

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

Identificação de alvos de interação do efator Phapa-6409670 de *Phakopsora pachyrhizi* em soja

Gabriele Lopes Knop
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

GABRIELE LOPES KNOP

Identificação de alvos de interação do efector Phapa-6409670 de *Phakopsora pachyrhizi* em soja

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biotecnologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Luciano Gomes Fietto

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

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

T

Knop, Gabriele Lopes, 1999-
K72i Identificação de alvos de interação do efetor
2025 Phapa-6409670 de *Phakopsora pachyrhizi* em soja / Gabriele
Lopes Knop. – Viçosa, MG, 2025.
1 dissertação eletrônica (49 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Luciano Gomes Fietto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2025.

Referências bibliográficas: f. 46-49.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.701>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Ferrugem da soja (Doença) - Aspectos genéticos. 2. Soja
- Genética. 3. Ferrugem asiática. 4. Interação proteína-proteína.
I. Fietto, Luciano Gomes, 1973-. II. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biotecnologia.
III. Título.

CDD 22. ed. 633.349492

GABRIELE LOPES KNOP

Identificação de alvos de interação do efetor Phapa-6409670 de *Phakopsora pachyrhizi* em soja

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biotecnologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 31 de julho de 2025.

Assentimento:

Gabriele Lopes Knop
Autora

Luciano Gomes Fietto
Orientador

Essa dissertação foi assinada digitalmente pela autora em 28/10/2025 às 09:34:25 e pelo orientador em 28/10/2025 às 09:58:48. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **ZAKS.CCPK.6TH8** e clique no botão 'Validar documento'.

Dedico à minha família, que sempre me apoiou, e a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

A jornada durante o mestrado foi repleta de desafios, aprendizados e conquistas. Certamente essa caminhada não foi fácil, e chegar até aqui só foi possível com o apoio de pessoas essenciais em minha vida, para as quais escrevo esse singelo agradecimento com o coração transbordando de gratidão.

Agradeço a Deus, por ser meu refúgio e proteção, a força necessária para eu persistir na busca dos meus objetivos. Sua presença é constante. A fé sempre me guiou e seguirá me direcionando no caminho certo.

Agradeço à toda minha família, principalmente meu pai César, minha mãe Dileuza, meu irmão Kaio, minha irmã Anna Carolina e minha avó Expedita. Vocês foram fundamentais nessa jornada e são tudo pra mim. Obrigada por sempre me incentivarem e me levantarem quando caí. Obrigada por me acolherem durante meus choros e compartilharem comigo inúmeros sorrisos. Obrigada por todas as orações e saibam que sem vocês eu jamais teria conseguido.

Agradeço aos meus amigos, aqueles desde a infância até os que conheci na UFV. Que coisa boa é dividir a vida com vocês. Obrigada por estarem comigo, torcendo pelas minhas vitórias nos jogos e, principalmente, na vida. Um agradecimento especial a minha mais que amiga Mônica (Iaiá) por nunca soltar a minha mão e também a Sara, Luana, Livia, Luiza e Nicole pelas palavras de encorajamento e por compartilharem tantos momentos comigo.

Agradeço à UFV e ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biotecnologia pela oportunidade de realizar o meu mestrado em uma instituição tão aclamada.

Agradeço ao meu orientador, professor Luciano Gomes Fietto, por todo ensinamento ao longo do mestrado e pela pronta atenção que sempre me disponibilizou quando precisei. Obrigada por me receber tão bem no laboratório e ter me orientado na realização dos experimentos.

Agradeço à minha amiga e pós doc do laboratório, Thays Vieira Bueno, por ter me explicado, instruído e me permitido aprender tanto com a sua ajuda. Certamente sua participação efetiva foi essencial para que eu conseguisse chegar até aqui.

Agradeço à Francismar Corrêa Marcelino-Guimarães pelo auxílio durante o

mestrado e apoio incondicional durante minha estadia no laboratório da Embrapa Soja em Londrina.

Agradeço à toda equipe do Laboratório de Biotecnologia Molecular pelas contribuições e pela troca constante de conhecimentos, em especial Lilian e Ananda, por toda paciência e disponibilidade.

Agradeço a todos os membros do laboratório da Embrapa Soja em Londrina, em especial a Adriana Brombini e Bruna Avelino pelo suporte nos experimentos realizados na Embrapa.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro.

Um ciclo se encerra para que outro, ainda melhor, possa ter início. Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização do presente trabalho, deixando meu mais profundo “obrigada”. Essa conquista foi construída com a participação essencial de todos vocês.

“O progresso da ciência depende de novas técnicas, novos desafios e novas ideias, porém o progresso real ocorre quando as novas ideias encontram pessoas dispostas a ouvi-las.”
(Carl Sagan)

RESUMO

KNOP, Gabriele Lopes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2025. **Identificação de alvos de interação do efector Phapa-6409670 de *Phakopsora pachyrhizi* em soja.** Orientador: Luciano Gomes Fietto.

A soja é o principal produto exportado pelo Brasil, entretanto, essa cultura é afetada significativamente pela doença chamada ferrugem asiática, causada pelo fungo biotrófico *Phakopsora pachyrhizi*. A infecção ocorre por meio da secreção de proteínas efetoras do fungo na planta. Esses efetores são responsáveis por mitigar a resposta de defesa do hospedeiro levando à suscetibilidade desencadeada por efetores. Algumas medidas já são implementadas para reverter esse cenário, como o vazio sanitário aliado ao uso de fungicidas e, ainda, cultivares com genes de resistência. Contudo, *Phakopsora pachyrhizi* possui elevada variabilidade genética, dificultando o seu controle. O objetivo deste projeto foi identificar as proteínas da soja que interagem com o efector Phapa-6409670 do fungo *P. pachyrhizi*, visando ampliar o conhecimento sobre a interação soja-*Phakopsora* e permitir a produção de cultivares de soja com resistência durável. Por meio da técnica de duplo híbrido de leveduras foi realizada uma triagem de uma biblioteca de cDNA oriundas de folhas de soja infectadas por *P. pachyrhizi*, em que o efector Phapa-6409670 foi utilizado como isca. A triagem resultou no isolamento de 23 clones. Destes 23 clones iniciais, 5 apresentaram interação forte. Para identificação dos possíveis parceiros de interação, os plasmídeos foram extraídos destes 5 clones e sequenciados. A análise das sequências mostrou que apenas um dos clones estava *in frame* com o domínio de ligação ao DNA de GAL4. A partir de comparações das sequências via BLASTn nos bancos de dados NCBI, identificou-se a proteína KOG3188 *Uncharacterized conserved protein* (Glyma.08G331200) como um candidato de interação do efector Phapa-6409670. Esta proteína, apesar de preservada evolutivamente, não se é conhecido ainda seu papel biológico, reforçando a relevância deste estudo. A ocorrência da interação dela com o efector fúngico sugere seu papel funcional na resposta da planta à infecção. Além disso, ela possui um domínio DUF 106, que atua nas respostas ao estresse de plantas, podendo modular vias de sinalização relacionadas ao metabolismo vegetal e à resistência.

Palavras-chave: efetores fúngicos; ferrugem asiática da soja; interação proteína-proteína; *Glycine max* (L). Merr.

ABSTRACT

KNOP, Gabriele Lopes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2025. **Identification of interaction targets of the effector Phapa-6409670 from *Phakopsora pachyrhizi* in soybean.** Adviser: Luciano Gomes Fietto.

Soybeans are Brazil's main export; however, this crop is significantly affected by Asian rust, a disease caused by the biotrophic fungus *Phakopsora pachyrhizi*. Infection occurs through the secretion of the fungus's effector proteins in the plant. These effectors mitigate the host defense response, leading to effector-triggered susceptibility. Some measures are already being implemented to reverse this situation, such as a sanitary break combined with the use of fungicides and cultivars with resistance genes. However, *Phakopsora pachyrhizi* has high genetic variability, making its control difficult. The objective of this project was to identify the soybean proteins that interact with the Phapa-6409670 effector of the fungus *P. pachyrhizi*, aiming to expand knowledge about the soybean-*Phakopsora* interaction and enable the production of soybean cultivars with durable resistance. Using the yeast two-hybrid technique, a cDNA library from soybean leaves infected with *P. pachyrhizi* was screened, using the effector Phapa-6409670 as bait. The screening resulted in the isolation of 23 clones. Of these 23 initial clones, 5 exhibited strong interaction. To identify potential interaction partners, plasmids were extracted from these 5 clones and sequenced. Sequence analysis showed that only one of the clones was in frame with the GAL4 DNA-binding domain. Based on sequence comparisons via BLASTn in the NCBI databases, the protein KOG3188 (Uncharacterized conserved protein) (Glyma.08G331200) was identified as a candidate interaction for the effector Phapa-6409670. Although evolutionarily preserved, its biological role is still unknown, reinforcing the relevance of this study. The interaction between the β -actin and the fungal effector suggests its functional role in the plant's response to infection. Furthermore, it possesses a DUF 106 domain, which functions in plant stress responses and may modulate signaling pathways related to plant metabolism and resistance.

Keywords: fungal effects; asian soybean rust; protein-protein interaction; *Glycine max* (L). Merr.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO /JUSTIFICATIVA.....	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1	Ferrugem asiática da soja.....	13
2.2	Moléculas efetoras.....	15
2.3	Sistema duplo híbrido de leveduras.....	17
2.4	Interações proteína-proteína em respostas planta-patógeno.....	19
3	OBJETIVOS.....	21
3.1	Objetivo geral.....	21
3.2	Objetivos específicos.....	21
4	METODOLOGIA.....	22
4.1	Técnicas básicas de bioquímica e biologia molecular.....	22
4.2	Perfil de expressão do efector Phapa-6409670 de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> durante o ciclo infeccioso.....	22
4.3	Extração de RNA total e síntese de cDNA.....	22
4.4	RT-qPCR.....	23
4.5	Clonagem dos genes efetores candidatos.....	24
4.6	Ensaio de transativação.....	25
4.7	Duplo híbrido de leveduras.....	26

4.8	Análises <i>in silico</i>	27
4.9	Predição de estruturas proteicas com AlphaFold Server.....	27
5	RESULTADOS.....	29
5.1	Expressão do efetor Phapa-6409670 durante o ciclo infeccioso.....	29
5.2	Identificação de proteína de soja como alvo de interação do efetor Phapa-6409670.....	30
5.3	Análises <i>in silico</i>	36
5.4	Predição da estrutura tridimensional do efetor Phapa-6409670 e da proteína KOG 3188.....	38
6	DISCUSSÃO.....	41
7	CONCLUSÕES.....	45
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

1 INTRODUÇÃO / JUSTIFICATIVA

A soja é extremamente importante para o comércio internacional brasileiro, sendo o principal produto exportado pelo país. De acordo com dados da Companhia Nacional de Abastecimento, CONAB, a produção dessa cultura no Brasil, na safra 2024/25, representou cerca de 169,49 milhões de toneladas, possuindo uma área plantada de 47,61 milhões de hectares. Porém, atingir alta produtividade tem sido desafiador para os produtores de soja, uma vez que essa *commodity* é significativamente afetada pela ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*.

Phakopsora pachyrhizi consiste em um parasita obrigatório (precisa de um hospedeiro vivo para completar seu ciclo de vida) responsável por causar essa doença grave que leva à desfolha precoce em cultivares de soja, impedindo também a completa formação dos grãos e, conseqüentemente, reduzindo a produtividade (Beruski et al., 2019). Esse fungo biotrófico penetra diretamente através da cutícula e epiderme, colonizando a folha e secretando proteínas efetoras capazes de modificar determinados processos celulares do hospedeiro (Godoy et al., 2016). Sendo assim, é possível que ocorra a supressão das respostas de defesa do hospedeiro, facilitando a infecção.

Apesar da importância do estudo deste patógeno, havia poucas informações sobre sua composição genética. Os primeiros estudos foram a partir de análises de transcriptoma de *Phakopsora* durante interações com a soja (Rincão et al., 2018). As sequências obtidas permitiram uma visão geral de genes e vias biológicas ativas no fungo durante o processo infeccioso. Buscando entender melhor esse patossistema, foram realizadas montagens de alta qualidade do genoma e transcriptoma de *Phakopsora pachyrhizi*, com anotações genômicas de três isolados desse fungo, descobrindo um genoma de até 1,25 Gb (Gupta et al., 2023). A partir deste estudo, torna-se mais fácil a compreensão sobre os mecanismos de ação deste patógeno, visto que o genoma agora é conhecido.

De Carvalho et al. (2017) utilizaram experimentos de microdissecção por captura a laser (LCM), RNAseq e um *pipeline* de bioinformática para a identificação de 36.350 contigs de *Phakopsora pachyrhizi*, expressos em planta, e realizaram a predição de 851 proteínas secretadas pelo patógeno e que possuem possível ação nas células do hospedeiro. Na sequência, fizeram análises *in silico* para encontrar, dentre elas, características comuns a proteínas efetoras de *P. pachyrhizi*, sendo identificadas 13 famílias multigênicas.

O transcrito de_novo_1216, identificado por De Carvalho et al. (2017), foi funcionalmente caracterizado por meio dos ensaios de supressão das respostas imunológicas de PTI e ETI em *Nicotiana benthamiana*, conforme demonstrado por Utiyama (2020). Neste trabalho, verificou-se que o efector de_novo_1216 apresentou localização subcelular no núcleo da planta, indicando possível papel em processos celulares. O fato de ser exclusivo da espécie *Phakopsora pachyrhizi* indica que esse efector pode estar envolvido em mecanismos evolutivos específicos, relacionados à adaptação do patógeno para suprimir o sistema de defesa do hospedeiro. A expressão gênica desse efector foi detectada em genótipos de soja suscetível, com indução observada nos tempos de 8 e 12 dias após a inoculação do fungo.

