

THAYS VIEIRA BUENO

**CARACTERIZAÇÃO DE EFETORES DE *Phakopsora pachyrhizi* E DE SEUS ALVOS
DE INTERAÇÃO NA SOJA**

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 C. Marcelino Guimarães

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2021**

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

T

B928c
2021
Bueno, Thays Vieira, 1991-
Caracterização de efetores de *Phakopsora pachyrhizi* e de
seus alvos de interação na soja / Thays Vieira Bueno. – Viçosa,
MG, 2021.
105 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Aluizio Borém de Oliveira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Interação planta-patógeno - Aspectos moleculares.
2. Ensaio de duplo híbrido de levedura. 3. Soja. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa
de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. II. Título.

CDD 22. ed. 633.34

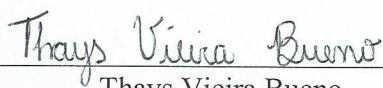
THAYS VIEIRA BUENO

CARACTERIZAÇÃO DE EFETORES DE *Phakopsora pachyrhizi* E DE SEUS ALVOS
DE INTERAÇÃO NA SOJA

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: 25 de fevereiro de 2021.

Assentimento:



Thays Vieira Bueno
Autora



Aluizio Borém de Oliveira
Orientador

Dedico à todas as pessoas,
as quais o trabalho desenvolvido nessa tese seja relevante e útil.

AGRADECIMENTOS

A gratidão é o sentimento que recebe maior espaço no meu coração nesse momento de finalização da tese. Pois, quando eu olho para trás, eu percebo que tudo só foi possível graças ao auxílio de diversas pessoas. Numa tentativa de expressar essa gratidão por todos que me auxiliaram escrevo esse agradecimento.

Agradeço à Deus, energia criadora de que tudo que existe, e por ter uma vida repleta de bênçãos e prosperidade. Agradeço a todos meus mentores espirituais por toda luz e boas vibrações emanadas para mim.

Agradeço a UFV e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade de aprimorar minha formação acadêmica.

Agradeço ao prof. Aluizio Borém pela orientação ao longo do doutorado e pela prontidão em me ajudar sempre que precisei dele.

Agradeço a Francismar Correa Marcelino-Guimarães primeiramente por ter aceitado me coorientar, e proporcionado muito aprendizado com sua orientação ao longo desses anos.

Agradeço ao prof. Luciano Fietto por ter me recebido em seu laboratório, me orientado nos experimentos e na escrita da tese.

Agradeço ao Prof. Felipe Lopes da Silva por ter me dado a oportunidade de inscrever no mestrado com ele, assim proporcionado a minha vinda para Viçosa e todo aprendizado que tive na UFV.

Agradeço ao Rhuston Magno Cortez dos Santos por ter participado das bancas de qualificação e de tese, colaborando com a produção desse trabalho.

Agradeço a Valeria Yukari Abe, amiga querida que Londrina me presenteou. Gratidão por todo auxílio nas análises de bioinformática, nos experimentos de bancada, por sempre sanar minhas dúvidas e estar sempre de braços abertos para me ajudar.

Agradeço a todas pessoas que trabalham no Laboratório de Biotecnologia Molecular.

Agradeço a Patrícia Pereira Fontes, amiga querida que Deus me presenteou nesse doutorado. Gratidão por ter sido uma amiga e orientadora no doutorado. Você foi muito importante para o sucesso desse trabalho. Gratidão por todo suporte, auxílio e ensinamentos sobre biologia molecular.

Agradeço ao Renato Senra pela amizade, auxílio com todos experimentos principalmente com a expressão e purificação de proteínas. Ao Higor Sette pela amizade, auxílio nos experimentos, por todas as piadas sem graça que tornavam nosso trabalho mais leve e alegre.

Agradeço aos queridos amigos Ananda Pereira Aguilar, Fernanda Albuini, Lilian Ribeiro, Amanda Bonoto, Silvana Dadalto, Ramila Rodrigues, Eduardo Monteiro e Gilza Barcelos pela amizade, ensinamentos e auxílio de todos vocês sempre que precisei.

Agradeço a toda equipe do laboratório da Embrapa Soja, Adriana Brombrini dos Santos e Silvana Rockenbach pela ajuda com os experimentos na Embrapa; ao Rafael Guayato pela ajuda nos ensaios de Co-IP, a Liliane Santana pela prontidão em auxiliar nas análises de bioinformática; a Fernanda Machado Castanho, Roberta Costa e Alice Utiyama por todo auxílio quando estava na Embrapa.

Agradeço a Rosangela Maria Barbosa, primeira pessoa que conheci em Viçosa, e hoje uma das principais pessoas da minha vida. Gratidão por todos os momentos que passamos juntas, por estar sempre pronta para me ajudar, por todo carinho e amor dedicados a mim.

Agradeço a Viviane Flaviana Condé, irmã que encontrei em Viçosa. Gratidão pela amizade, companheirismo, carinho, amor e por todo auxílio sempre. Nessa reta final do doutorado você foi fundamental para eu não perder as esperanças e o foco.

Agradeço aos meus pais, Flávio e Joelma, por terem me colocado nesse mundo, por serem a fonte de força e auxílio em qualquer momento da minha vida. Gratidão por vocês existirem e serem esses seres especiais.

Agradeço aos meus queridos irmãos pelo carinho e amor dedicados a mim. Matheus e Flavinho, gratidão por serem esses seres fascinantes que vocês são, por sempre me ouvirem e me inspirarem a ser sempre um ser humano melhor.

Agradeço aos amigos Mara Lucia, Rafael Finzi, Luciana Gontijo, Rayssa Camargo, Filipe Inácio, Felipe Morelli, amigos desde o tempo de graduação que são sempre presentes em minha vida, trazendo amor, alegria, conforto e aprendizados sempre.

Agradeço a todos os seres do planeta Terra que indireta ou diretamente contribuíram para esse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Mãos em prece.

“Mas o que salva a humanidade
É que não há quem cure a curiosidade...” (Tom Zé)

RESUMO

BUENO, Thays Vieira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2021. **Caracterização de efetores de *Phakopsora pachyrhizi* e de seus alvos de interação na soja.** Orientador: Aluizio Borém de Oliveira. Coorientadora: Francismar Corrêa Marcelino-Guimarães.

A ferrugem asiática da soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, é uma das principais doenças que acometem esta cultura, sendo um fator limitante para a produção de soja no Brasil e no mundo. As principais estratégias de controle dessa doença baseiam-se na utilização de fungicidas, no estabelecimento de vazio sanitário, uso de cultivares precoces e uso de resistência genética. A resistência genética da soja a partir de técnicas de melhoramento tem sido explorada, utilizando genes de resistência a *P. pachyrhizi* (*Rpp*). Embora tenha sido mapeado sete genes de resistência, ainda não existem cultivares de soja com resistência a todos os isolados da população do patógeno. Nesse sentido, a utilização de técnicas biotecnológicas associadas ao melhoramento de plantas pode auxiliar na produção de cultivares com resistência durável. Para tanto, a compreensão sobre interação soja - *P. pachyrhizi* é de suma importância para o sucesso no controle da doença. O objetivo do trabalho foi caracterizar os candidatos a efetores de *P. pachyrhizi* por meio da validação da função efetora e identificação de parceiros de interação das proteínas dos efetores candidatos, de forma a compreender o papel das interações na resposta de defesa da planta. Foi realizado os ensaios de duplo híbrido de levedura e *pull down* para identificar proteínas da soja que interagem com o efector Phapa-7431740. A proteína glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase (Gm β GLU) interagiu com o efector Phapa- 7431740 pelo sistema duplo híbrido de levedura. Para caracterização da beta-1,3-glucanase da soja foi realizado análise filogenética da família PR-2 e perfil de expressão gênica no genótipo de soja suscetível e resistente de *P. pachyrhizi*. Para caracterização *in silico* do candidato a efector Phapa-6417246 foi utilizado os bancos de dados dos três genomas de *Phakopsora* disponíveis no *Joint Genome Institute* (JGI). Para o efector Phapa-6417246 foi realizado os ensaios de supressão de PTI e ETI, e a análise de RT-qPCR ao longo do ciclo infeccioso em folhas de soja (cultivar BRS 184). Além disso, foi realizado o ensaio de *pull down*. Os resultados permitiram demonstrar que o candidato a efector Phapa- 6417246 suprimiu as respostas de defesa da planta mediadas por PTI e ETI, e sua expressão foi induzida na presença do hospedeiro nos tempos 6, 12, 24 e 48 horas após a inoculação do fungo. Assim, concluiu-se que a proteína da soja Gm β GLU é possivelmente alvo

do candidato a efetor de *P. pachyrhizi* Phapa-7431740. Esse efetor pode interferir na atividade dessa enzima, que é uma proteína relacionada a patogênese induzida pela presença do patógeno. Além disso, foi validada a função efetora do candidato a efetor Phapa-6417246, sendo esse efetor induzido na presença do hospedeiro. Porém, ainda são necessários realizar mais estudos para aprofundar o entendimento da atuação dos efetores nos mecanismos de defesa da planta.

Palavras-chave: Beta-1,3-glucanases. Interação planta-patógeno. Proteínas efetoras. Sistema duplo híbrido de levedura. Soja.

ABSTRACT

BUENO, Thays Vieira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2021. **Characterization of *Phakopsora pachyrhizi* effectors and their interaction targets in soybean.** Adviser: Aluizio Borém de Oliveira. Co-adviser: Francismar Corrêa Marcelino Guimarães.

Asian soybean rust, caused by the fungus *Phakopsora pachyrhizi*, is one of the major diseases that affect soybean, being a limiting factor for this crop production in Brazil and worldwide. The main strategies for controlling Asian soybean rust comprise fungicides action, the establishment of a sanitary void, the use of early cultivars, and genetic control. The promotion of soybeans' genetic resistance using breeding techniques has been explored using *P. pachyrhizi* (Rpp) resistance genes. Although seven resistance genes have been mapped, there are still no soybean cultivars resistant to all pathogen population isolates. Thus, the use of biotechnological techniques for plant breeding can contribute to the production of cultivars with lasting resistance. Therefore, understanding the soybean - *P. pachyrhizi* interaction is very important for the successful control of this disease. This work aimed to characterize candidate effectors of *P. pachyrhizi* through the validation of the effectors' function and identification of the effectors' interaction partners to understand the role of these interactions in the plant defense response. Yeast two-hybrid and pull-down assays were performed to identify soybean proteins that interact with the Phapa-7431740 effector. The glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase (Gm β GLU) protein interacted with the Phapa-7431740 effector by the yeast two-hybrid system. Phylogenetic analysis of the PR-2 family and the gene expression profile of susceptible and resistant soybean genotype to *P. pachyrhizi* were performed to characterize the soybean beta 1,3 glucanase. For the in silico characterization of the Phapa-6417246 candidate effector, the three genomes of *Phakopsora* available at the Joint Genome Institute (JGI) were used. Suppression tests of PTI and ETI and RT-qPCR analysis during the infectious cycle in soybean leaves (cultivar BRS 184) were performed for the Phapa-6417246 effector. In addition to that, the pull down test was performed. The Phapa-6417246 candidate effector suppressed the plant defense responses mediated by PTI and ETI, and its expression was induced in the host presence at 6, 12, 24, and 48 hours after the fungus inoculation. It was concluded that the Gm β GLU soybean protein is a possible target of the *P. pachyrhizi* Phapa-7431740 candidate effector. This effector may interfere with the activity of this enzyme, which is a protein related to the pathogenesis induced by the presence of *P. pachyrhizi*. Also, the function of the Phapa-6417246

candidate effector was validated, and its expression was induced in the presence of the host. However, further studies are still needed to deepen the understanding of effectors' performance in the plant's defense mechanisms.

Keywords: Beta-1,3-glucanases. Plant-pathogen interaction. Effector proteins. Yeast two-hybrid. Soybean.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	14
REFERÊNCIAS	16
CAPITULO I	17
RESUMO.....	18
ABSTRACT	19
1 INTRODUÇÃO	20
2 MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1 Caracterização <i>in silico</i> do candidato a efector Phapa-7431740.....	22
2.2 Ensaio de duplo híbrido de levedura	22
2.2.1 Clonagem do modelo gênico Phapa-7431740	22
2.2.2 Ensaio de transativação.....	23
2.2.3 Varredura para identificação de interação proteína-proteína pelo sistema de duplo híbrido de leveduras	24
2.2.4 Caracterização das interações pela ativação de genes repórteres.....	24
2.2.5 Análise das sequências obtidas no sequenciamento	25
2.3 Caracterização <i>in silico</i> da família PR-2 em soja	26
2.4 Perfil de expressão de Gm β GLU ao longo do ciclo infeccioso de <i>P. pachyrhizi</i>	27
2.4.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA.....	27
2.4.2 Análise RT-qPCR	27
2.5 Expressão heteróloga e purificação de proteína	28
2.5.1 Expressão da proteína candidata a efector do modelo gênico Phapa- 7431740 em transformantes de <i>E. coli</i> BL21 (DE3)-pLysS.....	28
2.5.2 Expressão da proteína da soja Gm β GLU em transformantes de ArcticExpress (D3)	29
2.5.3 Extração e purificação das proteínas.....	29
2.6 Ensaio de <i>pull down</i>	30
2.7 Técnicas de biotecnologia molecular.....	31
3 RESULTADOS	32
3.1 Caracterização <i>in silico</i> do gene candidato a efector	32
3.2 Identificação e caracterização de parceiros de interação da proteína candidata a efector Phapa-7431740	34
3.3 Caracterização da família PR-2 de soja	37
3.3 Perfil de expressão de Gm β GLU nos genótipos suscetível e resistente de soja infectados por <i>P. pachyrhizi</i>	45

3.4 Validação da interação proteína-proteína por <i>pull-down</i>	45
4 DISCUSSÃO	48
4.1 Interação de Gm β GLU com efector de <i>P. pachyrhizi</i>	48
4.2 Caracterização da proteína Gm β GLU	50
4.3 Expressão de genes PR-2 na presença de patógenos	52
5 CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS	55
CAPITULO II.....	61
RESUMO.....	62
ABSTRACT	63
1 INTRODUÇÃO	64
2 MATERIAL E MÉTODOS	66
2.1 Análises <i>in silico</i>	66
2.2 Clonagem do modelo gênico candidato a efector Phapa-6417246	67
2.3 Ensaio de supressão de PTI	67
2.3.1 Detecção da formação de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) por meio do corante DAB (3,3'-diaminobenzidina).....	68
2.3.2 Detecção do acúmulo de calose.....	68
2.4 Ensaio de supressão de ETI.....	69
2.5 Perfil de expressão gênica do candidato a efector Phapa-6417246 de <i>P. pachyrhizi</i> ao longo do ciclo infeccioso	69
2.5.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA.....	70
2.5.2 Análise RT-qPCR	70
2.6 Ensaio de transativação.....	71
2.7 Expressão heteróloga e purificação de proteína efectora	71
2.7.1 Expressão da proteína candidata a efector Phapa-6417246 em transformantes de ArcticExpress (D3)	71
2.7.2 Solubilização da proteína da fração insolúvel.....	72
2.8 Ensaio de <i>pull-down</i>	73
2.9 Técnicas de biotecnologia molecular.....	74
3 RESULTADOS	75
3.1 Caracterização <i>in silico</i> do modelo gênico Phapa-6417246	75
3.2 Supressão de respostas de defesa pelo efector Phapa-6417246	77
3.3. Perfil de expressão do Phapa-6417246 ao longo do ciclo infeccioso de <i>P. pachyrhizi</i>	79
3.4 Identificação de proteínas de soja parceiras de interação do efector candidato Phapa-6417246	80

4 DISCUSSÃO	91
5 CONCLUSÕES.....	94
REFERÊNCIAS	95
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	99
ANEXO 1.....	100

INTRODUÇÃO GERAL

A ferrugem asiática da soja é uma das principais doenças que afeta esta cultura, sendo um fator limitante para a produção de soja no Brasil e no mundo. Causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, pertencente a ordem Pucciniales (Goellner et al., 2010), a ferrugem asiática pode ocasionar perdas de produtividade de até 90%, quando em condições favoráveis ao desenvolvimento da doença (Goellner et al., 2010; Tremblay et al., 2013).

Atualmente, as principais estratégias de controle da ferrugem asiática da soja baseiam-se na utilização de fungicidas, no estabelecimento de vazio sanitário, uso de cultivares precoces e na delimitação do período de semeadura em alguns estados do Brasil (Goellner et al., 2010; Tremblay et al., 2013). O uso de fungicidas é um dos principais métodos, porém não é totalmente eficaz, uma vez que o nível de controle depende da quantidade inicial do inóculo do patógeno e do tempo de aplicação do produto (Goellner et al., 2010), além de não existir nenhum fungicida utilizado para o controle da ferrugem, ao qual não tenha sido relatada a resistência ou menor sensibilidade.

A resistência genética da soja a partir de técnicas de melhoramento tem sido explorada, utilizando genes de resistência a *P. pachyrhizi* (*Rpp*). Já foram mapeados sete genes de resistência. Entretanto, cultivares de soja com resistência a todos os isolados da população de patógenos ainda não estão disponíveis no mercado (Pham et al., 2009).

Como o controle da doença é limitado, há o interesse em investigar estratégias de controle, como as baseadas em novas técnicas biotecnológicas. Para tanto, há necessidade de mais pesquisas sobre a interação soja - *P. pachyrhizi*.

É sabido que as plantas possuem mecanismos de resistência basal devido a sua capacidade de reconhecer os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e também de reconhecer proteínas efetoras, secretadas pelo patógeno, por meio de receptores intracelulares (Dodds & Rathjen, 2010).

Para obter sucesso na infecção os fungos biotróficos, como *P. pachyrhizi*, produzem proteínas efetoras que são direcionadas ao citoplasma do hospedeiro, tornando o ambiente favorável ao crescimento e à reprodução do patógeno (Hall et al., 2009). Essas alterações causadas pelo patógeno podem incluir a supressão do sistema imune do hospedeiro, juntamente com a adaptação do metabolismo do hospedeiro para nutrição do fungo, uma vez que as proteínas efetoras são capazes de alterar os processos celulares do hospedeiro (Hall et al., 2009; Panstruga & Dodds, 2009).

Os estudos moleculares recentes sobre a resposta de defesa da planta e estratégias de infecção do patógeno estão desvendando uma nova perspectiva sobre essa interação planta-patógeno (Dodds & Rathjen, 2010). Assim, com a identificação e a caracterização de efetores de *P. pachyrhizi* espera-se encontrar informações sobre os mecanismos de ação que permitem a penetração e colonização do fungo na planta de soja e, desta forma, promover a infecção e suprimir a defesa da planta (Qi et al., 2016; Whitham et al., 2016). Esse entendimento é de suma importância para o desenvolvimento de estratégias que possibilitem uma resistência durável e de amplo espectro para controle desse patógeno.

Existem estudos a nível do transcriptoma de *P. pachyrhizi* expresso durante a interação com a soja (Carvalho et al., 2017; Tremblay et al., 2013) e em estruturas especializadas como o haustório (Kunjeti et al., 2016; Link et al., 2014), contudo, pouco se sabe sobre o processo de infecção a nível molecular (Luster et al., 2010). Utilizando a predição de efetores candidatos pelo secretoma de *P. pachyrhizi in planta* por meio do sistema de secreção III de bactérias em folhas de *Nicotiana benthamiana*, foi possível identificar proteínas candidatas a efector capazes de suprimir a resposta de defesa da planta mediada pela imunidade ativada por efetores (ETI) (Carvalho et al., 2017).

Visto isso, este trabalho teve como objetivo caracterizar os candidatos a efetores de *P. pachyrhizi* por meio da validação da função efetora e identificação de parceiros de interação das proteínas dos efetores candidatos, de forma a compreender o papel das interações na resposta de defesa da planta. A partir das interações obtidas, inferir sobre as possíveis vias de sinalização em que os efetores candidatos possam atuar.

REFERÊNCIAS

- Carvalho, M. C. da C. G., Costa Nascimento, L., Darben, L. M. ., Polizel-Podanosqui, A. M. ., Lopes-Caitar, V. S., Qi, M., Rocha, C. S., Carazzolle, M. F., Kuwahara, M. K., Pereira, G. A. G., Abdelnoor, R. V., Whitham, S. A., & Marcelino-Guimarães, F. C. (2017). Prediction of the in planta *Phakopsora pachyrhizi* secretome and potential effector families. *Molecular Plant Pathology*, 18(3), 363–377. <https://doi.org/10.1111/mpp.12405>
- Dodds, P. N., & Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11(8), 539–548. <https://doi.org/10.1038/nrg2812>
- Goellner, K., Loehrer, M., Langenbach, C., Conrath, U., & Koch, E. (2010). *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. *Molecular Plant Pathology*, 11(2), 169–177. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00589.x>
- Hall, S. A., Allen, R. L., Baumer, R. E., Baxter, L. A., Fisher, K., Bittiner-Eddy, P. D., Rose, L. E., Holub, E. B., & Beynon, J. L. (2009). Maintenance of genetic variation in plants and pathogens involves complex networks of gene-for-gene interactions. *Molecular Plant Pathology*, 10(4), 449–457. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00544.x>
- Kunjeti, S. G., Iyer, G., Johnson, E., Li, E., Broglie, K. E., Rauscher, G., & Rairdan, G. J. (2016). Identification of *Phakopsora pachyrhizi* Candidate Effectors with Virulence Activity in a Distantly Related Pathosystem. *Frontiers in Plant Science*, 7(MAR2016). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00269>
- Link, T. I., Lang, P., Scheffler, B. E., Duke, M. V., Graham, M. A., Cooper, B., Tucker, M. L., van de Mortel, M., Voegelé, R. T., Mendgen, K., Baum, T. J., & Whitham, S. A. (2014). The haustorial transcriptomes of *Uromyces appendiculatus* and *Phakopsora pachyrhizi* and their candidate effector families. *Molecular Plant Pathology*, 15(4), 379–393. <https://doi.org/10.1111/mpp.12099>
- Luster, D. G., McMahon, M. B., Carter, M. L., Fortis, L. L., & Nuñez, A. (2010). Proteomic analysis of germinating urediniospores of *Phakopsora pachyrhizi*, causal agent of Asian soybean rust. *PROTEOMICS*, 10(19), 3549–3557. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900469>
- Panstruga, R., & Dodds, P. N. (2009). Terrific Protein Traffic: The Mystery of Effector Protein Delivery by Filamentous Plant Pathogens. *Science*, 324(5928), 748–750. <https://doi.org/10.1126/science.1171652>
- Pham, T. A., Miles, M. R., Frederick, R. D., Hill, C. B., & Hartman, G. L. (2009). Differential Responses of Resistant Soybean Entries to Isolates of *Phakopsora pachyrhizi*. *Plant Disease*, 93(3), 224–228. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-3-0224>
- Qi, M., Link, T. I., Müller, M., Hirschburger, D., Pudake, R. N., Pedley, K. F., Braun, E., Voegelé, R. T., Baum, T. J., & 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. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005827>
- Tremblay, A., Hosseini, P., Li, S., Alkharouf, N. W., & Matthews, B. F. (2013). Analysis of *Phakopsora pachyrhizi* transcript abundance in critical pathways at four time-points during infection of a susceptible soybean cultivar using deep sequencing. *BMC Genomics*, 14(1), 614. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-614>
- Whitham, S. A., Qi, M., Innes, R. W., Ma, W., Lopes-Caitar, V., & Hewezi, T. (2016). Molecular Soybean-Pathogen Interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 54(1), 443–468. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100156>

CAPITULO I

Proteína glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase (Gm β GLU) da soja como alvo de interação de efector de *Phakopsora pachyrhizi*

RESUMO

A ferrugem asiática da soja é uma das principais doenças que afetam o desenvolvimento da cultura da soja. As limitações das estratégias de controle são relacionadas a interação soja - *P. pachyrhizi* apresentar alta especificidade. A *P. pachyrhizi* é capaz de secretar efetores envolvidos no parasitismo, através do haustório. Embora alguns estudos tenham validado a função efetora das proteínas secretadas pelo fungo, apenas um efector teve seu alvo identificado na soja. Tais estudos são essenciais para compreensão dos mecanismos de patogênese e, consequentemente, auxiliar no desenvolvimento de alternativas de controle da doença. O objetivo deste trabalho foi compreender os mecanismos de patogenicidade de *P. pachyrhizi* na interação com a soja, a partir da identificação dos possíveis parceiros de interação do modelo gênico Phapa-7431740. Para identificar a proteína da soja que interage com o efector, foi utilizado técnicas moleculares como ensaios de duplo híbrido de levedura e *pull down*. Para caracterização da beta-1,3-glucanase da soja foi realizado análise filogenética da família PR-2 e perfil de expressão gênica no genótipo de soja suscetível e resistente de *P. pachyrhizi*. A proteína glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase (Gm β GLU) interagiu com o efector Phapa-7431740 pelo sistema duplo híbrido de levedura. A família PR-2 de soja foi dividida em oito subfamílias, e a Gm β GLU foi classificada como tipo IV quanto a estrutura dos domínios na proteína. Os resultados permitiram concluir que a proteína da soja Gm β GLU é possivelmente alvo do candidato a efector de *P. pachyrhizi*, Phapa-7431740. Esse efector pode interferir na atividade dessa enzima, que é uma proteína relacionada a patogênese induzida pela presença do patógeno.

Palavras-chave: Efector de ferrugem. Interação planta-patógeno. Interação proteína-proteína. *Glycine max*.

ABSTRACT

Asian soybean rust is one of the major diseases that affect the development of soybean culture. The control strategies for this disease present as a limitation the high specificity of the soybean - *P. pachyrhizi* interaction. *P. pachyrhizi* can secrete effectors involved in parasitism through the haustoria. Although some studies have validated the effector function of proteins secreted by this fungus, only one effector had its target identified in soybean. Such studies are essential for understanding the mechanisms of pathogenesis and, consequently, assisting in the development of alternatives to control this disease. The aim of this work was to understand the pathogenic mechanisms of *P. pachyrhizi* in the interaction with soybean by identifying possible interaction partners of the Phapa-7431740 gene model. Molecular techniques, such as yeast two-hybrid and pull-down assays, were used to identify the soybean protein that interacts with the effector. Phylogenetic analysis of the PR-2 family and the gene expression profile of susceptible and resistant soybean genotype to *P. pachyrhizi* were performed to characterize the soybean beta-1,3-glucanase. The glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase (Gm β GLU) protein interacted with the Phapa-7431740 effector in the yeast two-hybrid system. The PR-2 soybean family was divided into eight subfamilies, and Gm β GLU was classified as type IV according to the structure of the protein domains. It was concluded that the soybean protein Gm β GLU is a possible target of the *P. pachyrhizi* effector candidate Phapa-7431740. This effector may interfere with the activity of this enzyme, which is a protein related to the pathogenesis induced by the presence of *P. pachyrhizi*.

Keywords: Protein-protein interaction. Rust effector. host-pathogen interaction. *Glycine max*

1 INTRODUÇÃO

A ferrugem asiática da soja causada pelo fungo biotrófico *Phakopsora pachyrhizi* (Sydow & Sydow) é uma das principais doenças que afetam a cultura. Desde o primeiro relato de sua ocorrência no Brasil, em 2001, a ferrugem asiática tem causado danos significativos a soja levando a grandes perdas econômicas (Godoy et al., 2016). Uma das dificuldades de controle se deve ao fato da interação soja - *P. pachyrhizi* apresentar alta especificidade, pois, uma vez que este fungo é um parasita obrigatório, há uma coevolução entre o patógeno e seu hospedeiro, o que torna esse patógeno altamente adaptativo (Aime et al., 2017). Logo, o entendimento sobre os processos biológicos e moleculares do fungo torna-se relevante para o maior conhecimento sobre essa doença (Rincão et al., 2018), e a partir disso, encontrar outras alternativas de controle.

Em função disso, o estudo das interações moleculares do patossistema soja - *P. pachyrhizi* é de suma importância para auxiliar no controle da doença. Os estudos de interação soja - *P. pachyrhizi* disponíveis focam principalmente em análises de transcriptoma, visando identificar genes responsivos na soja durante a infecção em interações compatíveis e incompatíveis (Morales et al., 2013; Panthee et al., 2007; Schneider et al., 2011; van de Mortel et al., 2007). Alguns trabalhos utilizaram análises de proteômica para identificar proteínas do fungo presentes na germinação dos urediniósporos (Luster et al., 2010) e proteínas específicas no processo de formação do apressório (Stone et al., 2012).

O secretoma da *Phakopsora* foi descrito pela primeira vez a partir da análise de RNAseq utilizando amostras oriundas do haustório do fungo (Link et al., 2014). Posteriormente, este secretoma foi expandido para 851 proteínas candidatas quando combinou o sequenciamento de alto desempenho com a microdissecção a laser da lesão (Carvalho et al., 2017) e os transcritos obtidos desse secretoma foram caracterizados quanto aos processos moleculares (Rincão et al., 2018).

Apesar destes trabalhos, poucos são os estudos disponíveis que visam validar a função efetora das proteínas secretadas por *P. pachyrhizi*. Dois candidatos a efetores de *P. pachyrhizi* (CSEP-07 e CSEP-09) foram capazes de aumentar a infecção de *P. infestans* em folhas de tabaco, sugerindo um papel na virulência do fungo da ferrugem da soja (Kunjetti et al., 2016). Com o objetivo de validar candidatos a efetores de *P. pachyrhizi* (PpECs) em larga escala, um estudo demonstrou que 17 PpECs foram capazes de suprimir a imunidade ativada por padrões moleculares associados a patógenos (PTI) (Qi et al., 2018). O efector PpEC23 é o único efector

de *P. pachyrhizi* identificado, e teve seu alvo de interação caracterizado no hospedeiro (Qi et al., 2016). Esse efector interagiu com o fator de transcrição da soja, GmSPL121, pelo ensaio de duplo híbrido de levedura, e foi sugerido seu papel na patogenicidade por meio da interferência direta na regulação pós-transcricional de GmSPL121.

O candidato a efector de *P. pachyrhizi*, de_novo_3939, foi capaz de suprimir a ETI, utilizando *Pseudomonas syringae* (Pst) DC3000 em folhas de tabaco, validando sua função efetora (Carvalho et al., 2017). Os autores realizaram o estudo das famílias dessas proteínas candidatas a efector e identificaram que o de_novo_3939 é pertencente à família 3, em que seus membros possuem alta quantidade de cisteína; são proteínas secretadas de tamanho pequeno; e apresentam os motivos conservados, [AFY]xC e [FY]xC. Estes motivos foram descritos como possivelmente importantes entre candidatos a efetores do fungo causadores de ferrugem (Link et al., 2014; Saunders et al., 2012).

