciclado em RuBP (*Ribulose 1,5-Bisphosphate*), o substrato de RuBisCO (Bracher et al., 2015; Chen et al., 2022; Leister et al., 2023).

“Aminomethyltransferase” (AMT), também chamada de “T-protein”, é uma proteína mitocondrial essencial para a fotorrespiração e metabolismo de um carbono, e atuante no sistema multienzimático de clivagem da glicina (*Glycine Cleavage*

Multienzyme System - GCS), também conhecido como complexo de glicina descarboxilase, responsável pela oxidação reversível da glicina e consequente produção de amônia (Okamura-Ikeda et al., 2010; Rasool et al., 2014; Timm et al., 2018).

A “Fructose-bisphosphatase” (FBP) é uma enzima essencial no Ciclo de Calvin, convertendo frutose-1,6-bifosfato em frutose-6-fosfato (Baslam et al., 2020; Gě et al., 2020).

A “Cysteine proteinase” (CP) é uma enzima que promove a clivagem de ligações proteicas através de resíduos de cisteína catalíticas. Um dos componentes essenciais para o funcionamento do sistema imune da planta são as enzimas PLCPs (*Papain-like Cysteine Proteases*), sendo responsável pela detecção do microrganismo e indução do sistema de defesa, como morte celular, através da ligação e degradação de efetores patogênicos (Niño et al., 2014; Pérez-López et al., 2021; Wang et al., 2021).

3.3. Ensaio de Duplo Híbrido de Levedura

Através do ensaio de duplo híbrido de levedura, investigou-se a interação entre o efector Phapa-4574965 as proteínas de soja identificadas por meio de “Pull-down”. Primeiramente, realizou-se o ensaio de transativação com a levedura AH109 contendo o efector Phapa-4574965 em vetor plasmidial pDEST32. A levedura com o vetor BD-4574965 ($OD_{600} = 1,0$) demonstrou pouca expressão em meio SD-LEU-HIS com 0mM 3-AT (Figura 2).

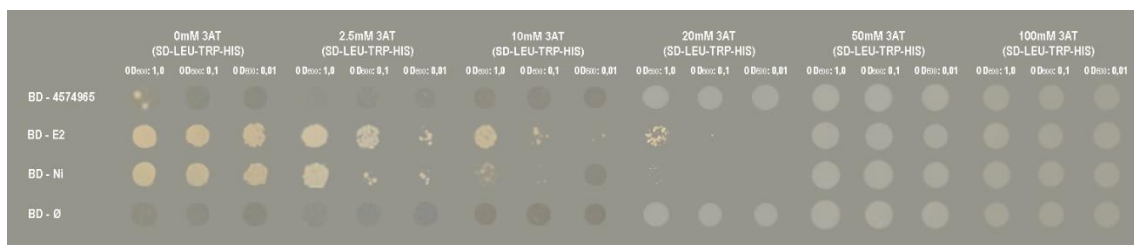


Figura 2 – **Teste de transativação de Phapa-4574965.** Teste de crescimento de leveduras (concentrações OD_{600} de 1,0; 0,1 e 0,01) contendo as construções BD-4574965, BD-E2 (controle positivo), BD-Ni (controle positivo) e BD-vazio (controle negativo) em meio sólido SD-Leu-His nas concentrações 0, 2,5, 10, 20, 50 e 100 mM de 3-AT.

Das proteínas da soja com as quais foi detectada uma possível interação com Phapa-4574965, identificadas pelo ensaio “Pull-down” (item 3.2), a “alanine transaminase” (AAT), “NAD-dependent epimerase/dehydratase domain-containing protein” e “cysteine proteinase” (CP) foram efetivamente clonadas em ambos os vetores contendo BD e AD (exceto “NAD-dependent epimerase/dehydratase domain-containing protein” (NAD), clonado apenas no vetor contendo BD) e transformadas em levedura AH109 para o ensaio de Duplo Híbrido de levedura.

No teste do gene repórter *HIS3*, os clones contendo o efector Phapa-4574965 e as proteínas da soja AAT e CP cresceram no meio seletivo SD-LEU-TRP-HIS em diferentes concentrações de 3-AT e levedura (Figura 3.A). O clone contendo BD-AAT + AD-4574965 apresentou crescimento em meio SD-LEU-TRP-HIS com até 0,5mM 3-AT à uma OD₆₀₀: 0,1. O clone contendo BD-4574965 + AD-AAT apresentou crescimento em meio SD-LEU-TRP-HIS com até 5mM 3-AT à uma OD₆₀₀: 0,01. O clone contendo BD-CP + AD-4574965 apresentou crescimento em meio SD-LEU-TRP-HIS com até 0,5mM 3-AT à uma OD₆₀₀: 0,1. O clone contendo BD-4574965 + AD-CP apresentou crescimento apenas em meio SD-LEU-TRP-HIS com 0mM 3-AT à uma OD₆₀₀: 0,01. O clone contendo BD-NAD + AD-4574965 apresentou crescimento apenas em meio SD-LEU-TRP-HIS com 0mM 3-AT à uma OD₆₀₀: 0,1. O controle positivo apresentou crescimento em todas as diferentes concentrações de levedura e 3-AT em meio seletivo. Os controles negativos não apresentaram crescimento, independente da concentração da levedura ou de 3-AT em meio SD-LEU-TRP-HIS.

No teste do gene repórter *LacZ*, todos os clones com construções distintas demonstraram interação ao apresentarem a pigmentação azulada (Figura 3.B). Em particular, os clones BD-4574965 + AD-AAT e BD-4574965 + AD-CP apresentaram uma pigmentação azulada mais escura.

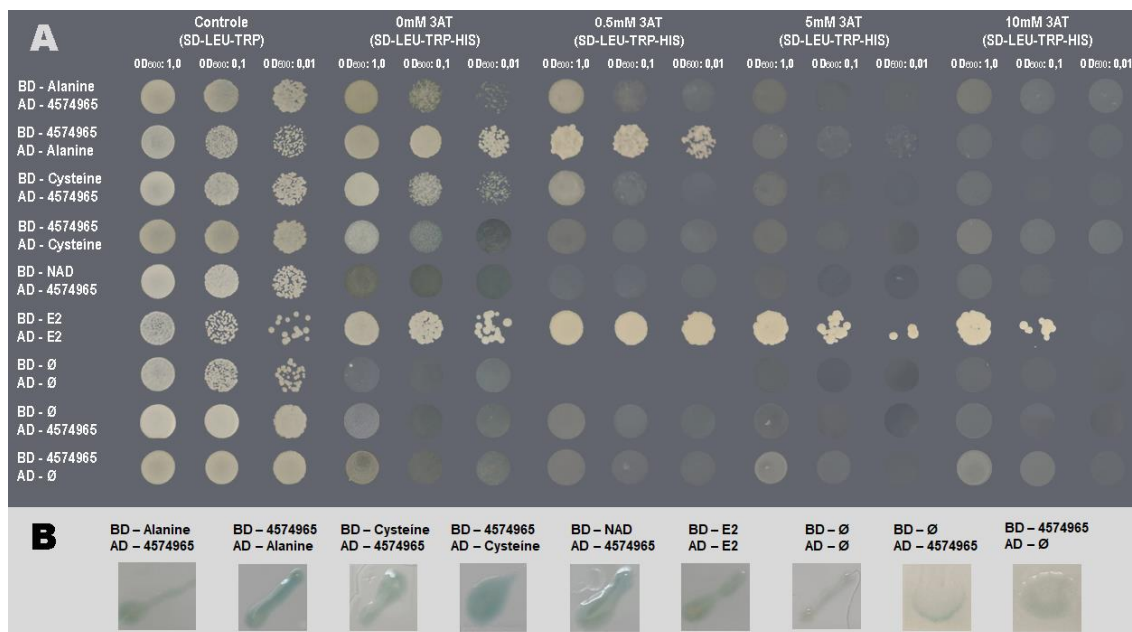


Figura 3 – Identificação da interação proteína-proteína por ensaio de Duplo Híbrido de levedura. A. Teste do gene repórter *HIS3* com os clones (concentrações OD_{600} de 1,0; 0,1 e 0,01) BD-4574965+AD-proteína da soja, BD-proteína da soja+AD-4574965, BD-4574965+AD-vazio (controle negativo), BD-vazio+AD-4574965 (controle negativo), BD-vazio+AD-vazio (controle negativo), BD-E2+AD-E2 (controle positivo) em meio sólido SD-Leu-Trp e em SD-Leu-Trp-His nas concentrações 0, 5, 10 e 15 mM de 3-AT. **B.** Teste do gene repórter *LacZ* em membrana de nitrocelulose.