Com o avanço nos dados genômicos de *Phakopsora pachyrhizi*, foi possível verificar a presença desse gene nos três genomas disponíveis. No genoma do isolado MT2006 (versão 1, JGI), o modelo gênico correspondente é o Phapa-6409670 que possui 1.259 nucleotídeos e codifica uma proteína predita de 262 aminoácidos, composta por 7 éxons, 6 íntrons e contendo 3,82% de cisteína. Além disso, há um peptídeo sinal nos primeiros 21 aminoácidos e um domínio conservado do tipo Y/F/WxC (especificamente YAC), localizado na posição 189 (Utiyama, 2020). Esse domínio conservado de ferrugem está associado à translocação de efetores através da membrana extra-haustorial fúngica para dentro das células da planta (Godfrey et al., 2010).

Visto a importância do papel desse efector, o intuito deste trabalho consiste em aprofundar o conhecimento sobre como o fungo *Phakopsora pachyrhizi* atua manipulando a resposta de defesa da planta *Glycine max*. Desse modo, o entendimento das interações planta-patógeno é de fundamental importância. Estudos recentes identificaram proteínas da soja como alvo de interação de efetores desse fungo, contribuindo para a supressão das respostas imunes da planta e para a virulência do patógeno (Bueno et al., 2024; Chicowski et al., 2023).

A partir disso, tem-se como objetivo identificar proteínas de soja que sejam alvo de interação do efector Phapa-6409670 utilizando o sistema de duplo híbrido de leveduras como ferramenta biotecnológica. Tais evidências serão fundamentais para possibilitar o desenvolvimento de formas alternativas de controle que promovam uma resistência de amplo espectro e durável, permitindo o controle efetivo deste patógeno.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ferrugem asiática da soja

Um estudo publicado pelo Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (Ipea) demonstrou que a soja (*Glycine max*) é fundamental para o desenvolvimento econômico do Brasil, fazendo parte de uma cadeia produtiva complexa e que abrange vários setores. Esse grão é muito importante para o consumo interno mas, principalmente, para o comércio internacional brasileiro, sendo o principal produto exportado pelo país. De acordo com dados da Companhia Nacional de Abastecimento, CONAB, a produção desse cultivo no Brasil, na safra 2024/25, representou cerca de 169,49 milhões de toneladas, possuindo uma área plantada de 47,61 milhões de hectares. Enquanto isso, no mundo, a produção dessa commodity foi de aproximadamente 420,78 milhões de toneladas, dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos.

Entretanto, observa-se que essa cultura é significativamente afetada pela ferrugem asiática da soja (FAS), uma das doenças mais graves que acometem a planta, sendo causada pelo fungo biotrófico *Phakopsora pachyrhizi* (Godoy et al., 2016). Esse parasita obrigatório é responsável por infectar os tecidos da planta, de modo especial as folhas, deixando lesões visíveis de coloração marrom e de, aproximadamente, dois a cinco milímetros de diâmetro (Seixas et al., 2018). O desenvolvimento dos sintomas da ferrugem asiática da soja se inicia nas folhas inferiores e progride gradualmente, formando lesões marrom-acinzentadas que, posteriormente, se tornarão bronzeadas e escuras (Figura 1) (Hossain et al., 2023). Quando em condições ambientais favoráveis, ocorre a proliferação do microrganismo, que quando não contido adequadamente pode levar a perdas significativas de rendimento do plantio, podendo chegar de 80% a 90%, ocasionando a desfolha precoce e, conseqüentemente, reduzindo a produção e a qualidade dos grãos de soja (Beruski et al., 2019).

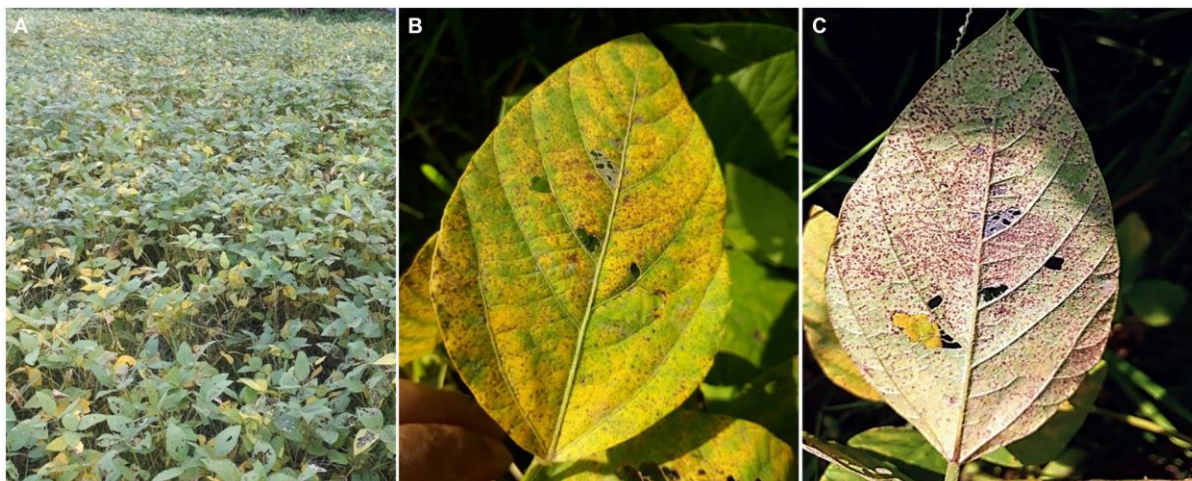


Figura 1 - Sintomas da ferrugem asiática da soja. (A) Observa-se um campo severamente infectado pela doença. (B) Folha amarelada infectada por FAS. (C) Esporulação significativa de *Phakopsora pachyrhizi* na folha (estágio mais avançado). Fonte: Hossain et al., 2023.

Muitas estratégias de controle da ferrugem asiática da soja já são empregadas, tais como o estabelecimento de vazios sanitários e emprego de cultivares precoces (Godoy et al., 2016). Além disso, os fungicidas têm sido o principal método utilizado para proteger a soja de tal infecção. Contudo, esse controle químico não se apresenta completamente eficaz, visto que é dependente também de outros fatores (Mueller et al., 2009). Um outro ponto consiste na alta taxa de variabilidade que este patógeno apresenta, ocorrendo um favorecimento da chamada “pressão de seleção”, por meio da qual os patógenos resistentes são selecionados (Yorinori; Junior; Lazzarotto, 2004). Logo, observa-se um aumento da resistência ou ainda uma diminuição da sensibilidade do fungo para com os fungicidas já utilizados (Godoy et al., 2016).

O fungo *Phakopsora pachyrhizi* possui ampla gama de hospedeiros, podendo infectar mais de 150 espécies, o que se torna um fator facilitador para sua dispersão em diferentes ambientes e permite afirmar a importância de se estudar este patógeno. É possível notar, porém, que a resistência do hospedeiro consiste em uma ferramenta valiosa para o controle deste microrganismo (Childs et al., 2018).

Sendo assim, tem-se então uma outra opção estratégica para tentar controlar a doença, que consiste no uso de uma fonte natural de resistência contida em genes presentes na soja (Godoy et al., 2016). Ocorre assim uma interação entre genes de resistência específicos da planta para *Phakopsora pachyrhizi* (RPP-P), com genes de avirulência do patógeno, gerando a imunidade desencadeada por efetor (Dodds e Rathjen, 2010). Atualmente, tem-se sete genes

de resistência à *P. pachyrhizi* dominantes (*Rpp*) identificados em soja, *Rpp* 1 a *Rpp* 7 (Bromfield e Hartwig 1980; Childs et al. 2018; Garcia et al., 2008; Hartwig 1986; Hidayat e Somaatmadja 1977; Li et al., 2012).

Entretanto, embora esses genes contribuam para a resistência da soja, eles não são capazes de conferir proteção abrangente contra todas as populações de *Phakopsora pachyrhizi*, em razão da elevada variabilidade genética apresentada por este patógeno. Ainda assim, a resistência genética é reconhecida como uma das estratégias mais eficientes e sustentáveis no manejo da ferrugem asiática da soja. Diante da complexidade envolvida no desenvolvimento de cultivares resistentes, torna-se imprescindível a realização de estudos aprofundados que elucidem os mecanismos moleculares e fisiológicos subjacentes à interação entre a planta hospedeira e o fungo.

2.2 Moléculas efetoras

Ao longo do tempo, as plantas desenvolveram duas estratégias principais para realizar a detecção de patógenos (Dodds e Rathjen, 2010). A primeira ocorre na superfície da célula hospedeira, onde moléculas microbianas conservadas (conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos - PAMPs) são identificadas por meio de proteínas receptoras. Essa interação ativa a chamada imunidade mediada por PAMP (PTI). Já a segunda estratégia envolve receptores intracelulares responsáveis pela detecção de moléculas de virulência dos patógenos, conhecidas como efetores. Esse processo resulta na ativação da imunidade mediada por efetores (ETI), um mecanismo geralmente mais robusto e que confere uma resposta imune intensificada. Sendo assim, tem-se que as moléculas efetoras são aquelas proteínas secretadas pelo patógeno no hospedeiro em questão como parte do processo de infecção (Dodds e Rathjen, 2010). A determinação do funcionamento desses efetores torna-se essencial para a melhor compreensão dos mecanismos de patogenicidade e também para o desenvolvimento de métodos eficazes de controle de doenças (Petre et al., 2015).

De Carvalho et al. (2017) utilizaram experimentos de microdissecção por captura a laser (LCM), RNAseq e um *pipeline* de bioinformática para a identificação de 36.350 *contigs* de *Phakopsora pachyrhizi* expressos em planta e realizaram a predição de 851 proteínas secretadas pelo patógeno e que possuem possível ação nas células do hospedeiro. Na sequência,

fizeram análises *in silico* para encontrar, dentre elas, características comuns a efetores. Dentre estas características estão tamanho pequeno, alta quantidade de resíduos de cisteína, presença de peptídeo sinal, domínio conservado e ausência de anotação funcional (Qi et al., 2018). O transcrito de_novo_1216 identificado por De Carvalho et al. (2017) foi validado funcionalmente por meio dos ensaios de supressão de PTI e ETI em *Nicotiana benthamiana* (Utiyama, 2020), sendo que o modelo gênico correspondente ao de_novo_1216 é o Phapa-6409670 no genoma MT2006 v.1 (JGI).

Dentre os efetores de *P. pachyrhizi* já identificados na literatura, tem-se que o primeiro descrito foi o efector PpEC23, que suprime a resposta de defesa da planta e interage com o fator de transcrição codificado pelo gene GmSPL121, que é um gene relacionado com as respostas de defesa da soja (Qi et al., 2016). Posteriormente, foi descrito outro efector de *Phakopsora*, denominado de Phapa-7431740, que interage com uma proteína relacionada à patogênese da família PR-2 (Beta-glucanase) (Bueno et al., 2022). Essa interação foi identificada por meio da técnica de duplo híbrido de leveduras e validada por ensaio de *pull-down*; além disso, foi verificada a inibição dessa enzima na presença do efector no meio. Utilizando o ensaio de duplo híbrido de leveduras e a marcação por proximidade, um outro estudo identificou supostos parceiros de interação do efector de *Phakopsora* (PpEC15), incluindo um fator de liberação de cadeia peptídica (PCRF), um fator de transcrição NAC83 (NAM, ATAF e CUC) e uma DAHP (3-desoxi-7-fosfoheptulonato) sintase (Chicowski et al., 2023).

Os efetores produzidos por patógenos desempenham funções variadas e essenciais nas interações planta-patógeno, influenciando a virulência em ambientes hospedeiros complexos (Qi et al., 2024). Os autores previamente mencionados investigaram as interações entre efetores candidatos de *Phakopsora pachyrhizi* (PpECs), identificados por análise do transcriptoma haustorial. Descobriu-se que o PpEC23 interage com o PpEC48, levando à exploração de suas interações com outras proteínas. Por meio de um ensaio de duplo híbrido de leveduras e complementação de luciferase, confirmou-se que essas interações ocorrem em células de soja. Notavelmente, o PpEC48 apresentou afinidade por pequenas proteínas ricas em cisteínas (SCRPs), mediada por um domínio rico em histidina, ressaltando o papel de motivos estruturais específicos. Esses achados oferecem novas perspectivas sobre as redes de interação entre efetores de *P. pachyrhizi*.

Devido a toda complexidade na compreensão do papel desses efetores, verifica-se a importância da caracterização dos efetores candidatos identificados. Para tanto, é essencial

investigar as interações que ocorrem entre proteínas, identificando, portanto, como ocorre essa interação planta-patógeno. Dessa forma pode-se compreender melhor os mecanismos de ação das moléculas efetoras e também os impactos no sistema do hospedeiro, objetivando diminuí-los.

2.3 Sistema duplo híbrido de leveduras

As interações proteína-proteína são parte fundamental para a ocorrência de processos biológicos e, em especial, são indispensáveis em diversas vias de sinalização celular (Castel et al., 2021). O sistema duplo híbrido de leveduras consiste em uma ferramenta genética muito importante utilizada para o estudo das interações entre proteínas. Esse modelo foi descrito em 1989 por Fields e Song, sendo gerado um novo sistema genético baseado nas propriedades do ativador transcricional GAL4 da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Essa tecnologia pode ter diferentes aplicações, dentre elas estão a identificação de possíveis parceiros de interação, a confirmação de interações suspeitas e também a definição de domínios que interagem entre si (Lin e Lai, 2023).

