

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Caracterização dos mecanismos de indução de resistência à ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*), por meio de dados ômicos, em plantas de soja tratadas com oligogalacturonídeos (OGs)

Eloísa Torrezan

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2023**

Eloísa Torrezan
Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas

Caracterização dos mecanismos de indução de resistência à ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*), por meio de dados ômicos, em plantas de soja tratadas com oligogalacturonídeos (OGs)

versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador
Prof. Dr. **CARLOS ALBERTO LABATE**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2023

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Torrezan, Eloísa

Caracterização dos mecanismos de indução de resistência à ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*), por meio de dados ômicos, em plantas de soja tratadas com oligogalacturonídeos (OGs) / Eloísa Torrezan. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2023.

70 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. *Glycine max* 2. *Phakopsora pachyrhizi* 3. Ômicas 4. Elicitores I. Título

Dedico com todo meu amor
aos meus pais Sandra e Claudemir,
à minha irmã, Julia
e ao meu companheiro, Caio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por permitir que tudo em minha vida fosse possível.

Agradeço à minha família pelo apoio incondicional, vocês são o que eu tenho de mais valioso. Aos meus pais Sandra e Claudemir que sonharam meus sonhos e comemoraram comigo cada conquista. À minha irmã, minha melhor amiga, que sempre é acolhimento e luz nos momentos de incerteza. Obrigada pela base sólida que me deram para voar.

Ao Caio, por ter sido meu maior apoiador e motivador ao longo deste projeto. Sua compreensão e paciência têm sido uma grande fonte de conforto para mim em tempos difíceis. Obrigada por tanto!

Agradeço ao meu orientador, Professor Carlos Alberto Labate, pela oportunidade na realização deste projeto, pelo suporte científico, disponibilidade e pela confiança em meu trabalho. Sua visão e experiência foram fundamentais para moldar minhas ideias.

Agradeço aos integrantes do Laboratório Max Feffer, pelo apoio no desenvolvimento desta pesquisa e pela amizade. Seus comentários e sugestões me ajudaram a refinar meu trabalho e alcançar melhores resultados. Ao Gustavo pela parceria na realização deste projeto. À Mônica por todo apoio no processamento de amostras e pela paciência em todos os ensinamentos. À Thais pelo suporte nas análises. Ao Fabricio por toda ajuda com bioinformática e pela companhia nos almoços. À Mariane pela amizade e companheirismo nesse período.

Agradeço aos professores da ESALQ, em especial aos do Departamento de Genética por todos os ensinamentos. Um tributo de amor ao Luiz de Queiroz e à Ermelinda que acreditaram no poder da educação e ensinaram que plantar nesta terra é lutar pela grande nação.

Agradeço à CAPES, pela concessão de minha bolsa.

**“Na vida, não existe nada a se temer,
apenas a ser compreendido”**

- Marie Curie

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1. A cultura da soja.....	13
2.2. Sistema imune de plantas.....	14
2.3. Ferrugem asiática da soja.....	17
2.4. Indutores de resistência em plantas – elicitores.....	19
3. OBJETIVOS.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1. Preparação e caracterização de OGs.....	25
4.2. Material vegetal.....	25
4.3. Obtenção do inóculo.....	26
4.4. Ensaio biológico para determinar o impacto dos OGs no desenvolvimento da soja.....	27
4.5. Ensaios biológicos para análises ômicas.....	28
4.6. Análise de proteoma.....	30
4.7. Análise estatística de proteínas.....	32
4.8. Análise funcional de proteínas.....	33
4.9. Análise metabolômica: GC-MS.....	34
4.10. Análise estatística de metabólitos.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1. Impacto da ferrugem na planta de soja - análise de proteoma.....	37
5.2. Impacto dos OGs na planta de soja.....	42
5.2.1. Ensaio biológico.....	42
5.2.2. Análise do proteoma.....	44
5.3. Impacto dos OGs na planta de soja na presença de <i>P. pachyrhizi</i>	50
5.3.1. Testemunhas do ensaio biológico.....	50
5.3.2. Análises do proteoma.....	51
5.3.3. Análises de metaboloma.....	56
6. CONCLUSÃO.....	61
7. REFERÊNCIAS.....	63

RESUMO

Caracterização dos mecanismos de indução de resistência à ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*), por meio de dados ômicos, em plantas de soja tratadas com oligogalacturonídeos (OGs)