3.4. Identificação da localização subcelular de Phapa-4574965 em *Nicotiana benthamiana*

Por meio da coexpressão transiente do efector Phapa-4574965 e marcadores de organelas em folhas de *N. benthamiana* agroinfiltradas, foram obtidas imagens por microscopia confocal e estas avaliadas para identificar a localização subcelular do efector em estudo. Através das imagens obtidas, observou-se nos respectivos filtros a expressão fluorescente tanto do GFP fusionado ao Phapa-4574965 quanto do mCherry fusionado às proteínas marcadoras, além da autofluorescência da clorofila.

Em todas as coexpressões transientes, observou-se que Phapa-4574965 apresenta-se fortemente detectado no núcleo e parcialmente no citosol das células de *N. benthamiana* (Figura 4, 5 e 6). Inclusive, Phapa-4574965 localiza-se fortemente apenas no nucleoplasma (Figura 5.B). Dentre todas as combinações testadas, observou-se colocalização subcelular entre Phapa-4574965 e a proteína nuclear, confirmando assim a localização nuclear de Phapa-4574965 na célula vegetal (Figura

5), e a proteína mitocondrial (Figura 6). Os discos foliares infiltrados com a solução de infiltração não apresentaram fluorescência, enquanto aqueles infiltrados com o vetor vazio pSITE apresentaram fluorescência GFP intensa, próxima à fluorescência observada no tecido infiltrado com eGFP.

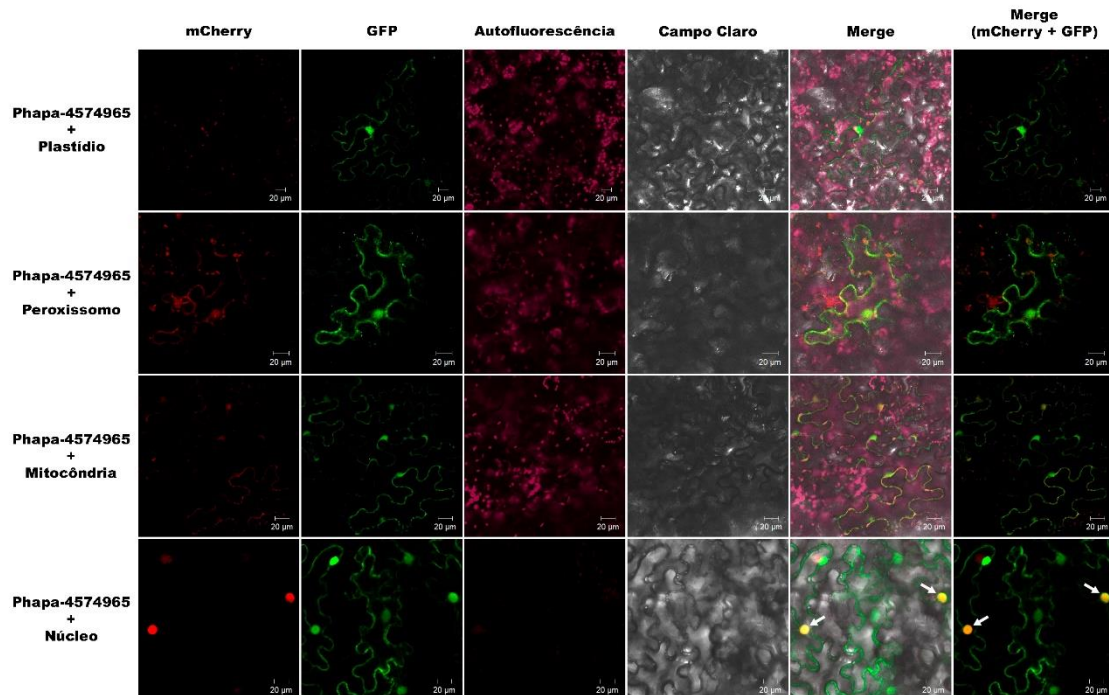
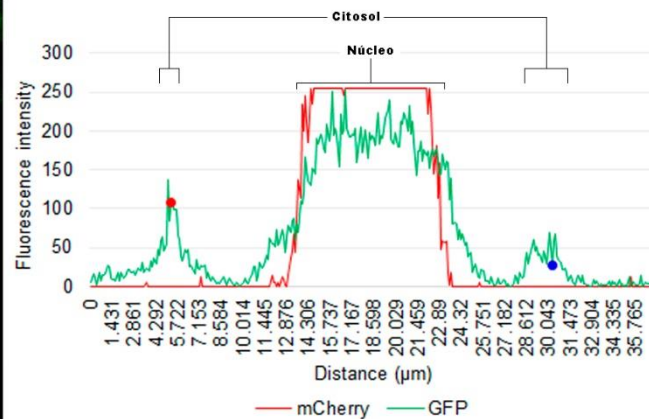
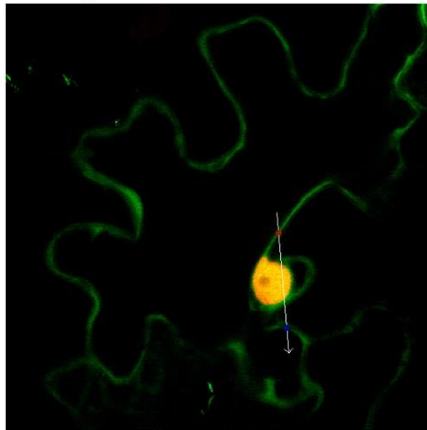


Figura 4 – Identificação da localização subcelular de Phapa-4574965. Imagens obtidas por microscopia confocal de folhas de *N. benthamiana* agroinfiltradas com Phapa-4574965 fusionado ao GFP e diferentes marcadores de organelas fusionadas ao mCherry. A co-localização de ambas as proteínas co-infiltradas foi observada no núcleo, como indicado pelas setas brancas. Utilizou-se excitação 543 nm para mCherry e 488 nm para GFP e clorofila. A fluorescência de GFP (verde), mCherry (vermelho) e clorofila (magenta) foi coletada em 505-525 nm, 580-620 nm e 680-700 nm, respectivamente. As imagens foram obtidas em objetiva 20x. Barra = 20 µm.

A

Phapa-4574965 + Núcleo

B

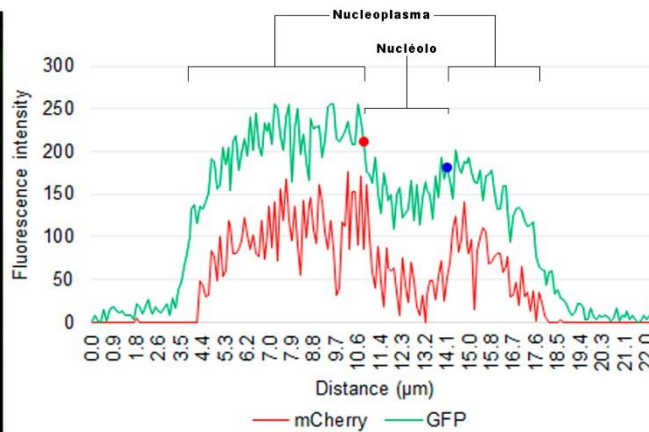
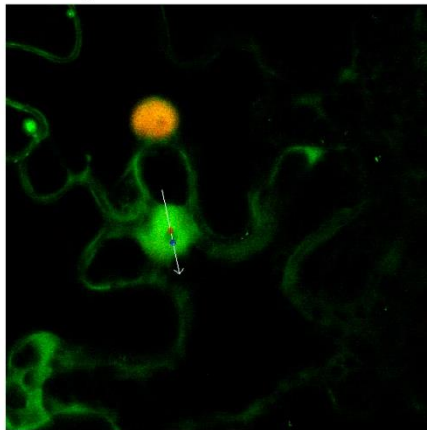
Phapa-4574965 + Núcleo

Figura 5 – **Phapa-4574965 no núcleo, citosol e nucleoplasma.** Imagens e dados obtidos por microscopia confocal e software LSM Image Browser a partir de folhas de *N. benthamiana* agroinfiltradas com Phapa-4574965 fusionado ao GFP e marcador nuclear fusionado ao mCherry, demonstrando localização subcelular no (A) núcleo, citosol e (B) nucleoplasma. Imagens da sobreposição das imagens do GFP e mCherry (esquerda). Utilizou-se excitação 543 nm para mCherry e 488 nm para GFP. A fluorescência de GFP (verde) e mCherry (vermelho) foi coletada em 505-525 nm e 580-620 nm, respectivamente. As imagens foram obtidas em objetiva 40x. Gráfico do perfil de fluorescência (direita), indicando a intensidade de fluorescência de GFP (linha verde) e mCherry (linha vermelha) ao longo da seta branca, contendo marcações para delimitar determinada região (azul e vermelho).