Após a publicação do primeiro genoma de referência de *P. pachyrhizi* (MT2006), o candidato de_novo_3939 foi identificado como correspondente ao modelo gênico Phapa-7431740, confirmando a sequência de codificação da proteína (CDS) predita em trabalho anterior (Carvalho et al., 2017). Este gene codifica uma proteína de 121 aminoácidos e contém o domínio EGF_CA (PF07645.16). O candidato a efector foi também identificado em outros dois genomas de *P. pachyrhizi* (UFV02 e K8108), recentemente publicados.

Com base no exposto, objetivo deste trabalho foi compreender os mecanismos de patogenicidade de *P. pachyrhizi* na interação com a soja, a partir da identificação dos possíveis parceiros de interação do modelo gênico Phapa-7431740, utilizando ensaios de duplo híbrido de levedura e *pull down*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização *in silico* do candidato a efetor Phapa-7431740

A sequência do transcrito do candidato a efetor de *P. pachyrhizi* de_novo_3939 (Carvalho et al., 2017) foi analisada quanto à similaridade significativa (70% de identidade e 50% de cobertura) com as sequências de proteínas do banco de dados dos três genomas de *Phakopsora pachyrhizi* (MT2006, PPUFV02 e K8108) disponíveis no JGI (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/mycocosm/home>). Essa sequência foi avaliada para verificar a presença da mesma nos genomas disponíveis, a clonagem correta e para demonstrar a estrutura do gene.

Foram realizadas análises do número e percentual de resíduos de cisteína na proteína madura e presença de domínios conservados pelo PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>), que são indicativos de sua provável função biológica. Domínios com valores de *Evalue* maior que 10^{-5} foram ignorados (Saunders et al., 2012).

2.2 Ensaio de duplo híbrido de levedura

2.2.1 Clonagem do modelo gênico Phapa-7431740

O modelo gênico Phapa-7431740 foi amplificado com *primers* específicos (Tabela 1) e clonado no vetor pCR8[®]/GW/TOPO (Invitrogen[®]) formando o vetor de entrada GW/TOPO_Phapa-7431740. Após confirmação da clonagem por sequenciamento, o vetor GW/TOPO_Phapa-7431740 foi utilizado para recombinar o modelo gênico P-7431740 para o vetor de destino pDEST32 (LEU2, CEN, Gentamicina[®]), formando o vetor BD-7431740, utilizando a enzima LR clonase (Invitrogen[®]), pelo sistema Gateway. O vetor BD-7431740 resultou no clone em que a sequência do gene está fusionada ao domínio de ligação ao DNA (BD) do Gal4p. Em seguida, a clonagem foi confirmada por PCR e posterior sequenciamento do plasmídeo.

Tabela 1 – Oligonucleotídeos específicos para amplificação e clonagem do modelo gênico 7431740, para amplificação dos vetores, e oligonucleotídeos específicos para RT-qPCR do gene Glyma.15G142400.1 (GmβGLU).

Oligonucleotídeos	Sequência (5'-3')
Fw-Phapa7431740	TCTACACTGGTGCCAATACCAC
Rv-Phapa7431740	TTCAGTTGCAGTGACGAAGG
Fw-pDEST22	AACCGAAGTGCGCCAAGTGTCTG
Rv-pDEST22	AGCCGACAACCTTGATTGGAGAC
Fw-pDEST32	TATAACGCGTTTGGGAATCACT
Rv-pDEST32	AGCCGACAACCTTGATTGGAGAC
Fw-pEXPAD-502	CGGTCCGAACCTCATAACAACCTC
Rv-pEXPAD-502	GTAAATTTCTGGCAAGGTAGAC
Fw-T7	TAATACGACTCACTATAGGG
Rv-T7 terminal	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
Fw-GmβGLU.1-RT	CCTTGCCACCAATCCTGACA
Rv-GmβGLU.1-RT	CCTCCAACGGGACTCACTTC

2.2.2 Ensaio de transativação

Um ensaio preliminar de transativação foi realizado para determinar a capacidade do candidato a efetor Phapa-7431740 ativar sozinho 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 transformada pelo método do acetato de lítio/polietilenoglicol, com o vetor de BD- 7431740 (isca) e o vetor pDEST22 vazio, e o resultado da transformação foi plaqueado em meio de seleção *synthetic dropout* (SD) na ausência de leucina e triptofano (SD-LEU-TRP).

As colônias AH109 transformadas foram crescidas em meio líquido e utilizadas no ensaio de transativação do gene repórter HIS3, segundo o manual da *Clontech*®, variando-se a concentração 3-AT (3-amino-1,2,4-triazol) no meio. O resultado deste ensaio foi utilizado para determinar a concentração do inibidor a ser utilizado na varredura.

2.2.3 Varredura para identificação de interação proteína-proteína pelo sistema de duplo híbrido de leveduras

A varredura pelo duplo híbrido de leveduras foi realizada de acordo com o manual da *Clontech*[®]. O rastreio foi realizado com a biblioteca de cDNA anteriormente preparada (Alves et al., 2011).

As leveduras AH109 transformadas com o vetor contendo o efetor (AH109 BD- 7431740) foram inoculadas em meio SD-LEU e crescidas por 16 a 18 horas a 28 °C e 180 rpm. O pré-inóculo foi transferido para 80 mL de meio SD-LEU e mantido a 28 °C e 180 rpm até atingir D.O.₆₀₀ = 0,4 - 0,6. A cultura foi centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos, e o *pellet* ressuspensionado em água destilada autoclavada. O passo de lavagem foi repetido três vezes. Na última lavagem, o *pellet* foi ressuspensionado no mix de transformação (7,2 mL de 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 minutos 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 minutos. A transformação foi centrifugada a 5000 x g a 20 °C por 10 minutos e o *pellet* lavado com água destilada por três vezes e ressuspensionado em meio seletivo SD na ausência de leucina, triptofano e histidina (SD-LEU-TRP-HIS). A transformação foi plaqueada em meio SD-LEU-TRP-HIS.

As colônias crescidas foram transferidas para placas com meio de seleção SD-LEU-TRP-HIS nas concentrações 0,0; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 mM de 3-AT. As colônias crescidas em maior concentração de 3-AT foram transferidas para meio de seleção líquido e os plasmídeos foram extraídos com o kit *Zymoprep Yeast Plasmid Miniprep I* (*Zymo Research*[®]). Para amplificação dos vetores-presa e manutenção em estoque, os plasmídeos extraídos da levedura foram utilizados para a transformação de bactérias DH5α competentes.

2.2.4 Caracterização das interações pela ativação de genes repórteres

As interações encontradas foram caracterizadas quanto à ativação de dois genes repórteres, segundo orientações do manual da *Clontech*[®]. O primeiro desses genes repórteres, HIS3, codifica a enzima His3p (imidazolglicerol-fosfato desidratase). A expressão desse gene confere capacidade de crescimento em meio deficiente em histidina a linhagens de leveduras auxotróficas para esse aminoácido. Essa enzima possui um inibidor competitivo, o 3-AT. Desse

modo, a intensidade das interações reflete-se na expressão dos níveis de His3p e, consequentemente, na sobrevivência das leveduras em elevadas concentrações de 3-AT.

Para este ensaio, as leveduras obtidas na varredura foram plaqueadas em meios seletivos SD-LEU-TRP-HIS com diferentes concentrações de 3-AT, variando de 0 a 10 mM, e crescidas em estufa a 28 °C por sete dias.

O segundo gene repórter, LacZ, codifica a enzima β -galactosidase e a atividade desse gene pode ser visualizada pela degradação de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -Dgalactopiranosídeo), ensaio no qual as interações entre proteínas são identificadas pelo aparecimento de coloração azul.

Nesse ensaio, as leveduras foram transferidas para membrana de nitrocelulose sobre meio sólido SD-LEU-TRP, e crescidas a 28 °C durante quatro dias. Após o crescimento das leveduras, a membrana foi submersa em nitrogênio líquido para garantir a ruptura da parede celular das células e então foi colocada sobre papel filtro embebido em tampão Z (Na_2HPO_4 60 mM, NaH_2PO_4 40 mM, KCl 10 mM, MgSO_4 1 mM pH7,0) adicionado de X-gal ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$). A membrana foi incubada a 28°C até o desenvolvimento de coloração azul.

Para ambos os ensaios, foi utilizado como controle positivo a proteína GmbZIPE2 (BD- E2 + AD- E2) que já se tem a confirmação da interação entre elas (Alves et al., 2015). Os controles negativos foram os plasmídeos vazios (BD- vazio + AD- vazio) e o plasmídeo BD contendo o efector Phapa-7431740 juntamente com o plasmídeo AD vazio (BD- 7431740 + AD- vazio).

2.2.5 Análise das sequências obtidas no sequenciamento

As sequências das presas obtidas foram amplificadas com *primers* específicos do vetor pEXP-AD502 (Tabela 1) e os produtos de PCR foram submetidos ao sequenciamento. As sequências obtidas foram analisadas por meio da retirada da região correspondente ao vetor pEXP-AD502 e posteriormente analisadas no ORFINDER (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) para identificação do frame de leitura das sequências. As sequências foram analisadas por busca de similaridade no *Phytozome* (<http://www.phytozome.net/>) e *National Center for Biotechnology Information* - NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para identificação das proteínas correspondentes.

2.3 Caracterização *in silico* da família PR-2 em soja

A proteína glucan endo-1,3-beta-glucosidase (Gm β GLU), que interagiu com o efector Phapa1-7431740, é membro da família de proteínas relacionadas a patogênese (PR-2). Foi realizada mineração *in silico* para obter as sequências de soja, visando identificar os membros da família PR-2 no genoma da soja. O conjunto de dados das proteínas de *Glycine max* do genoma Wm82.a4 foi obtida no banco de dados *Soybase* (<https://www.soybase.org/dlpages/>). O modelo HMM (*Hidden Markov Model*) do perfil PF00332 (domínio do glicosídeo hidrolase da família 17 – GH17) do banco de dados do PFAM (El-Gebali et al., 2019) foi utilizado para selecionar as sequências pertencentes a família PR-2. Fez-se a busca por similaridade desse modelo contra as proteínas de soja, empregando o programa HMMSEARCH (*HMMER package*) (Eddy, 2011) com os parâmetros padrões. Para a validação das sequências selecionadas, foi realizado um alinhamento por BLASTp das sequências contra o banco de dados *non-redundant* (nr) do NCBI a fim de verificar se alguma sequência não relacionada foi selecionada, utilizando o *E-value* de 10^{-5} .

Com as sequências de soja selecionadas, as sequências de proteínas da família PR-2 de algodoeiro (*Gossypium raimondii*) (Xu et al., 2016) e as sequências de *Arabidopsis thaliana* (Doxey et al., 2007) foi realizado o alinhamento múltiplo das sequências pelo programa MUSCLE (Edgar, 2004) utilizando os parâmetros padrão. O alinhamento múltiplo resultante foi utilizado para a construção da árvore filogenética com o programa IQ-TREE (Minh et al., 2020), também utilizando os parâmetros padrões.

O conjunto de 91 sequências de soja selecionadas anteriormente foi utilizado para classificar as sequências quanto à estrutura dos domínios na proteína e identificação dos domínios específicos em cada sequência. A identificação do domínio NTS (sequência N-terminal) foi realizada com o programa SignalP versões 3 e 4 (Nielsen et al., 1997). Para a definição das sequências que possuem o domínio X8 (CBM43), o modelo Pfam PF07983 foi aplicado na busca de similaridade contra sequências selecionadas, utilizando HMMSEARCH. Por fim, para verificar a presença do domínio CTS (sequência C-terminal hidrofóbica), foi utilizado o programa PredGPI (Pierleoni et al., 2008) a fim de identificar a presença da âncora de glicosidil fosfatidil linositol (GPI); e o programa deepLoc (Almagro Armenteros et al., 2017), para localização do peptídeo de sinal vacuolar da sequência.

2.4 Perfil de expressão de Gm β GLU ao longo do ciclo infeccioso de *P. pachyrhizi*

O perfil de expressão de Gm β GLU foi analisado durante o ciclo infeccioso em genótipos de soja suscetível (BRS184) e resistente (presença do gene de resistência *Rpp5*). Para ambos os genótipos, foi utilizado o isolado LPF16.1M para inoculação. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com três repetições. As plantas de soja foram cultivadas em vasos plástico de 0,5 L e mantidas em câmara climática de crescimento (Fitotron®). Quando as plantas atingiram o estágio V₃ foi realizada a inoculação do isolado da ferrugem no primeiro e segundo trifólio de cada planta. A suspensão dos esporos foi preparada com a adição 15 mg de esporos do isolado LPF16.1M em 30 mL de água destilada com 0,05 % de Tween® 20 obtendo uma concentração final de 10⁴ esporos mL⁻¹. As folhas foram coletadas nos tempos 0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas após inoculação (hai).

2.4.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA

As folhas de soja inoculadas e não inoculadas (mock) foram maceradas com nitrogênio líquido e realizada a extração do RNA total pelo método do Trizol (Invitrogen®), de acordo com o protocolo do fabricante. O RNA foi ressuspendido em 35 μ L de água ultrapura e armazenado a - 80 °C. As concentrações de RNA foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific®) e a integridade analisada em gel de agarose 1 %. Para eliminar o DNA genômico presente nas amostras, 5 μ g de RNA foi tratado com a enzima Desoxirribonuclease (DNase I - Invitrogen®) e visualizado em gel de agarose em 1 % para confirmar a eficiência do tratamento. Posteriormente, o cDNA foi sintetizado utilizando o kit SuperScript III First-Strand (Invitrogen®), seguindo as instruções do fabricante. A amplificação do cDNA foi realizada para confirmação da síntese das amostras e o cDNA foi armazenado a - 20 °C.

2.4.2 Análise RT-qPCR

Os *primers* específicos para o gene Gm β GLU foram desenhados utilizando o Primer3Plus *software* (Tabela 1). Anteriormente, foi calculado a eficiência de cada *primer*, utilizando diluições seriadas de cDNA e calculando a regressão linear obtida para cada gene. O perfil de expressão foi monitorado por PCR quantitativo (qPCR) usando os genes endógenos

EF- 1 β (fator de alongação 1 β) (Hu et al., 2009) e TUA-4 (α – tubulina) (Ma et al., 2013) como genes normalizadores, enquanto as plantas não inoculadas com a ferrugem foram empregadas como calibrador. As condições de amplificação foram: 95 °C por 10 minutos, e 40 ciclos de 94 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto, seguida pela determinação da curva de dissociação (*melting*) para determinar a especificidade das amplificações. As análises foram conduzidas no equipamento 7900HT Fast Real-Time PCR System (*Applied Biosystems*®), utilizando o kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen®). As amostras foram analisadas em duas corridas independentes e cada reação de PCR foi realizada em triplicata técnica. Os níveis de expressão dos genes alvos foram determinados pela quantificação relativa, através do *software* REST® (Pfaffl et al., 2002).

2.5 Expressão heteróloga e purificação de proteína

Para os ensaios os modelos gênicos Phapa-7431740 e o Glyma.15G142400.1 (Gm β GLU) foram sintetizados pela *Biomatik* no vetor de expressão pET28a. Os genes foram otimizados para expressão em *E. coli* e foram retirados os peptídeos sinal de ambos. Além disso, para ambas as construções foram adicionadas uma cauda de 6x histidina na posição N-terminal das proteínas a serem expressas.

2.5.1 Expressão da proteína candidata a efector do modelo gênico Phapa- 7431740 em transformantes de *E. coli* BL21 (DE3)-pLysS

As células de *E. coli* DH5 α transformadas com o plasmídeo pET28a- Phapa- 7431740 foi submetida a extração de DNA plasmidial (Sambrook et al., 1989). Células de *E. coli* BL21 (DE3)-pLysS foram inoculadas em meio seletivo contendo cloranfenicol (50 μ g mL⁻¹), e incubadas a 37 °C, a 180 rpm por 12 horas. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em 1,0 mL de solução de CaCl₂ (0,1M) e concentradas para 150 μ L. Este volume foi dividido em duas alíquotas de 75 μ L, em uma das alíquotas foram adicionados 3 μ L de DNA plasmidial. As células de *E. coli* BL21 (DE3)-pLysS foram transformadas com o vetor pET28a- Phapa- 7431740 e a transformação foi confirmada através de PCR de colônia, utilizando *primers* específicos para o vetor pET28a (Tabela 1).

As colônias de *E. coli* BL21 (DE3)-pLysS transformadas com pET28a- Phapa- 7431740 confirmadas como positivas foram inoculadas em meio LB contendo

canamicina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e cloranfenicol ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) em um volume de 100 mL. Uma colônia de *E. coli* BL21 (DE3)-pLysS não transformada foi inoculada em LB contendo cloranfenicol ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) no mesmo volume, que é utilizada como controle da expressão da proteína. Após incubação durante a noite a 37°C sob agitação, os inóculos foram transferidos para 1000 mL de LB e incubados a 37°C . Depois de atingida $\text{D.O.}_{600} = 0,6$, foi adicionado IPTG (Isopropil- β -Dgalactopiranosídeo) na concentração final de 1 mM e incubado em agitação por seis horas a 20°C .

2.5.2 Expressão da proteína da soja Gm β GLU em transformantes de ArcticExpress (D3)

As células de *E. coli* DH5 α transformadas com o plasmídeo pET28a-Gm β GLU foram submetidas a extração de DNA plasmidial. Células de ArcticExpress (D3) foram inoculadas em meio seletivo contendo gentamicina ($35 \mu\text{g mL}^{-1}$), e incubadas a 37°C , a 180 rpm por 12 horas. Após centrifugação, as células foram ressuspendidas em 1,0 mL de solução de CaCl_2 (0,1M) e concentradas para 150 μL . Este volume foi dividido em duas alíquotas de 75 μL , em uma das alíquotas foi adicionado 3 μL de DNA plasmidial. As células de ArcticExpress (D3) foram transformadas com o vetor pET28a-Gm β GLU. A transformação foi confirmada por PCR de colônia, utilizando *primers* específicos para o vetor pET28a (Tabela 1).

As colônias de ArcticExpress (D3) transformadas com pET28a- Gm β GLU confirmadas como positivas foram inoculadas em meio LB contendo canamicina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e gentamicina ($35 \mu\text{g mL}^{-1}$), em um volume de 100 mL. Uma colônia de ArcticExpress (D3) não transformada foi inoculada em LB contendo gentamicina ($35 \mu\text{g mL}^{-1}$) como controle. Após incubação durante a noite a 37°C sob agitação, os inóculos foram transferidos para meio LB com volume de 1000 mL e incubados sob agitação a 30°C . Depois de atingida $\text{D.O.}_{600} = 0,6$, foi adicionado IPTG na concentração final de 0,4 mM e o inóculo foi incubado por 24 horas a 12°C .

2.5.3 Extração e purificação das proteínas

Após a indução da expressão das proteínas as células bacterianas foram coletadas por centrifugação a 5000 rpm e ressuspendidas em tampão de ligação (20 mM Na_2HPO_4 , 500 mM NaCl, 20 mM Imizadol pH 7,4) para extração das proteínas totais das bactérias. Os extratos proteicos bacterianos totais foram submetidos a sonicação por cinco minutos, 30 segundos *on* e *off*, e 40 % de amplitude. Após a sonicação, os extratos proteicos foram

centrifugados a 12000 rpm, a 4 °C por 20 minutos, e posteriormente coletados os sobrenadantes, que correspondem as frações solúveis dos extratos bacterianos. As frações solúveis de ambas as proteínas foram purificadas com coluna cromatográfica HISTRAP de 1 mL utilizando o equipamento de Cromatografia Líquida de Proteína Rápida (FPLC). A qualidade da extração e da purificação foram analisadas por SDS-PAGE e *Western blot*, utilizando o anticorpo monoclonal da cauda 6x histidina (Invitrogen®) e revelado com 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) (Liao et al., 2008).

2.6 Ensaio de *pull down*

As proteínas purificadas codificadas pelos genes Phapa-7431740 e GmβGLU foram quantificadas pelo Qubit® (Invitrogen®) e utilizadas para o ensaio de interação proteína - proteína *in vitro* por *pull down*. Os ensaios de *pull down* foram feitos com a *bead* Ni-NTA magnética (QUIAGEN®) de acordo com as instruções do manual do fabricante. O experimento foi delineado com cinco tratamentos (A. Phapa-7431740 + GmβGLU; B. GmβGLU + Phapa-7431740; C. PBS 1X-Sem proteína + Phapa- 7431740; D. PBS 1X-Sem proteína + GmβGLU; E. PBS 1X-Sem proteína + PBS 1X-Sem proteína). Para cada tratamento foi utilizado 50 µL de *bead*, que tem capacidade de ligação de 15 µg de proteína. Foi adicionado aos 50 µL *bead* Ni-NTA magnética aproximadamente 20 µg da proteína em solução de PBS 1X para ligação na *bead*, os tratamentos C, D e E foram adicionados a *bead* apenas com a solução sem proteína. Em seguida, os tratamentos foram incubados sob agitação por uma hora a temperatura ambiente.

Os tubos foram colocados na barra magnética por um minuto para coleta do sobrenadante. As *beads* foram lavadas duas vezes com 300 µL de tampão de lavagem/interação (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 0,005 % Tween® 20, pH 8,0). Posteriormente, foi adicionado aproximadamente 20 µg da proteína em tampão de lavagem/interação para interação com a proteína ligada a *bead*, no tratamento E foi adicionado apenas a solução sem proteína. Os tratamentos foram novamente incubados sob agitação por uma hora para a interação das proteínas. Após esse tempo, as *beads* foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem/interação. As proteínas foram eluídas da *bead* e analisadas por SDS-PAGE (Liao et al., 2008).

2.7 Técnicas de biotecnologia molecular

Todas as técnicas de Biologia Molecular não descritas foram conduzidas de acordo com métodos já convencionados descritos na literatura (Sambrook et al., 1989).

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização *in silico* do gene candidato a efector

Inicialmente foi realizado um alinhamento via Blastx entre o transcrito de_novo_3939 e os três genomas de referência de *P. pachyrhizi* disponíveis no JGI (Tabela 2). Para identificar os modelos gênicos mais similares ao de_novo_3939 foram selecionadas apenas proteínas com mais de 50 % de cobertura e acima de 70% de identidade. A proteína predita pelo modelo gênico Phapa-7431740 foi identificada como idêntica a proteína codificada pelo transcrito de_novo_3939 no genoma MT2006, uma vez que apresentou 100 % de cobertura e 100 % de identidade. No genoma UFV02, a proteína do modelo gênico Phapa-866193 foi a mais similar ao de_novo_3939, apresentando 100 % de cobertura e 99,18 % de identidade. No genoma K8108, foi identificada a proteína do modelo gênico Phapa-7389100 com 88 % de cobertura e 100 % de identidade. A estrutura dos três modelos gênicos é similar, porém apenas o Phapa-7431740 é idêntico ao de_novo_3939 (Figura 1).

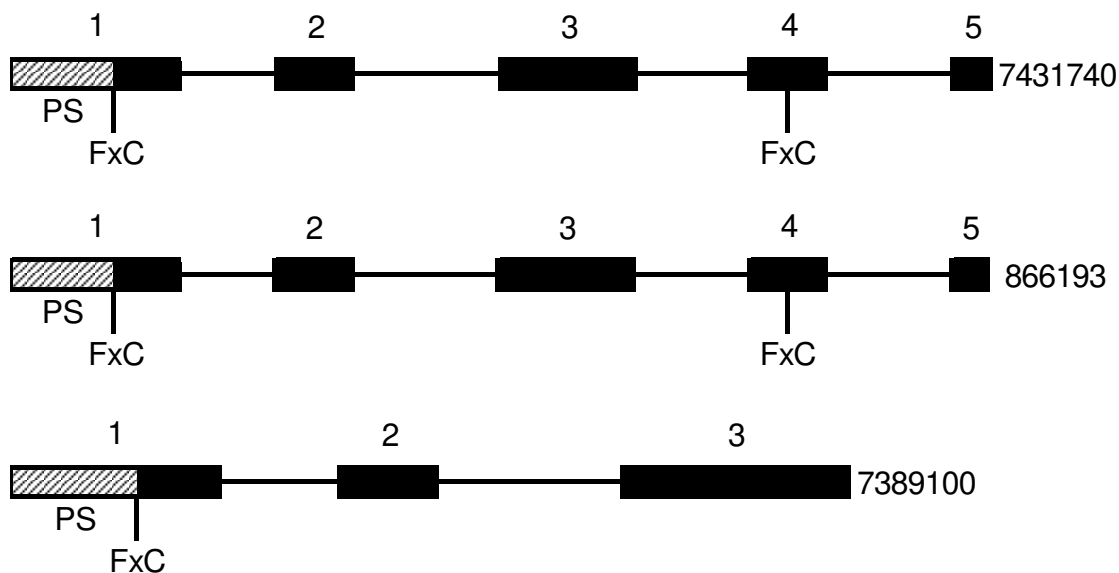


Figura 1 – Esquema da estrutura dos modelos gênicos com maior similaridade ao de_novo_3939 nos genomas de referência de *P. pachyrhizi*, 7431740 (genoma MT2006), 866193 (genoma UFV02) e 7389100 (genoma K8108). PS: peptídeo de sinal (1 – 25 aminoácidos). Os números 1, 2, 3, 4 e 5 representam os éxons, a linha preta os íntrons, e FxC é o motivo da proteína.

Tabela 2 – Candidatos a efetores de *P. pachyrhizi* com maior identidade em relação ao de_novo_3939 nos três genomas de referência disponíveis nos bancos de dados do *Joint Genome Institute* (JGI).

Candidato a efetor (Carvalho et al., 2017)	Genoma	Código da proteína com maior identidade	Tamanho da proteína (aa)	Identidade (%)	Cobertura (%)	Domínio	Peptídeo de sinal (aa)	Éxon/Intron	Número de cisteína	Motivo	Cobertura do RNA
de_novo_3939	MT2006	7431740	121	100	100	EGF_CA (PF07645.16)	1 - 25	5/4	11	FxC (15-17;102-104)	Sim
	UFV02	866193	121	99,18	100	EGF_CA (PF07645.16)	1 - 25	5/4	11	FxC (15-17;102-104)	Sim
	K8108	7389100	104	100	88	Ausência do domínio	1 - 25	3/2	7	FxC (15-17)	-

O modelo gênico Phapa-7431740 apresenta uma sequência de 1415 pb, com cinco éxons e quatro íntrons. A CDS possui 366 pb e codifica uma proteína com 121 aminoácidos, contendo 11 resíduos de cisteína (9%) e massa aproximada de 12,66 kDa. Também apresenta um peptídeo sinal de 25 resíduos de aminoácidos predito pelo SignalP, possuindo o motivo FxC e o domínio conservado EGF_CA igualmente ao transcrito (Tabela 2).

3.2 Identificação e caracterização de parceiros de interação da proteína candidata a efetor Phapa-7431740

Visto que o candidato a efetor foi validado funcionalmente, seguiu-se com a busca dos seus potenciais alvos de interação. Inicialmente, foi realizado o teste de transativação com a proteína candidata a efetora codificada pelo gene Phapa-7431740, clonada no vetor pDEST32 transformado na levedura AH109. A levedura com o vetor BD-7431740 não cresceu em nenhuma concentração de 3-AT, ou seja, ela não foi capaz de ativar sozinha o gene repórter. Assim, com o intuito de identificar alvos de interação para a proteína Phapa-7431740, foi realizada uma triagem com a biblioteca de cDNA de soja (Alves et al., 2011), em que esse candidato a efetor foi utilizado como isca, por meio do sistema de duplo híbrido em leveduras.

A triagem resultou no isolamento de 76 clones em meio SD-Leu-Trp-His. Desses 76 clones, dez cresceram em meio sólido SD-Leu-Trp-His com as concentrações 0, 1, 2, 3, 4 e 5 mM de 3-AT. Os dez clones que cresceram na presença de 3-AT foram transferidos para meio líquido SD-Leu-Trp-His para extração de DNA plasmidial da levedura. Os plasmídeos obtidos foram utilizados para a amplificação dos genes contidos no vetor com os primers pEXP-AD502 (Tabela 1) para estimar o tamanho dos insertos de cDNA das presas. Os produtos do PCR apresentaram tamanhos variados, de 700 a 1500 pb. Apenas um clone apresentou mais de uma banda de amplificação, o que pode indicar a presença de mais de um vetor da biblioteca de cDNA na levedura.

Os produtos dos PCR foram enviados para sequenciamento afim de identificar os possíveis parceiros de interação. Os dez insertos foram sequenciados e as sequências utilizadas para buscas via BLASTn e BLASTx nos bancos de dados NCBI (Benson et al., 2014) para identificação das proteínas alvo da soja. Apenas um clone isolado da levedura AD-bbt 3, apresentou 97,3 % de similaridade com a Glyma.15G142400.1 (Gm β GLU) e a sequência codificadora estava *in frame* com o domínio de ativação do DNA (AD) do Gal4p, indicando que a tradução da proteína final correspondia à identificada no alinhamento.

Para confirmar a interação, o plasmídeo AD-bbt 3 foi re-transformado na levedura AH109 e os ensaios dos genes repórteres HIS3 e LacZ foram realizados com os clones BD-7431740 + AD-bbt 3, BD-7431740+ AD-vazio, BD-vazio + AD-vazio, BD-E2 + AD-E2 (positivo). No ensaio para gene repórter HIS3, os clones foram plaqueados em meio SD-LEU-TRP-HIS variando-se a concentração de 3-AT (Figura 2A). Apenas os clones BD-E2 + AD-E2 (positivo) e BD-7431740+ AD-bbt 3 cresceram em meios adicionados de 3-AT. No ensaio do gene LacZ, os mesmos clones foram os que apresentaram coloração azul das colônias (Figura 2B). Estes ensaios indicam que há uma interação entre as proteínas.

O gene Gm β GLU identificado pelo sistema duplo híbrido de levedura apresenta uma sequência de 1383 pb, possuindo dois éxons e um íntron. A CDS (sequência de codificação) possui 1113 pb e codifica uma proteína com 370 resíduos de aminoácidos e uma massa de aproximadamente 37 kDa. A proteína Gm β GLU apresenta peptídeo sinal com 32 resíduos de aminoácidos, e é denominada glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase, possuindo o domínio conservado glicosídeo hidrolase da família 17 (GH17), retirado do site do *Phytozome* (<https://phytozome.jgi.doe.gov>).

A região identificada na interação com o gene Phapa-7431740 corresponde a região de 876-1317 pb do RNA mensageiro (mRNA) de 1383 pb. A região de 100 - 1036 pb da CDS corresponde à região do domínio GH17, que caracteriza a funcionalidade dessa proteína (Figura 2C).