A ferrugem Asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, acomete gravemente a cultura da soja, uma das principais atividades do agronegócio brasileiro. O sistema imune das plantas compreende uma série de complexos mecanismos de defesa contra o ataque de patógenos ou predadores. A planta é capaz de perceber a ameaça por meio de moléculas de alerta, denominadas elicitores. DAMPs (*Damage Associated Molecular Patterns*) são moléculas elicitoras geradas nas injúrias celulares durante uma infecção. Um estudo vem sendo realizado em nosso laboratório com um composto a base de uma classe de DAMPs, os oligogalacturonídeos (OGs), o qual vem demonstrando resultados significativos na redução da progressão de infecções causadas por fungos na soja. Assim, esse trabalho buscou estudar os mecanismos moleculares envolvidos no processo de infecção de *P. pachyrhizi* e compreender como se dá a indução da resistência da soja após o tratamento foliar com OGs, ao longo das 48 horas iniciais após tratamento. Nossos ensaios indicaram que os OGs exibem pouca ou nenhuma capacidade de afetar o desenvolvimento da planta de soja. Em geral, análises de proteoma indicaram alterações positivas na abundância de proteínas com mais relevância nos primeiros horários de amostragem. Os OGs, na presença ou ausência do patógeno, interferem em vias proteicas na planta, semelhantes às moduladas somente por *P. pachyrhizi*, sendo estas relacionadas a atividades peroxissomais, fotossíntese, metabolismo da glutatona, estresse oxidativo e modulação no transporte de proteínas, diretamente relacionadas à mecanismos de resposta de defesa da planta de soja. Dados de metaboloma indicaram capacidade dos OGs, na presença do patógeno, de mobilizar vias relacionadas a resistência da planta pela presença de EROs e moléculas relacionadas ao metabolismo de etileno.

Palavras-chave: *Glycine max*, *Phakopsora pachyrhizi*, Ômicas, Elicitores

ABSTRACT

Characterization of the induction mechanisms of resistance to Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*), through omic data, in soybean plants treated with oligogalacturonides (OGs)

Asian rust, caused by the *Phakopsora pachyrhizi* fungus, seriously affects the soybean crop, one of the main activities of Brazilian agribusiness. The Plant Immune System comprises a series of complex defense controls against attack by pathogens or predators. The plant is able to perceive the threat by means of warning alerts, called elicitors. DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns) are called elicitors, generated in cell injuries during an infection. A study has been carried out in our laboratory with a compound based on a class of DAMPs, the oligogalacturonides (OGs), which have shown results achieved in reducing the progression of occurrences caused by fungi in soybeans. Thus, this work sought to study the molecular mechanisms involved in the infection process of *P. pachyrhizi* and to understand how soybean resistance is induced after foliar treatment with OGs, during the initial 48 hours after treatment. Our assays indicated that OGs exhibit little or no ability to affect soybean plant development. In general, proteomics analyses indicated positive changes in the abundance of proteins with more tuning in the first times of sampling. The OGs, in the presence or absence of the pathogen, interfere in the plant protein pathways, like those impacted only by *P. pachyrhizi*, which are related to peroxisomal activities, photosynthesis, glutathione metabolism, oxidative stress and modulation of protein transport, directly related to the soybean plant defense response button. Metabolomics data indicated the ability of OGs, in the presence of the pathogen, to mobilize pathways related to plant resistance by the presence of ROS and molecules related to ethylene metabolism.