Phapa-4574965 + Mitocôndria

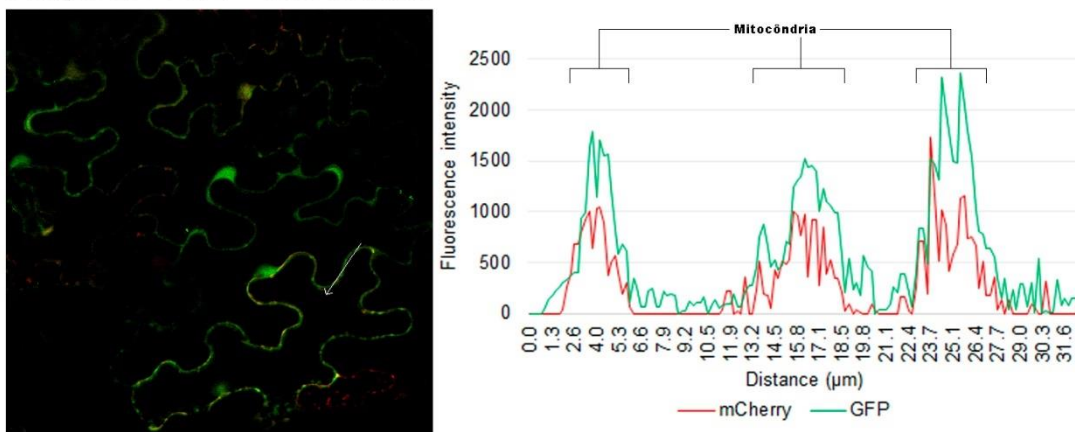


Figura 6 – **Phapa-4574965 na mitocôndria.** Imagens e dados obtidos por microscopia confocal e software LSM Image Browser a partir de folhas de *N. benthamiana* agroinfiltradas com Phapa-4574965 fusionado ao GFP e marcador mitocondrial fusionado ao mCherry. Imagens da sobreposição das imagens do GFP e mCherry (esquerda). Utilizou-se excitação 543 nm para mCherry e 488 nm para GFP. A fluorescência de GFP (verde) e mCherry (vermelho) foi coletada em 505-525 nm e 580-620 nm, respectivamente. As imagens foram obtidas em objetiva 20x. Gráfico do perfil de fluorescência (direita), indicando a intensidade de fluorescência de GFP (linha verde) e mCherry (linha vermelha) ao longo da seta branca.

3.5. Identificação da localização subcelular de Phapa-4574965 em *Glycine max*

Por meio da imunolocalização do efector Phapa-4574965 em folhas de *G. max* não inoculada e inoculadas com *P. pachyrhizi*, foram obtidas imagens por microscopia confocal e estas avaliadas para identificar a localização subcelular do efector em estudo. Através das imagens obtidas, observou-se nos respectivos filtros a expressão fluorescente tanto do FITC marcando a proteína Phapa-4574965 quanto do MitoTracker™ Red CMXRos (Invitrogen®) marcando as mitocôndrias da célula vegetal.

Os resultados deste ensaio não foram conclusivos devido à inconsistência da fluorescência do FITC observada tanto nas amostras inoculadas quanto nas não inoculadas com o patógeno (Figura 7), uma vez que tal anticorpo deveria marcar apenas a proteína efectora de *P. pachyrhizi*. A fluorescência de FITC observada não se deve à influência do MitoTracker™ Red CMXRos (Invitrogen®), uma vez que tal ocorrência é igualmente observada quando as amostras são tratadas apenas com os anticorpos anti-4574965 e *Goat Anti-Rabbit IgG-FITC* (Sigma).

Desta forma, as concentrações de anticorpo primário e secundário ou até mesmo a especificidade no anticorpo anti-4574965 deverão ser revisadas. Ajustes no protocolo de imunologia deverão ser realizados a fim de torná-lo eficaz para obter dados precisos com relação à localização subcelular do efector na célula hospedeira.

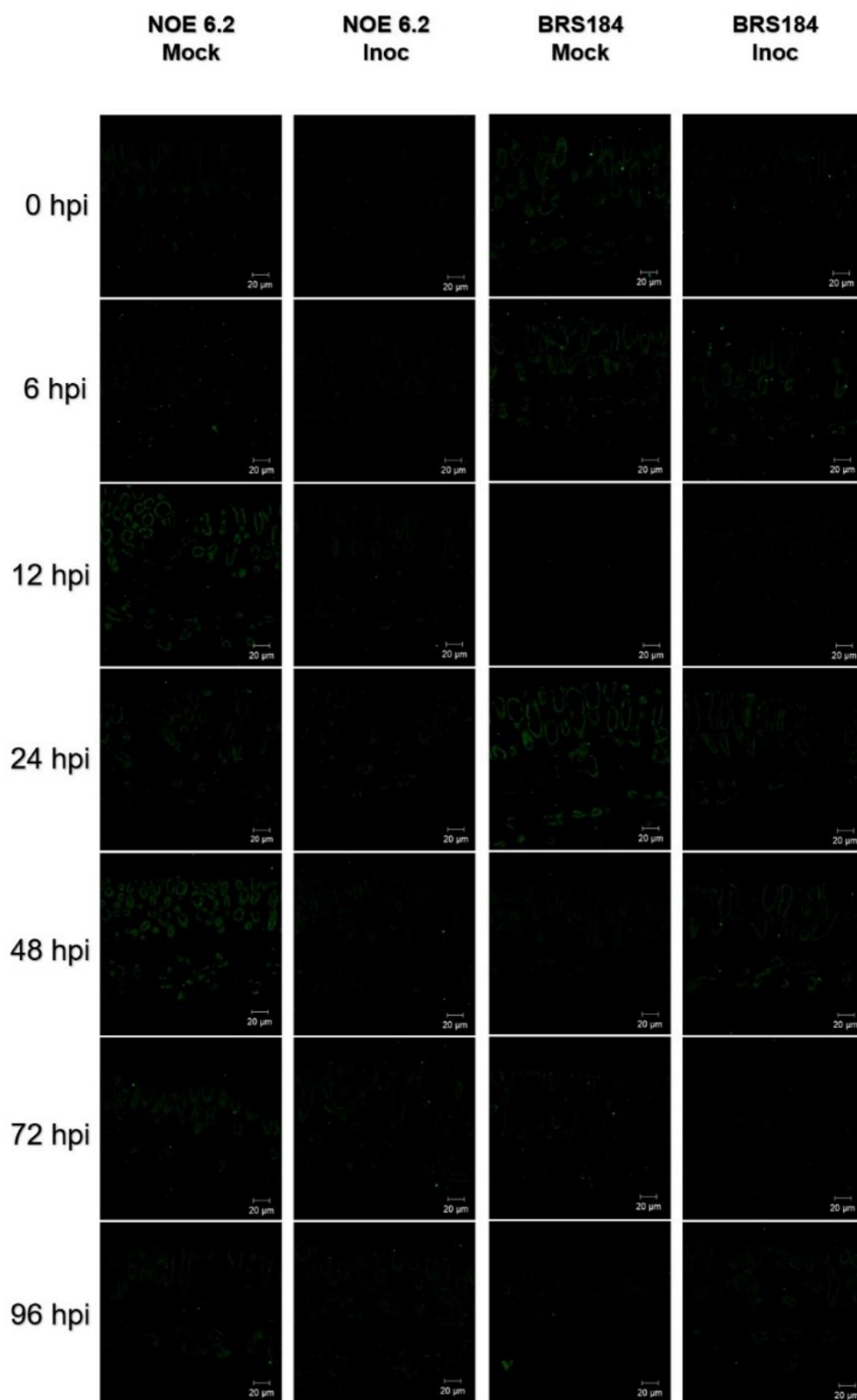


Figura 7 – **Identificação da localização subcelular de Phapa-4574965 por imunolocalização.** Imagens obtidas por microscopia confocal de folhas de *G. max* BRS184 (suscetível) e NOE 6.2 (resistente) não inoculadas (Mock) e inoculadas (Inoc) com esporos de *P. pachyrhizi*. As amostras foram tratadas com anticorpos primário (anti-4574965) e secundário (*Goat Anti-Rabbit IgG-FITC*). Utilizou-se excitação 488 nm para FITC. A fluorescência de FITC (verde) foi coletada em 505-550 nm. As imagens foram obtidas em objetiva 40x. Barra = 20 μ m.