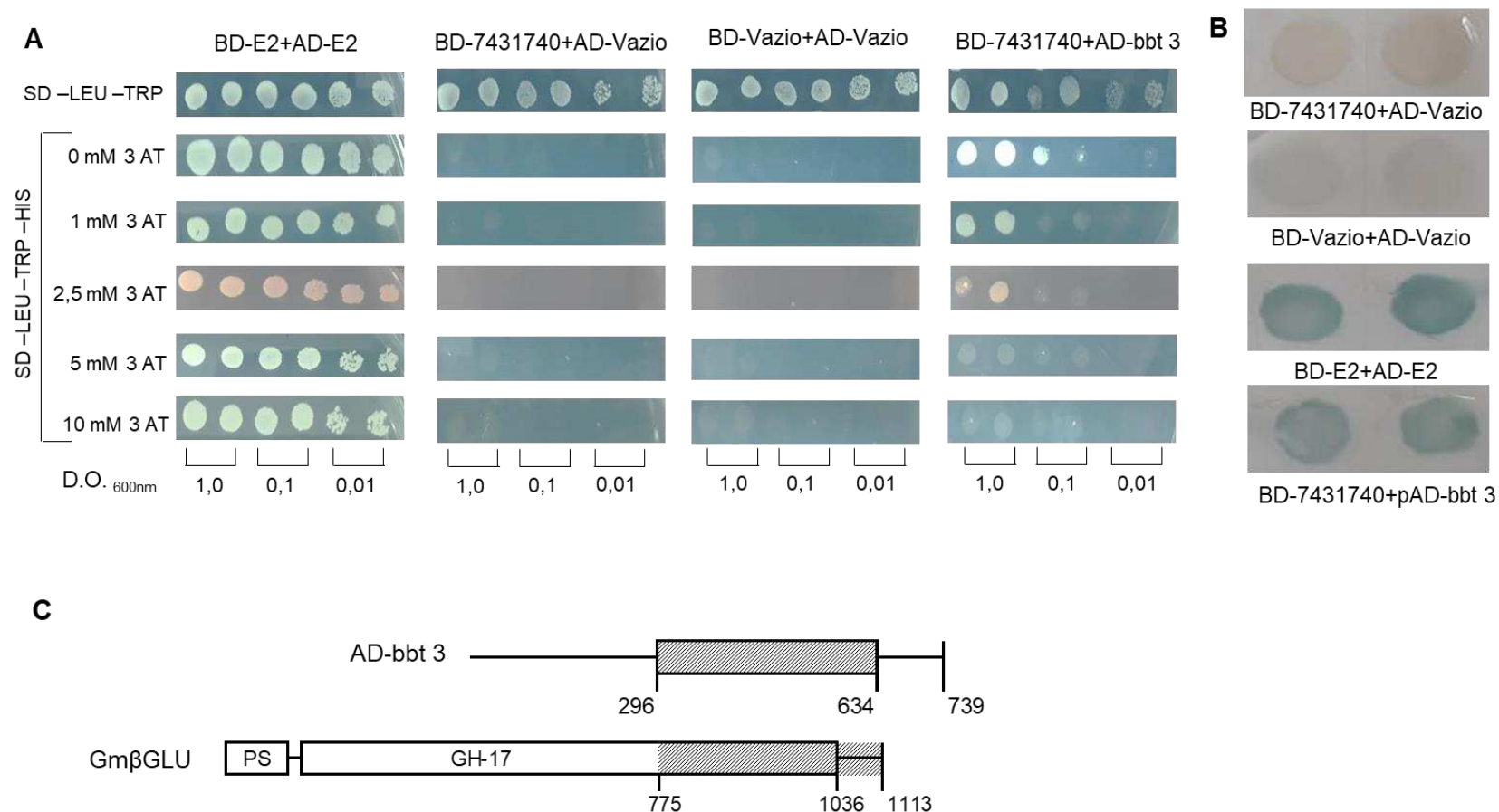


Figura 2 - Screening para identificação de interação proteína-proteína pelo sistema duplo híbrido de leveduras. **A.** Ensaio do gene repórter HIS3 com os clones BD- 7431740+ AD-bbt 3, BD-7431740+ AD-vazio (controle negativo), BD-vazio + AD-vazio (controle negativo), BD-E2 + AD-E2 (controle positivo) em meio sólido SD-Leu-Trp e em SD-Leu-Trp -His nas concentrações 0, 1, 2,5, 5 e 10 mM de 3-AT. **B.** Ensaio do gene LacZ em membrana de nitrocelulose. **C.** Esquema da região identificada na interação com o efetor. GmβGLU: esquema da sequência de cofidificação da proteína. AD-bbt 3: esquema do gene clonado no vetor com domínio de ativação do DNA (AD) (“presa”) que interagiu com o efetor (“isca”). Região hachurada representa a região identificada na interação. PS: peptídeo de sinal (1 – 32 aminoácidos). GH17: domínio do glicosídeo hidrolase família 17.

3.3 Caracterização da família PR-2 de soja

A proteína da soja que interagiu com o candidato a efector pelo sistema duplo híbrido de levedura é uma beta-1,3-glucanase. As beta-1,3-glucanases constituem famílias complexas e diversas em plantas, atuando em vários níveis dos processos fisiológicos e de desenvolvimento das plantas (Doxey et al., 2007). Devido essa complexidade e diversidade, foi realizada uma análise comparativa das proteínas beta-1,3-glucanases da soja com as proteínas encontradas em *Gossypium raimondii* (Xu et al., 2016) e *Arabidopsis thaliana* (Doxey et al., 2007).

É sabido que as beta-1,3-glucanase são membros da família PR-2, e que apresentam GH17 como principal domínio em sua estrutura (Henrissat, 1991; Sato, 1999; Yamaguchi et al., 2002; Zavaliev et al., 2013). Desse modo, o genoma de referência da soja *Glycine max* Wm82.a4 foi utilizado para eleger os potenciais membros da família PR-2, empregando o modelo HMM do perfil PF00332 (GH17). Com base nessa estratégia, foram obtidas 91 sequências de genes que codificam proteínas de soja com esse domínio. Posteriormente, foi realizada a análise comparativa das proteínas da soja (*Glycine max*) com 67 proteínas do algodoeiro (*Gossypium raimondii*) e 50 proteínas de *Arabidopsis thaliana* por meio da construção de uma árvore filogenética (Anexo 1).

De acordo com a estrutura dos domínios na proteína, os membros da família PR-2 foram classificados em tabaco em cinco classes (I – V) (Linthorst et al., 1990) (Figura 3A). Essas classes são diferenciadas pela ausência ou presença do domínio X8 e da sequência C- terminal hidrofóbica (CTS). O domínio X8 foi definido como uma nova classe de módulo de ligação a carboidratos da família 43 (CBM43), responsável pela ligação da beta-1,3-glucan (Barral et al., 2005). A sequência CTS corresponde a presença de peptídeo com sinal vacuolar (Sticher et al., 1992) e/ou presença da âncora de GPI (glicosidil fosfatidil inositol) (Borner et al., 2002).

Baseado na classificação (I – V) proposta para tabaco, observou-se dez tipos de estrutura dos domínios nas proteínas de soja. Foram identificadas proteínas pertencentes as classes I, II, IV, e V, e também nas classes I, II, III e V com variações na estrutura dentro de cada classe (Figura 3B). A variação nas classes I, II e V são a ausência da sequência N-terminal (NTS), enquanto que na classe III, foi observado duas variações: uma com adição da sequência C-terminal hidrofóbica (CTS); e outra com adição da CTS e ausência da NTS. Na classe III não foi encontrada nenhuma proteína de soja com essa estrutura dos domínios, mas foi encontrada uma proteína de soja em cada variação dentro da classe III (Tabela 3).

Tabela 3 – Disposição das beta-1,3-glucanases de *G. max*, *G. raimondii*, *A. thaliana* em classes de acordo com a estrutura dos domínios na proteína.

Espécies	Total	I	II	III	IV	V	I ^a	II ^a	III ^b	III ^c	V ^a
<i>Glycine max</i>	91	27	15	0	13	14	5	1	1	1	14
<i>Gossypium raimondii</i>	67	23	15	1	19	9	-	-	-	-	-
<i>Arabidopsis thaliana</i>	50	19	9	1	10	12	-	-	-	-	-

^a: ausência da sequência N-terminal. ^b: ausência da sequência N-terminal e presença da sequência C-terminal. ^c: presença da sequência C-terminal.

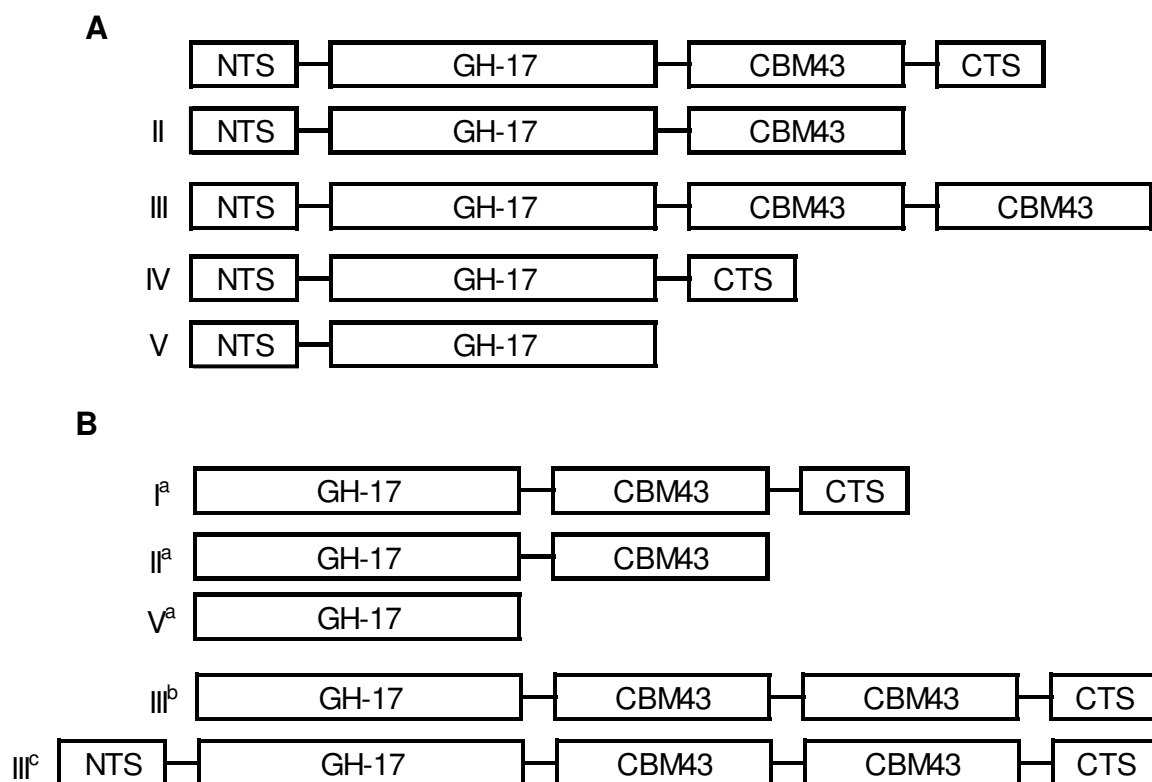


Figura 3 – Estrutura dos domínios nas proteínas beta-1,3-glucanases em *Glycine max*, *G. raimondii* e *A. thaliana*. **A.** As cinco classes baseadas na presença/ausência de CBM43 e CTS na posição C-terminal. **B.** As variações das classes I, II, III e V observadas nas sequências de soja. NTS: sequência N-terminal. GH-17 domínio do glicosídeo hidrolase da família 17. CBM43: módulo de ligação a carboidratos da família 43. CTS: sequência C- terminal.

A árvore filogenética foi dividida em oito subfamílias (A – H) baseado na estrutura dos domínios da proteína e das classificações obtidas em *A. thaliana* e *G. raimondii* (Tabela 4). Os membros Glyma.15G242125.1 e Gorai.008G159300 localizaram-se separados entre si e dos demais membros na árvore. O Glyma.15G242125.1 apresenta parcialmente o domínio GH17, além disso possui o domínio F-box. Proteínas com domínio conservado F-box são essenciais para degradação controlada de outras proteínas (Jain et al., 2007). Essas duas diferenças na estrutura de Glyma.15G242125.1 justifica sua localização distante dos demais na árvore. A

sequência Gorai.008G159300 foi classificada na classe V, apresentando os domínios completos, porém no alinhamento entre todas as sequências ela apresenta resíduos de aminoácidos muito distintos das demais sequências, o que possivelmente a colocou isolada na árvore.

A família de genes beta-1,3-glucanases de *Arabidopsis* foi também classificada em três grupos maiores (denominados α , β e γ) baseada na evolução dos genes da família PR-2 (Doxey et al., 2007). Os grupos β e γ de *Arabidopsis* apresentaram-se nas subfamílias F e E, respectivamente; e o grupo α incluiu as demais subfamílias. A família de genes beta-1,3-glucanases de *G. raimondii* foi classificada em oito subfamílias (A - H) de acordo com a estrutura dos domínios da proteína e da organização de éxon-intron (Xu et al., 2016). As oito subfamílias de *G. raimondii* apresentaram a mesma configuração na árvore, exceto o Gorai.008G159300 que ficou externo a todos os grupos. Visto isso, observa-se que existe similaridade entre os genes da família PR-2 nas diferentes espécies analisadas.

Apenas as subfamílias A e E possuem todos os membros com ausência do domínio X8 (PF07983) (Tabela 4). Dos 91 membros da soja, 44 não possuem a sequência CTS, 21 não possuem a sequência NTS. A perda do domínio CTS ocorre devido ao processo evolutivo, formando as classes II e V, o que justifica a diversidade funcional dos genes beta-1,3-glucanase (Doxey et al., 2007).

A proteína Gm β GLU, alvo de interação do efector *P. pachyrhizi*, foi classificada na subfamília E, juntamente com outras 15 sequências de soja, 11 de algodoeiro e 11 de *Arabidopsis* (Figura 4). Quanto à classificação baseada na estrutura do domínio da proteína, a Gm β GLU é pertencente a classe IV.

Tabela 4 – Caracterização de 91 sequências de proteínas dos genes beta-1,3-glucanases da soja quanto a estrutura, domínios e classificação.

Modelo gênico ¹	Tamanho da sequência de proteína (aa)	Peptídeo de sinal	Domínio GH17	Domínio X8 (CBM43)	Âncora de GPI	Sinal vacuolar	Classificação do Tabaco ²	Subfamílias ³
15G242125.1	267	-	3-86	-	-	Ausência	V ^a	-
01G193100.1	396	19-20	23-182	307-379	-	Ausência	II	B
11G048700.1	399	19-20	23-178	310-382	-	Ausência	II	B
02G294000.1	473	28-29	31-348	383-454	-	Ausência	II	B
14G020000.1	462	22-23	25-343	372-443	-	Ausência	II	B
02G269000.1	473	18-19	21-338	383-454	-	Ausência	II	B
14G048400.1	478	18-19	21-338	382-453	-	Ausência	II	B
05G156000.1	497	23-24	26-347	361-432	A-471	Ausência	I	D
08G113900.1	497	23-24	26-347	361-432	A-471	Ausência	I	D
14G130300.1	502	24-25	29-350	364-435	I-474	Ausência	I	D
17G202900.1	499	21-22	26-347	361-432	V-471	Ausência	I	D
02G070500.2	497	19-20	23-343	360-430	Y-476	Ausência	I	D
16G151900.1	497	19-20	23-343	360-430	Q-474	Ausência	I	D
05G235700.2	495	18-19	22-342	359-430	S-467	Ausência	I	D
08G043100.1	500	21-22	27-347	364-435	Y-478	Ausência	I	D
11G216000.1	499	16-17	23-342	360-431	S-470	Ausência	I	D
18G040600.1	499	16-17	23-342	360-431	S-470	Ausência	I	D
02G244700.1	506	-	31-350	368-439;455-478	N-474	Ausência	III ^b	D
14G214300.1	499	18-19	24-343	361-432;448-470	S-476	Ausência	III ^c	D
02G132600.2	195	-	85-178	-	-	Ausência	V ^a	D
01G049700.1	203	-	4-186	-	-	Ausência	V ^a	D
02G060666.1	203	-	4-186	-	-	Ausência	V ^a	D
15G108900.3	491	-	120-328	346-419	S-465	Ausência	I ^a	D
07G261600.1	524	24-25	43-362	380-451	N-496	Ausência	I	D

Continua...

Continuação...

Modelo gênico ¹	Tamanho da sequência de proteína (aa)	Peptídeo de sinal	Domínio GH17	Domínio X8 (CBM43)	Âncora de GPI	Sinal vacuolar	Classificação do Tabaco ²	Subfamílias ³
17G012500.1	547	-	66-385	403-474	N-519	Ausência	I ^a	D
05G225800.1	500	23-24	26-344	365-436	S-468	Ausência	I	D
08G032700.1	499	23-24	26-344	365-436	S-467	Ausência	I	D
20G022302.1	317	-	232-263;275-300	-	-	Ausência	V ^a	C
14G075500.1	485	28-29	32-350	395-466	-	Ausência	II	C
12G043800.2	345	1-35	2-228	254-326	-	Ausência	II	C
04G013000.4	460	26-27	30-347	371-441	-	Ausência	II	C
06G012900.2	460	27-28	31-348	371-441	-	Ausência	II	C
18G291500.1	457	24-25	25-336	370-440	-	Ausência	II	C
06G072800.3	383	29-30	32-349	-	N-356	Ausência	IV	C
07G030400.1	391	24-25	33-351	-	S-362	Ausência	IV	A
08G212400.1	390	24-25	33-351	-	S-358	Ausência	IV	A
13G365601.1	184	27-28	36-183	-	-	Ausência	V	A
15G007600.1	387	22-23	31-349	-	S-355	Ausência	IV	A
13G158000.1	389	23-24	29-347	-	N-362	Ausência	IV	A
17G113200.1	419	-	59-377	-	-	Ausência	V ^a	A
13G218300.2	400	1-25	33-347	-	-	Ausência	V	A
15G093700.1	399	1-25	33-347	-	-	Ausência	V	A
07G220000.1	436	-	33-348	-	-	Ausência	V ^a	A
20G018200.1	401	-	33-348	-	-	Ausência	V ^a	A
12G185200.1	428	1-17	71-386	-	S-403	Ausência	IV	A
13G316200.1	393	32-33	38-353	-	S-368	Presença	IV	A
11G183200.1	394	1-35	38-354	-	-	Presença	IV	A

Continua...

Continuação...

Modelo gênico ¹	Tamanho da sequência de proteína (aa)	Peptídeo de sinal	Domínio GH17	Domínio X8 (CBM43)	Âncora de GPI	Sinal vacuolar	Classificação do Tabaco ²	Subfamílias ³
12G089300.3	333	-	2-293	-	-	Ausência	V ^a	A
10G172300.1	415	24-25	25-348	-	S-384	Ausência	IV	A
02G253800.3	291	-	2-262	-	-	Ausência	V ^a	H
03G085951.1	140	20-21	26-118	-	-	Ausência	V	G
08G346800.1	468	22-23	30-351	378-449	-	Ausência	II	G
18G158200.1	468	22-23	30-351	378-449	-	Ausência	II	G
13G173200.1	392	19-20	23-347	-	-	Ausência	V	G
05G012600.1	823	25-26	29-109	-	-	Ausência	V	F
17G120767.1	488	25-26	29-349	371-441	-	Presença	I	F
04G152100.1	504	-	44-364	387-455	-	Presença	I ^a	F
06G210900.1	484	24-25	26-344	367-435	S-454	Presença	I	F
06G147300.1	490	25-26	32-353	374-444	S-464	Ausência	I	F
05G185100.1	482	20-21	27-346	367-436	P-450	Ausência	I	F
08G143050.1	177	-	2-77	98-161	-	Ausência	I ^a	F
16G042500.1	479	22-23	23-342	365-433	S-454	Ausência	I	F
02G071400.1	485	-	29-348	371-439	N-458	Ausência	I ^a	F
16G152600.1	418	-	28-347	370-404	-	Ausência	II ^a	F
13G115700.1	496	24-25	31-346	365-434	S-464	Ausência	I	F
17G044100.1	496	24-25	30-346	365-434	S-464	Ausência	I	F
04G074000.1	490	30-31	31-349	370-440	-	Ausência	II	F
06G075100.1	483	23-24	24-342	363-431	-	Ausência	II	F
14G131300.1	484	28-29	29-346	366-435	S-458	Ausência	I	F
17G202500.1	481	28-29	29-343	363-432	S-455	Ausência	I	F

Continua...

Continuação...

Modelo gênico ¹	Tamanho da sequência de proteína (aa)	Peptídeo de sinal	Domínio GH17	Domínio X8 (CBM43)	Âncora de GPI	Sinal vacuolar	Classificação do Tabaco ²	Subfamílias ³
07G269400.1	484	24-25	26-344	365-432	S-457	Presença	I	F
09G016300.1	488	24-25	26-345	366-434	Q-462	Ausência	I	F
15G122100.1	462	32-33	34-353	374-442	-	Presença	I	F
11G165100.1	487	23-24	29-351	371-439	S-460	Ausência	I	F
18G058300.1	485	24-25	27-349	369-437	H-459	Ausência	I	F
06G108700.1	341	26-27	29-338	-	-	Ausência	V	E
11G095100.1	341	24-25	33-339	-	-	Ausência	V	E
11G095200.2	237	-	17-220	-	-	Ausência	V ^a	E
11G095000.1	339	25-26	28-337	-	-	Ausência	V	E
12G021300.1	327	19-20	20-325	-	-	Ausência	V	E
16G114000.1	335	24-25	32-334	-	-	Ausência	V	E
16G114100.2	335	24-25	32-334	-	-	Ausência	V	E
16G113200.1	332	24-25	29-331	-	-	Ausência	V	E
16G113700.2	275	-	1-274	-	-	Ausência	V ^a	E
09G037100.2	332	-	1-306	-	-	Ausência	V ^a	E
15G142400.1	371	32-33	34-345	-	-	Presença	IV	E
03G132600.3	145	-	1-144	-	-	Ausência	V ^a	E
03G132900.1	345	31-32	34-342	-	-	Ausência	V	E
19G134800.2	347	32-33	35-344	-	-	Presença	IV	E
03G132700.1	348	32-33	35-346	-	-	Presença	IV	E
19G134700.1	349	33-34	36-346	-	-	Presença	IV	E

¹: Identificação dos modelos gênicos selecionados no genoma da soja Wm82. gnm4. ann1. ²: Classificação quanto a estrutura dos domínios das proteínas baseada na realizada para o tabaco. ³: Subfamílias identificadas para a família PR-2 de soja. ^a: Ausência do domínio NTS na estrutura da proteína das classes I, II e V. ^b: Ausência do domínio NTS e presença do domínio CTS na estrutura da proteína da classe III. ^c: Presença dos domínios NTS e CTS na estrutura da proteína da classe III de tabaco.

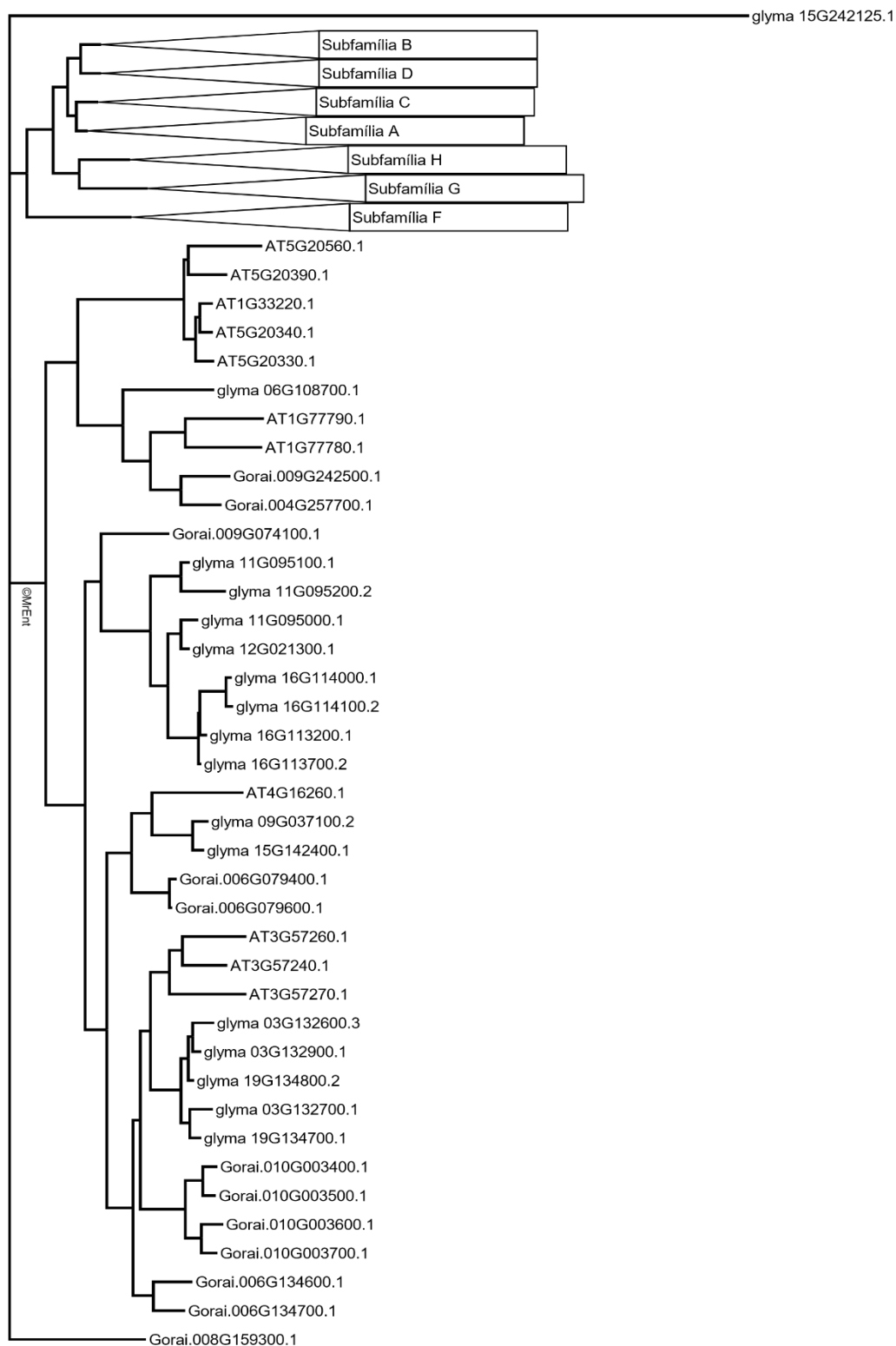


Figura 4 – Subfamília E com membros da família PR-2 das espécies *Glycine max*, *Gossypium raimondii*, *Arabidopsis thaliana*. Árvore filogenética dividida em oito subfamílias (A -H).

3.3 Perfil de expressão de Gm β GLU nos genótipos suscetível e resistente de soja infectados por *P. pachyrhizi*

A expressão do gene Gm β GLU foi analisada por RT-qPCR nos genótipos suscetível, BRS 184, e resistente de soja (gene de resistência *Rpp5*), infectados por *P. pachyrhizi*. Para confirmar a ocorrência da infecção foi verificada a presença dos sintomas 14 dias após a inoculação e foram observadas lesões do tipo TAN para o genótipo suscetível (interação compatível) e lesões do tipo *reddish-brown* (RB) para o genótipo resistente (interação incompatível).

Na interação compatível, observou-se que o Gm β GLU foi induzido nos tempos de 6, 12 e 24 hai, com maior nível de expressão no tempo de 12 hai, comparado as plantas não inoculadas (Tabela 5). Na interação incompatível, a expressão de Gm β GLU foi induzida nos tempos 0, 6, 12, 24, 48 e 72 hai, com pico de expressão no tempo de 12 hai. Este resultado demonstra que o gene Gm β GLU é induzido no hospedeiro na presença da *P. pachyrhizi*. Contudo, na interação compatível observa-se a indução da expressão apenas no início da infecção e com níveis de expressão menores que o observado na interação incompatível.

Tabela 5 – Níveis de expressão de Gm β GLU em diferentes tempos após inoculação em genótipos suscetível e resistente de soja. Os genes endógenos EF1 β e TUA-4 foram utilizados como normalizadores e como calibrador foram utilizadas as plantas não inoculadas com o isolado do fungo.

Gene	Genótipos	Tempos (horas após a inoculação)					
		0	6	12	24	48	72
Gm β GLU	Suscetível	1,34 ^{ns}	11,78 ^{**}	22,95 ^{**}	4,406 ^{**}	1,52 ^{ns}	0,95 ^{ns}
	Resistente	2,26 ^{**}	22,60 ^{**}	156,96 ^{**}	146,30 ^{**}	7,45 ^{**}	18,247 ^{**}

*:significativo a 0,01 de significância. ^{ns}: não significativo pelo teste de Randomização de Realocação Fixa de Pares Inteligentes[©].

3.4 Validação da interação proteína-proteína por *pull-down*

A proteína do candidato a efector de *P. pachyrhizi*, Phapa-7431740, e a proteína identificada pelo sistema de duplo híbrido de levedura, Glyma.15G142400.1 (Gm β GLU) foram expressos em *E. coli* BL21 (DE3)-pLysS e ArcticExpress (D3), respectivamente, contendo a cauda N-terminal de 6x histidina (Figura 5a1 e 5b1). A proteína Phapa-7431740 e a proteína

Gm β GLU apresentam uma massa de aproximadamente 15 e 37 kDa, respectivamente. Devido a presença da cauda de histidina foi possível confirmar expressão das proteínas por meio do *western blot* (Figura 5a2 e 5b1).

As duas proteínas foram expressas na fração solúvel das bactérias, e os extratos utilizados para purificação das proteínas por cromatografia de afinidade, utilizando resina de níquel em FPLC para a realização do ensaio de *pull down* (Figura 5c e 5d).

Ambas proteínas purificadas foram utilizadas para o ensaio de interação proteína-proteína *in vitro* (Figura 5e). Nesse ensaio foi realizado cinco tratamentos: A. Phapa-7431740 + Gm β GLU; B. Gm β GLU + Phapa-7431740; C. PBS 1X-Sem proteína + Phapa-7431740; D. PBS 1X-Sem proteína + Gm β GLU; E. PBS 1X-Sem proteína + PBS 1X-Sem proteína. Ou seja, no tratamento A, a proteína candidata a efetor foi ligada na *bead*, enquanto que, no tratamento B, a proteína da soja Gm β GLU foi ligada na *bead*. Os tratamentos C, D e E não foram ligados a nenhuma proteína a *bead*. Após a etapa de ligação da proteína, nos tratamentos A e D, foi adicionado a proteína Gm β GLU; nos tratamentos B e C, foi adicionado a proteína candidata a efetor para a interação, enquanto que, no tratamento E não foi adicionado nenhuma proteína (controle negativo).