O fator de transcrição GAL4 possui dois domínios funcionais independentes: um domínio de ligação ao DNA (*binding domain* - BD) e um domínio de ativação transcricional (*activation domain* - AD). Nos experimentos a serem realizados, as proteínas de interesse, denominadas comumente de “iscas” e “presas”, são fundidas separadamente aos domínios de ligação e de ativação, respectivamente. No momento em que ocorre a interação dessas proteínas, os domínios encontram-se próximos, o que permite então a ativação do processo transcricional de um gene repórter específico, com o recrutamento da maquinaria necessária para o processo (Fields e Song, 1989), que pode ser verificado na figura 2 a seguir.

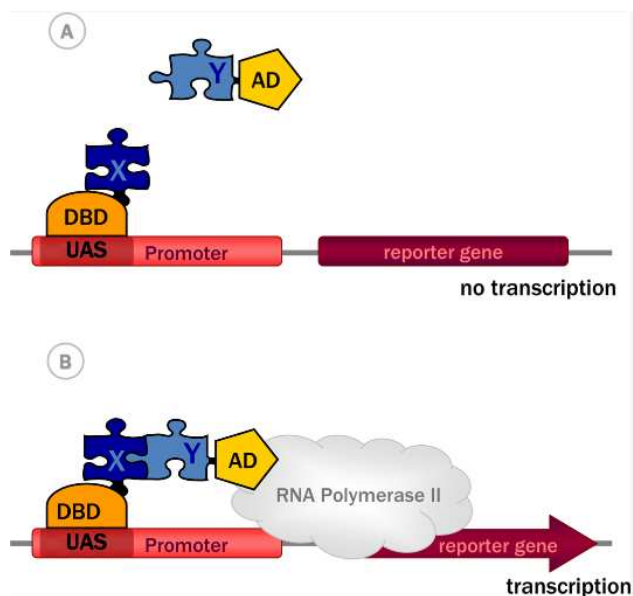


Figura 2 – Funcionamento do sistema clássico de duplo híbrido de leveduras. Fonte: Adaptado de Brückner et al., 2009.

Além da ativação de genes repórteres, isto também é verificado para marcadores selecionáveis. Como exemplo, tem-se o gene repórter dependente de interação HIS3, responsável por permitir o crescimento de leveduras em meio de cultura carente dessa substância. Isso possibilita a seleção de colônias positivas para HIS3 e que expressam proteínas que interagem entre si (Vidalain et al., 2015).

Esta técnica de duplo híbrido de leveduras é amplamente utilizada pois apresenta vantagens significativas, como a capacidade de identificação de interações proteicas *in vivo* e, conseqüentemente, em sua conformação original. Além disso, tem custo relativamente baixo quando comparada a outras metodologias, não exige equipamentos complexos e possui alto rendimento (Brückner et al., 2009). Entretanto, o método também possui limitações, como a geração de falsos positivos (biológicos e/ou técnicos), sendo as interações físicas detectadas na triagem em leveduras mas que não são reproduzíveis em um sistema de forma independente. Também pode ocorrer a presença de falsos negativos, nos quais as interações entre proteínas não são detectadas por serem sensíveis a alguma etapa na construção do sistema ou devido a falhas no processo de triagem (Brückner et al., 2009; Ito et al., 2002). Sendo assim, observa-se então a necessidade de validação dessa interação verificada pelo método, que pode ocorrer por meio de outros ensaios, utilizando preferencialmente métodos bioquímicos como ensaio *pull*

down e imunoprecipitação, além de métodos *in vivo/in situ* (colocalização, imunohistoquímica, entre outros) (Brückner et al., 2009; Fields, 2005).

Por meio do uso de técnicas biotecnológicas, como o sistema duplo híbrido de leveduras, é possível encontrar proteínas de soja que interajam com efetores de *Phakopsora pachyrhizi*, permitindo maiores e mais completos estudos sobre esse patossistema, além da criação de estratégias que promovam uma resistência duradoura para o controle deste patógeno.

2.4 Interações proteína-proteína em respostas planta-patógeno

A interação entre a soja e o fungo *Phakopsora pachyrhizi* representa um modelo importante para o entendimento dos mecanismos moleculares de patogênese em plantas. Estudos recentes identificaram proteínas da soja que interagem com efetores desse fungo, contribuindo para a supressão das respostas imunes das plantas e também para a virulência deste patógeno (Bueno et al., 2024; Chicowski et al., 2023).

Em soja, Cooper et al. (2011) realizaram uma proteômica nuclear comparativa entre uma cultivar suscetível (*Williams 82*) e um isolado resistente portador do gene *Rpp1*. Usando espectrometria de massas em amostras de núcleo, identificaram cerca de 4.975 proteínas, dentre as quais várias apresentaram mudanças significativas na abundância após a infecção pelo patógeno *Phakopsora pachyrhizi*. Essas proteínas incluem fatores de transcrição, moduladores de reparo de DNA, sinalização e regulação epigenética, reforçando que o gene de resistência *Rpp1* influencia amplamente o proteoma nuclear durante a resposta à ferrugem asiática da soja (Cooper et al., 2011).

Conforme observado, a compreensão das interações proteína-proteína entre plantas e patógenos tem sido fundamental para desvendar os mecanismos moleculares de resistência vegetal. Em cereais como trigo infectado por *Fusarium graminearum*, foi construída uma biblioteca de cDNA utilizando duplo híbrido de leveduras de alta qualidade a partir de tecidos infectados. A triagem com a proteína PFT (*pore-forming toxin-like protein*) revelou a presença de 23 possíveis proteínas que interagem, incluindo proteínas com domínios Znf-RING, ENTH e de ligação a RNA/DNA. Esses candidatos estão envolvidos em vias de ubiquitinação,

endocitose e regulação de espécies reativas de oxigênio (ROS), sugerindo um papel central na resposta imune da planta (HE et al., 2019).

Em soja, Qi et al. (2024) descreveram que os efetores de *Phakopsora pachyrhizi* formam complexas redes de interação entre si e com proteínas da planta. A interação entre os efetores PpEC23 e PpEC48 foi validada por experimentos de duplo híbrido de leveduras e também por meio de ensaios de bioluminescência em planta, revelando uma possível modulação da resposta imune vegetal de forma coordenada (QI et al., 2024). Já em *Arabidopsis thaliana*, Ehlert et al. (2006) utilizaram simultaneamente o ensaio de duplo híbrido de leveduras e um sistema adaptado em protoplastos (P2H) para mapear interações entre fatores de transcrição bZIP dos grupos C e S. Eles observaram heterodimerizações específicas que não eram detectadas na levedura, demonstrando que validações em plantas (como BiFC ou FRET) são importantes para confirmar a relevância biológica (Ehlert et al., 2006).

Outra aplicação significativa foi demonstrada por Correa Marrero et al. (2024), que realizaram triagens em larga escala de duplo híbrido de leveduras com 21 efetores de fitoplasmas frente a, aproximadamente, 2.000 reguladores de transcrição de *A. thaliana*, encontrando diversas interações com TFs ligados ao desenvolvimento, o que sugere um papel desses efetores na manipulação direta da regulação do hospedeiro (Correa Marrero et al., 2024).

Sendo assim, observa-se que o estudo das proteínas que participam de interações planta-patógeno é essencial para uma melhor compreensão acerca dos mecanismos moleculares envolvidos na defesa vegetal. Proteínas identificadas nessas interações têm se mostrado diretamente associadas às respostas de defesa das plantas, como é o caso das proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas). Além disso, proteínas envolvidas em processos metabólicos essenciais, como a fotossíntese, também têm sido reportadas como diferencialmente expressas durante o processo de infecção, sugerindo que o patógeno pode modular vias básicas da planta hospedeira como estratégia para facilitar sua colonização. O conhecimento aprofundado dessas interações pode, portanto, fornecer subsídios importantes para o desenvolvimento de novas estratégias de controle de doenças e melhoramento de cultivares com maior resistência.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar, por meio do sistema de duplo híbrido de leveduras, proteínas de soja que interagem com o efector Phapa-6409670 do fungo *Phakopsora pachyrhizi*.

3.2 Objetivos específicos

- Clonar o gene do efector Phapa-6409670 no vetor pDEST32;
- Realizar ensaios de transativação;
- Realizar a varredura com uma biblioteca de cDNAs;
- Identificar possíveis candidatos de interação do efector Phapa-6409670;
- Caracterizar a proteína parceira do efector Phapa-6409670.

4 METODOLOGIA

4.1 Técnicas básicas de bioquímica e biologia molecular

Para a realização do presente trabalho, foram utilizadas diversas técnicas básicas de bioquímica e biologia molecular. Aquelas que não se encontram descritas detalhadamente nesta seção, a exemplo do preparo de géis de agarose, eletroforese de DNA, extração de DNA plasmidial (Miniprep), preparo de soluções e tampões, foram realizadas de acordo com os protocolos propostos por Sambrook e colaboradores (1989). Além disso, todas as dosagens e quantificações de materiais genéticos (como DNA genômico e DNA plasmidial) foram realizadas utilizando o equipamento Qubit 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific).

4.2 Perfil de expressão do efector Phapa-6409670 de *Phakopsora pachyrhizi* durante o ciclo infeccioso

Com o objetivo de analisar o perfil de expressão do efector Phapa-6409670 durante as etapas do ciclo infeccioso, plantas de soja da cultivar BRS184 (suscetível a *Phakopsora pachyrhizi*) foram cultivadas em casa de vegetação na EMBRAPA Soja em Londrina, Paraná. Os esporos do fungo foram inoculados nas plantas, sendo que o isolado de *Phakopsora pachyrhizi* utilizado foi o CMES 1968, estando a suspensão de esporos na concentração de 4×10^4 esporos/ml e foi aplicada nas folhas em estágio V3. As folhas infectadas foram posteriormente coletadas em diferentes tempos, sendo eles 12h, 24h, 48h, 72h e 96h pós inoculação. As folhas foram coletadas, armazenadas em papel alumínio, congeladas utilizando nitrogênio líquido e, na sequência, armazenadas em ultra-freezer a -80°C . O experimento foi conduzido utilizando-se três repetições biológicas.

4.3 Extração de RNA total e síntese de cDNA

As folhas de soja inoculadas foram maceradas utilizando-se cadinhos e pistilos de porcelana e a extração de RNA total foi realizada por meio do método Trizol (1 mL / 100 mg tecido), de acordo com o protocolo de extração previamente estabelecido pelo fabricante

(Invitrogen™). Ao final, o RNA obtido foi ressuspenso em 30 µL de água UltraPure™ DNase/RNase-Free (Invitrogen™) e armazenado em ultra-freezer. As concentrações de RNA foram quantificadas em Espectrofotômetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific). Para a confirmação da integridade das amostras obtidas, foi feito um gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Além disso, também foi realizado o tratamento das amostras com a enzima Desoxirribonuclease (DNase I - Invitrogen™), para eliminar a possível presença de DNA genômico nas amostras. A síntese de cDNA foi preparada com 5 µg de RNA total tratado utilizando o kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen™), de acordo com as instruções do fabricante. Por fim, foi realizada uma reação de PCR para a amplificação do cDNA e validação da síntese das amostras. O cDNA obtido foi então armazenado a -20°C.

4.4 RT-qPCR

Para a realização das reações de RT-qPCR foram utilizados *primers* específicos para amplificação do gene efector Phapa-6409670 previamente desenhados pelo *software* Primer3Plus. A eficiência de amplificação dos *primers* foi calculada de acordo com a equação $E = [2(-1/\text{slope})]-1$ descrita por Pfaffl (2001). As análises foram conduzidas no equipamento QuantStudio 7Flex Real Time PCR System (Applied Biosystems™), utilizando o kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen). As especificações para a qPCR foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos (desnaturação), seguido de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos (anelamento) e a 60°C por 1 minuto (extensão). Uma etapa de dissociação foi adicionada ao final da PCR para confirmação da especificidade do *amplicon* gerado e consistiu na elevação da temperatura para 95°C por 15 segundos, seguida da diminuição até 60°C por 15 segundos e, por fim, na elevação até 95°C por 15 segundos. Cada amostra foi analisada em triplicata técnica utilizando 200 nM final de cada *primer* em reação de 12,5µL. O nível de expressão do gene Phapa-6409670 foi determinado pelo método $2^{-\text{delta Ct}}$ e o valor da expressão é representado pela média do Ct das três plantas/tempo (hpi) normalizados com o gene *citocromo B* de *Phakopsora pachyrhizi* (LINK et al., 2015).

4.5 Clonagem dos genes efetores candidatos

O gene do efector candidato, Phapa-6409670 foi inserido no vetor pDEST32 (LEU2, CEN, Gentamicina^R por meio da enzima LR clonase - Invitrogen), pelo sistema Gateway, adicionando 1µL da enzima LR clonase e 4 µL de DNA (plasmídeo do vetor e plasmídeo com DNA de interesse, na mesma proporção) e deixando sob incubação *overnight* a 25°C. Na sequência, foram adicionados 0,5 µL de proteinase K para parar a reação, que foi incubada por mais 10 minutos a 37 °C. Isso gerou como resultado clones em que as sequências de cada gene estão fusionadas no domínio de ligação (BD - *binding domain*) ao DNA do Gal4p, nesse caso gerando o vetor pDEST32-Phapa-6409670. Tendo sido realizada essa reação, seu produto foi utilizado para a transformação em *Escherichia coli* DH5α ultra competentes, por meio de choque térmico (células submetidas a 30 minutos no gelo e passadas imediatamente para uma temperatura de 42°C por 45 segundos), para a obtenção de maior número de cópias. Após esse processo, foi realizada a extração do DNA plasmidial (Miniprep) e as clonagens verificadas foram confirmadas por meio de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) na qual regiões específicas de DNA foram devidamente amplificadas. Posteriormente, ocorreu o sequenciamento dos plasmídeos obtidos.