4. DISCUSSÃO

O estudo de interações planta-patógeno permite sua compreensão e de sua co-evolução composta por constantes processos adaptativos em prol de sua sobrevivência, onde uma busca a efetiva infecção para desenvolver-se e o outro a efetiva defesa para proteger-se. Sabendo da importância de proteínas efetoras como fatores de patogenicidade, seu estudo tornou-se de grande relevância para enriquecer as estratégias de controle de estresse biótico das culturas, buscando entendimento de suas funções e processos biológicos envolvidos (Prasad et al., 2019; Fei & Liu, 2023). O patossistema *Glycine max-Phakopsora pachyrhizi* ainda é de extrema complexidade, principalmente devido à dificuldade de identificação e manipulação deste fitopatógeno em laboratório (Chicowski et al., 2024). Recentemente, alguns estudos têm identificado e elucidado sobre efetores de *P. pachyrhizi* (Qi et al., 2016, 2023; Bueno et al., 2022; Chicowski et al., 2023, 2024). Os efetores Phapa-4560229 e Phapa-4574965, identificados por meio do sequenciamento de microdissecções de lesões de *P. pachyrhizi* em soja (De Carvalho et al., 2017), apresentaram características efetoras como tamanho reduzido, presença de peptídeo sinal e validações funcionais como capacidade de supressão de PTI e ETI em *N. benthamiana* (Utiyama, 2020).

Durante a análise qPCR utilizando o genótipo suscetível (BRS184) infectado com *P. pachyrhizi*, não se observou expressão significativa do gene *Phapa-4560229*, sendo ainda down-regulado em 48 hpi. Tais resultados foram similares aos apresentados pelo Consórcio do Genoma do fungo *P. pachyrhizi* através da análise de RNA-Seq, onde observou-se expressão ausente na formação das estruturas tubo germinativo e apressório, e down-regulado em 8 e 12 dias pós-inoculação (dpi).

Por outro lado, o gene *Phapa-4574965* apresentou uma expressão significativa nos tempos 12, 24 e 48 hpi (Figura 1), com dois picos de expressão nos tempos 12 e 48 hpi, sendo o tempo 48 hpi o momento de maior expressão. No RNA-Seq realizado pelo Consórcio do Genoma do fungo *P. pachyrhizi*, as maiores expressões foram observadas na formação das estruturas fúngicas (tubo germinativo e apressório), os únicos pontos na fase inicial da infecção contempladas neste estudo. Ainda, a maior expressão observada fora na formação do apressório (Utiyama, 2020). Considerando que o apressório inicia sua formação entre 2 e 5 hpi, em aproximadamente 16 hpi possui o cone apressorial para penetração por rompimento das células da epiderme (Koch et al., 1983), e a formação do haustório no interior das células do mesófilo é realizado entre 24 e 48 hpi, pode-se indicar que a penetração do fungo no meio intercelular do tecido

vegetal está ocorrendo entre 5 e 24 hpi. Ao observar dois picos de expressão nos tempos 12 e 48 hpi, que estão relacionados com a penetração do patógeno, tanto no rompimento da epiderme quanto no seu desenvolvimento no meio intracelular da célula do mesófilo, respectivamente, sugere-se que este gene possa estar sendo requisitado nos momentos de invasão das células vegetais. Adicionalmente, o domínio GILT presente na estrutura do Phapa-4574965, trata-se de um domínio amplamente estudado no reino animal, porém pouco descrito nos organismos vegetais e fúngicos, pode possuir uma relação com o sistema de imunidade, uma vez que participa da desnaturação, renaturação e redução de pontes dissulfeto. Em humanos, GILT faz parte de um grupo de fatores redox com a finalidade de facilitar a entrada de patógenos pelas rotas endocíticas, ou seja, através da invaginação da membrana plasmática (Ceresa, 2012). O domínio GILT também está relacionado com a manutenção da homeostase de ROS e expressão de *Superóxido Dismutase 2 (SOD2)* (Sigal et al., 1999; Bogunovic, 2008; Singh & Cresswell, 2010; Wei et al, 2019). Em *Populus trichocarpa* (espécie arbórea do gênero *Populus*), foi identificado o gene *PtOSH1*, cuja estrutura e motivos são similares à GILT humana. Sob estresse de cádmium (Cd) prolongado, as enzimas antioxidantes da planta são destruídas, levando a intoxicação por ROS. No entanto, a expressão transiente de *PtOSH1* em *Arabidopsis* tratadas com Cd promoveu a catalisação a redução de pontes dissulfeto, podendo reparar enzimas antioxidantes e regular a ROS, mantendo assim a estabilidade das células vegetais (Wei et al, 2019). Assim, é possível que, através de seu domínio GILT, o efector Phapa-4574965 esteja manipulando o hospedeiro nos momentos em que o patógeno penetra e se desenvolve nos diferentes componentes do tecido do hospedeiro.

Na busca pela compreensão das funcionalidades de um efector, a investigação de moléculas do hospedeiro com as quais o efector possivelmente interaja permite uma visão maior sobre sua atuação na infecção do patógeno no hospedeiro. Com a varredura realizada por “Pull-down” e espectrometria de massa, foram identificadas oito proteínas de soja. A LOX e CP são duas enzimas ativamente presentes no sistema de defesa de plantas. Sua interação com o efector Phapa-4574965 poderia indicar sua participação em rotas essenciais do sistema imune do hospedeiro para favorecer a infecção.

Através da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, a LOX é responsável pelo início da síntese de oxilipinas, um composto de sinalização cíclico e acíclico, como ácido jasmônico, que participam da imunidade da planta contra estresses bióticos e abióticos (Rosahl & Feussner, 2004; Thakur & Udayashankar, 2019). Além de atuar na síntese de compostos antimicrobianos e na sinalização de defesa, vias de 9-LOX, especificamente, atuam nas respostas de HR da planta por meio da produção de

hidroperóxidos de ácidos graxos livres e são também estimuladas por ácido abscísico durante as respostas de defesa da planta, relacionadas inclusive com o fechamento de estômatos. A participação da LOX no sistema de defesa da planta foi observada em diversos complexos planta-patógeno bacteriano ou fúngico (Thakur & Udayashankar, 2019; Viswanath et al., 2020).

A CP é uma enzima ligada diretamente à clivagem proteica, participando do sistema imune principalmente como PLCP (Niño et al., 2014; Pérez-López et al., 2021; Wang et al., 2021). Inclusive, o silenciamento de PLCP ortólogo em *Nicotiana benthamiana* resultou no aumento de sua suscetibilidade à *Phytophthora infestans* (Kaschani et al., 2010). Em tomate, a redução da PLCP PIP1 promoveu elevada sensibilidade da planta à fungos, bactérias e oomicetos, demonstrando que tal enzima está relacionada à defesa basal contra uma gama de microrganismos (Ilyas et al., 2015). No patossistema trigo-*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, observou-se que, com o reconhecimento da infecção do patógeno por NB-LRR, a proteína TaTrxh1 (thioredoxin) associa-se com a TaCP1 (cysteine proteinase) para promover reduções de pontes dissulfeto e, desta forma, regular positivamente a morte celular e respostas de defesa através da sinalização por ácido salicílico (Shi et al., 2021). Da mesma forma que as PLCPs são essenciais para a defesa do hospedeiro, com a co-evolução patógeno-hospedeiro, as PLCPs tornaram-se também alvos de efetores patogênicos para inibir a imunidade da planta e favorecer o hospedeiro. Em milho, o efector apoplástico Pit2 inibe um conjunto de “PLCPs” apoplástico a fim de favorecer a infecção de *Ustilago maydis*. *Phytophthora* também possui um grupo de inibidores denominados EPIC (Extracellular Cystatin-like Protease Inhibitors), como o EPIC1 que interage com as PLCPs Rcr3 e C14 apoplásticas e EPIC2B que interage fortemente à Rcr3 e PIP1 para inibi-las (Kaschani et al., 2010).

As demais seis proteínas identificadas estão relacionadas com metabolismos energéticos (fotorrespiração e biossíntese de carboidrato). No sistema de defesa da planta é descrito um mecanismo denominado “high-sugar resistance”, uma vez que o açúcar pode estimular a imunidade da planta e a expressão de genes de defesa, promovendo, inclusive, resistência à patógenos fúngicos (Bolouri Moghaddam & Van Den Ende, 2012; Morkunas & Ratajczak, 2014). Através da indução de algumas proteínas PR (*Pathogenesis-related*), o açúcar desencadeia uma explosão oxidativa no início da infecção, além de intermediar em redes de sinalização hormonal relacionados com o sistema de defesa da planta (Morkunas & Ratajczak, 2014). Fitohormônios como etileno e jasmonato, por exemplo, possuem interação com as vias de sinalização da sacarose (Tauzin & Giardina, 2014). Assim, sua interação com Phapa-4574965 poderia

indicar funcionalidade interligadas com a biossíntese de carboidratos para inibir sinalização ou respostas de defesa.