O resultado observado no gel de poliacrilamida corado com *coomassie blue* revela que ambas as proteínas se ligaram na *bead*. No tratamento B, quando a Gm β GLU foi ligada primeiro na *bead* foi observado que as bandas de ambas as proteínas tiveram uma intensidade similar, o que difere do observado no tratamento A, onde a banda da Gm β GLU teve intensidade maior comparada a proteína efetora. Como nos tratamentos C e D as proteínas apareceram no gel, não podemos comprovar que as proteínas interagiram entre si nos tratamentos A e B, uma vez que ambas são capazes de se ligar a *bead*. Porém, pelo fato do tratamento A ter diferido do B, pode-se inferir que a interação das proteínas com a *bead* ocorre de maneira diferente. A proteína candidata a efetor apresenta um tamanho reduzido, logo, a proporção para ocorrer a interação entre as proteínas pode ser diferente de 1:1, que foi a proporção utilizada.

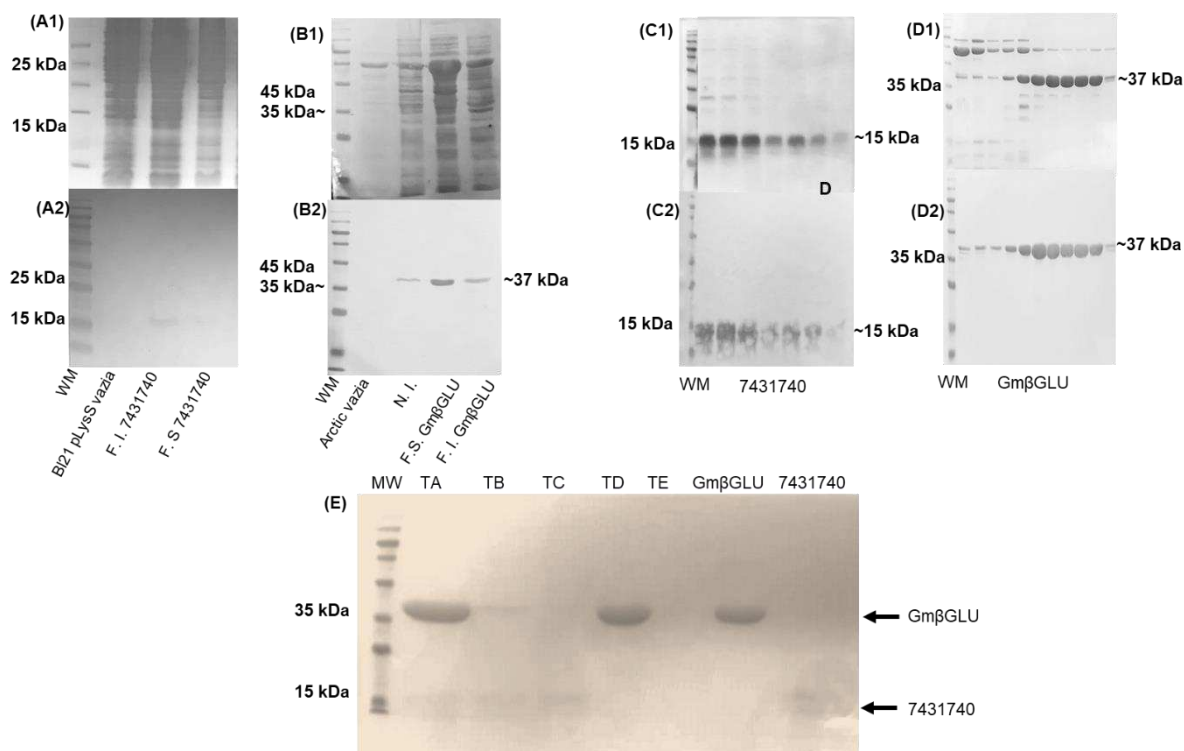


Figura 5 – A, B. Expressão heteróloga das proteínas codificadas pelos genes Phapa- 7431740 e GmβGLU em *E. coli* BL21 (DE3)-pLysS e ArcticExpress (D3), respectivamente. **A1.** Gel de poliacrilamida 12,5% corado com *coomassie blue*, ordem esquerda para direita: Marcador de proteína, Fração total extrato protéico de BL21 (DE3)-pLysS vazia, Fração solúvel de BL21 (DE3)-pLysS + 7431740-pET28a, Fração insolúvel de BL21 (DE3)- pLysS + 7431740-pET28a. **A2.** *Western blot* revelado com DAB, ordem direita para esquerda: Marcador de proteína, Fração total extrato protéico de BL21 (DE3)-pLysS vazia, Fração solúvel de BL21 (DE3)-pLysS + 7431740-pET28a, Fração insolúvel de BL21 (DE3)- pLysS + 7431740-pET28a. **B1.** Membrana de nitrocelulose marcado com *ponceau*, ordem direita para esquerda: Marcador de proteína, Fração total extrato protéico de ArcticExpress (D3) vazia, Fração total de ArcticExpress (D3) + GmβGLU-pET28a não induzida por IPTG (N. I.), Fração solúvel de ArcticExpress (D3) + GmβGLU-pET28a, Fração insolúvel de ArcticExpress (D3) + GmβGLU-pET28a. **B2.** *Western blot* revelado com DAB, ordem direita para esquerda: Marcador de proteína, Fração total extrato protéico de ArcticExpress (D3) vazia, Fração total de ArcticExpress (D3) + GmβGLU-pET28a não induzida por IPTG (N. I.), Fração solúvel de ArcticExpress (D3) + GmβGLU-pET28a, Fração insolúvel de ArcticExpress (D3) + GmβGLU-pET28a. **C, D.** Purificação das proteínas codificadas pelos genes 7431740 e GmβGLU. **C1.** Gel de poliacrilamida 12,5% corado com *coomassie blue* da purificação da fração solúvel de BL21 (DE3)-pLysS + 7431740-pET28a. **C2.** *Western blot* da purificação da fração solúvel de BL21 (DE3)-pLysS + 7431740-pET28a. **D1.** Gel de poliacrilamida 12,5% corado com *coomassie blue* da purificação da fração solúvel de ArcticExpress (D3) + GmβGLU-pET28a. **D2.** *Western blot* da purificação da fração solúvel de ArcticExpress (D3) + GmβGLU-pET28a. **E.** Ensaio de *pull down*. Gel de poliacrilamida 12,5% corado com *coomassie blue* com as proteínas codificadas pelos genes 7431740 e GmβGLU purificadas eluídas da *bead* Ni-NTA. TA: tratamento A; TB: tratamento B; TC: tratamento C; TD: tratamento D, TE: tratamento E; GmβGLU: amostra dessa proteína purificada; 7431740: amostra dessa proteína purificada.

4 DISCUSSÃO

4.1 Interação de Gm β GLU com efetor de *P. pachyrhizi*

Os fungos biotróficos secretam inúmeras proteínas efetoras no tecido do hospedeiro. Essas proteínas, que são translocadas no citoplasma através do haustório, tem a capacidade de manipular e suprimir o sistema de resposta de defesa da planta (Link et al., 2014; Tang et al., 2018). Diversos efetores fúngicos têm sido identificados e caracterizados visando a compreensão dos mecanismos utilizados pelos efetores na interação planta-patógeno. Identificar e caracterizar os efetores de *P. pachyrhizi* é um passo fundamental para compreender como esse patógeno infecta a cultura da soja e causa grandes prejuízos econômicos (Kunjeti et al., 2016). Estudos com o candidato a efetor de *P. pachyrhizi* Phapa-7431740 comprovam sua função como proteína efetora, por meio da validação funcional, através de ensaios de supressão da ETI e indução durante a interação com o hospedeiro (Carvalho et al., 2017), além da supressão de PTI (dados não publicados). Diversos outros candidatos a efetores de *P. pachyrhizi* vêm sendo validados em sistemas transientes como o descrito acima (Kunjeti et al., 2016; Qi et al., 2018).

O efetor Phapa-7431740 é uma proteína secretada por *P. pachyrhizi*, que possui tamanho reduzido, com 9 % de cisteína em sua estrutura (11 cisteínas), presença de peptídeo de sinal, e função desconhecida. Essas características são consideradas comuns a outros efetores já conhecidos (Ellis et al., 2009; Petre et al., 2015). Além disso, o motivo FxC presente efetor Phapa- 7431740 tem sido relatado como uma nova classe de motivos abundante em fungos causadores de ferrugem (Saunders et al., 2012). O motivo Y/F/WxC foi descrito como essencial para transferência de proteínas efetoras através da membrana extrahaustorial do fungo (Godfrey et al., 2010).

O domínio conservado EGF (fator de crescimento da epiderme) é amplamente encontrado na natureza e regula várias funções, incluindo a capacidade de aderir proteínas à componentes da matriz celular, ligação a íons de Ca²⁺, e manutenção da função e estrutura tridimensional das proteínas (Stenflo et al., 2000). Existem poucas informações sobre a função desse domínio na literatura. Em um estudo com patógenos de humanos, a presença do domínio EGF na proteína BAD1 de *Blastomyces dermatitidis* foi associado a patogenicidade desse fungo (Brandhorst et al., 2003, 2005). É necessário investigar a função do domínio EGF no candidato a efetor, uma vez que ele pode estar associado a patogenicidade da *P. pachyrhizi*.

Para maior compreensão dos mecanismos de patogenicidade de *P. pachyrhizi* durante a interação com a soja, além da validação funcional, alguns trabalhos têm utilizado ensaios de interação proteína-proteína, como sistema duplo híbrido de levedura, coimunoprecipitação e *pull down* associados a espectrometria de massas para identificar possíveis parceiros de interação dos efetores e assim obter informações sobre proteínas importantes no processo de infecção (Liu et al., 2016; Petre et al., 2015; Qi et al., 2016). Visto isso, neste trabalho foi identificado, pelo sistema duplo híbrido de levedura, que a proteína glucan endo beta-1,3-glucanase da soja (Gm β GLU) interagiu fisicamente com o candidato a efector Phapa-7431740.

As beta-1,3-glucanases são proteínas abundantes em plantas e têm sido caracterizadas em um grande número de espécies. Essas proteínas possuem um papel fundamental na divisão celular, no transporte de materiais através dos plasmodesmos, na resistência ao estresse abiótico e estão envolvidas desde a formação da flor até a maturação da semente (Balasubramanian et al., 2012). Além disso, as beta-1,3-glucanases têm sido descritas como enzimas ativadas durante a infecção por patógenos pela sua ação, principalmente, como proteínas antifúngicas, podendo atuar isoladamente ou em associação com quitinases (Bertoldo & Mazaro, 2018).

Estudos em outros patossistemas já descreveram efetores interagindo com proteínas PR-2. Por exemplo, o efector GIP1 de *Phytophthora infestans* que interage com uma proteína PR-2 (EGaseA) de soja, inibindo sua atividade (Bishop et al. 2005). De modo similar, um *smallRNA* (*Pst*-milR1) atua como efector de *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* ao se ligar ao gene da beta-1,3-glucanase (*SM638*) de trigo suprimindo sua ação por meio da regulação da expressão dessa PR-2 (Wang et al., 2017).

Assim como as beta-1,3-glucanases, outras proteínas envolvidas na patogênese, como as proteínas PR-5 são alvos de efetores. O efector BEC1054 de *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, por exemplo, pode atuar em diferentes níveis para comprometer os mecanismos de defesa da planta por meio de interações com quatro proteínas de cevada: uma proteína PR-5 (proteína relacionada a patogênese), uma proteína ribossomal e proteínas envolvidas no metabolismo primário e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e sinalização (Pennington et al., 2016).

Até o momento presente, o único efector de *P. pachyrhizi* identificado foi o PpEC23, que interage com o fator de transcrição da soja GmSPL121, que é um regulador negativo de imunidade da soja (Qi et al., 2016). Os exemplos de interação citados anteriormente demonstram que os efetores de diferentes patógenos podem atuar em vários níveis nos mecanismos de defesa da planta.

A ligação direta do candidato a efector Phapa-7431740 a uma beta-1,3 glucanase de soja, indica uma possível ação como inibidor de sua atividade, no intuito de impedir o reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro. Existem na literatura proteínas inibidoras de glucanases descritas e caracterizadas no oomiceto *Phytophthora* (Bishop et al., 2005; Damasceno et al., 2008; Rose et al., 2002). Esses efetores possuem o domínio serino protease e são capazes de inibir a atividade catalítica das enzimas beta-1,3-glucanases (Rose et al., 2002).

4.2 Caracterização da proteína Gm β GLU

As beta-1,3-glucanases apresentam o domínio GH17, que pertence à família dos glicosídeos hidrolases (GH), e é um grupo difundido de enzimas que hidrolisam a ligação glicosídica entre dois ou mais carboidratos ou entre um carboidrato e uma porção não carboidrato (Henrissat, 1991). Um sistema de classificação para hidrolases de glicosídeo, com base na similaridade de sequência, levou à definição de mais de 100 famílias diferentes (Davies & Henrissat, 1995; Henrissat et al., 1995). Nas plantas, estes membros da família GH estão envolvidos em diversos processos, incluindo metabolismo do amido, transporte, defesa ao estresse e remodelação da parede celular (Sekhwal et al., 2013). Os membros do grupo GH foram identificados como importantes na defesa contra estresses bióticos e abióticos em plantas (Minic, 2008; Opassiri et al., 2006).

Os genes beta-1,3-glucanases da soja apresentaram maior número de representantes quando comparado a algodoeiro e *A. thaliana*. As estruturas dos domínios nas proteínas são semelhantes quanto a classificação estipulada para as beta-1,3-glucanases de tabaco, porém, nas proteínas da soja, existem membros que variam quanto a essa estrutura dentro dessa classificação, o que não ocorreu com as proteínas de *A. thaliana* e *G. raimondii*. Em um estudo comparativo entre as proteínas beta-1,3-glucanases das espécies de algodoeiro, tabaco, *Arabidopsis*, cacaueiro e videira, os resultados sugeriram que as beta-1,3-glucanases ancestrais de plantas apresentam a estrutura da classe I, com presença da sequência N-terminal seguida do domínio GH17, CMB43 e a sequência C-terminal, e que durante o processo evolucionário essas proteínas passaram a ter a estrutura da classe II e V, onde houve perda do domínio CBM43 e da sequência C-terminal, que resultou na diversidade funcional das proteínas da família PR- 2 (Xu et al., 2016).

A família de PR-2 da soja foi dividida em oito subfamílias. A proteína Gm β GLU foi classificada na subfamília E, juntamente com a proteína EGaseB que é alvo do efector GIP de

Phytophthora. As sequências de AT3G57270, AT3G57260, AT3G57240, AT4G16260 de *Arabidopsis* pertencentes a subfamília E apresentaram mais de 50 % de identidade com a Gm β GLU. Essas sequências são proteínas PR secretadas no meio extracelular, que foram induzidas durante a infecção com patógenos bacterianos e fúngicos (Dong et al., 1991; Doxey et al., 2007). As sequências AT3G57260 e AT3G57240 foram altamente expressas no tecido das folhas (Doxey et al., 2007). A sequência de AT4G16260 de *Arabidopsis* codifica uma beta-1,3-endoglucanase que interage com o efector do nematoide de cisto (30C02). Quando AT4G16260 tem sua expressão aumentada nas raízes das plantas, há uma redução significativa na infecção (Hamamouch et al., 2012).

A Gm β GLU é classificada na classe IV quanto a estrutura dos domínios na proteína. Os membros da classe IV, sp41a e sp41b, foram descritos como não induzidos por patógenos e com alto nível de acúmulo no estilete (Ori et al., 1990). Porém, o perfil de expressão de Gm β GLU em folhas de soja infectadas por *Phakospora* demonstraram o contrário, pois houve indução desse gene membro da classe IV na presença do patógeno (Tabela 5). Além disso, conforme citado anteriormente, existem membros da subfamília E de soja e *Arabidopsis* relacionados a defesa da planta contra patógenos. Essa contradição entre os membros da classe IV pode ser justificada pela complexidade e diversidade da família das beta-1,3-glucanases. A subfamília E agrupou proteínas de soja, algodoeiro e *Arabidopsis* das classes IV e V (Figura 4).

O alinhamento entre a região identificada na interação pelo sistema duplo híbrido de levedura e as 15 sequências de proteínas de soja da subfamília E demonstrou que existe mais de 59% de identidade entre as proteínas da mesma subfamília e a região da Gm β GLU que interagiu com o efector Phapa-7431740 (Tabela 6). A proteína do gene Glyma.09G037100.4 apresentou 88 % de identidade em 100 % de cobertura da região e, devido à grande similaridade com a Gm β GLU, pode-se supor que a proteína do gene Glyma.09G037100.4 também interaja com o efector Phapa-7431740. Dentre as proteínas de soja da subfamília E a Glyma.19G134700.1, denominada SGN1, foi relatada como importante no desenvolvimento da planta e na defesa da planta contra o ataque de patógenos (Cheong et al., 2000).

Tabela 6 – Identidade (%), cobertura (%), tamanho da sequência de proteína, *E-value* dos alinhamentos entre as proteínas de soja da subfamília E em relação a região identificada na interação de proteína GmβGLU.

Modelo gênico	Identidade (%)	Cobertura (%)	Tamanho da proteína (aa)	<i>E-value</i>
Glyma.09G037100.4	88	100	371	1,0E-61
Glyma.19G134800.2	62	74	347	1,0E-35
Glyma.03G132700.1	61	74	348	7,0E-34
Glyma.06G108700.1	45	74	341	4,0E-19
Glyma.11G095100.1	64	72	345	3,0E-34
Glyma.12G021300.1	56	72	327	2,0E-31
Glyma.11G095000.1	55	72	339	1,0E-27
Glyma.19G134700.1	63	70	349	4,0E-33
Glyma.03G132900.1	64	69	341	7,0E-35
Glyma.16G113200.1	60	69	332	3,0E-31
Glyma.16G113700.2	59	69	275	1,0E-30
Glyma.16G114100.2	59	69	335	6,0E-30
Glyma.16G114000.1	59	69	335	6,0E-30
Glyma.11G095200.2	59	65	237	7,0E-27

4.3 Expressão de genes PR-2 na presença de patógenos

O perfil de expressão de GmβGLU durante a interação compatível teve comportamento semelhante ao perfil de expressão gênica do candidato a efector 7431740 nesta interação. Em trabalho anterior, foi observado que o candidato a efector do fungo também apresenta a sua expressão induzida nos tempos 6, 12 e 24 hai no genótipo suscetível de soja (BRS 231) inoculado com *P. pachyrhizi* (Carvalho et al., 2017). A expressão dessas duas proteínas nos mesmos períodos pode corroborar para a interação identificada entre elas, e sugerir que o efector do fungo interaja com a proteína da soja no início da infecção, possivelmente impedindo a atividade de GmβGLU sobre o patógeno. Neste tempo de 12 hai, a maioria dos urediniósporos germinados já formaram o apressório (Schneider et al., 2011). Logo, a expressão desse efector no início da infecção pode indicar o papel deste na supressão das vias de defesa da planta.

O gene PR-2 de trigo, SM638, na interação incompatível, foi induzido nos tempos 24 e 120 hai, enquanto que na interação compatível, SM638 foi induzido nos tempos 48 e 72 hai, em que os níveis de transcritos ao longo do tempo foi correlacionado negativamente com os níveis de transcritos do efector *Pst-milR1* (Wang et al., 2017). O oposto foi observado na interação compatível entre GmβGLU e Phapa-7431740, que se correlacionaram positivamente quanto ao nível de expressão gênica.

O fato da expressão da Gm β GLU ter sido induzida no início da infecção demonstra que provavelmente, uma das atividades dessa enzima é a defesa contra fungos, uma vez que, as beta-1,3-glucanases hidrolisam e liberam β -D-glucanas da parede celular fúngica, e por sua vez podem atuar como indutores de defesa na planta, induzindo acumulação de fitoalexinas (Edreva, 2004; Klarzynski et al., 2000; Okinaka et al., 1995; Simões et al., 2005). Ou seja, as beta-1,3-glucanases são provavelmente induzidas no início da infecção para auxiliar no reconhecimento do patógeno e ativação do sistema de resposta de defesa da planta.

Na interação incompatível, o perfil de expressão de Gm β GLU foi diferente da interação compatível, pois a expressão do gene foi induzida em todos os tempos ao longo da infecção, e com níveis de expressão maiores. Nesse caso, supõe-se que o mecanismo desencadeado pelo gene de resistência evite a redução da expressão de Gm β GLU ou garanta a sua indução, de forma que sua expressão continuou induzida ao longo do tempo da interação soja-*P. pachyrhizi*. Assim, essa proteína da soja deve apresentar papel importante na defesa do hospedeiro.

A validação da interação entre candidato a efector Phapa-7431740 com a proteína Gm β GLU ainda é necessária, pois apenas um ensaio de interação proteína-proteína é insuficiente para comprovar. Contudo, os resultados indicam que essa interação ocorra, uma vez que Gm β GLU é uma proteína PR que possui semelhança em sua estrutura com outra proteína de *Arabidopsis*, que comprovadamente interagem com um efector do nematoide de cisto. Além disso, pelo perfil de expressão gênica dessa PR-2 da soja, é verificado que a mesma tem sua expressão reduzida a partir de 12 hai na interação compatível da soja com a *Phakopsora*, enquanto que na interação incompatível a mesma tem sua expressão continuada até 72 hai.

5 CONCLUSÕES

O efector de *P. pachyrhizi* Phapa-7431740 é capaz de suprimir resposta de defesa mediadas por PTI e ETI da planta. A proteína da soja Gm β GLU é possivelmente alvo do efector de *P. pachyrhizi*, Phapa-7431740. Esse efector pode interferir na atividade dessa enzima, que é uma proteína relacionada a patogênese induzida pela presença do patógeno na soja. Contudo, são necessários estudos sobre a atuação do efector Phapa-7431740 na proteína Gm β GLU para maior compreensão da interação soja-*P. pachyrhizi*.

REFERÊNCIAS

- Aime, M. C., McTaggart, A. R., Mondo, S. J., & Duplessis, S. (2017). Phylogenetics and Phylogenomics of Rust Fungi. *Advances in Genetics*, 100, 267–307. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2017.09.011>
- Almagro Armenteros, J. J., Sønderby, C. K., Sønderby, S. K., Nielsen, H., & Winther, O. (2017). DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. *Bioinformatics*, 33(21), 3387–3395. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx431>
- Alves, M. S., Reis, P. A. B., Dadalto, S. P., Faria, J. A. Q. A., Fontes, E. P. B., & Fietto, L. G. (2011). A Novel Transcription Factor, ERD15 (Early Responsive to Dehydration 15), Connects Endoplasmic Reticulum Stress with an Osmotic Stress-induced Cell Death Signal. *Journal of Biological Chemistry*, 286(22), 20020–20030. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.233494>
- Alves, M. S., Soares, Z. G., Vidigal, P. M. P., Barros, E. G., Poddanosqui, A. M. P., Aoyagi, L. N., Abdelnoor, R. V., Marcelino-Guimarães, F. C., & Fietto, L. G. (2015). Differential expression of four soybean bZIP genes during *Phakopsora pachyrhizi* infection. *Functional and Integrative Genomics*, 15(6), 685–696. <https://doi.org/10.1007/s10142-015-0445-0>
- Balasubramanian, V., Vashisht, D., Cletus, J., & Sakthivel, N. (2012). Plant β -1,3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. *Biotechnology Letters*, 34(11), 1983–1990. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-1012-6>
- Barral, P., Suárez, C., Batanero, E., Alfonso, C., Alché, J. de D., Rodríguez-García, M. I., Villalba, M., Rivas, G., & Rodríguez, R. (2005). An olive pollen protein with allergenic activity, Ole e 10, defines a novel family of carbohydrate-binding modules and is potentially implicated in pollen germination. *Biochemical Journal*, 390(1), 77–84. <https://doi.org/10.1042/BJ20050456>
- Benson, D. A., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2014). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D32–D37. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1030>
- Bertoldo, É., & Mazaro, S. M. (2018). β -1,3 Glucanases: uma revisão sob a ótica da defesa vegetal. *Scientia Agraria Paranaensis*, 17(1), 1–13.
- Bishop, J. G., Ripoll, D. R., Bashir, S., Damasceno, C. M. B., Seeds, J. D., & Rose, J. K. C. (2005). Selection on glycine β -1,3-endoglucanase genes differentially inhibited by a *Phytophthora* glucanase inhibitor protein. *Genetics*, 169(2), 1009–1019. <https://doi.org/10.1534/genetics.103.025098>
- Borner, G. H. H., Sherrier, D. J., Stevens, T. J., Arkin, I. T., & Dupree, P. (2002). Prediction of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins in Arabidopsis. A Genomic Analysis. *Plant Physiology*, 129(2), 486–499. <https://doi.org/10.1104/pp.010884>
- Brandhorst, T., Gauthier, G. M., Stein, R. A., & Klein, B. S. (2005). Calcium Binding by the Essential Virulence Factor BAD-1 of *Blastomyces dermatitidis*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(51), 42156–42163. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507188200>
- Brandhorst, T., Wüthrich, M., Finkel-Jimenez, B., & Klein, B. (2003). A C-terminal EGF-like domain governs BAD1 localization to the yeast surface and fungal adherence to phagocytes, but is dispensable in immune modulation and pathogenicity of *Blastomyces dermatitidis*. *Molecular Microbiology*, 48(1), 53–65. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03415.x>
- Carvalho, M. C. da C. G., Costa Nascimento, L., Darben, L. M. ., Polizel-Podanosqui, A. M. ., Lopes-Caitar, V. S., Qi, M., Rocha, C. S., Carazzolle, M. F., Kuwahara, M. K., Pereira, G. A. G., Abdelnoor, R. V., Whitham, S. A., & Marcelino-Guimarães, F. C. (2017).

- Prediction of the in planta *Phakopsora pachyrhizi* secretome and potential effector families. *Molecular Plant Pathology*, 18(3), 363–377.
<https://doi.org/10.1111/mpp.12405>
- Cheong, Y. H., Kim, C. Y., Chun, H. J., Moon, B. C., Park, H. C., Kim, J. K., Lee, S.-H., Han, C., Lee, S. Y., & Cho, M. J. (2000). Molecular cloning of a soybean class III β -1,3-glucanase gene that is regulated both developmentally and in response to pathogen infection. *Plant Science*, 154(1), 71–81. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00187-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00187-4)
- Damasceno, C. M. B., Bishop, J. G., Ripoll, D. R., Win, J., Kamoun, S., & Rose, J. K. C. (2008). Structure of the Glucanase Inhibitor Protein (GIP) Family from *Phytophthora* Species Suggests Coevolution with Plant Endo- β -1,3-Glucanases. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(6), 820–830. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-6-0820>
- Davies, G., & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3(9), 853–859. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00220-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00220-9)
- Dong, X., Mindrinos, M., Davis, K. R., & Ausubel, F. M. (1991). Induction of Arabidopsis defense genes by virulent and avirulent *Pseudomonas syringae* strains and by a cloned avirulence gene. *The Plant Cell*, 3(1), 61–72. <https://doi.org/10.1105/tpc.3.1.61>
- Doxey, A. C., Yaish, M. W. F., Moffatt, B. A., Griffith, M., & McConkey, B. J. (2007). Functional divergence in the Arabidopsis β -1,3-glucanase gene family inferred by phylogenetic reconstruction of expression states. *Molecular Biology and Evolution*, 24(4), 1045–1055. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm024>
- Eddy, S. R. (2011). Accelerated Profile HMM Searches. *PLoS Computational Biology*, 7(10), e1002195. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002195>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Edreva, A. (2004). A novel strategy for plant protection: Induced resistance. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 3(2), 61–69.
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S. R., Luciani, A., Potter, S. C., Qureshi, M., Richardson, L. J., Salazar, G. A., Smart, A., Sonnhammer, E. L. L., Hirsh, L., Paladin, L., Piovesan, D., Tosatto, S. C. E., & Finn, R. D. (2019). The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D427–D432.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky995>
- Ellis, J. G., Rafiqi, M., Gan, P., Chakrabarti, A., & Dodds, P. N. (2009). Recent progress in discovery and functional analysis of effector proteins of fungal and oomycete plant pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(4), 399–405.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.05.004>
- Godfrey, D., Böhlenius, H., Pedersen, C., Zhang, Z., Emmersen, J., & Thordal-Christensen, H. (2010). Powdery mildew fungal effector candidates share N-terminal Y/F/WxC-motif. *BMC Genomics*, 11(1), 317. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-317>
- Godoy, C. V., Seixas, C. D. S., Soares, R. M., Marcelino-Guimarães, F. C., Meyer, M. C., & Costamilan, L. M. (2016). Asian soybean rust in Brazil: past, present, and future. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51(5), 407–421. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500002>
- Hamamouch, N., Li, C., Hewezi, T., Baum, T. J., Mitchum, M. G., Hussey, R. S., Vodkin, L. O., & Davis, E. L. (2012). The interaction of the novel 30C02 cyst nematode effector protein with a plant β -1,3-endoglucanase may suppress host defence to promote parasitism. *Journal of Experimental Botany*, 63(10), 3683–3695.
<https://doi.org/10.1093/jxb/ers058>
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*, 280(2), 309–316. <https://doi.org/10.1042/bj2800309>

- Henrissat, B., Callebaut, I., Fabrega, S., Lehn, P., Mornon, J. P., & Davies, G. (1995). Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(15), 7090–7094. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.15.7090>
- Hu, R., Fan, C., Li, H., Zhang, Q., & Fu, Y.-F. (2009). Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. *BMC Molecular Biology*, 10(1), 93. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-93>
- Jain, M., Nijhawan, A., Arora, R., Agarwal, P., Ray, S., Sharma, P., Kapoor, S., Tyagi, A. K., & Khurana, J. P. (2007). F-Box Proteins in Rice. Genome-Wide Analysis, Classification, Temporal and Spatial Gene Expression during Panicle and Seed Development, and Regulation by Light and Abiotic Stress. *Plant Physiology*, 143(4), 1467–1483. <https://doi.org/10.1104/pp.106.091900>
- Klarzynski, O., Plesse, B., Joubert, J. M., Yvin, J. C., Kopp, M., Kloareg, B., & Fritig, B. (2000). Linear β -1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiology*, 124(3), 1027–1037. <https://doi.org/10.1104/pp.124.3.1027>
- Kunjetti, S. G., Iyer, G., Johnson, E., Li, E., Broglie, K. E., Rauscher, G., & Rairdan, G. J. (2016). Identification of Phakopsora pachyrhizi Candidate Effectors with Virulence Activity in a Distantly Related Pathosystem. *Frontiers in Plant Science*, 7(MAR2016). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00269>
- Liao, Y., Zou, H.-F., Wei, W., Hao, Y.-J., Tian, A.-G., Huang, J., Liu, Y.-F., Zhang, J.-S., & Chen, S.-Y. (2008). Soybean GmbZIP44, GmbZIP62 and GmbZIP78 genes function as negative regulator of ABA signaling and confer salt and freezing tolerance in transgenic Arabidopsis. *Planta*, 228(2), 225–240. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0731-3>
- Link, T. I., Lang, P., Scheffler, B. E., Duke, M. V., Graham, M. A., Cooper, B., Tucker, M. L., van de Mortel, M., Voegelé, R. T., Mendgen, K., Baum, T. J., & Whitham, S. A. (2014). The haustorial transcriptomes of Uromyces appendiculatus and Phakopsora pachyrhizi and their candidate effector families. *Molecular Plant Pathology*, 15(4), 379–393. <https://doi.org/10.1111/mpp.12099>
- Linthorst, H. J. M., Melchers, L. S., Mayer, A., van Roekel, J. S., Cornelissen, B. J. C., & Bol, J. F. (1990). Analysis of gene families encoding acidic and basic β -1,3-glucanases of tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(22), 8756–8760. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.22.8756>
- Liu, C., Pedersen, C., Schultz-Larsen, T., Aguilar, G. B., Madriz-Ordeñana, K., Hovmøller, M. S., & Thordal-Christensen, H. (2016). The stripe rust fungal effector PEC6 suppresses pattern-triggered immunity in a host species-independent manner and interacts with adenosine kinases. *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1111/nph.14034>
- Luster, D. G., McMahon, M. B., Carter, M. L., Fortis, L. L., & Nuñez, A. (2010). Proteomic analysis of germinating urediniospores of Phakopsora pachyrhizi, causal agent of Asian soybean rust. *PROTEOMICS*, 10(19), 3549–3557. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900469>
- Ma, S., Niu, H., Liu, C., Zhang, J., Hou, C., & Wang, D. (2013). Expression Stabilities of Candidate Reference Genes for RT-qPCR under Different Stress Conditions in Soybean. *PLoS ONE*, 8(10), e75271. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075271>
- Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., von Haeseler, A., & Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Molecular Biology and Evolution*, 37(5), 1530–1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>
- Minic, Z. (2008). Physiological roles of plant glycoside hydrolases. *Planta*, 227(4), 723–740. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0668-y>
- Morales, A. M. A. P., O'Rourke, J. A., van de Mortel, M., Scheider, K. T., Bancroft, T. J.,