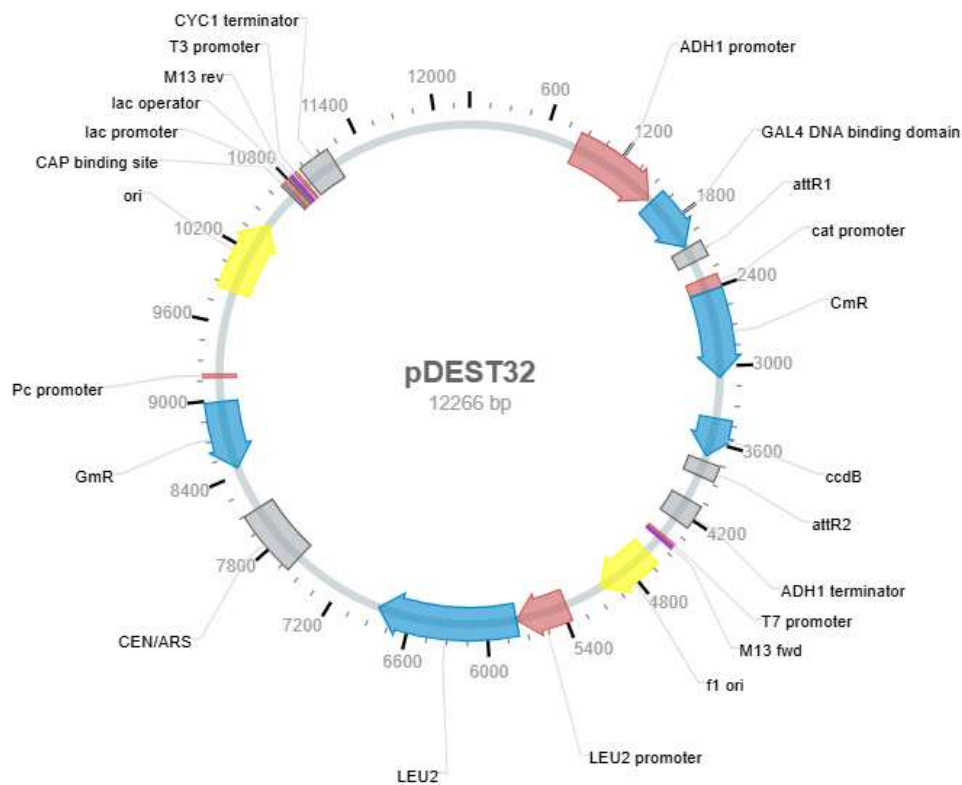


Figura 3 – Imagem esquemática do vetor pDEST32, gerada pelo site da NovoPro Bioscience, a partir da sequência de nucleotídeos do vetor. Fonte: NovoPro Bioscience.

4.6 Ensaio de transativação

Foi realizado um ensaio preliminar de transativação ou autoativação. Nesta técnica observa-se a capacidade de um fator de transcrição ou uma proteína reguladora na ativação da expressão de determinado gene-alvo. Logo, poderemos avaliar se a proteína efetora sozinha ativa a maquinaria celular e, conseqüentemente, o sistema repórter.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* AH109 (MATa, trp1-901, leu2-3,112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2:GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UASGAL2TATA-ADE2, URA3::MELUAS-MEL1TATAlacZ) foi submetida ao processo de transformação por meio do método do acetato de lítio/polietilenoglicol, com o vetor pDEST32-Phapa-6409670 e o resultado da transformação foi plaqueado em meio de seleção SD (*synthetic dropout*) na ausência de leucina (SD-LEU).

As colônias AH109 foram, na sequência, crescidas em meio líquido mantido em shaker a 30°C e utilizadas no ensaio de transativação do gene repórter HIS3, segundo as orientações do manual da Clontech, variando-se a concentração de 3-AT (3-amino-1,2,4-triazol) no meio, utilizando-se 0mM; 2,5mM; 5mM; 10mM; 20mM e 100mM. Esse reagente 3AT foi utilizado como um agente seletivo, visto que atua inibindo parcialmente a biossíntese de histidina, exigindo uma ativação mais forte do gene HIS3 para que as células cresçam.

4.7 Duplo híbrido de leveduras

A varredura pelo sistema duplo híbrido de leveduras (*screening*) foi realizada de acordo com as instruções do manual da Clontech. O rastreo foi realizado com a biblioteca de cDNAs (oriundos de folhas de soja suscetível infectadas pelos esporos do fungo *P. pachyrhizi*) inserida no vetor pDEST22 (TRP1, CEN, Ampicilina^R), vetor que resulta na fusão do domínio de ativação (AD – *active domain*) de Gal4p na proteína. Essa biblioteca foi produzida pelo laboratório de Biotecnologia da Embrapa Soja, em Londrina, Paraná, em parceria com o Laboratório de Biotecnologia Molecular, em Viçosa, Minas Gerais.

As leveduras AH109 foram então transformadas por meio do método de acetato de lítio/polietilenoglicol. Após confirmação dos transformantes, as leveduras foram inoculadas em meio SD-LEU e crescidas *overnight* a 28°/180 rpm. O pré-inóculo foi transferido para 80 mL de meio SD-LEU e mantido a 28°/180 rpm até atingir D.O. _{600 nm} 0,4-0,6. A cultura foi então centrifugada a 5000 x g por 10 min, e o pellet ressuspendido em água destilada autoclavada. Tal passo de lavagem foi repetido por três vezes, sendo que, na última lavagem, o pellet foi ressuspendido em um mix de transformação contendo 7,2 mL de polietilenoglicol (PEG) 50 % (m/v), 1,08 mL de acetato de lítio 1 M, 1,5 mL de DNA fita simples de esperma de salmão (ssDNA) previamente fervido por 5 min e 1,02 mL de DNA (20 µL de biblioteca de cDNA de soja + 1 mL de água) e mantido a 42°C por 50 min. A transformação foi centrifugada a 3000 x g/20°C por 10 min e o pellet lavado com água destilada por três vezes, sendo ressuspendido posteriormente em meio seletivo SD-LEU-TRP. O produto desta transformação foi então plaqueado em 15 placas com meio SD-LEU-TRP-HIS e 3 placas de meio SD-LEU-TRP para controle da transformação

As colônias crescidas nas placas foram transferidas para um meio seletivo líquido e foram realizados testes para avaliar a capacidade das colônias transformantes em ativar o gene repórter HIS3 (que é responsável por conferir a capacidade de crescimento em meio deficiente

de histidina a linhagens de leveduras auxotróficas para esse aminoácido) e o gene LacZ (que quando ativado leva à produção de β -galactosidase, cuja atividade pode ser detectada por meio de um ensaio de coloração utilizando X-gal, 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo, que gera uma cor azul quando hidrolisado). A intensidade da coloração é um indicativo da força da interação entre as proteínas.

Para avaliar o crescimento em meio sem histidina, foi utilizado um inibidor competitivo da enzima, o 3-AT. Nos ensaios a serem realizados, as concentrações desse inibidor foram variadas para que seja possível inferir a força das interações, que são resultantes dos níveis de expressão de HIS3 e, conseqüentemente, da sobrevivência das leveduras em elevadas concentrações do inibidor. O gene repórter LacZ foi avaliado como descrito por Amberg et al (2006), ou por permeabilidade em membrana de nylon, como descrito pelo manual da Clontech.

Após essas avaliações, os plasmídeos foram extraídos com o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). As seqüências das presas obtidas foram amplificadas e os produtos de PCR enviados para o sequenciamento.

4.8 Análises *in silico*

Considerando-se os experimentos previamente realizados, as amostras obtidas foram então enviadas para o sequenciamento. Ao retornarem os resultados, foram feitas diversas análises *in silico* para a identificação de possíveis parceiros do efetor Phapa-6409670. As seqüências obtidas foram utilizadas para buscas via BLASTn nos bancos de dados NCBI para verificação das proteínas alvo da soja.

4.9 Predição de estruturas proteicas com AlphaFold Server

A predição da estrutura tridimensional das proteínas obtidas neste trabalho foi realizada utilizando-se o AlphaFold Server, uma interface online baseada no modelo AlphaFold, acessada por meio do site <https://alphafoldserver.com/>, que utiliza o código aberto disponibilizado pela DeepMind. O AlphaFold consiste em um sistema de inteligência artificial com um extenso banco de dados de estruturas e seqüências proteicas, que permite prever com alta acurácia a estrutura tridimensional de proteínas a partir de sua seqüência primária de aminoácidos.

As sequências das proteínas de interesse, o efetor Phapa-6409670 e a proteína KOG 3188, foram inseridas diretamente no servidor web <https://alphafoldserver.com/>, que retornou os modelos estruturais preditos. Para cada proteína, o servidor gerou arquivos no formato PDB, acompanhados de escores de confiança pLDDT (*predicted Local Distance Difference Test*), utilizados para avaliar a qualidade da predição em diferentes regiões da estrutura. Os modelos preditos foram posteriormente visualizados e analisados com o objetivo de identificar elementos estruturais relevantes, além de possibilitar análises subsequentes, como a predição de sítios de interação.

5 RESULTADOS

5.1 Expressão do efector Phapa-6409670 durante o ciclo infeccioso

Para a análise do perfil de expressão do efector Phapa-6409670 durante as etapas do ciclo infeccioso, foi realizada a extração de RNA total por meio do método do Trizol. O gel de agarose que demonstra a integridade do RNA total extraído pode ser verificado abaixo (Figura 4).

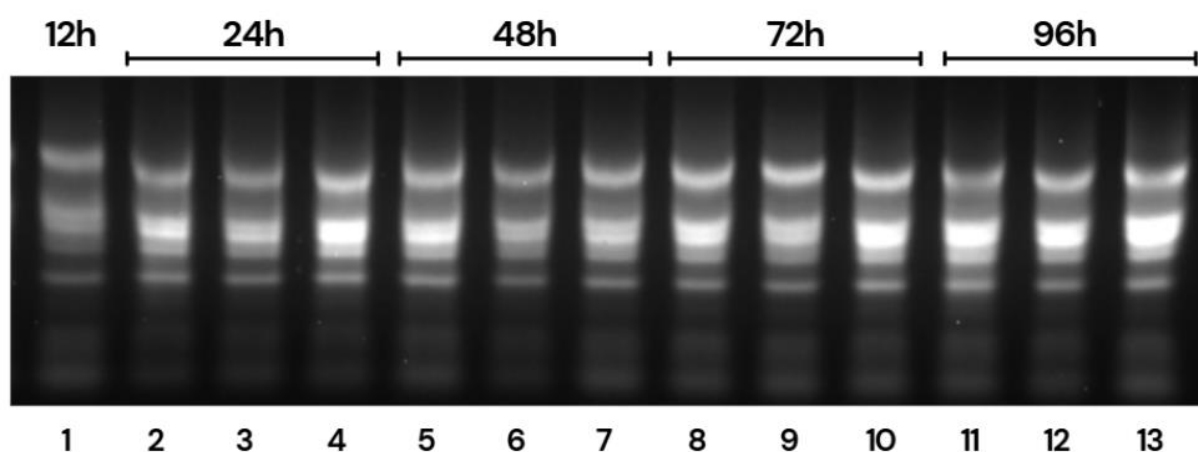


Figura 4 – Extração de RNA total. RNA total obtido de folhas de soja infectadas com *Phakopsora pachyrhizi* em diferentes tempos após a inoculação. Amostras de BRS 184 susceptível, de 1 a 13, obtidas nos tempos 12h (amostra única), 24h, 48h, 72h e 96h (triplicatas).

O nível de expressão do efector Phapa-6409670 foi avaliado durante o início do ciclo de infecção com o fungo na BRS184 (genótipo suscetível) e o resultado foi plotado em um gráfico (Figura 5).

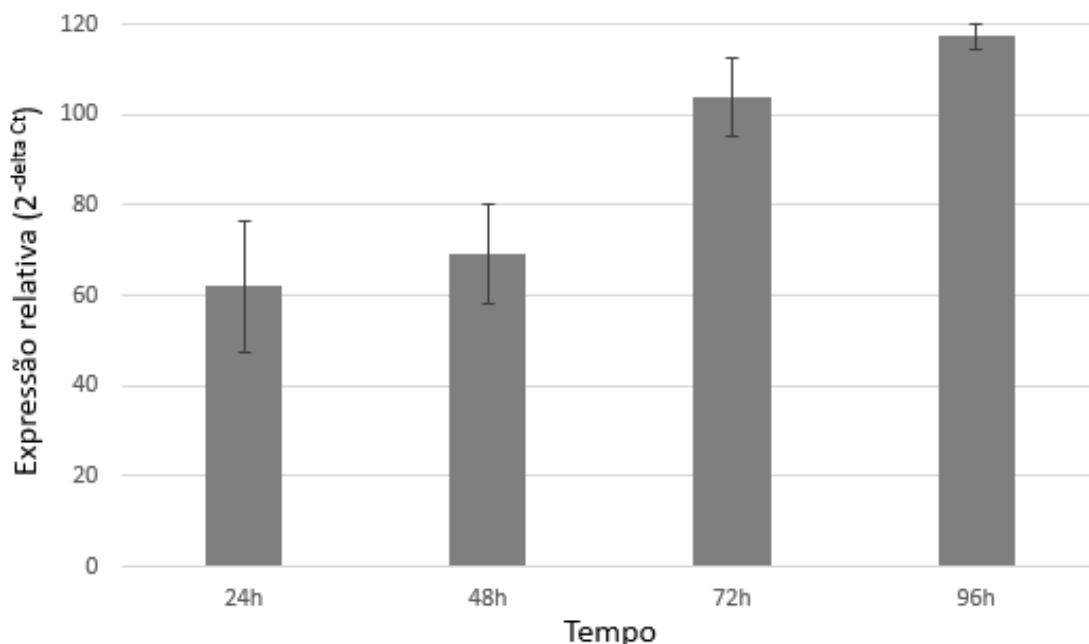


Figura 5 – Nível de expressão do efetor Phapa-6409670 nos diferentes tempos de infecção com *Phakopsora pachyrhizi* após normalização com o gene *CytB*. Os valores representam a média das replicatas biológicas e as barras indicam o desvio padrão da média.