Keywords: *Glycine max*, *Phakopsora pachyrhizi*, Omics, Elicitors

LISTA DE ABREVIATURAS

	Significado	Tradução
ANOVA	Analysis of variance	Análise de variância
ASCA	ANOVA - <i>simultaneous component analysis</i>	ANOVA - análise de componentes simultâneos
dpi	dias pós inoculação	
ETI	<i>Effector Triggered Immunity</i> <i>Effector Triggered</i>	Imunidade Causada Por Efetor
ETS	<i>Susceptibility</i>	Susceptibilidade Causada Por Efetor
GO	<i>Gene Ontology</i>	Ontologia Genética
HGA	Homogalacturonano	
hpi	horas pós inoculação	
HR	<i>Hypersensitive Response</i>	Reações De Hipersensibilidade Padrões Moleculares Associados a
DAMPs	<i>Damage Associated Molecular Pattern</i>	Dano Proteína Quinase Ativada Por
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>	Mitógeno
DTI	DAMP-Triggered Immunity <i>Nucleotide Binding- Leucine Reach</i>	Imunidade Induzida Por DAMPs Ligação de Nucleotídeos - Repetiçã
NB-LRR	<i>Repeat</i>	Rica de Leucina
OGs	Oligogalacturonídeos <i>Pathogen Associated Molecular</i>	Padrões Moleculares Associados a
PAMPs	<i>Patterns</i>	Patógenos Sistema de Monitoramento da
PIMS	<i>Pectin Integrity Monitoring System</i>	Integridade de Pectina
PRRs	<i>Pathogen Related Proteins</i>	Proteínas Relacionadas à Patógenos
PTI	<i>PAMP-Triggered Immunity</i>	Imunidade Induzida por PAMPs
rpm	Rotações Por Minutos	
WAKS	<i>Wall Associated Kinase</i>	Quinases Associados À Parede

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e exportador de soja (*Glycine max* (L.) Merrill), sendo responsável por aproximadamente 50% do comércio mundial (EMBRAPA, 2020). O cultivo de soja na diversidade de biomas brasileiros só é possível devido a robustos programas de pesquisa, desenvolvimento e inovação. No Brasil, a diversidade de fatores bióticos e abióticos que podem interferir no sucesso da produção da soja é um desafio a ser enfrentado, conciliando a crescente pressão sobre o aumento de produção de alimentos com medidas de produtividade mais sustentáveis.

O cultivo da soja vem sendo realizado de forma extensiva e massiva ao longo do país, práticas que acarretam aumento da incidência de doenças. Um dos fatores que mais impactam a produção da soja são as doenças causadas por fungos em que há grande dificuldade no controle, devido principalmente a constante redução na eficácia de fungicidas químicos (GODOY *et al.*, 2020a).

Segundo a Embrapa (2018), a ferrugem asiática, causada por *Phakopsora pachyrhizi*, é uma das principais doenças do cultivo da soja no Brasil, apresentando também grande impacto mundial. Em 2001 essa doença foi identificada pela primeira vez em território nacional e, desde então, vem sendo intensamente estudada e monitorada. Segundo os dados do Consórcio Antiferrugem, essa doença causa um prejuízo médio de US\$ 2,8 bilhões por safra no Brasil, perdas consequentes da desfolha precoce, um dos principais danos desta doença (EMBRAPA, 2018). O uso de defensivos químicos tem se mostrado como o mais eficiente dentre as medidas de controle disponíveis para esse patógeno. Ainda assim, é sabido que o uso excessivo de fungicidas provoca seleção de raças resistentes de *P. pachyrhizi* (HEANEY *et al.*, 1994).

Para iniciarem a colonização no hospedeiro, os patógenos fazem uso de diversas ferramentas para superar as barreiras de proteção da planta, que por sua vez, apresentam um complexo sistema de defesa para deter o desenvolvimento da doença (DALIO *et al.*, 2014). Plantas, insetos e mamíferos apresentam em comum um sistema primitivo e inato de defesa contra infecções microbianas. Contudo, diferentemente, em plantas, não são encontradas células móveis de defesa ou um sistema imune somático adaptativo; a imunidade é característica de cada célula, dependente de mecanismos constitutivos da planta e de sinais sistêmicos produzidos nos locais de infecção (CASTRO; KLUGE; SESTARI, 2008).

Dentre estes sinais sistêmicos, existem aqueles capazes de ativar respostas de defesa do sistema imune vegetal, estas moléculas são chamadas de elicitores (JONES; DANGL, 2006).

Oligogalacturonídeos (OGs) são elicitores químicos, bióticos de origem endógena (da própria planta), descritos como DAMPs (*Damage Associated Molecular Patterns*). (PATEL; KRISHNAMURTHY, 2013). Segundo Ferrari *et al.* (2013), OGs são frações pécnicas oriundas da degradação de HGA (homogalacturonano) durante a digestão da parede celular por enzimas pectinases secretadas pelos fungos, ou pela ação de enzimas hidrolíticas endógenas secretadas na ocorrência de injúrias na planta. HGA é sintetizado pelo complexo de golgi e depositado na parede celular.