- Borém, A., Nelson, R. T., Nettleton, D., Baum, T. J., Shoemaker, R. C., Frederick, R. D., Abdelnoor, R. V., Pedley, K. F., Whitham, S. A., & Graham, M. A. (2013). Transcriptome analyses and virus induced gene silencing identify genes in the Rpp4-mediated Asian soybean rust resistance pathway. *Functional Plant Biology*, 40(10), 1029. <https://doi.org/10.1071/FP12296>
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., & von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering Design and Selection*, 10(1), 1–6. <https://doi.org/10.1093/protein/10.1.1>
- Okinaka, Y., Mimori, K., Takeo, K., Kitamura, S., Takeuchi, Y., Yamaoka, N., & Yoshikawa, M. (1995). A Structural Model for the Mechanisms of Elicitor Release from Fungal Cell Walls by Plant [beta]-1,3-Endoglucanase. *Plant Physiology*, 109(3), 839–845. <https://doi.org/10.1104/pp.109.3.839>
- Opassiri, R., Pomthong, B., Onkoksoong, T., Akiyama, T., Esen, A., & Ketudat Cairns, J. R. (2006). Analysis of rice glycosyl hydrolase family 1 and expression of Os4bglu12 β -glucosidase. *BMC Plant Biology*, 6, 1–19. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-6-33>
- Ori, N., Sessa, G., Lotan, T., Himmelhoch, S., & Fluhr, R. (1990). A major stylar matrix polypeptide (sp41) is a member of the pathogenesis-related proteins superclass. *The EMBO Journal*, 9(11), 3429–3436. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07550.x>
- Panthee, D. R., Yuan, J. S., Wright, D. L., Marois, J. J., Mailhot, D., & Stewart, C. N. (2007). Gene expression analysis in soybean in response to the causal agent of Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow) in an early growth stage. *Functional & Integrative Genomics*, 7(4), 291–301. <https://doi.org/10.1007/s10142-007-0045-8>
- Pennington, H. G., Gheorghe, D. M., Damerum, A., Pliego, C., Spanu, P. D., Cramer, R., & Bindschedler, L. V. (2016). Interactions between the Powdery Mildew Effector BEC1054 and Barley Proteins Identify Candidate Host Targets. *Journal of Proteome Research*, 15(3), 826–839. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00732>
- Petre, B., Saunders, D. G. O., 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. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-15-0003-R>
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9), 36e – 36. <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.e36>
- Pierleoni, A., Martelli, P., & Casadio, R. (2008). PredGPI: a GPI-anchor predictor. *BMC Bioinformatics*, 9(1), 392. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-392>
- Qi, M., Graczyk, J. P., Seitz, J. M., Lee, Y., Link, T. I., Choi, D., Pedley, K. F., Voegelé, R. T., Baum, T. J., & 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. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-17-0173-FI>
- Qi, M., Link, T. I., Müller, M., Hirschburger, D., Pudake, R. N., Pedley, K. F., Braun, E., Voegelé, R. T., Baum, T. J., & 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. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005827>
- Rincão, M. P., Carvalho, M. C. da C. G. de, Nascimento, L. C., Lopes-Caitar, V. S., Carvalho, K. de, Darben, L. M., Yokoyama, A., Carazzolle, M. F., Abdelnoor, R. V., & Marcelino-Guimarães, F. C. (2018). New insights into *Phakopsora pachyrhizi* infection based on transcriptome analysis in planta. *Genetics and Molecular Biology*, 41(3), 671–691.

- <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2017-0161>
- Rose, J. K. C., Ham, K. S., Darvill, A. G., & Albersheim, P. (2002). Molecular cloning and characterization of glucanase inhibitor proteins: Coevolution of a counterdefense mechanism by plant pathogens. *Plant Cell*, 14(6), 1329–1345.
<https://doi.org/10.1105/tpc.002253>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor.
- Sato, S. K. and F. (1999). Plant Pathogenesis-Related Proteins: Molecular Mechanisms of Gene Expression and Protein Function. *The Journal of Biochemistry*, 125(1), 1–8.
- Saunders, D. G. O., Win, J., Cano, L. M., Szabo, L. J., Kamoun, S., & Raffaele, S. (2012). Using Hierarchical Clustering of Secreted Protein Families to Classify and Rank Candidate Effectors of Rust Fungi. *PLoS ONE*, 7(1), e29847.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029847>
- Schneider, K. T., van de Mortel, M., Bancroft, T. J., Braun, E., Nettleton, D., Nelson, R. T., Frederick, R. D., Baum, T. J., Graham, M. A., & Whitham, S. A. (2011). Biphasic Gene Expression Changes Elicited by *Phakopsora pachyrhizi* in Soybean Correlate with Fungal Penetration and Haustoria Formation. *Plant Physiology*, 157(1), 355–371.
<https://doi.org/10.1104/pp.111.181149>
- Sekhwil, M. K., Sharma, V., & Sarin, R. (2013). Annotation of glycoside hydrolases in *Sorghum bicolor* using proteins interaction approach. *Journal of Proteome Science and Computational Biology*, 2(1), 2. <https://doi.org/10.7243/2050-2273-2-2>
- Simões, K., Dietrich, S. M. C., Hahn, M. G., & Braga, M. R. (2005). Purification and characterization of a phytoalexin elicitor from spores of the saprobe *Mucor ramosissimus*. *Revista Brasileira de Botânica*, 28(4), 735–744.
<https://doi.org/10.1590/S0100-84042005000400008>
- Stenflo, J., Stenberg, Y., & Muranyi, A. (2000). Calcium-binding EGF-like modules in coagulation proteinases: function of the calcium ion in module interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1477(1–2), 51–63. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00262-9](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00262-9)
- Sticher, L., Hinz, U., Meyer, A. D., & Meins, F. (1992). Intracellular transport and processing of a tobacco vacuolar β -1,3-glucanase. *Planta*, 188(4), 559–565.
<https://doi.org/10.1007/BF00197049>
- Stone, C. L., McMahon, M. B., Fortis, L. L., Nuñez, A., Smythers, G. W., Luster, D. G., & Frederick, R. D. (2012). Gene expression and proteomic analysis of the formation of *Phakopsora pachyrhizi* appressoria. *BMC Genomics*, 13(1), 269.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-269>
- Tang, C., Xu, Q., Zhao, M., Wang, X., & Kang, Z. (2018). Understanding the lifestyles and pathogenicity mechanisms of obligate biotrophic fungi in wheat: The emerging genomics era. *The Crop Journal*, 6(1), 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.11.003>
- van de Mortel, M., Recknor, J. C., Graham, M. A., Nettleton, D., Dittman, J. D., Nelson, R. T., Godoy, C. V., Abdelnoor, R. V., Almeida, Á. M. R., Baum, T. J., & Whitham, S. A. (2007). Distinct Biphasic mRNA Changes in Response to Asian Soybean Rust Infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(8), 887–899. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-8-0887>
- Wang, B., Sun, Y., Song, N., Zhao, M., Liu, R., Feng, H., Wang, X., & Kang, Z. (2017). *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* microRNA-like RNA 1 (Pst-milR1), an important pathogenicity factor of Pst, impairs wheat resistance to Pst by suppressing the wheat pathogenesis-related 2 gene. *New Phytologist*, 215(1), 338–350.
<https://doi.org/10.1111/nph.14577>
- Xu, X., Feng, Y., Fang, S., Xu, J., Wang, X., & Guo, W. (2016). Genome-wide

- characterization of the β -1,3-glucanase gene family in *Gossypium* by comparative analysis. *Scientific Reports*, 6(1), 29044. <https://doi.org/10.1038/srep29044>
- Yamaguchi, T., Nakayama, K., Hayashi, T., Tanaka, Y., & Koike, S. (2002). Molecular Cloning and Characterization of a Novel β -1,3-Glucanase Gene from Rice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66(6), 1403–1406. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.1403>
- Zavaliev, R., Levy, A., Gera, A., & Epel, B. L. (2013). Subcellular Dynamics and Role of Arabidopsis β -1,3-Glucanases in Cell-to-Cell Movement of Tobamoviruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 26(9), 1016–1030. <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-13-0062-R>

CAPITULO II

**Caracterização funcional do efector de *Phakopsora pachyrhizi* Phapa-6417246 e
identificação de alvos de interação na soja**

RESUMO

O patógeno *Phakopsora pachyrhizi*, agente causal da ferrugem asiática da soja, secreta inúmeras proteínas efetoras na célula hospedeira, que são capazes de manipular o sistema de resposta de defesa da planta. Logo, entender a interação planta-patógeno é de suma importância para o sucesso no controle de doenças. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a proteína candidata a efector, Phapa-6417246, de *P. pachyrhizi* com base na análise de sua estrutura proteica e comparativa com demais organismos, validar funcionalmente sua capacidade de supressão de respostas de defesa da planta e, identificar possíveis proteínas de soja parceiras de interação desse efector. Para tanto, foi utilizado os bancos de dados dos três genomas de *Phakopsora* disponíveis no *Join Genome Institute* (JGI) para caracterização *in silico* do candidato a efector Phapa-6417246. Foi realizado os ensaios de supressão de PTI e ETI, e a análise de RT-qPCR do modelo gênico Phapa-6417246 ao longo do ciclo infeccioso em genótipo suscetível de soja. A proteína Phapa-6417246 foi capaz de ativar sozinha o gene repórter em altas concentrações de 3-AT, o que indica que ela pode estar relacionada a fatores de transcrição na planta. Devido a isso, foram realizadas a expressão e purificação da proteína Phapa-6417246; e o ensaio de *pull down* para identificação de possíveis parceiros de interação da proteína. Foi demonstrado que o efector Phapa-6417246 suprimiu as respostas de defesa da planta mediadas por PTI e ETI, e sua expressão foi induzida na presença do hospedeiro nos tempos 6, 12, 24 e 48 horas após a inoculação do fungo. Conclui-se que o candidato a efector Phapa-6417246 tem papel importante na patogenicidade do fungo com a validação de sua função efetora. Porém, para identificar possíveis parceiros de interação desse efector e compreender a função do efector na patogenicidade ainda é necessário a realização de outros estudos para aprofundar no entendimento sobre atuação do efector nos mecanismos de defesa da planta.

Palavras-chave: Efector. Resistência a ferrugem. Soja. Supressão de resposta de defesa.

ABSTRACT

Phakopsora pachyrhizi, the causal agent of Asian soybean rust, secretes numerous effector proteins in the host tissue, which are able to disrupt the plant's defense response system. Therefore, understanding plant-pathogen interaction is very important for successful disease control. This work aimed to characterize the candidate effector protein, Phapa-6417246, from *P. pachyrhizi* based on the analysis of its protein structure and by comparing it with other organisms to functionally validate its ability to suppress defense responses and to identify possible soybean interaction partners of this effector. The three genomes of *Phakopsora* available at the Joint Genome Institute (JGI) were used for the *in silico* characterization of the Phapa-6417246 candidate effector. The PTI and ETI suppression assays and the RT-qPCR analysis of the Phapa-6417246 gene model were carried out throughout the infectious cycle in a susceptible soybean genotype. In addition to that, the pull-down test was performed. The Phapa-6417246 candidate effector suppressed the plant defense responses mediated by PTI and ETI, and its expression was induced in the host presence at 6, 12, 24, and 48 hours after the fungus inoculation. It is concluded that the Phapa-6417246 effector candidate has an important role in the pathogenicity of the fungus due to its effector function validation. However, to identify possible interaction partners for this effector and understand the effector's role in pathogenicity, further studies are necessary to deepen the knowledge about the effector's role in the plant's defense mechanisms.

Keywords: Defense response suppression. Effector. Rust resistance. Soybean.

1 INTRODUÇÃO

A ferrugem asiática é considerada uma das doenças mais severas que afetam a cultura da soja. O agente causal da ferrugem asiática é o fungo *Phakopsora pachyrhizi*, um fungo biotrófico (parasita obrigatório) que possui uma ampla gama de hospedeiros e um ciclo de vida complexo (Goellner et al., 2010). Cultivares com genes de resistência estão disponíveis comercialmente. Porém, essas cultivares não dispensam a aplicação de fungicidas, que devem ser utilizadas como uma estratégia de manejo da doença, a fim de evitar que a resistência seja suplantada, em razão da elevada variabilidade genética do patógeno (Godoy et al., 2016; Henning, 2014; Zambolim, 2006). Nesse sentido, a utilização de técnicas biotecnológicas associadas ao melhoramento de plantas pode auxiliar na produção de cultivares com resistência de amplo espectro e com maior durabilidade no campo.

Assim, entender a interação planta-patógeno é de suma importância para o sucesso no controle de doenças nos cultivos agrícolas (Hammond-kosack & Jones, 2000). Os processos de reconhecimento pelo sistema de defesa das plantas são constituídos por duas linhas. A primeira linha são os processos associados à imunidade desencadeada por PAMPs (Padrões Moleculares Associados à Patógenos) usualmente denominado imunidade ativada por PAMPs (PTI). A segunda linha de defesa são aqueles associados à imunidade desencadeada por efetores. usualmente denominado imunidade ativada por efetores (ETI) (Dodds & Rathjen, 2010; Jones & Dangl, 2006).

Os PAMPs são padrões moleculares reconhecidos pelas células do sistema de defesa basal, como sinal de invasão por patógenos, considerados essenciais na aptidão de sobrevivência dos patógenos (Medzhitov & Janeway, 1997). Exemplos de PAMPs são as quitinas fúngicas, lipopolissacarídeos, flagelinas bacterianas, entre outros (Medzhitov & Janeway, 1997). Essa defesa permite que as plantas respondam de forma rápida e eficiente a uma ampla gama de patógenos (Roux et al., 2014).

Os patógenos adaptados secretam um arsenal de proteínas efetoras que podem suprimir PTI durante o processo de infecção, causando assim o desenvolvimento da doença (Stergiopoulos & de Wit, 2009), o que culmina na suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS) (Birch et al., 2008; Göhre & Robatzek, 2008). Os processos na resposta ETI incluem a secreção de efetores que suprimem a resposta imune. ETI é ativada por meio da interação direta ou indireta com as proteínas NB-LRR, que possuem domínio de ligação a nucleotídeos (NB -

nucleotide binding) e repetições de leucina (LRR - *leucine rich repeat*), que reconhecem esses efetores (Jones & Dangl, 2006).

Os efetores podem ser definidos como proteínas secretadas pelo patógeno dentro de células hospedeiras para auxiliar no processo de infecção (Dodds & Rathjen, 2010). Estas proteínas podem, por exemplo, alterar a atividade dos alvos nos hospedeiros ou agir como enzimas para suprimir PTI, facilitando a infecção (fatores de virulência ou toxinas) e/ou ativando respostas de defesa (fatores de avirulência ou elicitores) (Kamoun, 2009; Liu et al., 2016).

Vários estudos têm buscado identificar conjuntos de candidatos a efetores por meio de análises no proteoma (Duplessis et al., 2014; Garnica et al., 2013; Saunders et al., 2012), genoma ou transcriptoma conhecidos de fungos patogênicos (Carvalho et al., 2017; Elmore et al., 2020; Kunjeti et al., 2016; Link et al., 2014; Posada-Buitrago & Frederick, 2005; Rincão et al., 2018). Com o crescente número de efetores candidatos, que vem sendo disponibilizados e, para maior entendimento de suas funções nas células das plantas, torna-se necessário o uso de ferramentas para esse fim. Estudos apontam que por meio do uso de plantas modelo não hospedeiras e do sistema de secreção do tipo III de bactérias, é possível estudar a biologia da célula, bioquímica das proteínas, resposta de hipersensibilidade e ensaios de infecção (Petre et al., 2014).

Dentre as proteínas efetoras de ferrugens identificadas na literatura, têm-se quatro efetores (AvrM, AvrL567, AvrP123 e AvrP4) de *Melampsora lini* da ferrugem do linho, e o efetor (PGTAUSPE10-1) de *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* da ferrugem do trigo que foram identificados devido sua avirulência (Ellis et al., 2007; Upadhyaya et al., 2014). A proteína efetora RTP1 (*Rust Transferred Protein*) de *Uromyces fabae* da ferrugem do feijão (Kemen et al., 2005). Dentre os estudos sobre a interação soja- *P. pachyrhizi*, em 2014, foi descrito o secretoma da *P. pachyrhizi* a partir da análise de RNAseq utilizando amostras do haustório do fungo (Link et al., 2014). Posteriormente, foi realizada a predição do secretoma de *P. pachyrhizi* *in planta* e, a partir disso, foram preditas 851 proteínas secretadas pelo patógeno com possível ação no interior das células do hospedeiro (Carvalho et al., 2017).

Visto isso, o objetivo desse trabalho foi caracterizar a proteína candidata a efetor, Phapa-6417246, de *P. pachyrhizi* com base na análise de sua estrutura proteica e comparativa com demais organismos, além de validar funcionalmente sua capacidade de supressão de respostas de defesa, e identificar possíveis proteínas de soja parceiras de interação desse efetor.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Análises *in silico*

A sequência de proteína do transcrito de_novo_1576 (Carvalho et al., 2017), candidata a efetor de *P. pachyrhizi*, foi analisada quanto à similaridade significativa (70% de identidade e 50% de cobertura) com as sequências de proteínas do banco de dados dos três genomas de *Phakopsora pachyrhizi* (MT2006, PPUFV02 e K8108) presentes no *Joint Genome Institute* (JGI) (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/mycocosm/home>). Essa sequência foi avaliada para verificar a presença da mesma nos genomas disponíveis, a clonagem correta e para demonstrar a estrutura do gene.

Foram realizadas análises do número e percentual de resíduos de cisteína na proteína madura e presença de domínios conservados pelo PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>), que são indicativos de sua provável função biológica. Domínios com valores de *E-value* maior que 10^{-5} foram desconsiderados (Saunders et al., 2012). Além disso, foi realizada a busca de motivos presentes nas sequências de resíduos de aminoácidos dos modelos gênicos encontrados nos três genomas que são similares ao de_novo_1576.

Para identificação da sequência de ligação nuclear (NLS) no modelo gênico foi utilizado os programas NLStradamus (Nguyen Ba et al., 2009), predictNLS (Cokol et al., 2000), nucPred (Brameier et al., 2007) e cNLS mapper (Kosugi et al., 2008, 2009). Para verificar a presença de sítio de ligação ao nucleotídeo foi empregado o modelo PF00931 (NBS) do PFAM.

Para identificar outros modelos gênicos que se agrupam ao modelo gênico similar ao de_novo_1576, foi utilizada a análise de agrupamento de famílias de proteínas disponíveis no JGI por meio do algoritmo MCL-Cluster (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/clm/run/Phakopsoracomparative1.4168;BeMF01?organism=Phapa1>). Esses agrupamentos reuniram as proteínas preditas de *P. pachyrhizi* com proteínas de outras espécies de ferrugem, como *Cronartium quercuum* f. sp. *fusiforme*, *Melampsora lini*, *Melampsora medusae* f. sp. *deltoidae*, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, *Melampsora americana*, *Melampsora larici-populina* e *Puccinia triticina*.

Foi realizada a predição de proteínas de soja que sejam alvo do efetor Phapa-6417246 por meio do programa InterSPPI (Yang et al., 2019).

2.2 Clonagem do modelo gênico candidato a efector Phapa-6417246

O modelo gênico Phapa-6417246 foi amplificado com *primers* específicos (Tabela 1) e clonado no vetor pCR8®/GW/TOPO (Invitrogen®) formando o vetor de entrada GW/TOPO_6417246. Após confirmação da clonagem por sequenciamento, o vetor GW/TOPO_6417246 foi utilizado para recombinar o modelo gênico Phapa-6417246 para o vetor de destino pDEST32 (LEU2, CEN, Gentamicina®), formando o vetor BD-6417246, utilizando a enzima LR clonase (Invitrogen®), pelo sistema Gateway. O vetor BD-417246 resultou no clone em que a sequência do gene está fusionada ao domínio de ligação do DNA (BD) do Gal4p. A clonagem foi confirmada por PCR e posterior sequenciamento do plasmídeo.

Para os ensaios de supressão de PTI e ETI, o candidato a efector Phapa-6417246 foi recombinado para o vetor de destino pEDV6. Este vetor se baseia no Sistema de Secreção Tipo III de fitobactérias, permitindo a secreção da proteína de interesse e se mostrou promissor para fungos biotróficos (Sohn et al., 2007).

Tabela 1 – Oligonucleotídeos específicos para amplificação e clonagem do modelo gênico Phapa-6417246, para amplificação dos vetores, e oligonucleotídeos específicos para RT-qPCR do gene.

Oligonucleotídeos	Sequência (5'-3')
Fw-Phapa6417246	ATGCAGAACATTACCAGTGACTTTCCAGCCA
Rv-Phapa6417246	TTATATAAACAAAGAGACAATGAACGTGATATATGCAGC
Fw-pDEST22	AACCGAAGTGCGCCAAGTGTCTG
Rv-pDEST22	AGCCGACAACCTTGATTGGAGAC
Fw-pDEST32	TATAACGCGTTTGGAACTACT
Rv-pDEST32	AGCCGACAACCTTGATTGGAGAC
Fw-T7	TAATACGACTCACTATAGGG
Rv-T7 terminal	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
Fw-6417246-RT	CTGGTCACAGGCTTGGGTAG
Rv-6417246-RT	AAAAAGTGCTGCGAGAAGCG

2.3 Ensaio de supressão de PTI

Plantas de *Nicotiana benthamiana* foram cultivadas em vasos plásticos de 500 mL e mantidas em câmara de crescimento com 50-55 % de umidade, a 24 °C e 12 h/12 h (luz/escuro) por 5 semanas. Para a inoculação, colônias da estirpe *Effector-to-Host Analyze* (EtHAN) da bactéria de solo *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 foram ressuspensas em solução tampão, MgCl₂ 10 mM, tendo a concentração ajustada para D.O.₆₀₀=0,5.

Os tratamentos, solução tampão de 10 mM de $MgCl_2$ (controle negativo), EtHAN (controle positivo), e EtHAN transformada com o pEDV6- de_novo_1576, foram infiltrados na face abaxial das folhas de *N. benthamiana* com auxílio de uma seringa sem agulha até formar uma circunferência de 1,5 cm. Na face adaxial, a circunferência foi demarcada com a caneta permanente para que no momento de coleta dos discos foliares fosse possível identificar a área infiltrada. Os discos foram utilizados para a detecção de espécies reativas de oxigênio e detecção de acúmulo de calose.

2.3.1 Detecção da formação de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) por meio do corante DAB (3,3'-diaminobenzidina)

Para a detecção de ROS, os discos foliares foram coletados 24 horas após a infiltração com auxílio de um perfurador de folha. Na capela de exaustão, foi adicionado solução do corante DAB, que reage com ROS e produz pigmentação característica. Em seguida, a placa foi coberta com papel alumínio, devido à fotossensibilidade do DAB, e mantida sob leve agitação por 12 a 16 horas.

Posteriormente, os discos foliares foram lavados com água destilada e despigmentados para permitir a visualização da pigmentação de ROS. Discos foliares foram imersos em solução de etanol:glicerol:ácido acético (3:1:1) por 15 minutos. Todo o procedimento foi realizado em capela de exaustão. Por fim, foram preparadas lâminas com os discos foliares em glicerol 50% para observação em microscópio com a objetiva de 10x. A captura da imagem foi realizada por meio do *software* Motic® Imagens Plus 2.0.

2.3.2 Detecção do acúmulo de calose

Para a detecção do acúmulo de calose foram coletados discos foliares 72 horas após infiltração. A despigmentação da clorofila foi realizada por meio da imersão dos discos foliares em 2 mL de etanol 95 %, sob leve agitação a 37 °C por no mínimo seis horas. Em seguida, foram feitas as etapas de reidratação dos discos foliares com soluções menos concentradas de etanol (70 %, 30 % e água destilada) sob leve agitação. Ao final, foi adicionado aos discos foliares a solução corante azul de anilina (que cora estruturas de calose provenientes da infecção de patógenos no tecido foliar) + Tween® 20. A placa foi coberta com papel alumínio e mantida sob agitação leve por duas horas. Posteriormente, as lâminas foram preparadas com os discos

foliares em glicerol 50 %, e estas foram analisadas por meio de microscopia de fluorescência, utilizando o filtro DAPI, onde as partes pigmentadas com o azul de anilina são excitadas por meio da luz UV do microscópio. As imagens foram documentadas por meio do *software* Zeiss AxioVision 3.0, com visualização na objetiva de 5x.

2.4 Ensaio de supressão de ETI

Pseudomonas syringae pv. *tomato* DC3000 (Pst DC3000) é uma bactéria fitopatogênica que codifica um efetor secretado pelo sistema de secreção do tipo III (SST3) e induz a ETI caracterizada pela resposta de hipersensibilidade (HR) em *N. benthamiana* (Mysore & Ryu, 2004). O modelo gênico Phapa-6417246 clonado no vetor pEDV6 (Sohn et al., 2007) e o vetor vazio foram conjugados em Pst DC3000 por acoplamento triparental usando *Escherichia coli* HB101 (pRK2013) como uma linhagem auxiliar.

As bactérias foram cultivadas seletivamente em meio Luria-Bertani (LB) contendo 50 mg mL⁻¹ de rifampicina e 75 mg mL⁻¹ de gentamicina a 28 °C. As células bacterianas foram cultivadas por 12 a 16 horas em meio líquido LB com os antibióticos apropriados a 28 °C em agitador rotativo (250 rpm).

As bactérias foram coletadas por centrifugação, lavadas e ressuspensas em MgCl₂ 10 mM a uma densidade óptica a 600 nm (D.O.₆₀₀) de 0,2, 0,02 e 0,004 (D.O. de 0,15108 unidades formadoras de colônias (ufc) mL⁻¹). Essa suspensão bacteriana foi introduzida na parte abaxial das folhas de *N. benthamiana* com uma seringa de 1 mL sem agulha. As folhas foram fotografadas após 48 horas da inoculação. O candidato a efetor foi testado contra o controle negativo (vetor vazio) em folhas de *N. benthamiana*.

2.5 Perfil de expressão gênica do candidato a efetor Phapa-6417246 de *P. pachyrhizi* ao longo do ciclo infeccioso

O perfil de expressão gênica do candidato a efetor Phapa-6417246 de *P. pachyrhizi* foi analisado no genótipo de soja suscetível (BRS184) inoculado com o isolado LPF16.1M de *P. pachyrhizi* durante o ciclo infeccioso. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com três repetições. As plantas de soja foram cultivadas em vasos de 0,5 L e mantidos em câmara climática de crescimento (Fitotron®). Quando as plantas atingiram o estágio V₃, foi realizada a inoculação do isolado da ferrugem por aspersão no primeiro e

segundo trifólio. A suspensão dos esporos foi preparada com 15 mg de esporos do isolado em 30 mL de água destilada e 0,05 % de Tween[®] 20, obtendo uma concentração final de 10^4 esporos mL⁻¹. As folhas foram coletadas nos tempos 0, 6, 12, 24 e 48 horas após inoculação (hai). As plantas foram mantidas na câmara e crescimento até o aparecimento dos sintomas e sinais da infecção por *P. pachyrhizi*.

2.5.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA

As folhas de soja inoculadas foram maceradas com nitrogênio líquido e realizada a extração do RNA total pelo método do Trizol (Invitrogen[®]), de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras foram analisadas quanto à integridade do RNA, em gel de agarose 1 % e a concentração foi estimada pelo espectrofotômetro NanoDrop[™] 1000 (Thermo Scientific[®]). Para eliminar o DNA genômico presente nas amostras, a enzima Desoxirribonuclease (DNase I - Invitrogen[®]) foi utilizada no tratamento do RNA, que, posteriormente foi visualizado em gel de agarose 1 % para confirmar a eficiência do tratamento. O cDNA foi sintetizado utilizando o kit Super Script III First-Strand (Invitrogen[®]), seguindo as instruções do fabricante. A amplificação do cDNA foi realizada para confirmação da síntese das amostras, e o cDNA foi armazenado a - 20°C.

2.5.2 Análise RT-qPCR

Os *primers* para as reações de RT-qPCR foram desenhados utilizando o *software* Primer3Plus[®] com base na sequência do modelo gênico Phapa-6417246 obtida do genoma MT2006 de *P. pachyrhizi* (Tabela 1). A eficiência de amplificação de cada *primer* foi calculada por diluições seriadas de cDNA e calculando a regressão linear obtida para cada gene. O perfil de expressão foi monitorado por PCR quantitativo (qPCR), utilizando o gene endógeno citocromo B (CytB) de *P. pachyrhizi* como gene normalizador (Link et al., 2014) e o tempo 0 hai foi empregado como calibrador. As condições de amplificação foram: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, seguida pela determinação da curva de dissociação (*melting*) para determinar a especificidade das amplificações. As análises foram realizadas no equipamento 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems[®]), utilizando o kit Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen[®]). As amostras

foram analisadas em triplicata. O nível de expressão do gene alvo foi determinado pela quantificação relativa, por meio do *software* REST[®] (Pfaffl et al., 2002).