O gene Phapa-6409670 teve sua expressão gradualmente induzida ao longo do tempo de análise do ensaio (12h, 24h, 48h, 72h e 96h), sendo os maiores valores observados nos tempos 72h e 96h, um indicativo de que a ação deste pode estar mais associada à manutenção e avanço da infecção na planta.

5.2 Identificação de proteína de soja como alvo de interação do efetor Phapa-6409670

Anteriormente à realização do *screening*, foi feito um ensaio de transativação ou teste de autoativação. Como não houve crescimento da levedura contendo pDEST32+Phapa-6409670 em meio sem histidina, observa-se que não há ativação do sistema de transcrição pelo efetor (Figura 6). Sendo assim, o ensaio do duplo híbrido de leveduras pode ser realizado para esse efetor.

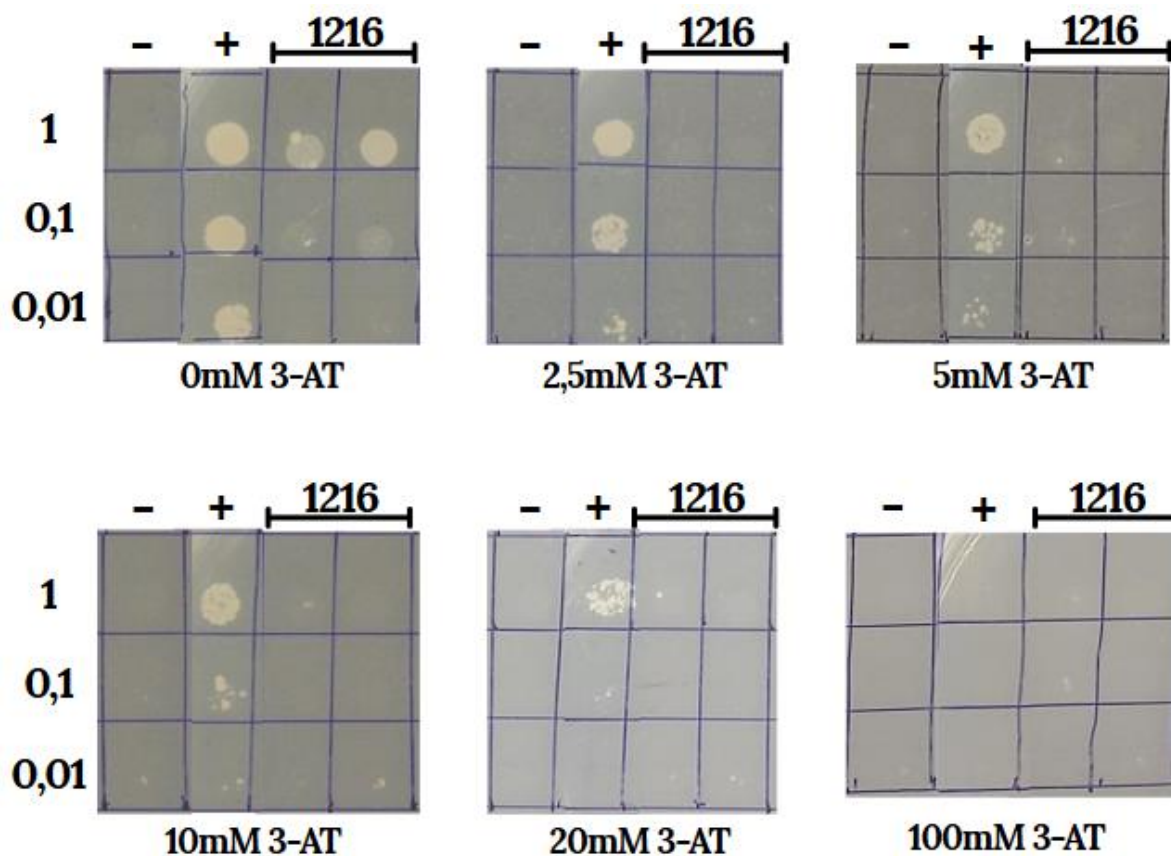


Figura 6 – Teste de auto ativação em diferentes concentrações de 3-AT (0mM; 2,5mM; 5mM; 10mM; 20mM e 100mM) em meio SD-LEU-HIS. As amostras foram preparadas em densidade óptica (D.O._{600nm}) de 1,0, 0,1 e 0,01. “-” representa o controle negativo (pDEST32 vazio); “+” representa o controle positivo (NiNi); as últimas duas colunas são duas amostras do vetor pDEST32 contendo o efector Phapa-6409670.

Para a identificação de alvos de interação para a proteína Phapa-6409670, modelo gênico correspondente ao de_novo_1216 no genoma MT2006 v.1 (JGI) (previamente validado funcionalmente), foi realizada uma triagem com a biblioteca de cDNA oriunda de folhas de soja infectadas por esporos de *Phakopsora pachyrhizi*, em que esse efector foi utilizado como isca, por meio do sistema de duplo híbrido de leveduras. Essa triagem gerou como resultado o isolamento de 23 clones em meio SD- LEU-TRP-HIS (Figura 7).

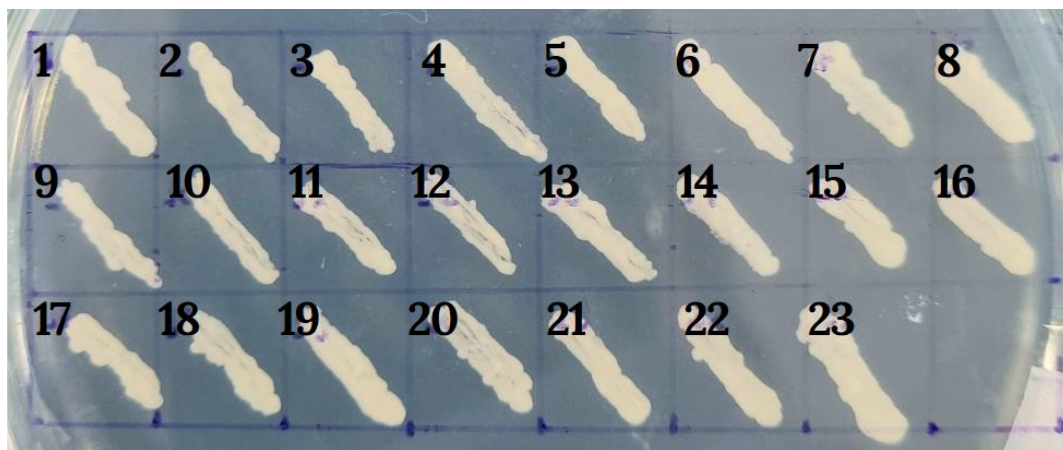


Figura 7 – Clones 1 a 23, em meio sólido SD-LEU-TRP-HIS, resultado do duplo-híbrido de leveduras utilizando o efator Phapa-6409670.

Todos os 23 clones também apresentaram crescimento positivo em meio sólido SD-LEU-TRIP-HIS. Na primeira placa, onde as amostras foram preparadas em densidade óptica ($D.O_{600nm}$) 1,0, houve maior crescimento (Figura 8A), enquanto que na segunda placa, com as amostras sendo preparadas em densidade óptica ($D.O_{600nm}$) 0,1, também ocorreu significativo crescimento, porém menor em comparação com a anterior (Figura 8B). Tais resultados comprovam que as leveduras possuem a construção isca e ao menos uma presa.

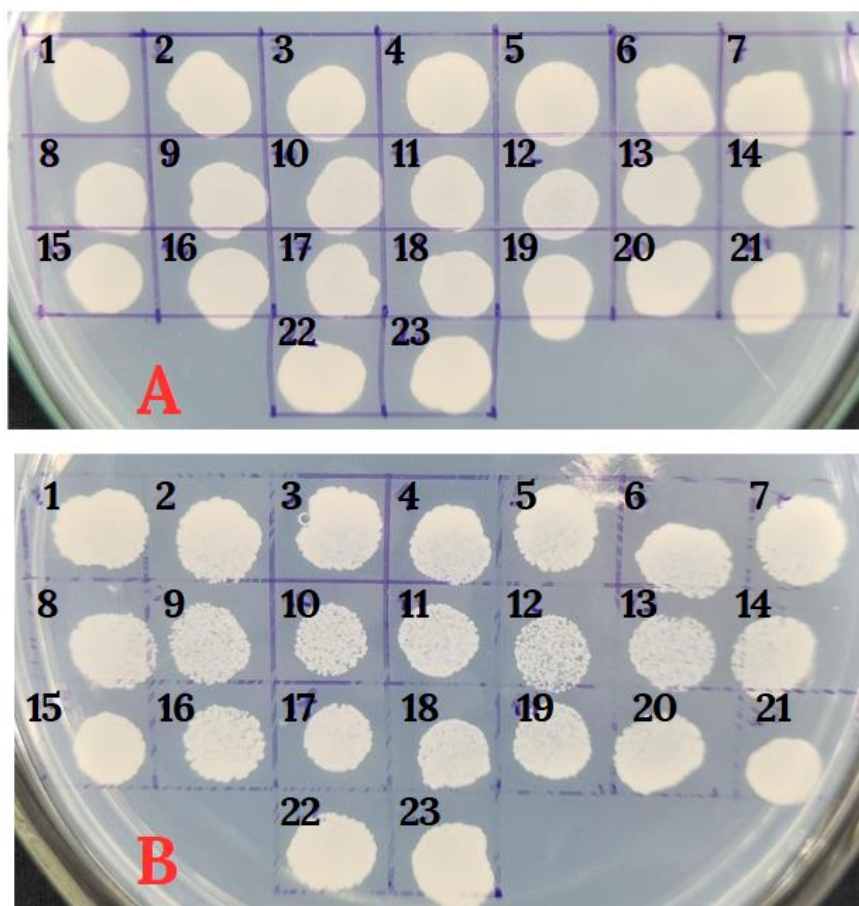


Figura 8 – (A) Clones 1 a 23, em meio sólido SD-LEU-TRP-HIS, amostras preparadas em densidade óptica $D.O_{600nm}$ 1,0. (B) Clones 1 a 23, em meio sólido SD-LEU-TRP-HIS, amostras preparadas em densidade óptica $D.O_{600nm}$ 0,1.

Esses 23 clones também foram aplicados em placas contendo meio sólido SD-LEU-TRP-HIS contendo diferentes concentrações do inibidor competitivo 3-AT, sendo elas 0mM, 0,125mM, 0,25mM, 0,5mM, 1,0mM e 2,5mM. Os clones BD-Phapa6409670+AD-1, BD-Phapa6409670+AD-5, BD-Phapa6409670+AD-7 e BD-Phapa6409670+AD-8 foram evidenciados na Figura 9 a seguir.

Clones	D.O. _{600nm}	Concentrações de 3-AT						
		0mM	0,125mM	0,25mM	0,5mM	1,0mM	2,5mM	
BD-Phapa6409670+AD-clone	1	1						
	1	0,1						
	5	1						
	5	0,1						
	7	1						
	7	0,1						
	8	1						
	8	0,1						

Figura 9 – Clones 1, 5, 7 e 8 em meio sólido SD-LEU-TRIP-HIS, as amostras foram preparadas em densidade óptica (D.O._{600nm}) 1,0 e 0,1 em diferentes concentrações de 3-AT: 0mM; 0,125mM; 0,25mM; 0,5mM; 1,0mM e 2,5mM.

Os clones 1, 5, 7 e 8 que cresceram mesmo na presença do inibidor competitivo 3-AT, foram selecionados e transferidos então para o meio líquido SD-LEU-TRIP-HIS para a posterior realização da extração de DNA plasmidial (miniprep).

Para selecionar o plasmídeo pDEST22, essas minipreps foram transformadas em *Escherichia coli* DH5 alfa utilizando a marca de seleção do plasmídeo (meio com ampicilina). Após fazer as transformações, todas as colônias que foram obtidas dos clones 1, 5, 7 e 8 apresentaram resultados positivos, com possíveis colônias transformadas, confirmando assim a presença do plasmídeo AD (Figuras 10 e 11). Para identificação dos possíveis parceiros do efetor Phapa-6409670, os plasmídeos provenientes da reação de PCR foram enviados para sequenciamento.