Na busca de uma alternativa para a realização de um manejo mais sustentável e eficiente, uma suspensão contendo uma mistura de OGs com diferentes graus de polimerização foi testada com sucesso em nosso laboratório, para a indução da resistência da soja à ferrugem. A aplicação destes OGs tem como objetivo estimular previamente o sistema imune da planta ao ataque de patógenos, tendo como alvo a planta e não o fungo. O uso desta composição em ensaios feitos em nosso laboratório demonstrou resultados interessantes para o controle da ferrugem asiática (dados prévios ainda não publicados). Frente aos resultados promissores observados com o produto de OGs, surge a necessidade de analisar a planta infectada logo após o tratamento com OGs para investigar os mecanismos subjacentes às respostas de defesa. Para tanto, as respostas iniciais da planta serão exploradas através de técnicas “multi-ômicas”, correlacionando dados para compreensão desse sistema biológico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merr.)

O gênero *Glycine* pertence à classe das Rosidaeas, ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Papilionoideae, tribo Phaseoleae, gênero *Glycine* L., espécie *G. max*. É uma planta herbácea com estatura entre 60 e 110 cm, de acordo com a cultivar. Apresenta caule hispido, com poucas ramificações e raiz com eixo principal. Suas folhas são trifoliadas e suas flores, de coloração branca, realizam fecundação autógama. Como as Fabaceae, seus frutos são vagens (legumes) os quais, no processo de amadurecimento, evoluem da cor verde para a amarela e, posteriormente, marrom-acinzentado (NEPOMUCENO; FARIAS; NEUMAIER, 1999).

Os hábitos de crescimento das variedades de soja podem ser do tipo indeterminado (sem racemo terminal), determinado (com racemo terminal) ou semideterminado (intermediário) (SEDIYAMA; TEIXEIRA; REIS, 1999). Sua floração depende da quantidade de horas sem luz, ou seja, duração da noite, sendo, originalmente, tratada como uma planta de dias curtos. Contudo, atualmente as cultivares brasileiras são menos restritas a condições fotoperiódicas (NEPOMUCENO; FARIAS; NEUMAIER, 1999).

Segundo uma revisão da Embrapa (2020), a soja é originária do continente asiático, onde hoje está compreendida a China, mais precisamente na região da Manchúria, há pelo menos seis mil anos atrás. Diferentemente da arquitetura que observamos dessas plantas hoje, suas ancestrais eram rasteiras. Há relatos que a soja chegou ao Brasil no ano de 1882 e após uma década, foi levada ao Instituto Agrônomo, em São Paulo, para ser estudada e cultivada. Por volta da década de 1940, o potencial produtivo desta planta foi notado pelo país e, em 1970, houve uma explosão no valor do grão no mercado internacional. Desde então, a cultura da soja demanda expansão produtiva, recebendo grande atenção por ser uma importante fonte de proteína vegetal, amplamente utilizada na dieta animal em atividades pecuaristas (HARTMAN; WEST; HERMAN, 2011), consequência também do aumento de poder aquisitivo da população de países como a China, a maior compradora de soja do mundo (PINAZZA, 2007; WESZ, 2016).

O Brasil investe em tecnologias e inovação desde o final do século passado, para produção nacional da soja, “tropicalizando” a planta e tornando possível a produção da cultura em todas as regiões do país. Hoje, o Brasil é o maior produtor mundial do grão, com 43,242 milhões de hectares de área plantada (4,2% a mais do que no ano anterior) e produção de 153,583 milhões de toneladas (22,3 % a mais que a última safra) (CONAB, 2022). Para a safra 2022/23, a

CONAB estima expansão de área produtiva de soja, em relação ao relatório passado, conseqüentemente, é estimado aumento da produção do grão para a próxima safra.

Mesmo em expansão, a produção de soja no país enfrenta obstáculos. Um dos fatores que mais impactam a produção deste grão são as “Doenças de Final de Ciclo” (DFCs) causadas principalmente pelos patógenos *Septoria glycines*, *Cercospora kikuchi*, *Colletotrichum truncatum* e *Phakopsora pachyrhizi*, que também pode ocorrer em outros estágios de desenvolvimento da planta. Considerando a necessidade de aumento de produção de alimentos no mundo devido ao aumento da população, pesquisadores do mundo inteiro têm investido esforços para encontrar novas estratégias para realizar um manejo agrícola eficaz e mais sustentável.