2.6 Ensaio de transativação

Ensaio preliminar de transativação foi realizado para determinar a capacidade da proteína efetora, do modelo gênico Phapa-6417246, ativar sozinha 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 transformada pelo método do acetato de lítio/polietilenoglicol, com os vetores de interesse (iscas clonadas no vetor pDEST32, que são utilizados no *screening*) e o vetor pDEST22 vazio. O resultado da transformação foi plaqueado em meio de seleção SD (*synthetic dropout*) na ausência de leucina e triptofano (SD-LEU-TRP).

As colônias AH109 transformadas foram multiplicadas em meio líquido e utilizadas no ensaio de transativação do gene repórter HIS3, segundo o manual da Clontech[®], variando-se a concentração 3-AT (3-amino-1,2,4-triazol) no meio. O resultado deste ensaio foi utilizado para determinar a concentração do inibidor a ser utilizado na varredura. Nesse caso houve a transativação em altas concentrações de 3-AT pelo modelo gênico Phapa-6417246, o que impede a utilização do sistema de duplo híbrido para identificação dos parceiros de interação. Então, para este efector foi realizado apenas o ensaio de *pull down* para identificar possíveis parceiros de interação em soja.

2.7 Expressão heteróloga e purificação de proteína efetora

2.7.1 Expressão da proteína candidata a efector Phapa-6417246 em transformantes de ArcticExpress (D3)

As células de *E. coli* DH5α transformadas com os plasmídeos pET28a- 6417246 (plasmídeo sintetizado com modelo gênico Phapa-6417246 pela Biomatik[®]) foram submetidas a extração de DNA plasmidial (Sambrook et al., 1989). Células de ArcticExpress (D3) foram inoculadas em meio seletivo contendo gentamicina (35 µg mL⁻¹) e incubadas a 37 °C, a 180 rpm por 12 horas. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em 1,0 mL de solução de

CaCl₂ (0,1 M) e concentradas para 150 µL. Este volume foi dividido em duas alíquotas de 75 µL e em uma das alíquotas foi adicionado 3 µL de DNA plasmidial.

As células foram incubadas em gelo por 20 minutos, e para a ocorrência do choque térmico, a amostra foi transferida rapidamente para um banho-maria a 42 °C por 45 segundos e logo incubadas em gelo por cinco minutos. Em seguida, foram adicionados 800 µL de meio LB e incubadas a 37 °C por uma hora. As células foram concentradas para 50 µL, plaqueadas em meio LB contendo canamicina (50 µg mL⁻¹) e incubadas a 37 °C. A transformação foi confirmada por meio de PCR de colônia, utilizando *primers* específicos para o vetor pET28a (Tabela 1).

As colônias de ArcticExpress (D3) transformadas com pET28a- 6417246 confirmadas como positivas foram inoculadas em meio LB contendo canamicina (50 µg mL⁻¹) e gentamicina (35 µg mL⁻¹), e uma colônia de ArcticExpress (D3) não transformada foi inoculada em LB contendo gentamicina (35 µg mL⁻¹) em um volume de 100 mL. Essas colônias foram incubadas por 12 a 16 horas na temperatura de 37 °C sob agitação. Em seguida, esses inóculos foram transferidos para meio LB com volume de 1000 mL e incubados a 30 °C. Depois de atingida D.O.₆₀₀ = 0,6, foi adicionado Isopropil-β-Dgalactopiranosídeo (IPTG) na concentração final de 0,4 mM, para indução da expressão de proteína, e o inóculo incubado por 24 horas na temperatura de 12 °C.

Após a indução da expressão das proteínas as células bacterianas foram coletadas por centrifugação a 5000 rpm e ressuspendidas em tampão de ligação (20 mM Na₂HPO₄, 500 mM NaCl, 20 mM Imizadol pH 7,4) para extração das proteínas totais das bactérias. Os extratos proteicos bacterianos totais foram levados para o sonicador por cinco minutos, 30 segundos *on* e *off*, e 40 % de amplitude. Após a sonicação, foram centrifugadas a 12000 rpm, a 4 °C por 20 minutos e então coletados os sobrenadantes (que são as frações solúveis dos extratos bacterianos). O *pellet* (que corresponde a fração insolúvel do extrato bacteriano) foi ressuspendido no tampão ligação. As frações solúveis e insolúveis do extrato bacteriano foram analisadas por SDS-PAGE e *Western Blot* para teste de solubilidade da proteína e confirmação da expressão (Liao et al., 2008).

2.7.2 Solubilização da proteína da fração insolúvel

A proteína do candidato a efector foi expressa na fração insolúvel da estirpe bacteriana e realizado o protocolo de solubilização da proteína. As células bacterianas de Arctic-pET28a-

6417246, após indução da expressão da proteína, foram centrifugadas, ressuspensas em tampão de lise (100 mM Tris-HCl pH 6,9, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 1 mg mL⁻¹ de lisozima) e acondicionadas em gelo por 30 minutos. Em seguida, essa amostra foi levada para o sonicador por cinco minutos, 30 segundos *on* e *off*, e 40 % de amplitude. Após a sonicação as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm, a 4 °C por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 20 mL de tampão de lavagem (100 mM Tris- HCl pH 6,9, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol) para a lavagem do *pellet*, e centrifugado novamente. Esse processo de lavagem foi realizado duas vezes. Por fim, o *pellet* foi ressuspendido no tampão de solubilização (8 M Ureia, 50 mM Tris- HCl pH 6,9, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol). Essa amostra foi mantida sob agitação por 12 a 16 horas a 4 °C. Posteriormente, armazenada a 60 °C por dez minutos e centrifugada a 12000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi coletado e purificado com coluna cromatográfica HISTRAP de 1 mL, utilizando o equipamento de Cromatografia Líquida de Proteína Rápida (FPLC). A qualidade da purificação foi analisada por SDS-PAGE e *Western Blot* (Liao et al., 2008).

Após a purificação, a proteína em análise foi renaturada realizando-se a diluição do eluato em 10 vezes em tampão de renaturação (100 mM Tris pH 6,9, 500 mM NaCl, 33% glicerol) e estocado a – 4 °C por 48 horas.

2.8 Ensaio de *pull-down*

O genótipo de soja suscetível (cultivar BRS184; lesão tipo TAN), e os genótipos resistentes (fontes *Rpp1b*, *Rpp4* e *Rpp5*; lesão tipo RB) foram semeadas em vasos de 0,5 L e mantidas em câmara climatizada (*Fitotron*®) com temperatura controlada (28 °C durante o dia e 25 °C durante a noite), fotoperíodo de 12 h de luz e aproximadamente 50 % de umidade relativa do ar. As plantas em estágio vegetativo V₃ (Fehr & Caviness, 1977) tiveram suas segundas folhas trifoliadas inoculadas com urediniósporos de *P. pachyrhizi* (isolado LPF2016.1M) e coletadas em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas após a inoculação (hai). Foi obtido um *pool* das folhas com todos os tempos após a inoculação para cada genótipo de soja. Os tecidos vegetais foram triturados em nitrogênio líquido e as proteínas totais foram extraídas usando o tampão de extração (Tris 50 mM, pH 7,5, NP 40 1 %, PMSF 2 mM). Os extratos foram centrifugados por três vezes a 16000 x g por dez minutos a 4 °C e o sobrenadante foi armazenado a - 20 °C.

Os ensaios de *pull down* foram realizados com a *bead* Ni-NTA magnética (QUIAGEN®), de acordo com as instruções do manual do fabricante. O ensaio com a proteína candidata a efetor do modelo gênico Phapa-6417246 purificada foi realizado com duas repetições para cada extrato proteico dos genótipos de soja. O ensaio sem a proteína (apenas o tampão de ligação da *bead*) foi realizado como controle negativo. Para cada repetição foi utilizado 25 µL de *bead*.

As proteínas eluídas foram tripsinizadas utilizando o protocolo de digestão em solução do Laboratório de Espectrometria de Massas (LNBio) e identificadas por espectrometria de massas (Shevchenko et al., 2007).

2.9 Técnicas de biotecnologia molecular

Todas as técnicas de Biologia Molecular não descritas foram conduzidas de acordo com métodos já convencionados descritos na literatura (Sambrook et al., 1989).

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização *in silico* do modelo gênico Phapa-6417246

O transcrito de_novo_1576 foi identificado com candidato a efetor de *P. pachyrhizi* (Carvalho et al., 2017). Recentemente foram publicados três genomas de referência de *P. pachyrhizi*, o que possibilitou confirmar a existência da proteína codificada pelo transcrito de_novo_1576 no genoma do fungo e caracterizar o gene quanto à estrutura. Utilizando como critério de seleção 70% de identidade e 50% de cobertura, os modelos gênicos Phapa-6417246 (genoma MT2006), Phapa-3002089 (genoma UFV02) e Phapa-8511288 (genoma K8108) foram identificados como idênticos ao transcrito de_novo_1576, por serem do mesmo tamanho, apresentarem 100 % de identidade e 100 % de cobertura (Tabela 2). Os modelos gênicos adicionais Phapa-6417485 (genoma MT2006) e Phapa-10409174 (genoma K8108) apresentaram 99,3 % de identidade e 100 % de cobertura em relação a proteína codificada pelo transcrito de_novo_1576.

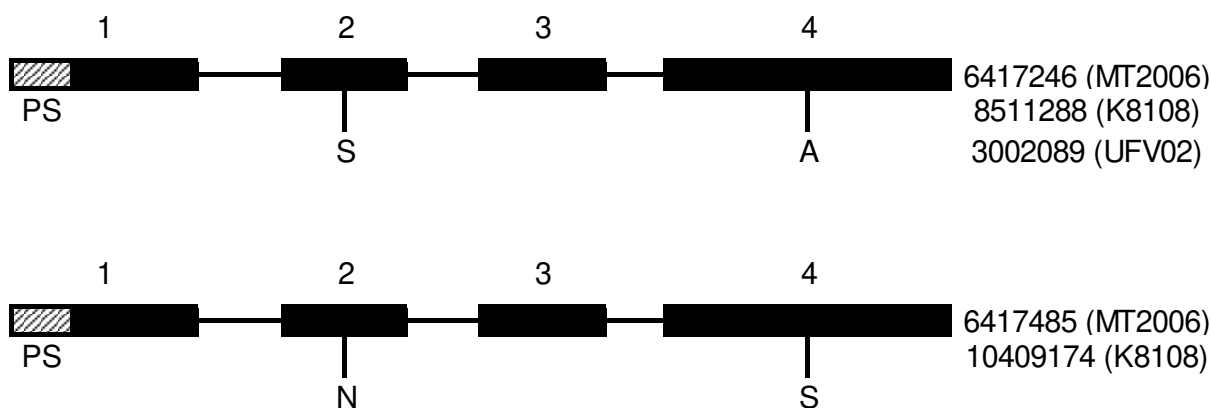


Figura 1 - Esquema da estrutura dos modelos gênicos com maior similaridade ao de_novo_1576 nos genomas de referência de *P. pachyrhizi*, 6417246 e 6417485 (genoma MT2006), 3002089 (genoma UFV02), 8511288 e 10409174 (genoma K8108). PS: peptídeo de sinal. Os números 1, 2, 3 e 4 representam os éxons, a linha preta os íntrons. S: serina. A: alanina. N: asparagina.

Tabela 2 - Candidatos a efetores de *P. pachyrhizi* com maior identidade em relação ao de_novo_1576 nos três genomas de referência disponíveis nos bancos de dados do *Joint Genome Institute* (JGI).

Genoma	Código da proteína com maior identidade	Tamanho da proteína (aa)	Identidade (%)	Cobertura (%)	Domínio	Peptídeo de sinal (aa)	Éxon/Intro n	Número de cisteína	Motivo	Cobertura do RNA
MT2006	6417246	307	100	100	TRI5 (PF06330)	1 - 25	4/3	13	Ausência	Sim
	6417485	307	99,3	100	TRI5 (PF06330)	1 - 25	4/3	13	Ausência	Sim
UFV02	3002089	307	100	100	TRI5 (PF06330)	1 - 25	4/3	13	Ausência	Sim
K8108	8511288	307	100	100	TRI5 (PF06330)	1 - 25	4/3	13	Ausência	Sim
	10409174	307	99,3	100	TRI5 (PF06330)	1 - 25	4/3	13	Ausência	-

Os modelos gênicos similares a *de_novo_1576* tem estrutura semelhante, exceto pela codificação de dois aminoácidos distintos nas sequências de proteína de Phapa- 6417485 e Phapa-10409174 (Figura 1). As proteínas de Phapa-6417246, Phapa-3002089 e Phapa-8511288 apresentam serina (S) na posição 15 e alanina (A) na posição 268, enquanto as proteínas de Phapa- 6417485 e Phapa- 10409174 possuem asparagina (N) na posição 15 e serina (S) na posição 268 da sequência de proteína, sendo esses últimos possivelmente variante alélicos.

Os modelos gênicos Phapa-6417246, Phapa-3002089 e Phapa-8511288 apresentam uma sequência com 1214 pb, contendo quatro éxons e três íntrons. A CDS (sequência de codificação) possui 924 pb e codifica uma proteína com 307 aminoácidos, com 12 resíduos de cisteína (4 %) e massa predita de aproximadamente 30 kDa. Apresentam também peptídeo sinal de 25 resíduos de aminoácidos, predito pelo SignalP, e domínio conservado TRI5 (PF06330) (Tabela 2).

Utilizando os programas NLStradamus (Nguyen Ba et al., 2009), predictNLS (Cokol et al., 2000), nucPred (Brameier et al., 2007) e cNLS mapper (Kosugi et al., 2008, 2009), não foi identificado nenhum NLS na sequência do modelo gênico Phapa- 6417246. Na busca por similaridade com domínio NBS (PF00931) não foi observado a presença de sítio de ligação ao nucleotídeo.

3.2 Supressão de respostas de defesa pelo efector Phapa-6417246

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a deposição de calose são respostas de defesa basal da planta associadas à PTI. A bactéria EtHAn, quando infiltrada no tecido apoplástico de *N. benthamiana*, promove essas respostas de defesa. Contudo, efetores fúngicos podem desencadear a supressão das respostas de defesa.

Os resultados de pigmentação de ROS por DAB e de deposição de calose por azul de anilina indicaram que no controle negativo (solução tampão de 10 mM MgCl₂) não houve indução de resposta de defesa pois não houve bactérias (Figura 2A, 2B). No controle positivo (bactéria com vetor vazio), devido ao reconhecimento da bactéria pela planta, foi possível observar a pigmentação de ROS por DAB e formação de calose, o que indica que houve resposta de defesa associada à PTI.

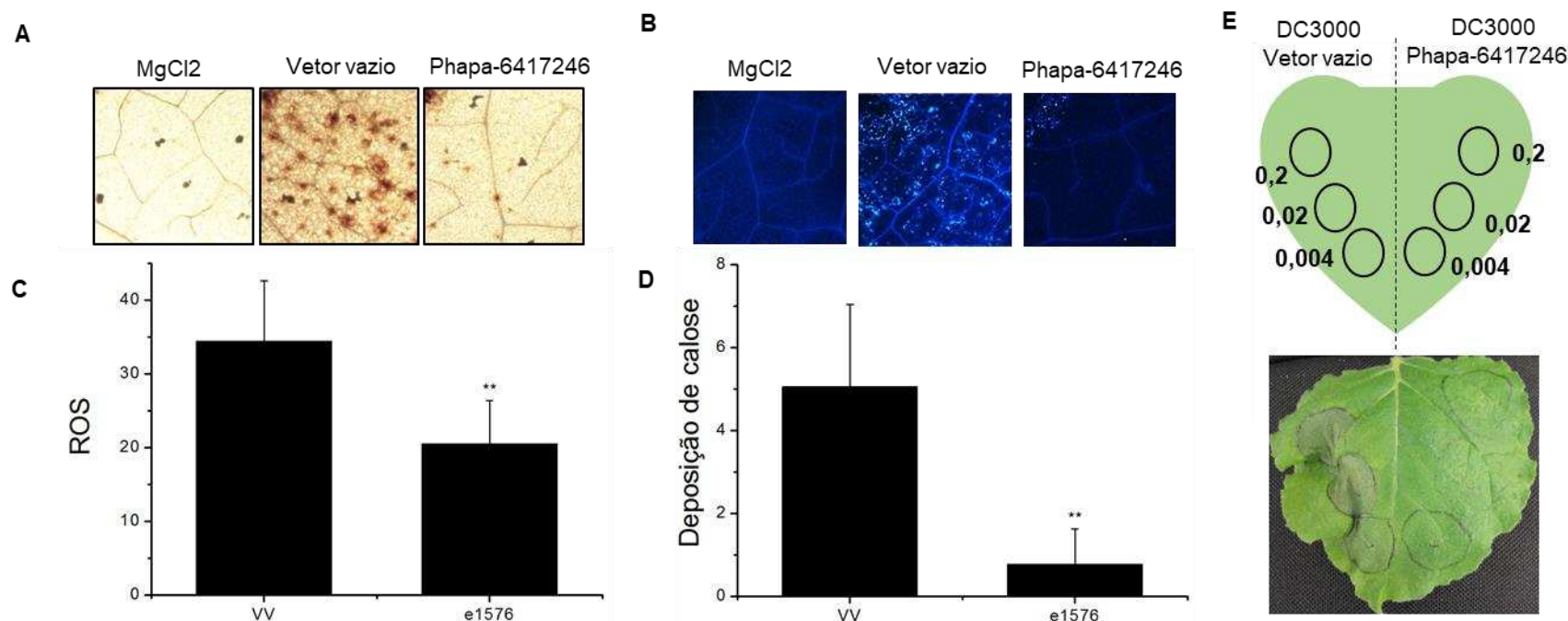


Figura 2 – Supressão de respostas de defesa pelo candidato a efetor Phapa-6417246. Ensaio de supressão de PTI: Folhas de *N. benthamiana* infiltradas com o controle negativo (MgCl₂), controle positivo (*P. fluorescens* com vetor vazio) e o tratamento *P. fluorescens* contendo a proteína candidata a efetora Phapa-6417246. **A.** Pigmentadas com corante DAB, para observação de espécies reativas de oxigênio. **B.** Pigmentadas com azul de anilina para observação de estruturas de calose. **C.** Gráfico da coloração por DAB para pigmentação de ROS para os tratamentos *P. fluorescens* com vetor vazio (VV) e *P. fluorescens* com efetor Phapa- 6417246 (e1576). **: significativo a 0,01 de significância pelo teste *t*. **D.** Gráfico da coloração por azul de anilina para deposição de calose para os tratamentos *P. fluorescens* com vetor vazio (VV) e *P. fluorescens* com efetor Phapa- 6417246 (e1576). **: significativo a 0,01 de significância pelo teste *t*. **E.** Ensaio de supressão de ETI por meio do sistema de secreção do tipo III de *Pseudomonas syringae* (Pst) DC3000 em folhas de *N. benthamiana*. Pst DC3000 transformado o vetor vazio [DC3000 Vetor vazio (ev)] foi infiltrado no lado esquerdo das folhas de tabaco, onde uma resposta de hipersensibilidade pôde ser detectada. Ao lado direito das folhas, Pst DC3000 transformado com o vetor contendo o candidato a efetor Phapa-6417246 foi infiltrado usando a mesma concentração de suspensão bacteriana.

O tratamento de EtHAn contendo a proteína do gene Phapa- 6417246 clonada apresentou mínima pigmentação de ROS e de estruturas de calose. Observa-se que a coloração das imagens do tratamento com a proteína candidata é similar as imagens do controle negativo. Verificou-se por teste *t* que houve diferença ($p < 0,01$) da coloração entre o tratamento da bactéria com o vetor vazio e do tratamento com vetor clonado com Phapa-6417246 nos ensaios com pigmentação de ROS por DAB e de deposição de calose por azul de anilina, demonstrando que a proteína candidata a efetor de *P. pachyrhizi* foi capaz de suprimir a PTI, o que indica uma atividade efetora (Figura 2C, 2 D).

Por meio do sistema de secreção do tipo III foi possível infiltrar o candidato a efetor Phapa-6417246 via Pst DC3000 em folhas de *N. benthamiana* para testar sua capacidade de suprimir a ETI. Foi possível observar que não houve indução de resposta de hipersensibilidade (HR) quando o efetor estava presente (Figura 2E). No controle negativo (Pst DC3000 carregando o vetor vazio pEDV6), foi observada a indução de HR por meio de manchas foliares na região infiltrada. Desse modo, é demonstrado que o candidato a efetor Phapa-6417246 também é capaz de suprimir a ETI desencadeada por Pst DC3000. A fim de confirmar a supressão de ETI, as bactérias foram capturadas da região infiltrada e colocadas para crescer em meio de cultivo. O que permitiu validar que as bactérias estavam ativas pois apresentaram crescimento satisfatório.

3.3. Perfil de expressão do Phapa-6417246 ao longo do ciclo infeccioso de *P. pachyrhizi*

A expressão do gene Phapa-6417246 foi analisada por RT-qPCR no genótipo suscetível, BRS 184, infectado por *P. pachyrhizi*. Para confirmar a ocorrência da infecção foi verificada a presença dos sintomas 14 dias após a inoculação e foi observado lesões do tipo TAN (interação compatível) (Figura 3). Observou-se que o Phapa-6417246 teve expressão induzida nos tempos 6, 12, 24 e 48 hai, com nível de expressão elevado no tempo de 48 hai, comparado as plantas do tempo 0 hai (Tabela 3).

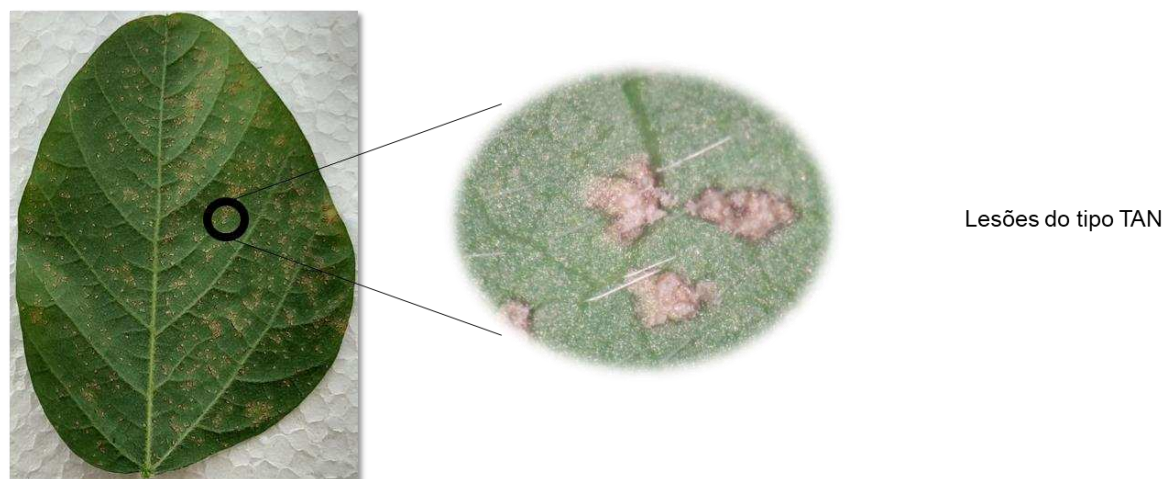


Figura 3 – Lesão do tipo TAN observada 14 dias após a inoculação do isolado LPF2016.1M de *P. pachyrhizi* no genótipo suscetível de soja (BRS 184). Foto retirada por Castanho, F.M. (2019).

Tabela 3 – Níveis de expressão do candidato a efector Phapa-6417246 nos tempos (6, 12, 24, 48 e 72 horas após inoculação) em genótipo suscetível de soja. O gene endógeno CytB foi utilizado como normalizador e como calibrador foi utilizado o tempo 0 hai.

Gene	Tempos (horas após a inoculação)			
	6	12	24	48
Phapa-6417246	3,54**	17,15**	10,46**	109,87**

*:significativo a 0,01 de significância pelo teste de Randomização de Realocação Fixa de Pares Inteligentes[®].

3.4 Identificação de proteínas de soja parceiras de interação do efector candidato Phapa-6417246

O transformante AH109 com a construção BD-6417246 foi capaz de crescer em meio SD-LEU-HIS com 100 mM 3-AT (Figura 4), o que tornou inviável realizar a varredura de proteínas de soja pelo sistema duplo híbrido de levedura. Nesse caso, foi realizado o ensaio de interação *in vitro* por *pull down*.

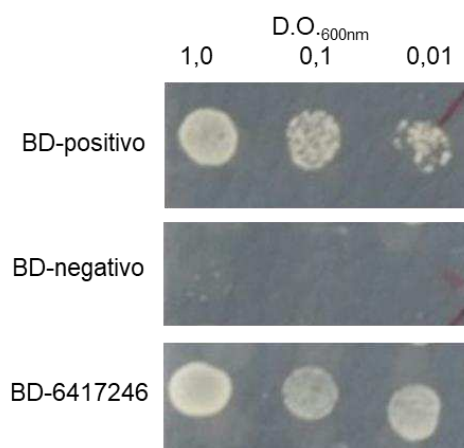


Figura 4 – Ensaio de transativação em levedura AH109: leveduras transformadas com as construções BD-positivo (proteína conhecida), BD-vetor_vazio+AD_vetor_vazio, BD-6417246 inoculadas em meio SD-LEU-HIS com 100 Mm 3-AT.

Para realização do ensaio de *pull down*, inicialmente realizou-se a expressão heteróloga e purificação da proteína. O modelo gênico Phapa-6417246 clonado no vetor pET28a foi transformado em ArcticExpress (D3). Após confirmação dessa transformação por PCR, foi realizado teste de solubilidade da proteína, em que a proteína foi altamente expressa na fração insolúvel. A fração insolúvel do extrato proteico foi solubilizada com 8 M de Ureia e posteriormente purificada com coluna cromatográfica HISTRAP de 1 mL utilizando o equipamento FPLC. A qualidade da purificação foi verificada por SDS PAGE e *Western blot* (Figura 5).

Para o ensaio de interação proteína-proteína *in vitro*, após a renaturação da proteína, foi realizado o *pull down*. O ensaio foi delineado com quatro tratamentos e duas repetições. Os tratamentos foram: (A) interação entre Phapa-6417246 e extrato proteico do genótipo suscetível (BRS 184) de soja; (B) interação entre Phapa-6417246 e extrato proteico do genótipo resistente (*Rpp1*) de soja; (C) interação entre Phapa- 6417246 e extrato proteico do genótipo resistente (*Rpp4*) de soja; (D) interação entre Phapa-6417246 e extrato proteico do genótipo resistente (*Rpp5*) de soja; (E) interação entre tampão de ligação e extrato proteico do genótipo suscetível (BRS 184) de soja; (F) interação entre tampão de ligação e extrato proteico do genótipo resistente (*Rpp1*) de soja; (G) interação entre tampão de ligação e extrato proteico do genótipo resistente (*Rpp4*) de soja; (H) interação entre tampão de ligação e extrato proteico do genótipo resistente (*Rpp5*) de soja.

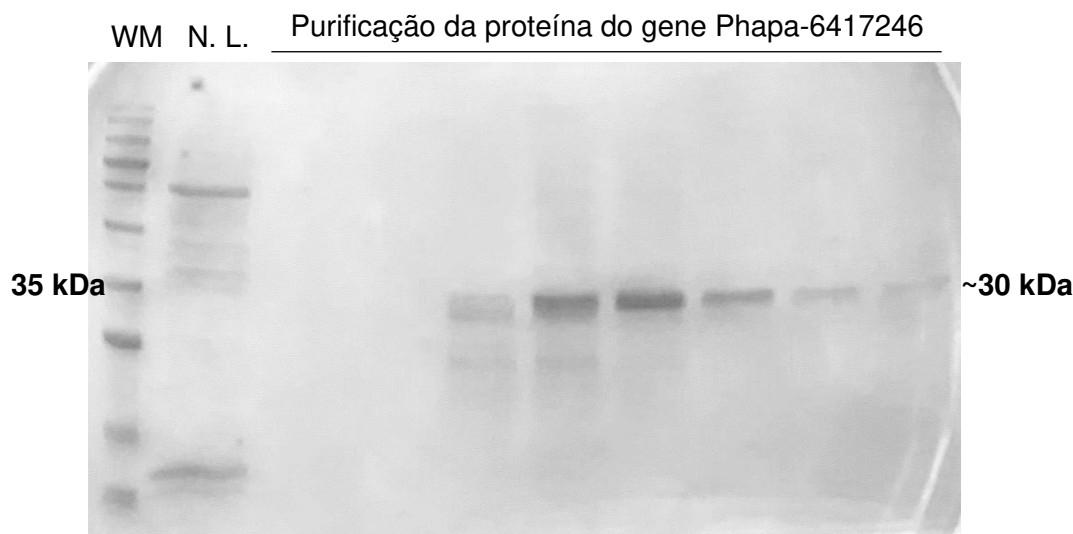


Figura 5 – Purificação do candidato a efetor Phapa-6417246. Gel de poliacrilamida 12,5% corado com *coomassie blue* da purificação da fração insolúvel de ArcticExpress (D3) + 6417246-pET28a. N. L. = Fração não ligada da purificação.

As proteínas recuperadas da *bead* após a interação *in vitro* foram digeridas com tripsina e foram enviadas para leitura em espectrômetro de massas. O tratamento A foi analisado em SDS PAGE, e foi possível observar duas bandas no gel (Figura 6). Possivelmente houve interação da proteína Phapa-6417246 com uma proteína do extrato proteico de soja, pois foi observado duas bandas na canaleta, uma banda de 30 kDa, que corresponde a massa da proteína Phapa-6417246 e uma banda de aproximadamente 85 kDa, correspondendo alguma proteína de soja.

Outra forma de identificar interação proteína-proteína é por meio da utilização de programas que realizam a predição dessas possíveis interações. Para tanto, foi empregado o método de predição, denominado InterSPPI (Yang et al., 2019), que baseia-se nas interações domínio-domínio, domínio-motivo conhecidas da literatura. Esse programa prediz a interação do efetor com proteínas de *A. thaliana*, no caso do Phapa-6417246, foi predita interação com 160 proteínas de *Arabidopsis*.

Utilizando o banco de dados do *Phytozome Biomart* (<https://phytozome.jgi.doe.gov/biomart/martview/29f718472f73da86e9c97fed38d817a6>) foi identificado 255 genes de soja ortólogos dos genes encontrados de *Arabidopsis*. Desses 255 genes foi observado a ocorrência de 111 diferentes domínios conservados PFAM (Tabela 4). Foi observado que 42 genes preditos codificam fatores de transcrição, que pode ser observado na Tabela 4 do número 85 ao 98.