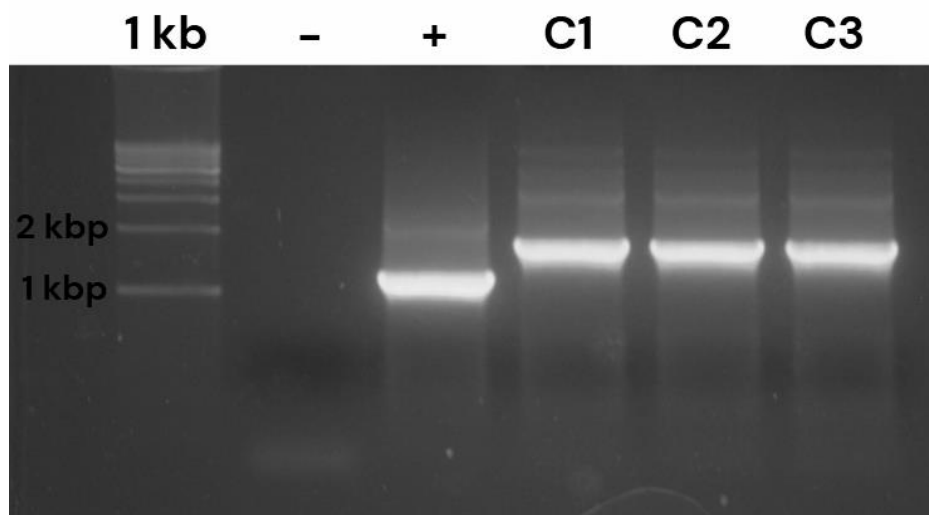


Figura 10 – PCR com *primers* pDEST-22 para as 3 colônias transformadas do clone 1 do ensaio de duplo-híbrido de levedura. “1kb” representa o marcador de peso molecular utilizado (Marcador Cellco 1kb plus DNA ladder MMK 130); “-” representa o controle negativo; “+” representa o controle positivo; C1, C2 e C3 são as 3 colônias transformadas.

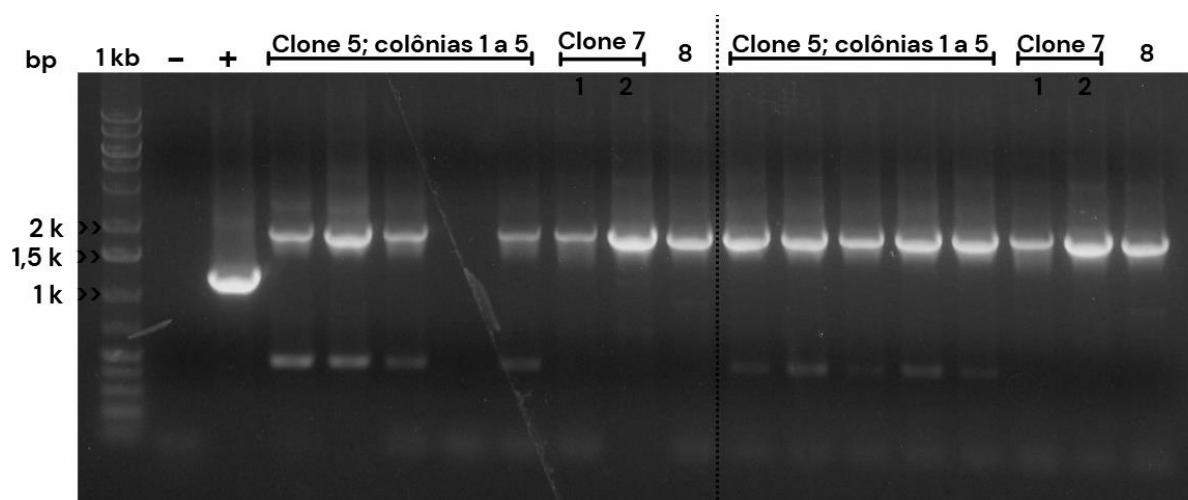
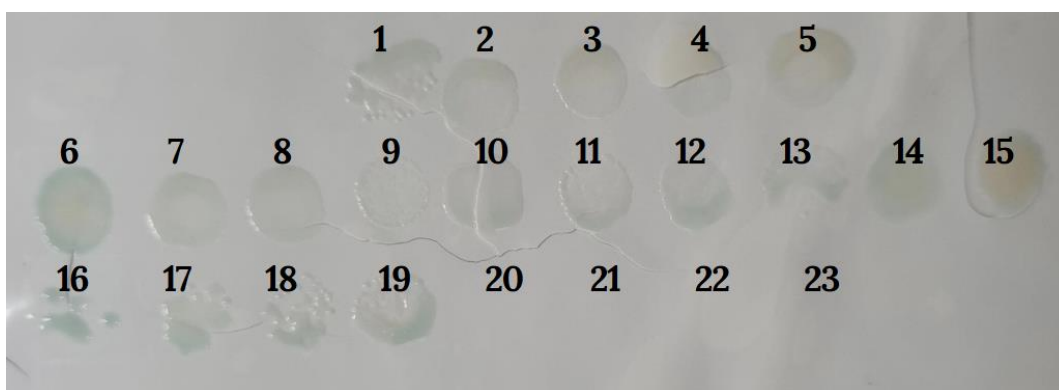


Figura 11 – PCR com *primers* pDEST-22 para as colônias transformadas dos clones 5, 7 e 8 do ensaio de duplo-híbrido de levedura. “1kb” representa o marcador de peso molecular utilizado (Marcador Cellco 1kb plus DNA ladder MMK 130); “-” representa o controle negativo; “+” representa o controle positivo.

Além do ensaio com o gene repórter HIS3, foi realizado o ensaio com o gene repórter LacZ. A partir dos clones de 1 a 23 obtidos pelo ensaio de duplo híbrido de leveduras, foi realizado um teste de membrana, utilizando-se X-gal. Como o gene repórter LacZ codifica a

enzima β -galactosidase, a atividade desse gene pode ser visualizada pela degradação de X-gal, ensaio no qual as interações entre proteínas são identificadas pelo aparecimento de coloração azul (Figura 12). Em (A) tem-se o resultado do teste após 4h de reação e em (B) após 14h de reação, no qual observa-se a presença de coloração azul significativa. Tais resultados indicam que possivelmente há uma interação ocorrendo entre as proteínas em estudo.

(A):



(B):

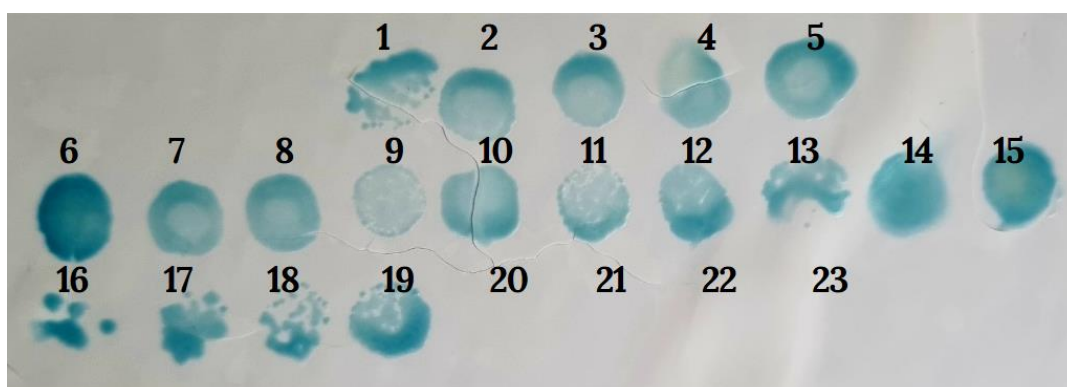


Figura 12 – Teste da membrana (atividade de β -GAL). Clones de 1 a 23 em (A) após 4h de reação e em (B) após 14h de reação, apresentando agora coloração azul.

5.3 Análises *in silico*

Para identificação dos possíveis parceiros do efetor Phapa-6409670, os plasmídeos provenientes da reação de PCR foram enviados para sequenciamento. Sendo assim, os resultados que retornaram são referentes às 3 colônias obtidas do clone 1, 5 colônias do clone

5, 2 colônias do clone 7 e 1 colônia do clone 8. O sequenciamento de Sanger foi realizado pela empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda, utilizando o DNA plasmidial obtido dos clones em questão. A análise dos eletroferogramas, obtidos do sequenciamento, foram realizadas por meio do programa Chromas 2.3. Posteriormente, as sequências obtidas foram comparadas e alinhadas com as sequências da soja (*Glycine max*) por meio do programa Clustal Omega.

As sequências obtidas foram utilizadas para buscas via BLASTn nos bancos de dados NCBI e na plataforma *Phytozome* para verificação das proteínas alvo da soja. As proteínas obtidas resultam do alinhamento com genes em *Glycine max Wm82.a6.v1*, possuindo identidade de 100% e cobertura acima de 65%, sendo elas: Glyma.08G331200 (KOG 3188 - Proteína conservada não caracterizada), Glyma.11G077600 (Ferredoxina--NADP(+) redutase/NADPH desidrogenase), Glyma.19G106800 (GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 2), Glyma.14G004200 (FLAs - Proteína arabinogalactana 2 semelhante à fasciclina) (Quadro 1).

Quadro 1 – Quadro de identificação e alinhamento de genes em *Glycine max Wm82.a6.v1*.

CLONE	GLYMA	NOMENCLATURA	IDENTIDADE	COBERTURA	E-VALUE
1	Glyma.08G331200	KOG3188 - Proteína conservada não caracterizada	100 %	82 %	2.77e-97
5	Glyma.11G077600	Ferredoxina--NADP(+) redutase / NADPH desidrogenase	100 %	65 %	1.90e-118
7	Glyma.19G106800	GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 2	100 %	75 %	2.36e-155
8	Glyma.14G004200	FLAs - Proteína arabinogalactana 2 semelhante à fasciclina	100 %	84 %	0

Entretanto, ao analisar as sequências foi observado que apenas os sequenciamentos provenientes do clone 1 se encontram *in frame* com o GAL4, sendo a similaridade das bases próxima a 99%. Sendo assim, os demais clones 5, 7 e 8, foram desconsiderados momentaneamente.

O gene Glyma.08G331200.1, de *Glycine max Wm82.a6.v1*, prediz a proteína KOG 3188, que possui uma CDS (sequência que codifica a proteína) de 741 bases nucleotídicas, indicando assim o comprimento da sequência, obtida a partir das anotações do *Phytozome*. O tamanho do peptídeo resultante foi determinado pelo número de aminoácidos resultante da tradução da CDS, possuindo 247 aminoácidos como tamanho da proteína predita. Além disso, a proteína KOG 3188 possui um domínio de função desconhecida DUF 106 (*Domain of Unknown Function*) transmembrana, que se estende do 4° ao 192° aminoácido. As proteínas

desta família são caracterizadas pela presença de um domínio específico, mas, como o nome indica, suas funções biológicas ainda não foram identificadas ou compreendidas completamente.

5.4 Predição da estrutura tridimensional do efector Phapa-6409670 e da proteína KOG 3188

As estruturas tridimensionais do efector Phapa-6409670 e da proteína KOG 3188 foram preditas por meio do AlphaFold Server, com modelos de alta confiabilidade baseados nos escores pLDDT (>90 para a maior parte da cadeia polipeptídica de KOG 3188, por exemplo) (Figura 13).

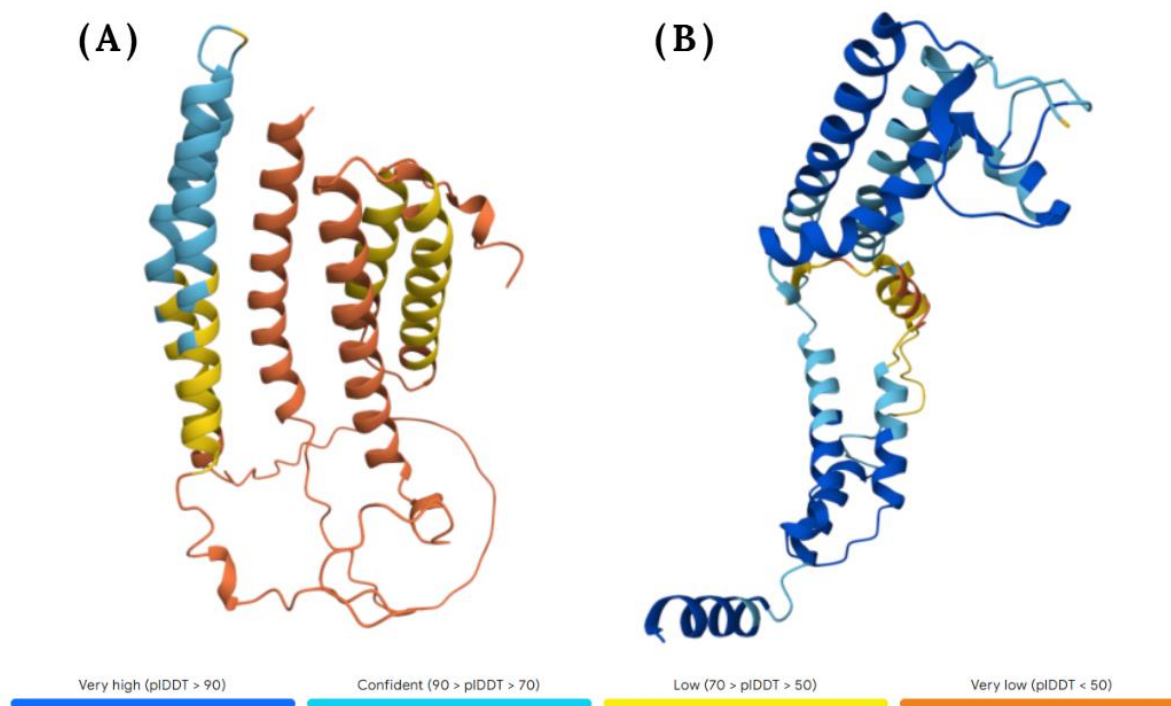


Figura 13 – Estruturas tridimensionais preditas via AlphaFold Server para (A) o efector Phapa-6409670 e (B) a proteína KOG 3188. As estruturas encontram-se representadas no modo cartoon, com coloração baseada no escore de confiança pLDDT.