A NAD, participante da biossíntese de polissacarídeos, já foi descrita como relacionada com os sistemas de defesa da planta à estresses bióticos e abióticos, como respostas de defesa desencadeadas por alimentação de insetos e tolerância ao cromo (Zeng et al., 2014; Natale et al., 2023). Adicionalmente, identificou-se que, durante a simbiose entre *Rhizophagus irregularis*, uma micorriza arbuscular, e *Medicago truncatula*, o efector fúngico RiSLM é capaz de suprimir a expressão de NAD, um dos genes de defesa utilizados no estudo (Zeng et al., 2020).

A AAT apresentou expressão desencadeada por ácido salicílico e etileno durante a resposta de resistência de *Capsicum annuum* L. cv. Bugang infectado por *Tobacco mosaic virus* (TMV) patótipo P0. Possivelmente, tal enzima está envolvida nas vias de sinalização de defesa e/ou participar de forma indireta provendo ATP através do piruvato, produto da reação da qual participa (Kim et al., 2005).

A enzima FBP, nas plantas, está envolvida tanto no desenvolvimento da planta quanto nas respostas aos estresses abióticos e biótico. Em um estudo do sistema algodão-*Verticillium dahliae*, verificou-se a indução de determinadas regiões do gene *cyFBP* (*Cytosolic Fructose-bisphosphatase*), podendo assim estar relacionado com certas respostas de defesa da planta como formação de gel, lignificação epidérmica e modificação da cortiça interna para evitar a propagação do patógeno. Além disso, observou-se também um aumento na biossíntese de lignina, fitoalexinas, polissacarídeos, lipídeos, entre outros. Sugere-se que o açúcar metabolizável esteja relacionado de forma positiva com a produção de lignina (Gě et al., 2020). Adicionalmente, a glicose e frutose resultantes da hidrólise da sacarose são fontes de energia para fungos biotróficos e também podem atuar como quanto moléculas de sinalização de defesa da planta (Baslam et al., 2020).

No caso da AMT, a GCS a qual participa é necessária para uma variedade de processos metabólicos vitais como biossíntese de ácidos nucleicos, proteínas, lignina, entre outros (Okamura-Ikeda et al., 2010; Rasool et al., 2014; Timm et al., 2018). Em um estudo com *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, Li et al. (2023) descrevem que, nas plantas, a amônia resultante da decomposição de glicina por GCS combina-se com glutamato, sintetizando assim a glutamina, que tomará seu lugar em diferentes atividades de metabolismo, como as de aminoácidos e açúcares. Durante a defesa da planta, a AMT, em conjunto com outros sistemas de eliminação, evita a superprodução de ROS. Varela et al. (2018) sugere que o vírus CPSMV (*Cowpea Severe Mosaic Virus*)

tenha induzido a biossíntese de AMT em *Vigna unguiculata* justamente para evitar excessivas quantidades de ROS, que são prejudiciais para seu desenvolvimento. Em condições de estresse, como infecção de patógenos, a síntese de óxido nítrico (NO) pode ser aumentada. Mecanismo de sinalização mitocondrial de óxido nítrico (NO) está envolvido na S-nitrosilação de GCS, uma vez que enzimas mitocondriais são alvos primários da nitrosilação ou nitração, elevando assim a proporção de glicina para serina e limitando a disposição de NADH para o transporte de elétrons, o que resulta na morte celular e, possivelmente, complementa o mecanismo de apoptose (Igamberdiev, Ratcliffe & Gupta, 2014). Uma análise proteômica de *Glycine max* cv. Xinyixiaoheidou sob tratamento com ácido salicílico, jasmonato de metila, ácido 1-amino ciclopropano-1-carboxílico, peróxido de hidrogênio, nitroprusseto de sódio e vitamina B1 revelou que AMT, juntamente com “Serine hydroxymethyltransferase”, foram positivamente induzidas, indicando sua participação no controle de ROS produzida para evitar o dano oxidativo, uma vez que, mesmo ROS sendo essencial para a defesa da planta, sua presença em excesso pode prejudicar tanto a defesa quanto posterior desenvolvimento da planta (Zhao et al., 2013). Concomitantemente, o domínio GILT presente no modelo gênico de *Phapa-4574965* está correlacionado com atividades mitocondriais e manutenção da homeostase de ROS, tornando a AMT uma potencial proteína da soja para futuros estudos para validação de sua interação com o efector Phapa-4574965.

Para manipular fisiologicamente diferentes rotas moleculares da planta ou interferir na cascata de sinalização de defesa, os efetores patogênicos citoplasmáticos movem-se pelo interior da célula hospedeira para interagir com seus alvos em diferentes compartimentos celulares, favorecendo assim o desenvolvimento do patógeno (Dodds & Rathjen, 2010; Lo Presti et al., 2015; Prasad et al., 2019). A mitocôndria possui um importante papel dentro do sistema imune da planta, participando da sinalização de defesa como óxido nítrico, ROS e ácido salicílico (Xu et al., 2020; Figueroa, Ortiz & Henningsen, 2021). Efetores que se movem do citosol para o núcleo são classificados como efetores nucleares, interferindo ou reprogramando genes relacionados com a defesa da planta. Além disso, alguns efetores se translocam para o nucléolo a fim de regular a síntese proteica. Desta forma, dependendo do local de ação, o arsenal do patógeno conta com diversos efetores sendo orquestrados tanto para comprometer o reconhecimento e sinalizações de defesa no citosol quanto manipular processos de transcrição e tradução da planta para suprimir sua defesa (Prasad et al., 2019).

Diferentes estudos com efetores de ferrugem têm investigado sua localização subcelular para caracterizar o efector em estudo e incrementar suas informações funcionais para compreender sua atividade. No estudo desenvolvido por Xu et al. (2020),

verificou-se que o efector MoCDIP4, de *Magnaporthe oryzae*, é capaz de ligar-se à chaperona DnaJ (OsDJA9). A OsDJA9 promove a degradação de OsDRP1E e, uma vez ligado ao efector MoCDIP4, a degradação de OsDRP1E é impedida, levando assim ao seu acúmulo e posterior deformação da mitocôndria e aumento da suscetibilidade do hospedeiro à *M. oryzae*. Adicionalmente, a interação MoCDIP4-OsDJA9 ocorre no retículo endoplasmático e a consequência da ação desse efector é observada na mitocôndria, demonstrando assim que o local de interatividade do efector não necessariamente é o mesmo local onde ocorrerá a interferência e alterações.

Em *Melampsora larici-populina*, 19 candidatos a efector apresentaram localização citoplasmática e nuclear. Inclusive, MLP124017 demonstrou associação com TOPLESS e proteínas relacionadas a TOPLESS (TPL/TPR), um co-repressor envolvido em processos como respostas de defesa da planta, provavelmente presente no núcleo vegetal. Já MLP107772 apresentou localização cloroplástica e mitocondrial, com provável interação com a proteína 1 relacionada ao cloroplasto (CTP1 - *Chloroplast-Targeted Protein 1*), que se acumula na mitocôndria (Petre et al., 2015, 2016; Lorrain et al., 2018).

Dos 11 candidatos a efetores localizados no citoplasma e núcleo *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, Liu et al. (2016) identificaram a interação do efector PEC6 com uma adenosina kinase (TaADK) no citosol e núcleo de células de *Triticum aestivum*. Qi et al. (2019b) descreveu que o efector PstGSRE1 (*Puccinia striiformis Glycine-Serine-Rich Effector 1*), localizado no citoplasma e núcleo, interage com o fator de transcrição TaLOL2 (*LSD-1-Like zincfinger*), relacionado com rotas de sinalização de espécies reativas a oxigênio (ROS), de forma a impedir sua movimentação para o núcleo para que este não atue na rota HR desencadeada por ROS.

Recentemente, Wang et al. (2022) observaram que o efector PstSIE1 interage com TaSGT1, um componente auxiliar de NB-LRR para o reconhecimento de efetores e, conseqüentemente, desencadeamento de ETI, tanto no citoplasma quanto no núcleo de células de trigo. Em *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, Ortiz et al. (2022) identificaram o reconhecimento do efector AvrSr50, localizado no citoplasma e núcleo, com a NLR Sr50 no citosol, desencadeando a ETI. Qi et al. (2019a) verificaram que 18 candidatos a efector de *Uromyces appendiculatus* apresentaram localização citoplasmática e nuclear em células de *N. benthamiana*. Em *Phakopsora pachyrhizi*, diversos candidatos a efector foram identificados no citoplasma e núcleo celular vegetal (De Carvalho et al., 2015; Qi et al., 2017). Chicowski et al. (2023) observaram que o efector PpEC15 apresentou uma forte localização no núcleo e parcial no citosol em células de *N. benthamiana*, movendo-

se tanto para o cloroplasto quanto núcleo para interação com DAHP (3-deoxy-7-phosphoheptulonate) synthase.