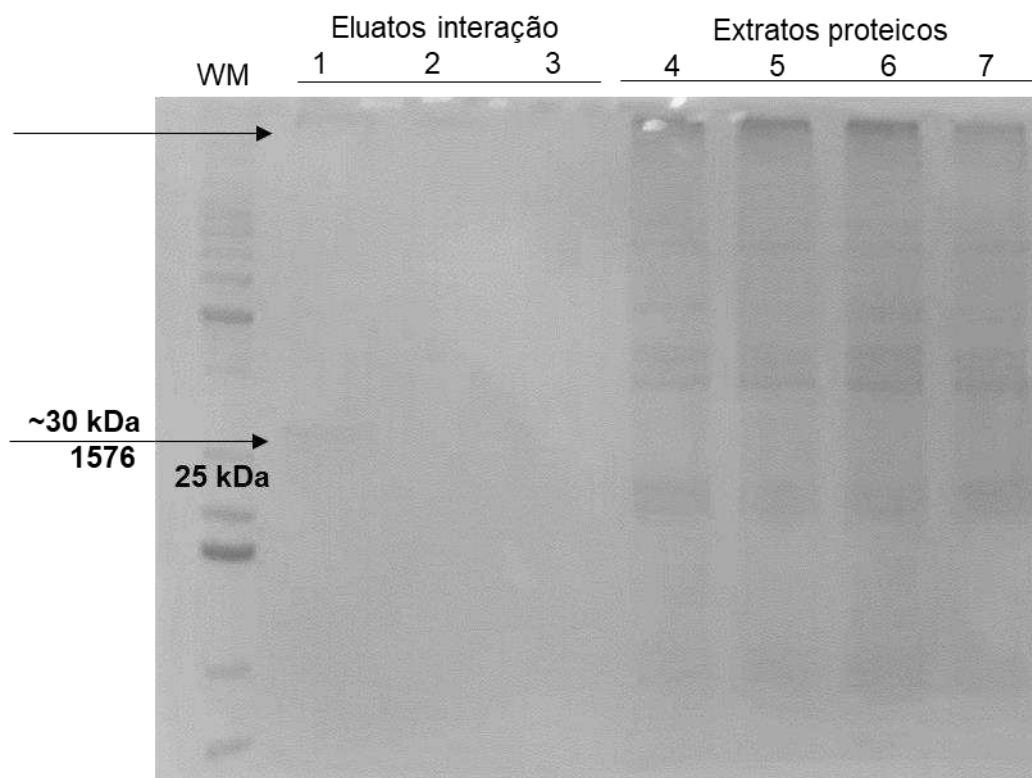


Figura 6 – Ensaio interação proteína-proteína *in vitro*. Gel de poliacrilamida 12,5% corado com *coomassie blue*. Eluatos interação: 1. Eluato da interação Phapa-6417246 e extrato proteico do genótipo BRS184, 2 e 3. Eluatos da interação tampão de ligação (sem adição de proteína, controle negativo) e extrato proteico do genótipo BRS184 e genótipo com resistência *Rpp1*. Extratos proteicos de soja: 4. BRS184. 5. *Rpp1*. 6. *Rpp4*. 7. *Rpp5*. Setas indicam posição das bandas na canaleta Eluato interação 1.

Tabela 4 – Lista com informações sobre os genes preditos em soja como possíveis alvos de interação do candidato a efector Phapa-6417246.

ID	Descrição	Gene	PFAM		
1	Prefoldin Beta Subunit (Pfdb, PFDN6)	Glyma.08G046600 Glyma.12G006600	PF01920		
2	COP9 Signalosome Complex Subunit 5 [EC:3.4.-.-] (COPS5, CSN5)	Glyma.04G075000 Glyma.06G076000	PF01398		
3	Speckle-Type POZ Protein (SPOP)	Glyma.11G222900 Glyma.18G034700	PF00651		
4	Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2	Glyma.01G188900 Glyma.05G091100 Glyma.11G053300 Glyma.17G169700	PF00179		
5	Nucleosome Assembly Protein 1-Like 1 (NAP1L1, NRP)	Glyma.09G064400 Glyma.15G170700	PF00956		
6	SWI/SNF-Related Matrix-Associated Actin-Dependent Regulator Of Chromatin Subfamily A Member 2/4 [EC:3.6.4.-] (SMARCA2_4)	Glyma.07G069400 Glyma.09G257900 Glyma.16G035100 Glyma.18G234700	PF04851	PF08880	PF00271
7	U11/U12 Small Nuclear Ribonucleoprotein 35 Kda Protein (SNRNP35)	Glyma.08G366200 Glyma.18G296100	PF00076		
8	Peroxin-5 (PEX5, PXR1)	Glyma.04G116700 Glyma.06G320100	PF07719	PF13414	PF00515
9	RPM1-Interacting Protein 4 (RIN4)	Glyma.03G084000 Glyma.08G349500 Glyma.16G090700 Glyma.18G166800	PF05627		
10	Jasmonate ZIM Domain-Containing Protein (JAZ)	Glyma.09G174200	PF09425	PF06200	
11	Nuclear Pore Complex Protein Nup53 (NUP35, NUP53)	Glyma.13G355300 Glyma.15G018900	PF05172		
12	Brassinosteroid Resistant 1/2 (BZR1_2)	Glyma.04G033800 Glyma.06G034000 Glyma.14G076900 Glyma.17G248900	PF05687		
13	Guanine Nucleotide-Binding Protein Subunit Beta-2-Like 1 Protein	Glyma.05G243800 Glyma.08G051600	PF00400		
14	Exocyst Complex Component 2 (EXOC2, SEC5)	Glyma.10G217200 Glyma.20G174900	PF08700		

Continua...

Continuação...

ID	Descrição	Gene	PFAM	
15	Autophagy-Related Protein 9 (ATG9)	Glyma.03G162100	PF04109	
		Glyma.10G035800		
		Glyma.13G122200		
		Glyma.19G163500		
16	Uncharacterized Conserved Protein	Glyma.09G132800	PF05903	
		Glyma.16G179500		
17	Predicted Muts-Related Protein Involved In Mismatch Repair	Glyma.11G175400	PF01713	PF08590
		Glyma.18G063000		
18	Uncharacterized Conserved Protein	Glyma.08G290400	PF09793	
		Glyma.18G133800		
19	Kinesin Motor Domain (Kinesin) // Zinc Finger, C3HC4 Type (RING Finger) (Zf-C3HC4_3)	Glyma.04G009100	PF13920	PF00225
		Glyma.06G009000		
		Glyma.11G112700		
		Glyma.12G038600		
20	Gamma-Thionin Family (Gamma-Thionin)	Glyma.08G268000	PF00304	
		Glyma.16G100400		
21	NPH3 Family (NPH3)	Glyma.02G061400	PF03000	
		Glyma.16G143800		
22	ENT Domain (ENT) // Agenet Domain (Agenet)	Glyma.04G068800	PF03735	PF05641
		Glyma.05G010000		
		Glyma.17G118000		
23	Remorin, C-Terminal Region (Remorin_C)	Glyma.01G186300	PF03763	
		Glyma.05G095500		
		Glyma.11G055600		
		Glyma.17G174300		
24	Zinc-Finger Of The FCS-Type, C2-C2 (Zf-FLZ)	Glyma.02G146100	PF04570	
		Glyma.03G155800		
		Glyma.10G027900		
		Glyma.19G158100		
24	RNA Recognition Motif	Glyma.02G019000	PF14259	
26	Inhibitor Of Apoptosis	Glyma.09G048200	PF13920	
		Glyma.15G155500		
		Glyma.07G223100		
		Glyma.09G019900		
		Glyma.15G126400		
27	Glutaredoxin	Glyma.20G022400	PF00462	
		Glyma.04G141800		
28	E3 Ubiquitin-Protein Ligase Sinat3-Related	Glyma.04G235700	PF03145	
		Glyma.06G129000		
29	Small Ubiquitin-Related Modifier	Glyma.08G320500	PF11976	
		Glyma.18G165200		

Continua...

Continuação...

ID	Descrição	Gene	PFAM			
30	Complement Component 1	Glyma.07G137100 Glyma.18G187800	PF02330			
31	Carbonic Anhydrase 2, Chloroplastic-Related	Glyma.05G007100 Glyma.19G007700	PF00484			
32	23.5 Kda Heat Shock Protein, Mitochondrial-Related	Glyma.12G013100	PF00011			
33	Plastidial Pyruvate Kinase 1, Chloroplastic	Glyma.10G178900 Glyma.20G211200	PF02887	PF00224		
34	Bell-Like Homeodomain Protein 1-Related	Glyma.02G196500 Glyma.03G202300 Glyma.10G081700 Glyma.19G199500	PF05920	PF07526		
35	Homeobox Protein Knotted-1-Like 1	Glyma.04G049500 Glyma.14G091200 Glyma.U039200	PF03789	PF05920	PF03790	PF03791
36	Testis-Specific Y-Encoded Protein	Glyma.17G053800	PF00956			
37	Nucleosome Assembly Protein 1,4	Glyma.13G105600	PF00956			
38	Mads Box Protein	Glyma.09G266200 Glyma.18G224500	PF00319	PF01486		
39	Mads-Box Protein Soc1	Glyma.07G080900	PF01486	PF00319		
40	Exocyst Complex Protein Exo70	Glyma.04G162400 Glyma.06G203900	PF03081			
41	Brahma Associated Protein 155 Kda	Glyma.04G247200 Glyma.06G115600 Glyma.13G031300 Glyma.14G153000	PF00249	PF04433	PF16495	
42	Conserved Oligomeric Golgi Complex Component 2	Glyma.05G047300 Glyma.17G129100	PF12022	PF06148		
43	Splicing Factor, Suppressor Of White-Apricot Homolog	Glyma.02G293200 Glyma.14G021200	PF09750	PF01805		
44	Wilms' Tumor 1-Associating Protein	Glyma.04G186400 Glyma.05G040200 Glyma.06G179400 Glyma.17G086600	PF17098			

Continua...

Continuação...

ID	Descrição	Gene	PFAM		
45	Pra1 Family Protein C-Related	Glyma.07G011000	PF03208		
		Glyma.08G194200			
		Glyma.13G351200			
		Glyma.15G023400			
46	Genomic Dna, Chromosome 3, Tac Clone:K24a2-Related	Glyma.05G007800	PF13374	PF13424	
		Glyma.19G008200			
47	Conserved Oligomeric Golgi Complex Component 8	Glyma.02G043400	PF04124		
		Glyma.16G120600			
48	Ntkl-Binding Protein 1	Glyma.03G192100	PF04949		
		Glyma.19G192600			
50	F16f4.11 Protein	Glyma.10G225300	PF13837		
		Glyma.16G167700			
		Glyma.20G166500			
51	Protein Oberon 1-Related	Glyma.02G305700	PF07227	PF16312	
		Glyma.13G025900			
		Glyma.14G007300			
		Glyma.20G059100			
52	Copper Transport Protein Atox1-Related	Glyma.07G252500	PF00403		
		Glyma.17G021900			
53	Protein Topless-Related	Glyma.07G028000	PF00400		
		Glyma.08G214600			
		Glyma.13G367300			
		Glyma.15G006100			
54	F6a14.12 Protein-Related	Glyma.05G241900	PF13639		
		Glyma.07G097700			
		Glyma.08G049400			
		Glyma.09G180300			
55	E3 Ubiquitin-Protein Ligase Bre1-Like 1	Glyma.01G074000	PF13920		
		Glyma.11G175700			
56	U-Box Domain-Containing Protein 14	Glyma.10G208200	PF04564	PF00514	
		Glyma.20G182600			
57	Armadillo/Beta-Catenin-Like Repeats-Containing Protein-Related	Glyma.09G039600	PF16186	PF01749	PF00514
		Glyma.15G144800			
		Glyma.17G031000			
58	Importin Subunit Alpha-2	Glyma.10G148800	PF16186	PF01749	PF00514
		Glyma.20G239200			
59	Cw-Type Zinc-Finger Protein	Glyma.07G249600	PF07496		
		Glyma.09G046300			
		Glyma.15G154200			
		Glyma.17G024800			

Continua...

Continuação...

ID	Descrição	Gene	PFAM		
60	Mitogen-Activated Protein Kinase 3	Glyma.12G073000 Glyma.U021800	PF06293		
61	Homeobox-Leucine Zipper Protein Athb-14-Related	Glyma.05G166400 Glyma.08G124400 Glyma.09G023600	PF00046	PF08670	PF01852
62	Microtubule-Associated Protein 70-5	Glyma.07G267400 Glyma.09G013100 Glyma.15G118000 Glyma.17G006600	PF07058		
63	At Hook Motif Dna-Binding Family Protein	Glyma.01G219600 Glyma.05G207300 Glyma.08G014000 Glyma.11G023900	PF03479		
64	Della Protein Gai-Related	Glyma.05G140400 Glyma.08G095800	PF12041	PF03514	
65	Auxin-Responsive Protein Iaa10-Related	Glyma.03G167400 Glyma.10G040400 Glyma.13G127000 Glyma.19G168500	PF02309		
66	Plastid-Lipid-Associated Protein 3, Chloroplastic-Related	Glyma.09G008100 Glyma.15G112500	PF04755		
67	Zinc-Finger Homeodomain Protein 3-Related	Glyma.07G271900 Glyma.17G002200	PF04770		
68	F18k10.6 Protein-Related	Glyma.10G197500 Glyma.20G192500	PF02365		
69	F11o4.3-Related	Glyma.02G222300 Glyma.04G226700 Glyma.06G138100 Glyma.14G189300	PF02365		
70	C1 Domain-Containing Protein-Related	Glyma.03G145300 Glyma.19G148300	PF03107	PF07649	
71	Protein Tify 8	Glyma.04G071400 Glyma.06G072700 Glyma.17G205200	PF06200		
72	Emsy N Terminus And Plant Tudor-Like Domain-Containing Protein	Glyma.02G178800 Glyma.09G112500	PF03735		
73	Protein Accumulation And Replication Of Chloroplasts 6, Chloroplastic	Glyma.14G216700 Glyma.17G255300	PF13355		

Continua...

Continuação...

ID	Descrição	Gene	PFAM			
74	Angiotensin-Converting Enzyme 2	Glyma.03G129900 Glyma.19G132200	PF09713			
75	Phosphoribosylformimino-5-Aminoimidazole Carboxamide Ribotide Isomerase	Glyma.02G054800	PF00977			
76	Nicotinate Phosphoribosyltransferase	Glyma.05G094000	PF04095			
77	5'-Methylthioadenosine Nucleosidase (MTN)	Glyma.04G005900 Glyma.06G005600	PF01048			
78	Large Subunit Ribosomal Protein L4e (RP-L4e, RPL4)	Glyma.10G048600 Glyma.13G136400 Glyma.19G178100	PF14374	PF00573		
79	26S Proteasome Regulatory Subunit T6 (PSMC5, RPT6)	Glyma.07G002200 Glyma.08G224500	PF07724			
80	S-Phase Kinase-Associated Protein 1 (SKP1, CBF3D)	Glyma.01G163900 Glyma.02G045700 Glyma.11G079600 Glyma.16G123700	PF03931	PF01466		
81	Anaphase-Promoting Complex Subunit 8 (APC8, CDC23)	Glyma.01G216500 Glyma.11G026400 Glyma.12G016100	PF13414 PF13176	PF07719 PF13414	PF00515	PF04049
82	Guanine Nucleotide-Binding Protein G(I)/G(S)/G(T) Subunit Beta-1 (GNB1)	Glyma.04G013100 Glyma.11G118500 Glyma.12G043900	PF00400			
83	Copper Chaperone For Superoxide Dismutase (CCS)	Glyma.05G055000	PF00403	PF00080		
84	Clathrin Heavy Chain (CLTC)	Glyma.02G258200 Glyma.11G231100 Glyma.14G058300 Glyma.18G026000	PF09268	PF13838	PF01394	PF00637
85	Transcription Factor MYC2 (MYC2)	Glyma.01G096600 Glyma.08G271900	PF00010	PF14215		
86	Transcription Factor GT-2 And Related Proteins, Contains Trihelix DNA-Binding/SANT Domain	Glyma.04G135400 Glyma.11G156700 Glyma.13G195800 Glyma.15G234100	PF13837			
87	TCP Family Transcription Factor (TCP)	Glyma.02G105900 Glyma.05G027400 Glyma.12G168300 Glyma.16G004300 Glyma.17G099100	PF03634			

Continua...

Continuação...

ID	Descrição	Gene	PFAM			
88	GATA Transcription Factor 24-Related	Glyma.08G221800	PF06200	PF00320	PF06203	
89	Transcription Factor Myc3-Related	Glyma.01G018400 Glyma.09G204500	PF00010	PF14215		
90	Homeobox Protein Transcription Factors	Glyma.01G028300	PF03789	PF05920	PF03790	PF03791
91	Homeobox Protein Transcription Factors	Glyma.02G036900 Glyma.08G284300 Glyma.18G141200	PF03789	PF05920	PF03790	PF03791
92	Transcription Factor Bee 3	Glyma.05G234500 Glyma.07G092700 Glyma.08G042000 Glyma.09G183500 Glyma.17G223100	PF00010			
93	Transcription Factor Une12-Related	Glyma.03G158500 Glyma.10G031600 Glyma.19G160900	PF00010			
94	Transcription Factor Tcp9	Glyma.03G018800 Glyma.07G080300 Glyma.10G240200 Glyma.20G154400	PF03634			
95	Transcription Factor Tcp14	Glyma.04G170600 Glyma.06G193000	PF03634			
96	Transcription Factor Tcp10-Related	Glyma.06G232300 Glyma.12G158900 Glyma.16G053900 Glyma.19G095300	PF03634			
97	Transcription Factor Tcp13	Glyma.08G247300 Glyma.18G268700 Glyma.19G030900	PF03634			
98	Myb Family Transcription Factor Apl	Glyma.08G163500 Glyma.15G215000 Glyma.15G263700	PF00249	PF14379		

4 DISCUSSÃO

O modelo gênico Phapa-6417246 codifica uma proteína secretada por *P. pachyrhizi* de tamanho pequeno, mais de 3 % de cisteína em sua estrutura, com peptídeo de sinal e função desconhecida, esta proteína é possivelmente um efetor de *P. pachyrhizi* já que essas características são consideradas comuns a outros efetores já conhecidos (Ellis et al., 2009; Petre et al., 2015). Além disso, por análise de agrupamento entre diferentes espécies de fungos causadores de ferrugem, disponibilizada no banco de dados do JGI, foi verificado que os modelos gênicos Phapa-6417246, Phapa-3002089 e Phapa-8511288 agrupam-se apenas entre si, sugerindo que esse modelo gênico pode ser específico a *P. pachyrhizi*.

O domínio TRI5, identificado na proteína do modelo gênico Phapa-6417246, é característico da enzima tricodieno sintase, a responsável por catalisar a primeira etapa das vias do tricoteceno das espécies de *Fusarium* e *Trichothecium* (Rynkiewicz et al., 2001; Trapp et al., 1998). Pressupõe-se que tricoteceno esteja envolvido na patogenicidade do fungo em plantas, porém ainda é desconhecida sua função na infecção (Desjardins et al., 1993; Kimura et al., 2007). Foram identificados 11 candidatos a efetores fitotóxicos de *Fusarium virguliforme*, que apresentam os domínios conservados que codificam a enzima tricodiene sintetase (Chang et al., 2016). A presença do domínio TRI5 no candidato a efetor Phapa-6417246 pode estar relacionado com a patogenicidade de *P. pachyrhizi*.

Assim como realizado para o efetor Phapa-6417246, diversos outros candidatos a efetores de *P. pachyrhizi* vêm sendo validados em sistemas transientes. Dois candidatos a efetores de *P. pachyrhizi* (CSEP-07 e CSEP-09) foram capazes de aumentar a infecção de *P. infestans* em folhas de tabaco, sugerindo um papel na virulência do fungo da ferrugem asiática da soja (Kunjeti et al., 2016). Com o objetivo de validar candidatos a efetores de *P. pachyrhizi* (PpECs) em larga escala, um estudo demonstrou que 17 PpECs foram capazes de suprimir PTI (Qi et al., 2018).

Outros três candidatos a efetores de *P. pachyrhizi* apresentaram capacidade de supressão a respostas de defesa mediadas por ETI utilizando o sistema de expressão transiente em folhas de tabaco (Carvalho et al., 2017). O efetor PpEC23 de *P. pachyrhizi* suprimiu a resposta de defesa mediada por ETI, quando expresso em folhas de tabaco e de soja, e a resposta mediada por PTI (Qi et al., 2019), assim como o efetor Phapa-6417246.

O efetor Phapa-6417246 teve sua expressão gênica induzida na presença do hospedeiro numa interação compatível. Outros 22 candidatos a efetores de *P. pachyrhizi* tiveram seu perfil de expressão gênica analisados durante o ciclo infeccioso em genótipo suscetível de soja (BRS 231), e foi observado que, em geral, os transcritos das famílias 1 e 3 foram induzidos nos tempos iniciais de infecção (6, 12 e 24 hai) (Carvalho et al., 2017). Nas primeiras horas de infecção ocorre a germinação dos esporos e em 12 hai é comumente observado que grande parte dos apressórios estão formados. Em 24 hai é observado a penetração e desenvolvimento das hifas de infecção (Schneider et al., 2011). Ou seja, nessas horas iniciais da infecção os efetores podem atuar na supressão da resposta de defesa da planta mediadas por PTI e ETI.

Um estudo sobre perfil de expressão gênica de candidatos a efetores da ferrugem da soja demonstrou que os efetores CSEP-06, CSEP-08 e CSEP-09 apresentaram altos níveis de expressão relativa apenas nas primeiras 24 hai, enquanto o CSEP-03 e o CSEP-07 mantiveram níveis de expressão indetectáveis no início da infecção em folhas de soja, porém foram induzidos após o tempo de 72 hai (Kunjeti et al., 2016). Já o efetor PpEC23 de *P. pachyrhizi* foi induzido durante a formação do apressório com alto nível de expressão, e indução de expressão continuada nos tempos 72, 120, 168 e 336 hai (Qi et al., 2019).

A expressão de seis transcritos de *P. pachyrhizi*, que possuem papel importante na patogenicidade do fungo, foram analisadas por RT-qPCR nos genótipos suscetível (BRS 231) e resistente (PI561356) inoculados com *P. pachyrhizi*, e apresentaram indução em diferentes tempos ao longo do ciclo infeccioso (Rincão et al., 2018). A diversidade observada na expressão gênica de efetores durante o processo de infecção é justificada pelas diferentes funções que os efetores possuem, tais como induzir a liberação de nutrientes para o patógeno e causar alterações nas células dos tecidos infectados (Qi et al., 2019).

Para identificar possíveis proteínas de soja que sejam alvo do efetor Phapa-6417246 foi realizado ensaio de *pull down*, porém os resultados da análise de proteômica não constam neste trabalho. Diversos trabalhos utilizaram ensaios de interação proteína-proteína *in vitro* associadas a espectrometria de massas para identificação de proteínas que interagem com efetores fúngicos. Proteínas do álamo foram identificadas como parceiras de interação dos candidatos a efetores de *Melampsora larici-populina* por meio da coimuprecipitação associada ao espectrômetro de massas (Petre et al., 2015).

Estudo utilizando a técnica de interação proteína-proteína demonstrou que quatro proteínas de cevada interagiram com o efetor BEC1054 de *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*

(Pennington et al., 2016). Outro exemplo, é o efector *Pst-milR1* de *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* que se liga ao gene PR-2 de trigo suprimindo sua ação (Wang et al., 2017).

A capacidade de auto ativação do gene repórter em 100 mM de 3-AT pelo Phapa-6417246, indica que a proteína predita pode ser um fator de transcrição. Porém, esse efector não apresentou em sua estrutura nenhum sítio de ligação ao nucleotídeo e nenhum NLS, o que invalida a hipótese da proteína efectora ser um fator de transcrição. Apesar disso, foi predito que a proteína efectora de Phapa-6417246 pode interagir com fatores de transcrição, ou seja, essa proteína pode atuar a nível nuclear ao se ligar a fatores de transcrição manipulando a resposta de defesa da planta. Como é caso do efector PpEC23 de *P. pachyrhizi* interage com o fator de transcrição da soja, GmSPL121, que regula negativamente a imunidade da soja (Qi et al., 2016).

As proteínas preditas como alvo de interação do efector Phapa-6417246 apresentam diversas funções, como regulação do *splicing* alternativo; sinalização baseada em ubiquitina e nas vias de renovação de proteínas; movimentação de histonas para interior do núcleo, e montagem de nucleossomos; mediação das interações entre proteínas; regulação de genes induzidos por brassinosteróides; entre outras (Tabela 4). Por meio dos domínios conservados dessas proteínas foi verificado que a maioria apresenta alguma função no núcleo da célula, o que corrobora para hipótese que o efector Phapa-641246 interage com proteínas da soja que apresentem alguma função no núcleo.

Dentre essas proteínas preditas em soja como alvos de interação do efector Phapa-6417246, tem-se o fator de transcrição da família TCP. Esse fator de transcrição desempenha papel importante no desenvolvimento da planta e sinalização dos hormônios relacionados a estresses abióticos e bióticos (Feng et al., 2018). Essa interação pode inferir sobre uma possível ação do efector na cascata de sinalização de hormônios da planta. Porém, é necessário investigar sobre essa possível interação entre o fator de transcrição TCP e o efector Phapa-6417246.

5 CONCLUSÕES

O efetor Phapa-6517246 de *P. pachyrhizi* suprime a resposta de defesa da planta mediados por PTI e ETI, utilizando o sistema de expressão transiente em folhas de tabaco. Além disso, a expressão do efetor Phapa-6517246 é induzida em folhas de soja infectadas por *P. pachyrhizi*. Este efetor pode ainda interagir com algum fator de transcrição da soja.

REFERÊNCIAS

- Birch, P. R., Boevink, P. C., Gilroy, E. M., Hein, I., Pritchard, L., & Whisson, S. C. (2008). Oomycete RXLR effectors: delivery, functional redundancy and durable disease resistance. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 11, Issue 4, pp. 373–379). <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.04.005>
- Brameier, M., Krings, A., & MacCallum, R. M. (2007). NucPred Predicting nuclear localization of proteins. *Bioinformatics*, 23(9), 1159–1160. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm066>
- Carvalho, M. C. da C. G., Costa Nascimento, L., Darben, L. M. ., Polizel-Podanosqui, A. M. ., Lopes-Caitar, V. S., Qi, M., Rocha, C. S., Carazzolle, M. F., Kuwahara, M. K., Pereira, G. A. G., Abdelnoor, R. V., Whitham, S. A., & Marcelino-Guimarães, F. C. (2017). Prediction of the in planta *Phakopsora pachyrhizi* secretome and potential effector families. *Molecular Plant Pathology*, 18(3), 363–377. <https://doi.org/10.1111/mpp.12405>
- Chang, H. X., Domier, L. L., Radwan, O., Yendrek, C. R., Hudson, M. E., & Hartman, G. L. (2016). Identification of multiple phytotoxins produced by *fusarium virguliforme* including a phytotoxic effector (fvNIS1) associated with sudden death syndrome foliar symptoms. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29(2), 96–108. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-15-0219-R>
- Cokol, M., Nair, R., & Rost, B. (2000). Finding nuclear localization signals. *EMBO Reports*, 1(5), 411–415. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvd092>
- Desjardins, A. E., Hohn, T. M., & McCormick, S. P. (1993). Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance. *Microbiological Reviews*, 57(3), 595–604. <https://doi.org/10.1128/MMBR.57.3.595-604.1993>
- Dodds, P. N., & Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11(8), 539–548. <https://doi.org/10.1038/nrg2812>
- Duplessis, S., Bakkeren, G., & Hamelin, R. (2014). *Advancing Knowledge on Biology of Rust Fungi Through Genomics* (pp. 173–209). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397940-7.00006-9>
- Ellis, J. G., Dodds, P. N., & Lawrence, G. J. (2007). Flax Rust Resistance Gene Specificity is Based on Direct Resistance-Avirulence Protein Interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 45(1), 289–306. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094331>
- Ellis, J. G., Rafiqi, M., Gan, P., Chakrabarti, A., & Dodds, P. N. (2009). Recent progress in discovery and functional analysis of effector proteins of fungal and oomycete plant pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(4), 399–405. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.05.004>
- Elmore, M. G., Banerjee, S., Pedley, K. F., Ruck, A., & Whitham, S. A. (2020). De novo transcriptome of *Phakopsora pachyrhizi* uncovers putative effector repertoire during infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 110(October 2019), 101464. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2020.101464>
- Fehr, W. R., & Caviness, C. E. (1977). Stages of soybean development. *Iowa State University*, 1–12. <http://lib.dr.iastate.edu/specialreports/87>
- Feng, Z.-J., Xu, S.-C., Liu, N., Zhang, G.-W., Hu, Q.-Z., & Gong, Y.-M. (2018). Soybean TCP transcription factors: Evolution, classification, protein interaction and stress and hormone responsiveness. *Plant Physiology and Biochemistry*, 127, 129–142. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.03.020>

- Garnica, D. P., Upadhyaya, N. M., Dodds, P. N., & Rathjen, J. P. (2013). Strategies for Wheat Stripe Rust Pathogenicity Identified by Transcriptome Sequencing. *PLoS ONE*, 8(6), e67150. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067150>
- Godoy, C. V., Seixas, C. D. S., Soares, R. M., Marcelino-Guimarães, F. C., Meyer, M. C., & Costamilan, L. M. (2016). Asian soybean rust in Brazil: past, present, and future. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51(5), 407–421. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500002>
- Goellner, K., Loehrer, M., Langenbach, C., Conrath, U., & Koch, E. (2010). *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. *Molecular Plant Pathology*, 11(2), 169–177. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00589.x>
- Göhre, V., & Robatzek, S. (2008). Breaking the Barriers: Microbial Effector Molecules Subvert Plant Immunity. *Annual Review of Phytopathology*, 46(1), 189–215. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.46.120407.110050>
- Hammond-kosack, K., & Jones, J. D. G. (2000). responses to plant pathogens. In *Biochemistry and molecular biology of plants* (pp. 1102–1155).
- Henning, A. A. (2014). *Manual de identificação de doenças de soja*.
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Kamoun, S. (2009). The Secretome of Plant-Associated Fungi and Oomycetes. In *The Mycota* (pp. 173–180). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-87407-2_9
- Kemen, E., Kemen, A. C., Rafiqi, M., Hempel, U., Mendgen, K., Hahn, M., & Voegelé, R. T. (2005). Identification of a Protein from Rust Fungi Transferred from Haustoria into Infected Plant Cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI*, 18(11), 1130–1139. <https://doi.org/10.1094/MPMI>
- Kimura, M., Tokai, T., Takahashi-Ando, N., Ohsato, S., & Fujimura, M. (2007). Molecular and genetic studies of *Fusarium trichothecene* biosynthesis: Pathways, genes, and evolution. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71(9), 2105–2123. <https://doi.org/10.1271/bbb.70183>
- Kosugi, S., Hasebe, M., Entani, T., Takayama, S., Tomita, M., & Yanagawa, H. (2008). Design of Peptide Inhibitors for the Importin α/β Nuclear Import Pathway by Activity-Based Profiling. *Chemistry & Biology*, 15(9), 940–949. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.07.019>
- Kosugi, S., Hasebe, M., Matsumura, N., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., Tomita, M., & Yanagawa, H. (2009). Six Classes of Nuclear Localization Signals Specific to Different Binding Grooves of Importin α . *Journal of Biological Chemistry*, 284(1), 478–485. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807017200>
- Kunjjeti, S. G., Iyer, G., Johnson, E., Li, E., Broglie, K. E., Rauscher, G., & Rairdan, G. J. (2016). Identification of *Phakopsora pachyrhizi* Candidate Effectors with Virulence Activity in a Distantly Related Pathosystem. *Frontiers in Plant Science*, 7(MAR2016). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00269>
- Liao, Y., Zou, H.-F., Wei, W., Hao, Y.-J., Tian, A.-G., Huang, J., Liu, Y.-F., Zhang, J.-S., & Chen, S.-Y. (2008). Soybean GmbZIP44, GmbZIP62 and GmbZIP78 genes function as negative regulator of ABA signaling and confer salt and freezing tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Planta*, 228(2), 225–240. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0731-3>
- Link, T. I., Lang, P., Scheffler, B. E., Duke, M. V., Graham, M. A., Cooper, B., Tucker, M. L., van de Mortel, M., Voegelé, R. T., Mendgen, K., Baum, T. J., & Whitham, S. A. (2014). The haustorial transcriptomes of *Uromyces appendiculatus* and *Phakopsora pachyrhizi* and their candidate effector families. *Molecular Plant Pathology*, 15(4), 379–393. <https://doi.org/10.1111/mpp.12099>