As estruturas evidenciadas na figura acima possuem coloração baseada no escore de confiança pLDDT. As regiões com maior confiabilidade (azul escuro) indicam domínios estruturais bem definidos, enquanto as regiões em amarelo e laranja correspondem a estruturas menos confiáveis, geralmente desordenadas ou não definidas claramente ainda.

As estruturas foram analisadas em programa de visualização molecular (PyMOL), com foco nas regiões de contato entre as proteínas, predizendo um modelo estrutural tridimensional para o complexo formado entre o efector Phapa-6409670 e a proteína KOG 3188, evidenciado na figura 14 abaixo. A previsão da interação foi baseada na co-localização espacial das duas sequências inseridas, permitindo a identificação de possíveis regiões de contato e fornecendo suporte estrutural para hipóteses funcionais sobre a interação planta-patógeno.

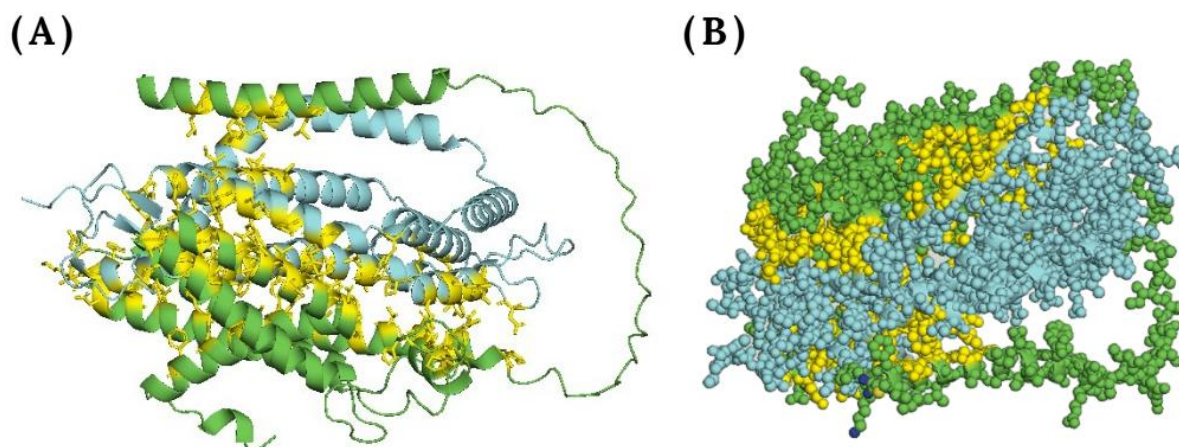


Figura 14 – Modelo estrutural tridimensional predito para o complexo formado entre o efector Phapa-6409670 (em verde) e a proteína KOG 3188 (em azul), obtido por meio do programa PyMOL. A interação entre as estruturas está evidenciada em amarelo. **(A)** Estrutura em cartoon. **(B)** Estrutura em esferas.

As estruturas preditas serviram como base para análises estruturais e futuras etapas de modelagem de interação proteína-proteína, com o objetivo de investigar possíveis sítios de ligação e entender os mecanismos moleculares envolvidos na interação planta-patógeno. Para tal, foi utilizado também o servidor PDBsum no site da EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/pdbsum>), realizando a predição dos átomos que interagem entre si. O

esquema de interação, predito para o complexo formado entre o efector Phapa-6409670 (“*chain A*”) e a proteína KOG 3188 (“*chain B*”), evidencia 29 aminoácidos do efector e 28 aminoácidos da proteína que interagem entre si (Figura 15).

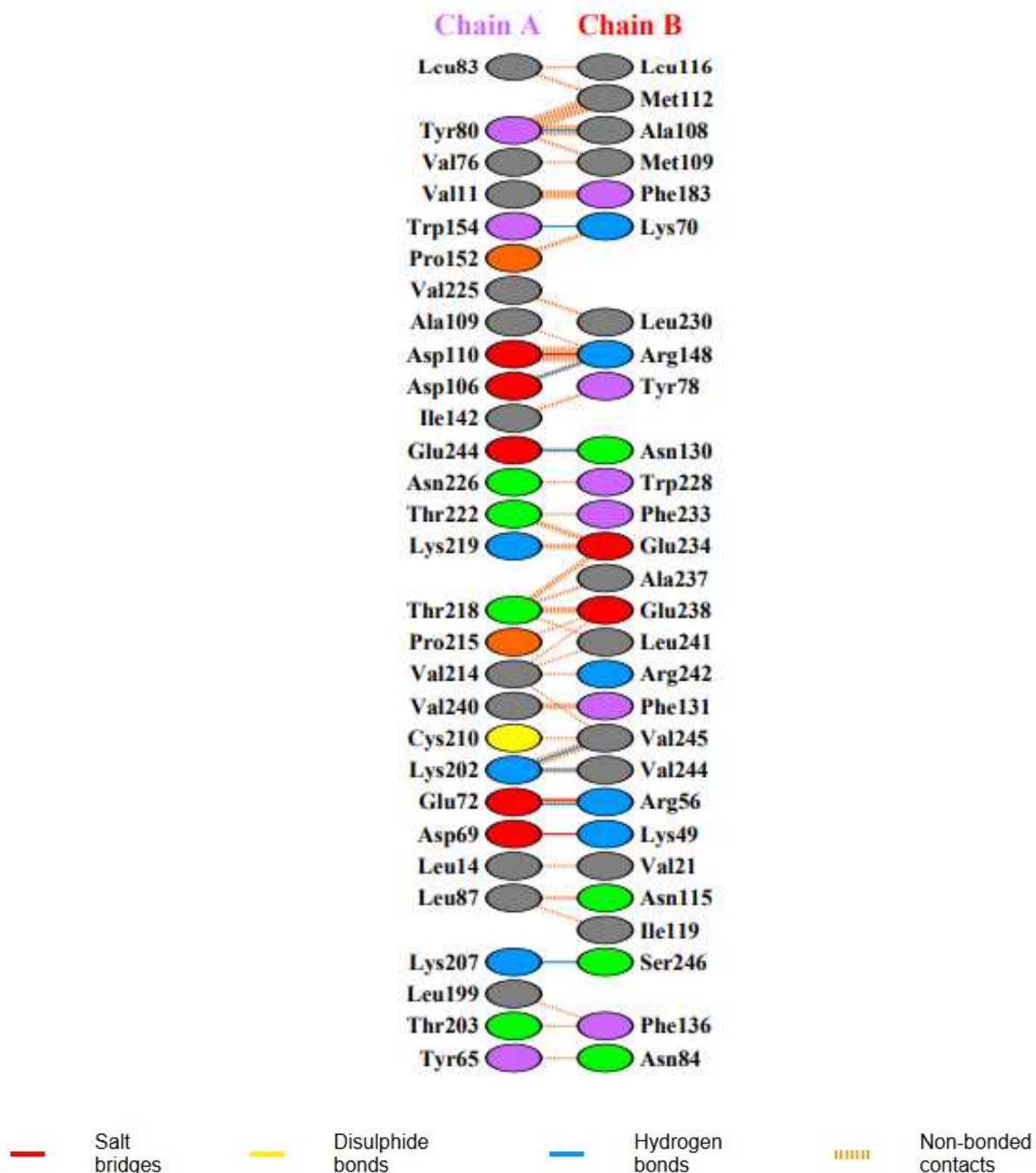


Figura 15 – Esquema de interação predito para o complexo formado entre o efector Phapa-6409670 (“*chain A*”) e a proteína KOG 3188 (“*chain B*”), obtido por meio do servidor PDBsum no site da EMBL-EBI. No esquema estão evidenciados 29 aminoácidos do efector e 28 aminoácidos da proteína que interagem entre si.

6 DISCUSSÃO

A compreensão da interação planta-patógeno consiste em uma relação extremamente importante. O estudo dos efetores secretados pelo fungo biotrófico *Phakopsora pachyrhizi*, o agente causador da ferrugem asiática da soja, é peça fundamental para entender melhor os mecanismos moleculares por meio dos quais esse patógeno age manipulando o sistema de defesa da planta hospedeira. Estudos têm evidenciado que esse microrganismo é responsável por secretar proteínas pequenas e ricas em resíduos de cisteína (SSCRP), durante a formação do haustório, as quais são candidatas a efetores que podem suprimir tanto a imunidade basal (PTI) quanto a imunidade desencadeada por efetores (ETI). Dentre essas moléculas, têm-se como destaque o efector PpEC23, que interage fisicamente com o fator de transcrição GmSPL121 da soja, um regulador negativo da defesa vegetal, que age bloqueando algumas respostas, como o estresse oxidativo (Qi et al., 2016).

Outros trabalhos também utilizaram a técnica de duplo híbrido de leveduras, a exemplo de Correa Marrero et al. (2024), que realizaram triagens em larga escala com 21 efetores de fitoplasmas frente a, aproximadamente, 2.000 reguladores de transcrição de *Arabidopsis thaliana*. Neste estudo puderam observar diversas interações com TFs ligados ao desenvolvimento, sugerindo o papel importante desses efetores na manipulação direta da regulação do hospedeiro (Correa Marrero et al., 2024). Além disso, um estudo recente também descreveu um outro efector Phapa-7431740 que interage com uma proteína relacionada à patogênese da família PR-2 (Beta-glucanase), identificada por meio da mesma técnica de duplo híbrido de leveduras e validada por ensaio de *pull-down* (Bueno et al., 2022).

Um outro exemplo de efector, PpEC15, descrito por Chicowski et al. (2023), não apenas inibe respostas imunes, mas também interage com proteínas-chave do hospedeiro, incluindo a DAHP-sintase, estando envolvido em respostas de supressão da defesa basal em plantas. Para a obtenção de tais resultados também foi utilizado o sistema de duplo híbrido de leveduras. Ademais, foi realizada uma modelagem estrutural de PpEC15 e também de DAHP por meio do algoritmo Phyre2.0, além da predição da modelagem do homotetrâmero de DAHP, pelo AlphaFold, e visualização no PyMOL (Chicowski et al., 2023).

Sendo assim, nota-se que os avanços em genômica, tecnologias de sequenciamento de nova geração e ferramentas de bioinformática têm ampliado de maneira significativa as

possibilidades para identificação de genes candidatos a efetores. Logo, pode-se detectar genes importantes relacionados à suscetibilidade da planta hospedeira, sobretudo aqueles que codificam proteínas secretadas altamente expressas durante o processo infeccioso (Petre et al., 2014; Sperschneider et al., 2015).

Conforme evidenciado neste trabalho, foi observada a expressão do gene efector Phapa-6409670 durante as etapas do ciclo infeccioso de *Phakopsora pachyrhizi*. O nível de expressão revelou uma tendência de elevação nos níveis de expressão com o passar do tempo, atingindo as maiores medições nos dois últimos tempos anotados (72h e 96h). De acordo com Utiyama (2020), o efector Phapa-6409670 possui, além de tamanho reduzido e abundância de resíduos de cisteína, peptídeo sinal e um domínio conservado Y/F/WxC. Esse efector apresentou também indução da expressão gênica após 8 e 12 dias da realização da infecção pelo fungo. Por outro lado, no estudo evidenciado por de Carvalho et al. (2017), ao identificarem 851 candidatos a efetores com expressão em plantas, foi observado que alguns possuíam um pico de expressão 12h após a inoculação, ou seja, ainda nos estágios iniciais do processo de infecção. Diante disso, observa-se que diferentes moléculas efectoras podem atuar em diferentes momentos durante a ocorrência da infecção, de modo a manipular o sistema de defesa do hospedeiro (no caso a planta), favorecer a proliferação do microrganismo e, conseqüentemente, da doença.

O efector Phapa-6409670 utilizado apresenta uma sequência gênica de 1259 nucleotídeos, codificando uma proteína de 262 aminoácidos (uma molécula pequena) que contém, aproximadamente, 3,82% de resíduos de cisteína; possui peptídeo sinal entre os resíduos 1 e 21, e um domínio do tipo Y/F/WxC (YAC) foi identificado na posição 189 da cadeia polipeptídica (Utiyama, 2020). No presente trabalho foi observado que esse efector interage possivelmente com uma proteína de soja (Glyma.08G331200), KOG 3188, uma proteína conservada não caracterizada, sugerindo uma interface de interação proteína-proteína importante para a virulência.

Entretanto, a proteína da soja KOG 3188 não havia sido descrita como alvo do efector Phapa-6409670 de *Phakopsora pachyrhizi*, sendo um dado inédito e que irá agregar no esclarecimento de interações planta-patógeno. Embora essa proteína seja preservada evolutivamente, não se é conhecido ainda seu papel biológico, o que reforça a relevância deste estudo. A ocorrência da possível interação dela com o efector fúngico sugere que ela desempenha um papel funcional na resposta da planta à infecção. Os modelos estruturais tridimensionais preditos gerados por meio do AlphaFold Server, juntamente com as análises

no programa PyMOL, são ferramentas importantes para reforçar uma provável interface formada pelo complexo Phapa-6409670 - KOG 3188. Utilizando o servidor PDBsum foram observados quais átomos interagem entre si no complexo formado, evidenciando 29 aminoácidos do efector e 28 aminoácidos da proteína.

Diante disso, tem-se ainda que a proteína KOG 3188 possui um domínio de função desconhecida DUF 106 (*Domain of Unknown Function*) transmembrana, que se estende do 4º ao 192º aminoácido. Um estudo de revisão realizado por Lv et al. (2023) destacou que mais de 24% das famílias de proteínas no Pfam correspondem a domínios DUF.