2.2. Sistema imune de plantas

Para que um patógeno obtenha sucesso na infecção de uma planta saudável, três fatores devem ser garantidos neste evento: i) o hospedeiro deve ser suscetível; ii) o patógeno deve ser virulento e iii) o ambiente deve ser favorável ao desenvolvimento do patógeno (LEITE, 2012). Dessa forma, é pequeno o número de microrganismo que efetivamente infectam uma planta, sendo a infecção uma exceção e não uma regra (FERREIRA *et al.*, 2007).

O sistema imune das plantas é constituído por ferramentas moleculares inatas oriundas de cada célula vegetal, valendo-se de mecanismos constitutivos e sinais sistêmicos que emanam a partir do local de infecção. Os mecanismos constitutivos são aqueles compreendidos na estrutura física da planta que dificultam a entrada de patógenos nas células, por exemplo, o revestimento de cutículas e ceras. A parede celular do vegetal constitui-se como uma segunda barreira de prevenção à invasão de patógenos (PANDEY *et al.*, 2016).

Há também mecanismos sistêmicos de defesa da planta em resposta a percepção de sinais de infecção por padrões moleculares. Os padrões moleculares são classificados em elicitores e efetores, em que, elicitores são aqueles capazes de ativar as vias do sistema imune da planta, modulando as respostas de defesa, ao passo que, diferentemente os efetores são moléculas que inibem estas vias de defesa, suprimindo o sistema imune da planta (JONES; DANGL, 2006).

Segundo Jones e Dangl (2006), existem duas vias de reconhecimento de invasão. A primeira se faz pelo reconhecimento dos padrões moleculares através de proteínas transmembranares de reconhecimento (PRRs) (*Pathogen Related Proteins*). A ativação dessas proteínas de

membrana dá início a uma cascata de sinalização mediada por MAP-quinases (*Mitogen-Activated Protein* quinase). Simplificadamente, a cascata de sinalização ocorre quando uma MAPK quinase quinase (MAPKKK) fosforila uma MAK quinase, que em seguida irá fosforilar uma MAPK. Essa sequência de reações químicas se configura como uma via de sinalização capaz de controlar fatores de transcrição responsáveis por regular a expressão de genes relacionados à defesa de plantas (BENT; MACKEY, 2007).

Além disso, segundo Jones e Dangl (2006), a constatação desse padrão molecular patogênico desencadeia na planta alterações nos níveis de Ca^{2+} . Esses padrões moleculares modulam respostas fisiológicas da planta, ativando mecanismos como a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs), alterações nos níveis hormonais e rearranjos na parede celular. Esses eventos são um dos recursos que a planta utiliza para sua defesa, contudo, existe um segundo caminho de respostas.

A segunda via de ação da célula ocorre por meio de genes de resistência, denominados genes R, que codificam proteínas R, grande parte das vezes enriquecidas do aminoácido leucina na porção C-terminal (domínio LRR), portanto chamadas de proteínas NB-LRR (*nucleotide binding- leucine reach repeat*) (JONES; DANGL, 2006). Essas proteínas NB-LRRs atuam no reconhecimento de padrões moleculares produzidos pelo patógeno, ativando respostas de defesa de hipersensibilidade pela planta, resultante da morte celular no local em que houve infecção, o que detém a disseminação do patógeno.

A importância do gene R foi postulada por Flor (1942), que observou que o reconhecimento de patógenos depende da presença de genes de avirulência (ausência de virulência/patogenicidade) e, em quase todos os casos analisados a resistência é dominante sobre a susceptibilidade e a avirulência dominante sobre a virulência. Segundo Zaeamela (2011), já foram descritos sete genes de resistência à ferrugem asiática em soja em locus denominados RPP (*Resistance to Phakopsora pachyrhizi*). Os genes de resistência RPP possuem a capacidade de reconhecer proteínas efetoras de raças de *P. pachyrhizi*, ativando uma resposta de defesa, em consequência da ativação de proteínas como quinases, proteínas ligadoras de nucleotídeos e fatores de transcrição. Essas proteínas estão envolvidas na regulação da expressão gênica e na ativação de mecanismos de defesa, como a produção de metabólitos antimicrobianos, a indução de morte celular programada e a produção de hormônios de defesa (GARCIA *et al.*, 2008; LANGENBACH *et al.* 2016).