- Liu, C., Pedersen, C., Schultz-Larsen, T., Aguilar, G. B., Madriz-Ordeñana, K., Hovmøller, M. S., & Thordal-Christensen, H. (2016). The stripe rust fungal effector PEC6 suppresses pattern-triggered immunity in a host species-independent manner and interacts with adenosine kinases. *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1111/nph.14034>
- Medzhitov, R., & Janeway, C. A. (1997). Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition. *Cell*, 91(3), 295–298. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80412-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80412-2)
- Mysore, K. S., & Ryu, C.-M. (2004). Nonhost resistance: how much do we know? *Trends in Plant Science*, 9(2), 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2003.12.005>
- Nguyen Ba, A. N., Pogoutse, A., Provart, N., & Moses, A. M. (2009). NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics*, 10(1), 202. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-202>
- Pennington, H. G., Gheorghe, D. M., Damerum, A., Pliego, C., Spanu, P. D., Cramer, R., & Bindschedler, L. V. (2016). Interactions between the Powdery Mildew Effector BEC1054 and Barley Proteins Identify Candidate Host Targets. *Journal of Proteome Research*, 15(3), 826–839. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00732>
- Petre, B., Joly, D. L., & Duplessis, S. (2014). Effector proteins of rust fungi. *Frontiers in Plant Science*, 5(AUG). <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00416>
- Petre, B., Saunders, D. G. O., 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. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-15-0003-R>
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9), 36e–36. <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.e36>
- Posada-Buitrago, M. L., & Frederick, R. D. (2005). Expressed sequence tag analysis of the soybean rust pathogen *Phakopsora pachyrhizi*. *Fungal Genetics and Biology*, 42(12), 949–962. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2005.06.004>
- Qi, M., Grayczyk, J. P., Seitz, J. M., Lee, Y., Link, T. I., Choi, D., Pedley, K. F., Voegelé, R. T., Baum, T. J., & 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. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-17-0173-FI>
- Qi, M., Link, T. I., Müller, M., Hirschburger, D., Pudake, R. N., Pedley, K. F., Braun, E., Voegelé, R. T., Baum, T. J., & 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. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005827>
- Qi, M., Mei, Y., Grayczyk, J. P., Darben, L. M., Rieker, M. E. G., Seitz, J. M., Voegelé, R. T., Whitham, S. A., & Link, T. I. (2019). 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*, 10(October). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01182>
- Rincão, M. P., Carvalho, M. C. da C. G. de, Nascimento, L. C., Lopes-Caitar, V. S., Carvalho, K. de, Darben, L. M., Yokoyama, A., Carazzolle, M. F., Abdelnoor, R. V., & Marcelino-Guimarães, F. C. (2018). New insights into *Phakopsora pachyrhizi* infection based on transcriptome analysis in planta. *Genetics and Molecular Biology*, 41(3), 671–691. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2017-0161>
- Roux, F., Voisin, D., Badet, T., Balagué, C., Barlet, X., Huard-Chauveau, C., Roby, D., &

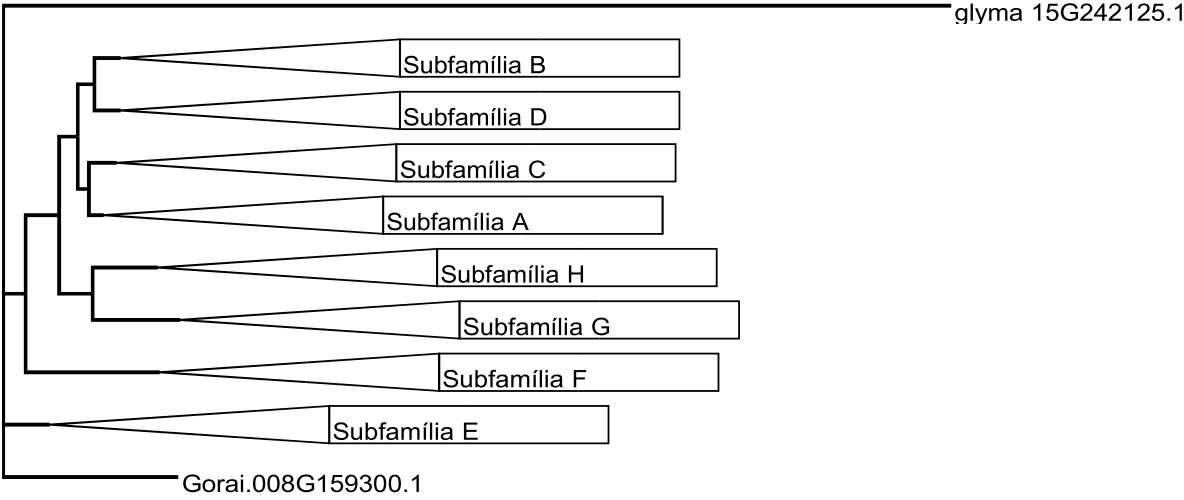
- Raffaele, S. (2014). Resistance to phytopathogens e tutti quanti: Placing plant quantitative disease resistance on the map. *Molecular Plant Pathology*, 15(5), 427–432. <https://doi.org/10.1111/mpp.12138>
- Rynkiewicz, M. J., Cane, D. E., & Christianson, D. W. (2001). Structure of trichodiene synthase from *Fusarium sporotrichioides* provides mechanistic inferences on the terpene cyclization cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(24), 13543–13548. <https://doi.org/10.1073/pnas.231313098>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor.
- Saunders, D. G. O., Win, J., Cano, L. M., Szabo, L. J., Kamoun, S., & Raffaele, S. (2012). Using Hierarchical Clustering of Secreted Protein Families to Classify and Rank Candidate Effectors of Rust Fungi. *PLoS ONE*, 7(1), e29847. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029847>
- Schneider, K. T., van de Mortel, M., Bancroft, T. J., Braun, E., Nettleton, D., Nelson, R. T., Frederick, R. D., Baum, T. J., Graham, M. A., & Whitham, S. A. (2011). Biphasic Gene Expression Changes Elicited by *Phakopsora pachyrhizi* in Soybean Correlate with Fungal Penetration and Haustoria Formation. *Plant Physiology*, 157(1), 355–371. <https://doi.org/10.1104/pp.111.181149>
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havli, J., Olsen, J. V., & Mann, M. (2007). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*, 1(6), 2856–2860. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.468>
- Sohn, K. H., Lei, R., Nemri, A., & Jones, J. D. G. (2007). The Downy Mildew Effector Proteins ATR1 and ATR13 Promote Disease Susceptibility in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 19(12), 4077–4090. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.054262>
- Stergiopoulos, I., & de Wit, P. J. G. M. (2009). Fungal Effector Proteins. *Annual Review of Phytopathology*, 47(1), 233–263. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.112408.132637>
- Trapp, S. C., Hohn, T. M., McCormick, S., & Jarvis, B. B. (1998). Characterization of the gene cluster for biosynthesis of macrocyclic trichothecenes in *Myrothecium roridum*. *Molecular and General Genetics*, 257(4), 421–432. <https://doi.org/10.1007/s004380050666>
- Upadhyaya, N. M., Mago, R., Staskawicz, B. J., Ayliffe, M. A., Ellis, J. G., & Dodds, P. N. (2014). A Bacterial Type III Secretion Assay for Delivery of Fungal Effector Proteins into Wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(3), 255–264. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-13-0187-FI>
- Wang, B., Sun, Y., Song, N., Zhao, M., Liu, R., Feng, H., Wang, X., & Kang, Z. (2017). *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* microRNA-like RNA 1 (Pst-milR1), an important pathogenicity factor of Pst, impairs wheat resistance to Pst by suppressing the wheat pathogenesis-related 2 gene. *New Phytologist*, 215(1), 338–350. <https://doi.org/10.1111/nph.14577>
- Yang, S., Li, H., He, H., Zhou, Y., & Zhang, Z. (2019). Critical assessment and performance improvement of plant–pathogen protein–protein interaction prediction methods. *Briefings in Bioinformatics*, 20(1), 274–287. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx123>
- Zambolim, L. (2006). Manejo integrado da ferrugem asiática da soja. In *Ferrugem asiática da soja* (pp. 73–98).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

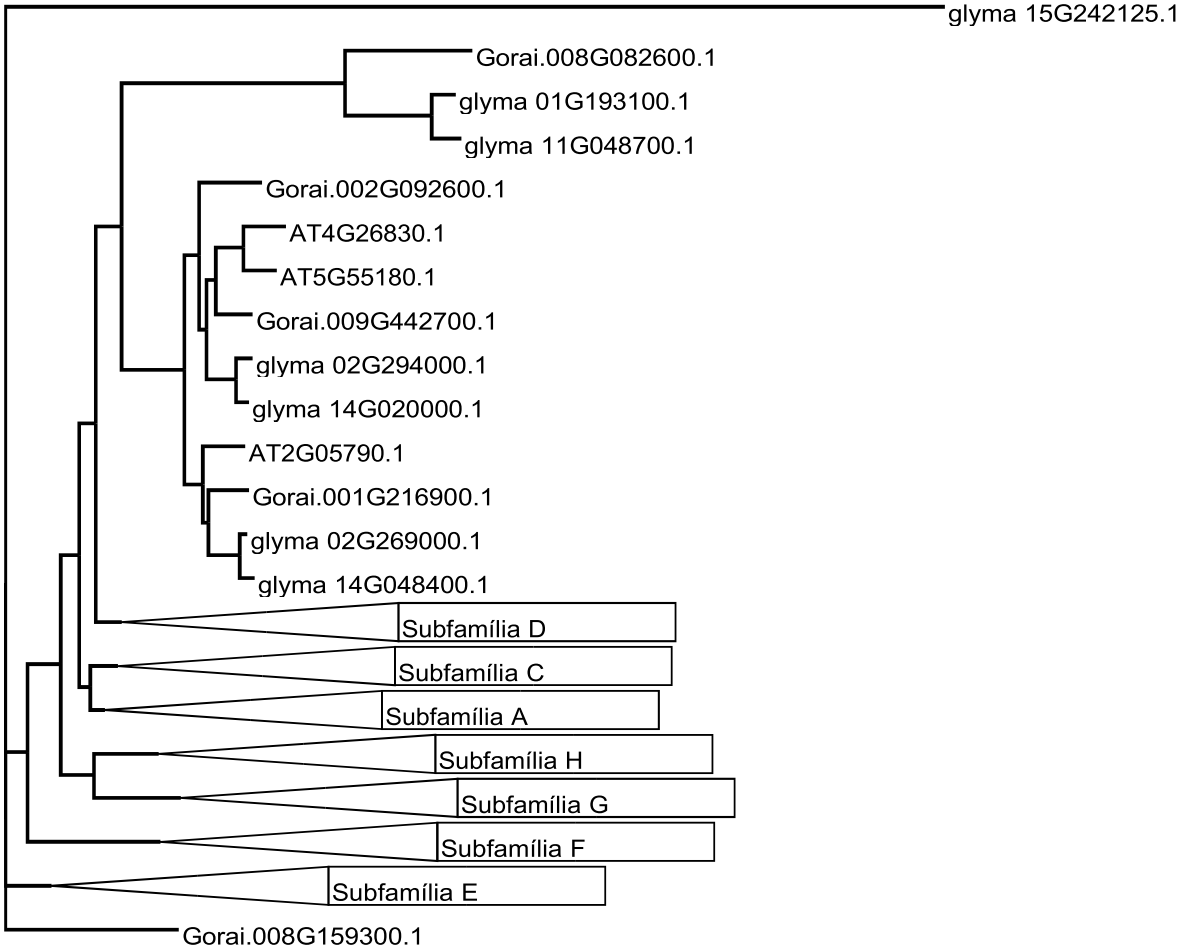
Os candidatos a efetores Phapa-7431740 e Phapa-6417246 são capazes de suprimir as respostas de defesa da planta mediados por PTI e ETI, o que valida a função efetora dessas proteínas secretadas por *P. pachyrhizi*. O candidato a efector Phapa-7431740 interage fisicamente com uma beta-1,3-glucanase da soja pelo sistema duplo híbrido de levedura. O candidato a efector Phapa-6417246 possivelmente interagiu com proteínas do genótipo suscetível de soja por meio do ensaio de *pull down*, porém, ainda é necessária a identificação das proteínas pelo espectrômetro de massas. Outros estudos sobre a função dos candidatos a efetores de *Phakopsora* são necessários para maior entendimento da atuação desses efetores nos mecanismos de defesa da soja.

ANEXO 1

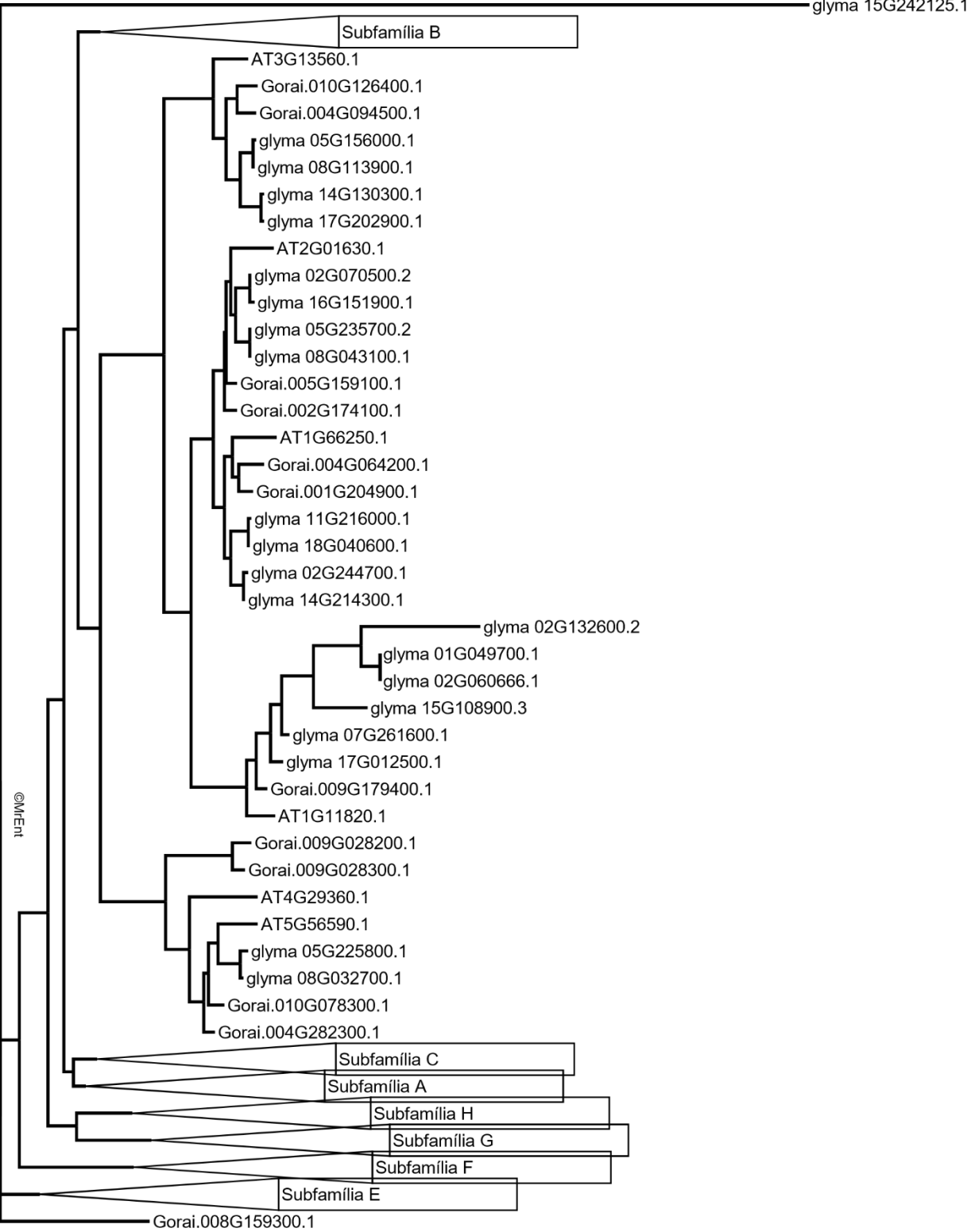
(A) Esquema da divisão da árvore filogenética



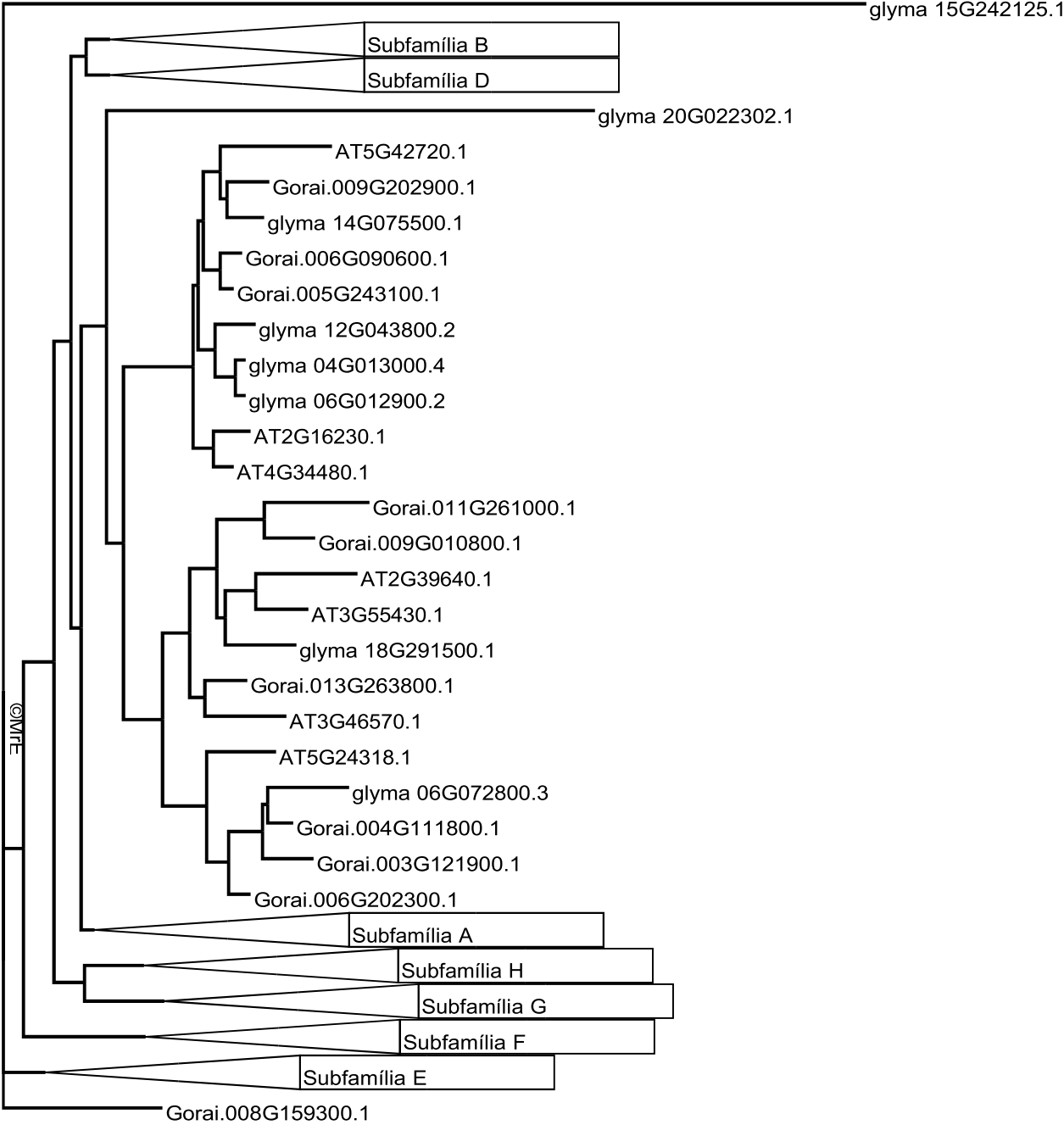
(B) Subfamília B



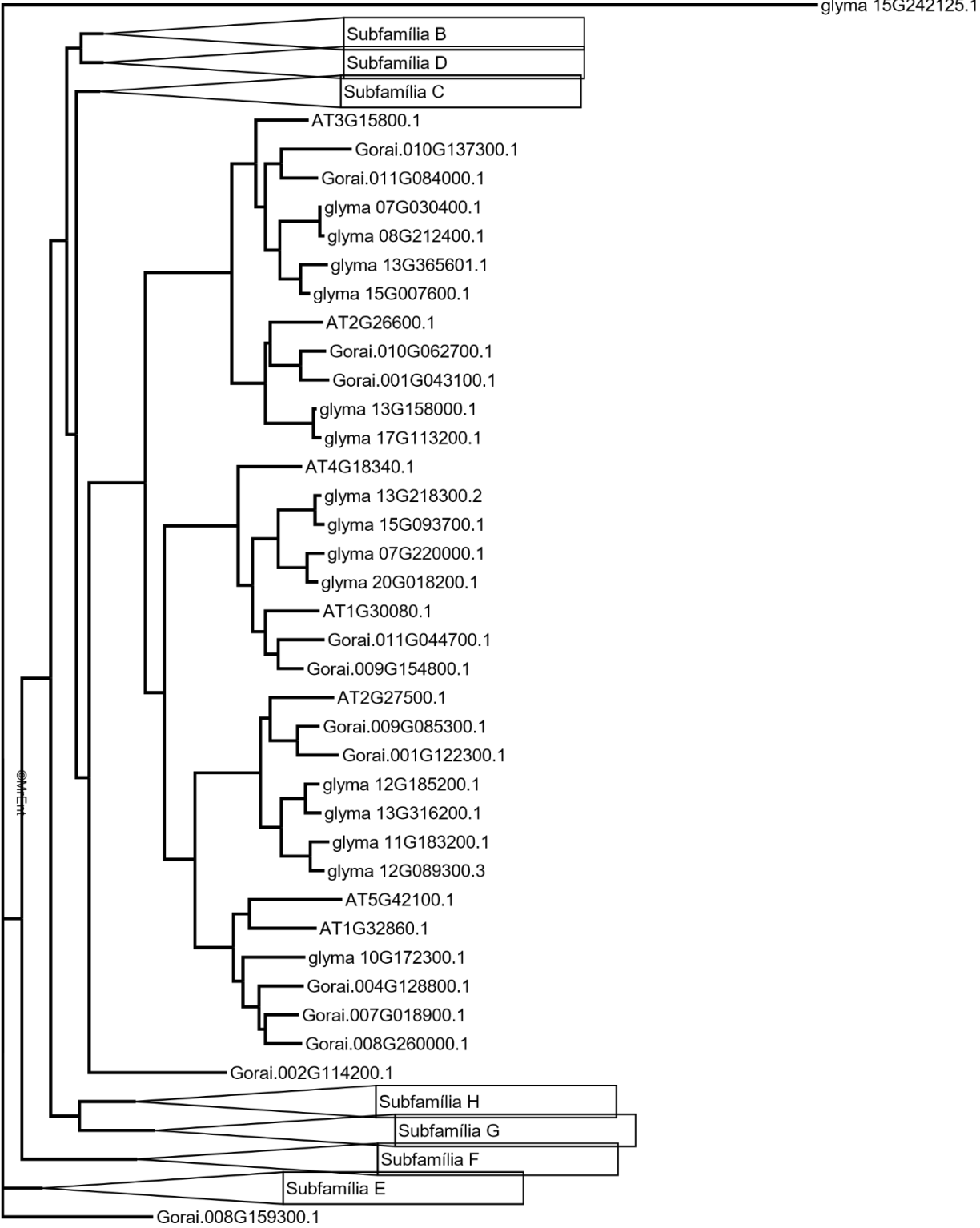
(C) Subfamília D



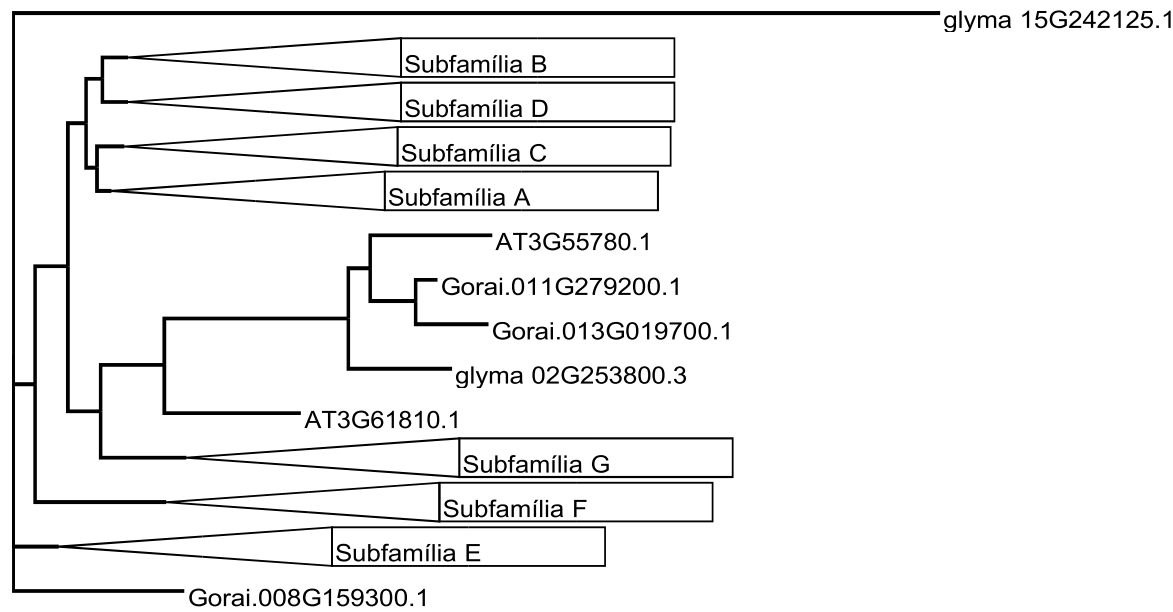
(D) Subfamília C



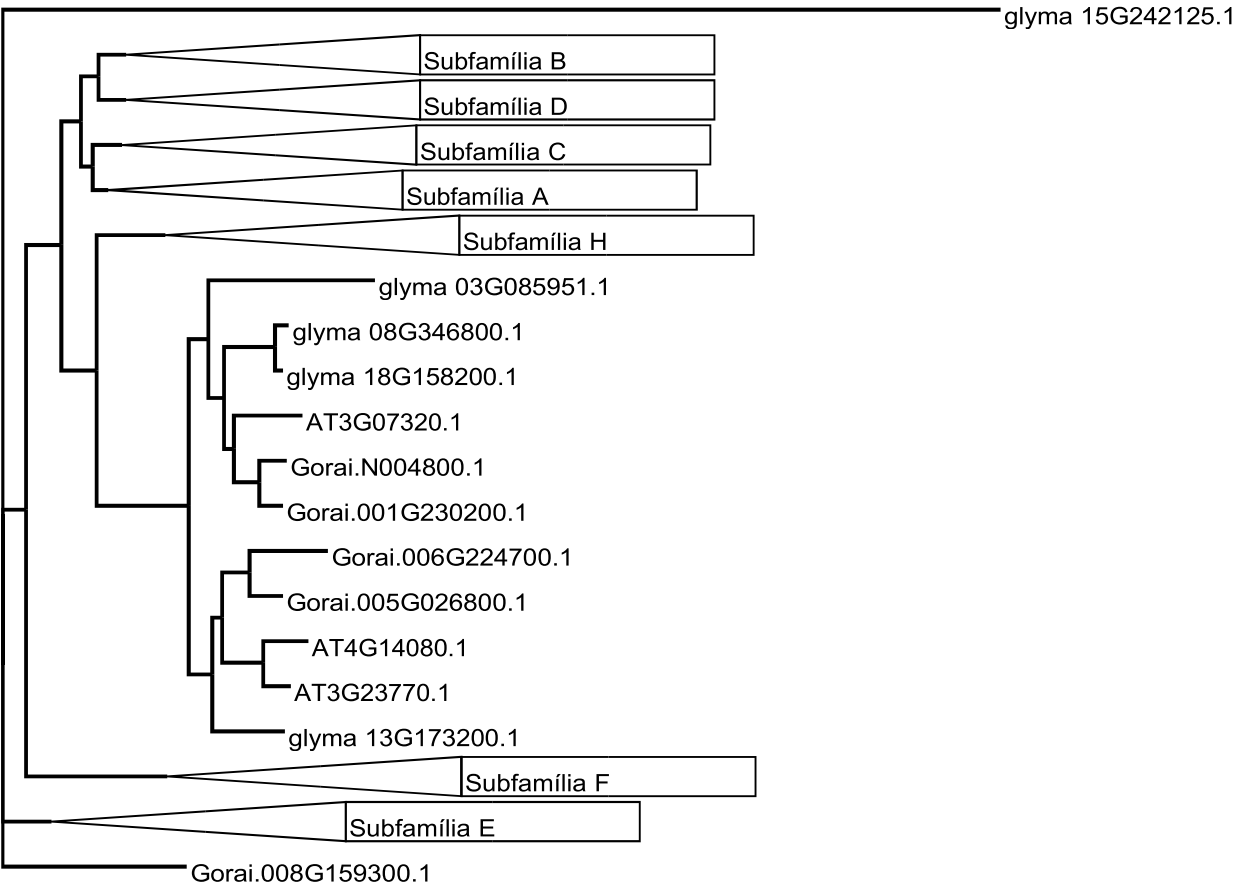
(E) Subfamília A



(F) Subfamília H



(G) Subfamília G



(H) Subfamília F