Neste estudo, através do ensaio de duplo híbrido de levedura, Phapa-4574965 demonstrou interação com as proteínas de soja AAT e NAD, pertencentes à metabolismos energéticos e possíveis vias do sistema imune da planta, e CP, uma enzima essencial para as respostas de defesa da planta. Inclusive, observou-se que AAT apresentou uma interação mais forte quando comparado com CP e NAD. Contudo, é possível que CP e/ou NAD também sejam proteínas com as quais Phapa-4574965 interage, porém de forma mais fraca. Adicionalmente, Phapa-4574965 apresentou co-localização com o marcador nuclear e mitocondrial, o que não foi observado durante a co-expressão transiente entre o efector e marcadores de plastídeo e peroxissomo. Observou-se ainda que a localização do efector foi fortemente expressa apenas no nucleoplasma. Além da forte expressão no núcleo, há uma expressão parcial no citosol, determinando assim uma localização núcleo-citoplasmática e mitocondrial ao efector Phapa_4574965. A observação de sua presença na mitocôndria corresponde com a predição de localização mitocondrial obtida por ferramentas de bioinformática e se correlaciona com o domínio GILT presente em seu modelo gênico (Utiyama, 2020). Além disso, tal localização mitocondrial corrobora com a localização da proteína “Aminomethyltransferase” da soja, uma das proteínas identificadas no ensaio “Pull-down” associado com a espectrometria de massa. O seguimento de demais ensaios relacionados à validação da interação proteína-proteína será importante para aprofundar o estudo referente a tais resultados observado.

5. CONCLUSÃO

O efector Phapa-4574965 expressou-se significativamente durante a interação de *P. pachyrhizi* e soja, inclusive nos tempos que contemplam a incursão do patógeno no tecido hospedeiro. Além disso, é possível que Phapa-4574965 interaja tanto com proteínas com importante papel no sistema imune da planta quanto proteínas relacionadas ao metabolismo energético. Pelo menos oito potenciais proteínas da soja foram identificadas no ensaio “Pull-down” associado com espectrometria, sendo que a interação com os alvos “NAD-dependent epimerase/dehydratase”, “Cysteine proteinase” e “Alanine transaminase” foram também observadas nas hibridizações via Y2H. Observou-se também a localização subcelular do efector Phapa-4574965 através do método de colocalização em células de *N. benthamiana*. Phapa-4574965 apresentou localização mitocondrial, correlacionando-se assim com sua predição de sua localização, seu domínio GILT e com a “Aminomethyltransferase”, uma das oito proteínas da soja com a qual possivelmente interaja. Além disso, este efector possui também localizações citoplasmática e nuclear, precisamente no nucleoplasma. Tais resultados fornecem indícios de uma possível funcionalidade complexa envolvendo tais organelas, auxiliando futuros ensaio para investigar tais localizações e sua relação com a atividade do efector no auxílio da infecção do fitopatógeno.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M.S. **Caracterização bioquímica e funcional de fatores de transcrição envolvidos na resposta a estresses biótico e abiótico em soja**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa. 2013.

BASLAM, M. *et al.* Recent advances in carbon and nitrogen metabolism in C3 plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, p. 318, 2020.

BENTHAM, A.R. *et al.* A molecular roadmap to the plant immune system. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 44, p. 14916-14935, 2020.

BOGUNOVIC, B. **The role of Gamma interferon Inducible Lysosomal Thiol reductase (GILT) in immune and cellular functions**. Georgetown University. 2008.

BOLOURI MOGHADDAM, M.R. & VAN DEN ENDE, W. Sugars and plant innate immunity. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 11, p. 3989-3998, 2012.

BRACHER, A. *et al.* Degradation of potent Rubisco inhibitor by selective sugar phosphatase. **Nature Plants**, v. 1, n. 1, p. 1-7, 2015.

BUENO, T.V. *et al.* A *Phakopsora pachyrhizi* effector suppresses PAMP-triggered immunity and interacts with a soybean glucan endo-1, 3- β -glucosidase to promote virulence. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 35, n. 9, p. 779-790, 2022.

BUNCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W. & JONES, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. 2nd Edition. United States: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. 1264 p.

CAO, Y. *et al.* Identification of differential expression genes in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) in response to heat stress by cDNA-AFLP analysis. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

CEPEA. **PIB do agronegócio brasileiro**. Disponível em: <<https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>> Acesso em: 20 de jan. de 2024.

CERESA, B. (Ed.). **Molecular regulation of endocytosis**. BoD–Books on Demand, 2012.

CHEN, Y. *et al.* Biogenic volatile organic compounds and protein expressions of *Chamaecyparis formosensis* and *Chamaecyparis obtusa* var. *formosana* leaves under different light intensities and temperatures. **Plants**, v. 11, n. 12, p. 1535, 2022.

CHICOWSKI, A.S. *et al.* A soybean rust effector protease suppresses host immunity and cleaves a 3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase. **bioRxiv**, p. 2023.09. 07.556260, 2023.

CHICOWSKI, A.S. *et al.* Soybean - *Phakopsora pachyrhizi* interactions: towards the development of next - generation disease - resistant plants. **Plant Biotechnology Journal**, v. 22, n. 2, p. 296-315, 2024.

CNA. **Boletim do Comércio Exterior do Agronegócio**. Disponível em: <<https://cnabrasil.org.br/publicacoes/boletim-do-comercio-exterior-do-agronegocio-13>> Acesso em: 20 de jan. de 2024.

COLL, N.S., EPPLE, P., & DANGL, J.L. Programmed cell death in the plant immune system. **Cell Death & Differentiation**, v. 18, n. 8, p. 1247-1256, 2011.

CUI, H., TSUDA, K., & PARKER, J.E. Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. **Annual review of plant biology**, v. 66, p. 487-511, 2015.

DALIO, R.J.D.; MAGALHAES, D.M.; ATILIO, L.B.; RODRIGUES, C.M.; BRETON, M. C.; PICH, S.; PASCHOLATI, S.F. & MACHADO, M.A. Efetores na Interações Planta-patógeno. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 22, p. 25-68, 2014.

DARBEN, L. M. **Obtenção e caracterização molecular e da virulência de isolados monouredinais de *Phakopsora pachyrhizi* coletados em diferentes regiões do Brasil**. 95 f. Tese (Doutorado em Genética e melhoramento) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-graduação em Genética e melhoramento, Maringá, PR. 2013.

DE CARVALHO, M.C.C.G. *et al.* Prediction of the in planta *Phakopsora pachyrhizi* secretome and potential effector families. **Molecular Plant Pathology**, v. 18, n. 3, p. 366-377, 2017.

DODDS, P.N. & RATHJEN, J.P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 8, p. 539-548, 2010.

EMBRAPA SOJA. **Soja em números (safra 2022/23)**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>> Acesso em: 20 de jan. de 2024.

FEHR, W.R. & CAVINESS, C.E. **Stages of soybean development**. 1977.

FEI, W. & LIU, Y. Biotrophic fungal pathogens: a critical overview. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 195, n. 1, p. 1-16, 2023.

FIGUEROA, M.; ORTIZ, D. & HENNINGSEN, E.C. Tactics of host manipulation by intracellular effectors from plant pathogenic fungi. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 62, p. 102054, 2021.

Ě, Q. *et al.* Disequilibrium evolution of the Fructose-1, 6-bisphosphatase gene family leads to their functional biodiversity in *Gossypium* species. **BMC genomics**, v. 21, p. 1-17, 2020.

GODOY, C.V. *et al.* Asian soybean rust in Brazil: past, present, and future. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 407-421, 2016.

GOODIN, M.M. *et al.* *Nicotiana benthamiana*: Its history and future as a model for plant-pathogen interactions. **Mol. Plant-Microbe Interact**, v. 21, n. 8, p. 1015-1026, 2008.

GUPTA, Y.K. *et al.* Major proliferation of transposable elements shaped the genome of the soybean rust pathogen *Phakopsora pachyrhizi*. **Nature communications**, v. 14, n. 1, p. 1835, 2023.

GRASSO, V. *et al.* Relatedness among agronomically important rusts based on mitochondrial cytochrome b gene and ribosomal ITS sequences. **Journal of Phytopathology**, v. 154, n. 2, p. 110-118, 2006.