O sistema imune de plantas é representado através de um modelo chamado “zig-zag” (JONES; DANGL, 2006) amplamente referenciado na literatura (Figura 1). Este modelo representa as etapas entre a competição planta-patógeno, partindo do momento em que a planta reconhece um padrão molecular infeccioso (DAMP/PAMP) por meio de PRRs, gerando uma ‘imunidade induzida por DAMP (DTI ou PTI). Na fase 2, os patógenos sobreviventes implantam moléculas efetoras a fim de suprimir o sistema imune da planta, contribuindo para sua virulência. Estes efetores abalam PTI, resultando em ETS (susceptibilidade causada por efector). Em um terceiro momento, a proteína NB-LRR reconhece o efector, direta ou indiretamente, desencadeando uma imunidade causada por efector (ETI), uma imunidade mais rápida e eficaz do que PTI, podendo culminar em morte celular no local da infecção, ou seja, uma reação de hipersensibilidade (HR). Na quarta fase do sistema, o patógeno dribla ETI através da própria seleção natural de indivíduos mais aptos, produzindo novos tipos de efetores e promovendo, mais uma vez, ETS. A seleção natural pode atuar também selecionando novas proteínas R, desencadeando mais uma ETI e assim por diante.

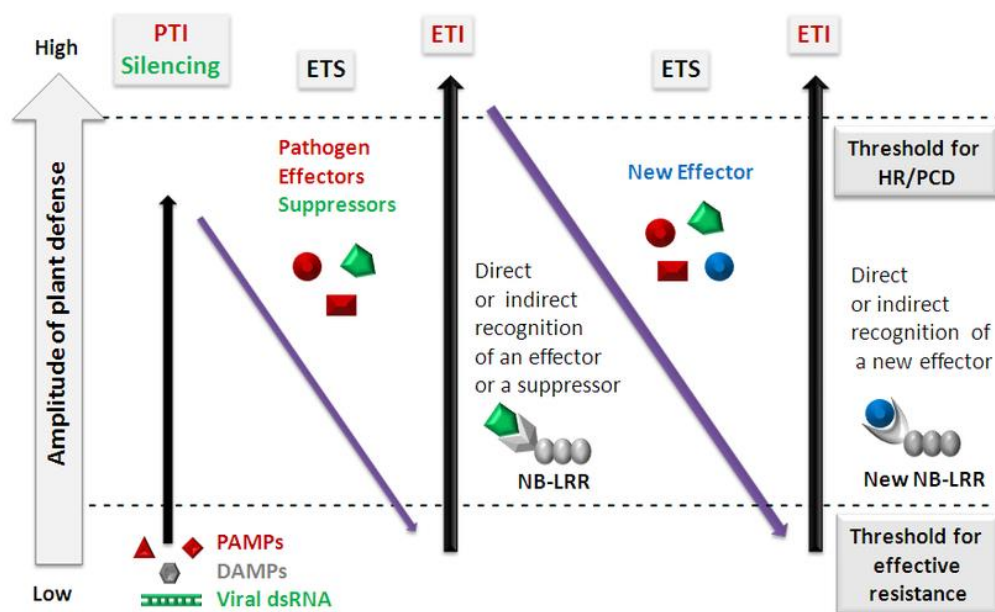


Figura 1: Modelo “zig-zag” do funcionamento do sistema imune de plantas (JONES; DANGL, 2006).

Plantas fazem uso de diversas estratégias para responder aos sinais de infecção. Alterações hormonais coordenadas consistem em uma importante via de resposta de defesa de plantas contra patógenos invasores (PIETERSE *et al.*, 2012). O ácido salicílico, o ácido jasmônico e o etileno são as três principais moléculas que atuam na sinalização basal à invasão

de patógenos. O etileno atua nos mecanismos de defesa à ferimentos mecânicos, por exemplo causado por pragas herbívoras. O ácido jasmônico atua nas vias de sinalização de respostas à ferimentos. Já a sinalização dependente de ácido salicílico é crucial na defesa às invasões localizadas e sistêmicas por bactérias e fungos biotróficos (LORENZO; SOLANO, 2004; CAMPE *et al.* 2014). Esses três mecanismos de defesa podem ocorrer de forma integrada.