Proteínas contendo domínios de função desconhecida (DUFs) vêm sendo progressivamente caracterizadas, especialmente em *Arabidopsis thaliana*, o que tem permitido compreender melhor sua participação em importantes processos fisiológicos e também de defesa em plantas. Dentre os domínios funcionalmente caracterizados até o momento, destacam-se, por exemplo, DUF 6, DUF 246 e DUF 579, que têm sido relacionados ao desenvolvimento da parede celular vegetal (Lv et al., 2023).

O domínio DUF 26, também conhecido por seu papel associado a estresses bióticos, é amplamente distribuído em proteínas vegetais de função extracelular, particularmente naquelas denominadas proteínas ricas em cisteína semelhantes a receptores (CRRSPs). Um exemplo amplamente estudado é a proteína GnK2 de *Ginkgo biloba*, caracterizada por sua capacidade de se ligar à manose e atuar como uma lectina com propriedades antifúngicas, demonstradas por experimentos *in vitro* (Miyakawa et al., 2009; Miyakawa et al., 2014).

De forma semelhante, proteínas contendo o mesmo domínio foram identificadas em *Zea mays*, com participação em mecanismos de defesa frente à infecção por fungos patogênicos (Ma et al., 2017). Esses dados indicam que o domínio DUF26 pode estar envolvido tanto no reconhecimento de patógenos quanto na sinalização de resposta imune, reforçando sua importância funcional na imunidade vegetal. Ademais, nos permite inferir que o domínio DUF 106, presente na proteína KOG 3188 encontrada neste estudo, possui papel significativo nas respostas ao estresse de plantas, podendo modular vias de sinalização relacionadas ao metabolismo vegetal e à resistência.

Logo, ao relacionar os dados presentes na literatura com os resultados gerados por este estudo, foi apresentado um panorama geral sobre a interação planta-patógeno na ferrugem

asiática da soja. Tais evidências comprovam a necessidade de se explorar mais tais interações com objetivo de buscar novas estratégias para controle da doença por meio da biotecnologia.

7 CONCLUSÕES

Neste estudo foi observado que a expressão do efector Phapa-6409670 se eleva conforme a ferrugem asiática da soja progride na planta, evidenciando uma tendência e refletindo a importância desse efector na infecção. Além disso, por meio do uso das técnicas biotecnológicas previamente destacadas, a exemplo do sistema duplo híbrido de leveduras, foi identificada uma proteína presente na soja (KOG 3188) que interage com o efector Phapa-6409670 do fungo *Phakopsora pachyrhizi*. Entretanto, apesar das evidências destacadas, faz-se necessária uma validação final da interação identificada.

Sendo assim, nota-se que tais evidências serão fundamentais para possibilitar o desenvolvimento de formas alternativas de controle que promovam uma resistência de amplo espectro e durável, permitindo um controle mais efetivo deste patógeno.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amberg, D. C., Burke, D. J., & Strathern, J. N. (2006). Assay of β -galactosidase in yeast: assay of crude extracts. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(1), pdb-prot4157.

Beruski, G. C., Sentelhas, P. C., Pereira, A. B., Câmara, G. M., Junior, I. P., & Schiebelbein, L. M. (2020). Soybean rust epidemics as affected by weather conditions in Brazil. *Journal of Agricultural Science*, 12(1), 213-225.

Bromfield, K. R., & Hartwig, E. E. (1980). Resistance to Soybean Rust and Mode of Inheritance 1. *Crop Science*, 20(2), 254-255.

Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D., & Schlattner, U. (2009). Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *International journal of molecular sciences*, 10(6), 2763-2788.

Bueno, T. V., Fontes, P. P., Abe, V. Y., Utiyama, A. S., Senra, R. L., Oliveira, L. S., ... & Marcelino-Guimarães, F. C. (2022). 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*, 35(9), 779-790.

Bueno, T. V. et al. (2024) A *Phakopsora pachyrhizi* effector suppresses PAMP-triggered immunity and interacts with a soybean glucan endo-1,3-beta-glucosidase to promote virulence. *Molecular Plant–Microbe Interactions*, 35, 779–790.

Castel, P., Holtz-Morris, A., Kwon, Y., Suter, B. P., & McCormick, F. (2021). DoMY-Seq: A yeast two-hybrid–based technique for precision mapping of protein–protein interaction motifs. *Journal of Biological Chemistry*, 296.

Chicowski, A. S., Qi, M., Variz, H., Bredow, M., Montes, C., Caiazza, F., ... & Whitham, S. A. (2023). A soybean rust effector protease suppresses host immunity and cleaves a 3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase. *bioRxiv*, 2023-09.

Chicowski, A. S. et al. (2023) Soybean-*Phakopsora pachyrhizi* interactions: towards the development of next-generation disease-resistant plants. *Plant Biotechnology Journal*, 22, 296–315.

Childs, S. P., Buck, J. W., & Li, Z. (2018). Breeding soybeans with resistance to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*). *Plant Breeding*, 137(3), 250-261.

Childs, S. P., King, Z. R., Walker, D. R., Harris, D. K., Pedley, K. F., Buck, J. W., ... & Li, Z. (2018). Discovery of a seventh Rpp soybean rust resistance locus in soybean accession PI 605823. *Theoretical and Applied Genetics*, 131, 27-41.

Cooper, B. et al. Nuclear proteomic changes linked to soybean rust resistance. *Molecular bioSystems*, v. 7, n. 3, p. 773–83, mar. 2011.

De Carvalho, M. C. D. C., Costa Nascimento, L., Darben, L. M., Polizel-Podanosqui, A. M., Lopes-Caitar, V. S., Qi, M., ... & Marcelino-Guimarães, F. C. (2017). Prediction of

the in planta *Phakopsora pachyrhizi* secretome and potential effector families. *Molecular plant pathology*, 18(3), 363-377.

Dodds, P. N., & Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11(8), 539-548.

Ehlert, A. et al. Two-hybrid protein-protein interaction analysis in *Arabidopsis* protoplasts: establishment of a heterodimerization map of group C and group S bZIP transcription factors. *The Plant Journal*, v. 46, n. 5, p. 890–900, jun. 2006.

Fields, S., & Song, O. K. (1989). A novel genetic system to detect protein–protein interactions. *Nature*, 340(6230), 245-246.

Fields, S. (2005). High-throughput two-hybrid analysis: The promise and the peril. *The FEBS journal*, 272(21), 5391-5399.

Garcia, A., Calvo, É. S., de Souza Kiihl, R. A., Harada, A., Hiromoto, D. M., & Vieira, L. G. E. (2008). Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. *Theoretical and Applied Genetics*, 117(4), 545-553.

Godoy, C. V., Seixas, C. D. S., Soares, R. M., Marcelino-Guimarães, F. C., Meyer, M. C., & Costamilan, L. M. (2016). Ferrugem-asiática da soja no Brasil: passado, presente e futuro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51(5), 407-421.

Gupta, Y. K., Marcelino-Guimarães, F. C., Lorrain, C., Farmer, A., Haridas, S., Ferreira, E. G. C., ... & Van Esse, H. P. (2023). Major proliferation of transposable elements shaped the genome of the soybean rust pathogen *Phakopsora pachyrhizi*. *Nature Communications*, 14(1), 1835.

Hartwig, E. E. (1986). Identification of a fourth major gene conferring resistance to soybean rust 1. *Crop Science*, 26(6), 1135-1136.

HE, Y. et al. Yeast two-hybrid screening for proteins that interact with PFT in wheat. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 15521, 29 out. 2019.

Hidayat, O. O., & Somaatmadja, S. Screening of soybean breeding lines for resistance to soybean rust. *Phakopsora pachyrhizi*, 9-22.

Hossain, M. M. et al. Understanding *Phakopsora pachyrhizi* in soybean: comprehensive insights, threats, and interventions from the Asian perspective. *Frontiers in microbiology*, v. 14, p. 1304205, 2023.

Ito, T., Ota, K., Kubota, H., Yamaguchi, Y., Chiba, T., Sakuraba, K., & Yoshida, M. (2002). Roles for the two-hybrid system in exploration of the yeast protein interactome. *Molecular & Cellular Proteomics*, 1(8), 561-566.

Link, T.; Hirschburger, D.; Müller, M.; Voegelé, R.T. Reference genes in the pathosystem *Phakopsora pachyrhizi*/soybean suitable for normalization in transcript profiling. *International Journal of Molecular Sciences*. v. 16, p. 23057-075, 2015.

Lin, J. S., & Lai, E. M. (2023). Protein–Protein Interactions: Yeast Two Hybrid. In *Bacterial Secretion Systems: Methods and Protocols* (pp. 235-246). New York, NY: Springer US.

Li, S., Smith, J. R., Ray, J. D., & Frederick, R. D. (2012). Identification of a new soybean rust resistance gene in PI 567102B. *Theoretical and Applied Genetics*, 125, 133-142.

Lv, Peiyun; Wan, Jinlu; Zhang, Chunting; Hina, Aiman; Al Amin, G. M.; Begum, N.; Zhao, T. *Unraveling the Diverse Roles of Neglected Genes Containing Domains of Unknown Function (DUFs): Progress and Perspective. International Journal of Molecular Sciences*, Basel, v. 24, n. 4, p. 4187, 2023. DOI: 10.3390/ijms24044187.

Ma, LS; Wang, L.; Trippel, C.; Mendoza-Mendoza, A.; Ullmann, S.; Moretti, M.; Carsten, A.; Kahnt, J.; Reissmann, S.; Zechmann, B.; et al. O efector repetitivo Rsp3 de *Ustilago maydis* bloqueia a atividade antifúngica de proteínas de milho que se ligam à manose. *Nat. Commun.* 2018, 9 , 1711.

Miyakawa, T.; Hatano, K.; Miyauchi, Y.; Suwa, Y.; Sawano, Y.; Tanokura, M. Uma proteína secretada com motivo rico em cisteína específico de plantas funciona como uma lectina de ligação à manose que exhibe atividade antifúngica. *Plant Physiol.* 2014, 166 , 766–778.

Miyakawa, T.; Miyazono, K.; Sawano, Y.; Hatano, K.; Tanokura, M. Estrutura cristalina da ginkbilobina-2 com homologia ao domínio extracelular de cinases semelhantes a receptores ricos em cisteína de plantas. *Proteínas* 2009, 77 , 247–251.

Miguel Correa Marrero et al. Protein interaction mapping reveals widespread targeting of development-related host transcription factors by phytoplasma effectors. *The Plant Journal*, v. 117, n. 4, p. 1281–1297, 15 nov. 2023.

Mueller, T.A., Miles, M.R., Morel, W., Marois, J.J., Wright, D.L., Kemeraït, R.C., Levy, C. and Hartman, G.L. (2009) Effect of fungicide and timing of application on soybean rust severity and yield. *Plant Disease*. 93, 243–248.

Petre, B.; Joly, D. L.; Duplessis, S. (2014). Effector proteins of rust fungi. *Frontiers in plant science*, v. 5, p. 416, 2014.

Petre, B., Saunders, D. G., Sklenar, J., Lorrain, C., Win, J., Duplessis, S., & Kamoun, S. (2015). Candidate effector proteins of the rust pathogen *Melampsora larici-populina* target diverse plant cell compartments. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(6), 689-700.

Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 29, n. 45, 2001.

Qi, M., Grayczyk, J. P., Seitz, J. M., Lee, Y., Link, T. I., Choi, D., & Whitham, S. A. (2018). Suppression or activation of immune responses by predicted secreted proteins of

the soybean rust pathogen *Phakopsora pachyrhizi*. *Molecular plant-microbe interactions*, 31(1), 163-174.

Qi, M., Link, T. I., Müller, M., Hirschburger, D., Pudake, R. N., Pedley, K. F., & Whitham, S. A. (2016). A small cysteine-rich protein from the Asian soybean rust fungus, *Phakopsora pachyrhizi*, suppresses plant immunity. *PLoS Pathogens*, 12(9), e1005827.

Qi, M., Yu, H., Bredow, M., Chicowski, A. S., Fields, L. D., & Whitham, S. A. (2024). Insights into *Phakopsora pachyrhizi* effector–effector interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 37(3), 227-231.

Rincão, M. P., Carvalho, M. C. D. C. G. D., Nascimento, L. C., Lopes-Caitar, V. S., Carvalho, K. D., Darben, L. M., ... & Marcelino-Guimarães, F. C. (2018). New insights into *Phakopsora pachyrhizi* infection based on transcriptome analysis in planta. *Genetics and Molecular Biology*, 41, 671-691.

Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*. New York: Cold Springs Harbor Laboratc.

Seixas, C. D. S., Harger, N., de Oliveira, F. T., Seratto, C. D., Gheller, J. A., & de Oliveira, A. B. (2018). Monitoramento de *Phakopsora pachyrhizi* na safra 2017/2018 para tomada de decisão do controle da ferrugem-asiática da soja. Londrina: Embrapa Soja.

Sperschneider, J. et al. (2015). Advances and challenges in computational prediction of effectors from plant pathogenic fungi. *PLoS pathogens*, v. 11, n. 5, p. e1004806.

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.

Vidalain, P. O., Jacob, Y., Hagemeyer, M. C., Jones, L. M., Neveu, G., Roussarie, J. P., ... & De Haan, C. A. (2015). A field-proven yeast two-hybrid protocol used to identify coronavirus–host protein–protein interactions. *Coronaviruses: Methods and Protocols*, 213-229.

Yorinori, J. T., Nunes Junior, J., & Lazzarotto, J. J. (2004). Ferrugem "asiática" da soja no Brasil: evolução, importância econômica e controle.