HARTMAN, G.L. *et al.* **Compendium of soybean diseases and pests**. St. Paul, MN: American Phytopathological Society, 2015.

HASTINGS, K.T. & CRESSWELL, P. Disulfide reduction in the endocytic pathway: immunological functions of gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, n. 3, p. 657-668, 2011.

IGAMBERDIEV, A.U.; RATCLIFFE, R.G. & GUPTA, K.J. Plant mitochondria: source and target for nitric oxide. **Mitochondrion**, v. 19, p. 329-333, 2014.

ILYAS, M. *et al.* Functional divergence of two secreted immune proteases of tomato. **Current Biology**, v. 25, n. 17, p. 2300-2306, 2015.

JONES, J.D.G. & DANGL, J.L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323, 2006.

KAMOUN, S. The secretome of plant-associated fungi and oomycetes. In: **Plant relationships**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2009. p. 173-180.

KASCHANI, F. *et al.* An effector-targeted protease contributes to defense against *Phytophthora infestans* and is under diversifying selection in natural hosts. **Plant physiology**, v. 154, n. 4, p. 1794-1804, 2010.

KIM, K.J. *et al.* CaAlaAT1 catalyzes the alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase reaction during the resistance response against Tobacco mosaic virus in hot pepper. **Planta**, v. 221, p. 857-867, 2005.

KISHOREKUMAR, R. *et al.* An overview of important enzymes involved in nitrogen assimilation of plants. **Nitrogen metabolism in plants: methods and protocols**, p. 1-13, 2020.

KOCH, E.; EBRAHIM-NESBAT, F. & HOPPE, H.H. Light and electron microscopic studies on the development of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) in susceptible soybean leaves. **Journal of Phytopathology**, v. 106, n. 4, p. 302-320, 1983.

KOURELIS, J. & VAN DER HOORN, R. A. Defended to the nines: 25 years of resistance gene cloning identifies nine mechanisms for R protein function. **The Plant Cell**, v. 30, n. 2, p. 285-299, 2018.

KUNJETI, S.G. *et al.* Identification of *Phakopsora pachyrhizi* candidate effectors with virulence activity in a distantly related pathosystem. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 269, 2016.

LEISTER, D. *et al.* An ancient metabolite damage-repair system sustains photosynthesis in plants. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 3023, 2023.

LI, Y. *et al.* Glycine-Induced Phosphorylation Plays a Pivotal Role in Energy Metabolism in Roots and Amino Acid Metabolism in Leaves of Tea Plant. **Foods**, v. 12, n. 2, p. 334, 2023.

LIU, C. *et al.* The stripe rust fungal effector PEC 6 suppresses pattern - triggered immunity in a host species - independent manner and interacts with adenosine kinases. **New Phytologist**, 2016.

LO PRESTI, L. *et al.* Fungal effectors and plant susceptibility. **Annual review of plant biology**, v. 66, p. 513-545, 2015.

LORRAIN, C.; PETRE, B. & DUPLESSIS, S. Show me the way: rust effector targets in heterologous plant systems. **Current opinion in microbiology**, v. 46, p. 19-25, 2018.

LORRAIN, C. *et al.* Advances in understanding obligate biotrophy in rust fungi. **New Phytologist**, v. 222, n. 3, p. 1190-1206, 2019.

MA, B. *et al.* PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 17, n. 20, p. 2337-2342, 2003.

MAIA, T.A. **Identificação e análise funcional de efetores de *Hemileia vastatrix*, agente causal da ferrugem do cafeeiro.** 2013. 124 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MARQUES, J.P.R. & SOARES, M.K.M. **Manual de técnicas aplicadas à histopatologia vegetal.** 2021.

MARTIN, K. *et al.* Transient expression in *Nicotiana benthamiana* fluorescent marker lines provides enhanced definition of protein localization, movement and interactions in planta. **The Plant Journal**, v. 59, n. 1, p. 150-162, 2009.

MCALLISTER, C.H. *et al.* Analysis of the enzymatic properties of a broad family of alanine aminotransferases. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e55032, 2013.

MÖLLER, P.A. **Análise funcional de genes de *Phakopsora pachyrhizi* candidatos a efetores utilizando o sistema EDV.** 2014. 61 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MORKUNAS, I. & RATAJCZAK, L. The role of sugar signaling in plant defense responses against fungal pathogens. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, p. 1607-1619, 2014.

MUR, L.A. *et al.* The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? **Journal of experimental Botany**, v. 59, n. 3, p. 501-520, 2008.

NATALE, R. *et al.* In silico and in vitro approaches allow the identification of the Prosystemin molecular network. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 21, p. 212-223, 2023.

NELSON, B.K.; CAI, X. & NEBENFÜHR, A. A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. **The Plant Journal**, v. 51, n. 6, p. 1126-1136, 2007.

NGUYEN, J. *et al.* Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase is upregulated in human melanoma. **Melanoma research**, v. 26, n. 2, p. 125-137, 2016.

NIÑO, M. *et al.* Key roles of cysteine protease in different plant pathosystem. **Plant breeding and biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 97-109, 2014.

OKAMURA-IKEDA, K. *et al.* Crystal structure of aminomethyltransferase in complex with dihydrolipoyl-H-protein of the glycine cleavage system: implications for recognition of lipoyl protein substrate, disease-related mutations, and reaction mechanism. **Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 24, p. 18684-18692, 2010.

ORTIZ, D. *et al.* The stem rust effector protein AvrSr50 escapes Sr50 recognition by a substitution in a single surface-exposed residue. **New Phytologist**, v. 234, n. 2, p. 592-606, 2022.

PÉREZ-LÓPEZ, E. *et al.* A clubroot pathogen effector targets cruciferous cysteine proteases to suppress plant immunity. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 2327-2340, 2021.

PETRE, B., JOLY, D. L., & DUPLESSIS, S. Effector proteins of rust fungi. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 416, 2014.

PETRE, B. *et al.* Candidate effector proteins of the rust pathogen *Melampsora larici-populina* target diverse plant cell compartments. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 28, n. 6, p. 689-700, 2015.

PETRE, B. *et al.* Rust fungal effectors mimic host transit peptides to translocate into chloroplasts. **Cellular microbiology**, v. 18, n. 4, p. 453-465, 2016.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W. & DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST[®]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 9, p. e36-e36, 2002.

PRASAD, P. *et al.* Rust pathogen effectors: perspectives in resistance breeding. **Planta**, v. 250, n. 1, p. 1-22, 2019.

QI, M. *et al.* A small cysteine-rich protein from the Asian soybean rust fungus, *Phakopsora pachyrhizi*, suppresses plant immunity. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 9, p. e1005827, 2016.

QI, M. *et al.* Suppression or activation of immune responses by predicted secreted proteins of the soybean rust pathogen *Phakopsora pachyrhizi*. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 31, n. 1, p. 163-174, 2018.

QI, M. *et al.* Candidate effectors from *Uromyces appendiculatus*, the causal agent of rust on common bean, can be discriminated based on suppression of immune responses. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1182, 2019a.

QI, M.; YU, H.; BREDOW, M.; CHICOWSKI, A.S.; FIELDS, L.D. & WHITHAM, S.A. Insights into *Phakopsora pachyrhizi* effector-effector interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, n. ja, 2023.

QI, T. *et al.* Stripe rust effector PstGSRE1 disrupts nuclear localization of ROS-promoting transcription factor TaLOL2 to defeat ROS-induced defense in wheat. **Molecular Plant**, v. 12, n. 12, p. 1624-1638, 2019b.

RASOOL, K.G. *et al.* Optimization of protein isolation from date palm plants and its utilization in differential proteomics associated with red palm weevil infestation. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v. 51, n. 4, 2014.

REIS, E.M.; BRESOLIN, A.C.R. & CARMONA, M. **Doenças da soja In: ferrugem asiática**. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 48 p., 2006.

ROCHA, M. *et al.* Analysis of alanine aminotransferase in various organs of soybean (*Glycine max*) and in dependence of different nitrogen fertilisers during hypoxic stress. **Amino Acids**, v. 39, p. 1043-1053, 2010.

ROSAHL, S. & FEUSSNER, I. Oxylipins. In: **Plant lipids**. Blackwell, 2020. p. 329-354.

SEIFERT, G.J. Nucleotide sugar interconversions and cell wall biosynthesis: how to bring the inside to the outside. **Current opinion in plant biology**, v. 7, n. 3, p. 277-284, 2004.

SHI, B. *et al.* Wheat thioredoxin (*TaTrxh1*) associates with RD19-like cysteine protease TaCP1 to defend against stripe rust fungus through modulation of programmed cell death. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 34, n. 4, p. 426-438, 2021.

SHEVCHENKO, A. *et al.* In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856, 2006.

SIGAL, L.J. *et al.* Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. **Nature**, v. 398, n. 6722, p. 77-80, 1999.

SINGH, R. & CRESSWELL, P. Defective cross-presentation of viral antigens in GILT-free mice. **Science**, v. 328, n. 5984, p. 1394-1398, 2010.

TAUZIN, A.S. & GIARDINA, T. Sucrose and invertases, a part of the plant defense response to the biotic stresses. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 86818, 2014.

THAKUR, M & UDAYASHANKAR, A.C. Lipoxygenases and their function in plant innate mechanism. **Bioactive Molecules in Plant Defense: Signaling in Growth and Stress**, p. 133-143, 2019.

TIMM, S. *et al.* T-protein is present in large excess over the other proteins of the glycine cleavage system in leaves of Arabidopsis. **Planta**, v. 247, p. 41-51, 2018.

TORUÑO, T.Y.; STERGIPOULOS, I. & COAKER, G. Plant-pathogen effectors: cellular probes interfering with plant defenses in spatial and temporal manners. **Annual review of phytopathology**, v. 54, p. 419-441, 2016.

UTIYAMA, A.S. **Caracterização funcional de proteínas candidatas a efetores de *Phakopsora pachyrhizi***. 86 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR. 2020.

VARELA, A.L.N. *et al.* A resistant cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) genotype became susceptible to cowpea severe mosaic virus (CPSMV) after exposure to salt stress. **Journal of proteomics**, v. 194, p. 200-217, 2019.

VISWANATH, K.K. *et al.* Plant lipoxygenases and their role in plant physiology. **Journal of Plant Biology**, v. 63, p. 83-95, 2020.

XU, G. *et al.* A fungal effector targets a heat shock–dynamin protein complex to modulate mitochondrial dynamics and reduce plant immunity. **Science advances**, v. 6, n. 48, p. eabb7719, 2020.

YORINORI, J.T. *et al.* Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease**, v. 89, n. 6, p. 675-677, 2005.

YUAN, M. *et al.* PTI-ETI crosstalk: an integrative view of plant immunity. **Current opinion in plant biology**, v. 62, p. 102030, 2021.

WANG, S. *et al.* Cleavage of a pathogen apoplastic protein by plant subtilases activates host immunity. **New Phytologist**, v. 229, n. 6, p. 3424-3439, 2021.

WANG, Y. *et al.* A stripe rust fungal effector PstSIE1 targets TaSGT1 to facilitate pathogen infection. **The Plant Journal**, v. 112, n. 6, p. 1413-1428, 2022.

WEI, H. *et al.* Identification and Characterization of an OSH1 Thiol Reductase from *Populus trichocarpa*. **Cells**, v. 9, n. 1, p. 76, 2019.

WEST, L.C. & CRESSWELL, P. Expanding roles for GILT in immunity. **Current opinion in immunology**, v. 25, n. 1, p. 103-108, 2013.

ZENG, F. *et al.* Physiological and proteomic alterations in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings under hexavalent chromium stress. **Planta**, v. 240, p. 291-308, 2014.

ZENG, T. *et al.* A lysin motif effector subverts chitin - triggered immunity to facilitate arbuscular mycorrhizal symbiosis. **New Phytologist**, v. 225, n. 1, p. 448-460, 2020.

ZHAO, J. *et al.* A comparative proteomics analysis of soybean leaves under biotic and abiotic treatments. **Molecular biology reports**, v. 40, p. 1553-1562, 2013.

MORKUNAS, I. & RATAJCZAK, L. The role of sugar signaling in plant defense responses against fungal pathogens. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, p. 1607-1619, 2014.

NATALE, R. *et al.* In silico and in vitro approaches allow the identification of the Prosystemin molecular network. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 21, p. 212-223, 2023.

NIÑO, M. *et al.* Key roles of cysteine protease in different plant pathosystem. **Plant breeding and biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 97-109, 2014.

OKAMURA-IKEDA, K. *et al.* Crystal structure of aminomethyltransferase in complex with dihydrolipoyl-H-protein of the glycine cleavage system: implications for recognition of lipoyl protein substrate, disease-related mutations, and reaction mechanism. **Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 24, p. 18684-18692, 2010.

PÉREZ-LÓPEZ, E. *et al.* A clubroot pathogen effector targets cruciferous cysteine proteases to suppress plant immunity. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 2327-2340, 2021.

PETRE, B., JOLY, D. L., & DUPLESSIS, S. Effector proteins of rust fungi. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 416, 2014.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W. & DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 9, p. e36-e36, 2002.

PRASAD, P. *et al.* Rust pathogen effectors: perspectives in resistance breeding. **Planta**, v. 250, n. 1, p. 1-22, 2019.

QI, M. *et al.* A small cysteine-rich protein from the Asian soybean rust fungus, *Phakopsora pachyrhizi*, suppresses plant immunity. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 9, p. e1005827, 2016.

QI, M. *et al.* Insights into *Phakopsora pachyrhizi* effector-effector interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, n. ja, 2023.

RASOOL, K.G. *et al.* Optimization of protein isolation from date palm plants and its utilization in differential proteomics associated with red palm weevil infestation. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v. 51, n. 4, 2014.

ROCHA, M. *et al.* Analysis of alanine aminotransferase in various organs of soybean (*Glycine max*) and in dependence of different nitrogen fertilisers during hypoxic stress. **Amino Acids**, v. 39, p. 1043-1053, 2010.

ROSAHL, S. & FEUSSNER, I. Oxylipins. In: **Plant lipids**. Blackwell, 2020. p. 329-354.

SEIFERT, G.J. Nucleotide sugar interconversions and cell wall biosynthesis: how to bring the inside to the outside. **Current opinion in plant biology**, v. 7, n. 3, p. 277-284, 2004.

SHI, B. *et al.* Wheat thioredoxin (*TaTrxh1*) associates with RD19-like cysteine protease *TaCP1* to defend against stripe rust fungus through modulation of programmed cell death. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 34, n. 4, p. 426-438, 2021.

SHEVCHENKO, A. *et al.* In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856, 2006.

SIGAL, L.J. *et al.* Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. **Nature**, v. 398, n. 6722, p. 77-80, 1999.

SINGH, R. & CRESSWELL, P. Defective cross-presentation of viral antigens in GILT-free mice. **Science**, v. 328, n. 5984, p. 1394-1398, 2010.

TAUZIN, A.S. & GIARDINA, T. Sucrose and invertases, a part of the plant defense response to the biotic stresses. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 86818, 2014.

THAKUR, M & UDAYASHANKAR, A.C. Lipoxygenases and their function in plant innate mechanism. **Bioactive Molecules in Plant Defense: Signaling in Growth and Stress**, p. 133-143, 2019.

TIMM, S. *et al.* T-protein is present in large excess over the other proteins of the glycine cleavage system in leaves of Arabidopsis. **Planta**, v. 247, p. 41-51, 2018.

UTIYAMA, A.S. **Caracterização funcional de proteínas candidatas a efetores de *Phakopsora pachyrhizi***. 2020. 86 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

VARELA, A.L.N. *et al.* A resistant cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) genotype became susceptible to cowpea severe mosaic virus (CPSMV) after exposure to salt stress. *Journal of proteomics*, v. 194, p. 200-217, 2019.

VISWANATH, K.K. *et al.* Plant lipoxygenases and their role in plant physiology. **Journal of Plant Biology**, v. 63, p. 83-95, 2020.

YUAN, M. *et al.* PTI-ETI crosstalk: an integrative view of plant immunity. **Current opinion in plant biology**, v. 62, p. 102030, 2021.

WANG, S. *et al.* Cleavage of a pathogen apoplastic protein by plant subtilases activates host immunity. **New Phytologist**, v. 229, n. 6, p. 3424-3439, 2021.

WEI, H. *et al.* Identification and Characterization of an OSH1 Thiol Reductase from *Populus trichocarpa*. **Cells**, v. 9, n. 1, p. 76, 2019.

ZENG, F. *et al.* Physiological and proteomic alterations in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings under hexavalent chromium stress. **Planta**, v. 240, p. 291-308, 2014.

ZENG, T. *et al.* A lysin motif effector subverts chitin - triggered immunity to facilitate arbuscular mycorrhizal symbiosis. **New Phytologist**, v. 225, n. 1, p. 448-460, 2020.

ZHAO, J. *et al.* A comparative proteomics analysis of soybean leaves under biotic and abiotic treatments. **Molecular biology reports**, v. 40, p. 1553-1562, 2013.