Tendo em vista as dificuldades encontradas no controle de *P. pachyrhizi* em soja, dá-se a importância do estudo do sistema imune de plantas como uma ferramenta para a agricultura moderna.

2.3. Ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*)

A ferrugem asiática é considerada uma das principais doenças da cultura da soja e tem como agente causal o fungo *Phakopsora pachyrhizi*. A doença acarreta prejuízos anuais bilionários causando danos de 10 a 90% nas mais diversas regiões nas quais ela incide, perdas consequentemente da desfolha precoce o que compromete a formação, o enchimento das vagens e o peso final dos grãos (GODOY *et al.*, 2020b).

Phakopsora pachyrhizi pertence a divisão Basidiomycota, que são fungos que apresentam uma fase dicariótica em seu ciclo de vida. São filamentosos, com hifas septadas e com poro central nos septos. Apresentam parede celular quitinosa, possuem capacidade para anastomose de hifas vegetativas (somatogamia), produzem protuberantes corpos de frutificação, têm mecanismos de lançamento forçado dos esporos sexuais e algumas espécies produzem conídios anamorfos (KRUGNER; BACCHI, 1995).

A ferrugem asiática está compreendida na ordem Puccinales e no gênero *Phakopsora*. É um patógeno obrigatório, ou seja, biotrófico, que necessita do seu hospedeiro vivo para se desenvolver e se multiplicar. O ciclo de vida deste fungo é complexo, podendo ser necessário dois diferentes hospedeiros, portanto denominado macrocíclico (AIME; MCTAGGART; MONDO, 2017). Possuem vários tipos de estruturas de frutificação, cada uma referente a uma fase do ciclo de vida deste patógeno (WELFORT, 2018). O processo de colonização pode ser dividido em fase de penetração, em que o esporo do patógeno ao germinar, libera apressórios e acessa o interior do hospedeiro; fase biotrófica, iniciada quando o fungo se estabelece na planta ao formar a estrutura denominada de haustório, especializada na absorção de nutrientes e assim se desenvolve; e ,por último, fase reprodutiva (ou esporulação) em que este forma pústulas

contendo esporos que se disseminam pelo vento (KOCH; EBRAHIMNESBAT; HOPPE, 1983; MESQUITA *et al.* 2016).

Godoy *et al.* (2020b) identificou alguns possíveis hospedeiros alternativos da ferrugem asiática da soja, incluindo o amendoim (*Arachis hypogaea*), o feijão-guandu (*Cajanus cajan*) e a crotalária (*Crotalaria* spp.). Essas plantas podem abrigar o fungo e, quando presentes em grandes quantidades nas áreas próximas às lavouras de soja, podem contribuir para a disseminação da doença. Contudo, sabe-se que ainda é pouco conhecida a diversidade de plantas hospedeiras desse patógeno.

O fungo *P. pachyrhizi* se desenvolve na umidade da superfície foliar, em temperatura amena, abaixo de 28°C, causando uma redução na capacidade fotossintética da folha (MARCHETTI; MELCHING; BROMFIELD, 1976). O aparecimento de pequenas pontuações marrons escuras na face superior da folha (face adaxial) da soja é um dos primeiros sinais observados na infecção por ferrugem, mas que nem sempre é rapidamente identificado. Posteriormente, ocorre a formação de haustórios, no interior da folha, que se associam às membranas celulares da planta. Com o desenvolvimento no interior do tecido vegetal, formam-se, na parte inferior da folha (face abaxial), pequenas verrugas denominadas urédias. As urédias são como uma massa pulverulenta alaranjada, as quais abrigam os uredósporos, que são os esporos da fase assexual do fungo (PELIN; WORDELL FILHO; NESI, 2020). A coloração dessas pústulas é que dá o nome de ferrugem ao grupo de fungos.

O ar é o principal meio de dispersão dos uredósporos, que iniciam uma nova infecção ao germinar. Ao contrário de outras ferrugens que apresentam capacidade de penetrar nas folhas vegetais apenas pelos estômatos, a ferrugem asiática da soja também é capaz de penetrar diretamente pela epiderme foliar (GOELLNER *et al.*, 2010).

Segundo Almeida *et al.* (2020) o fungo *P. pachyrhizi* estimula vias de ácido jasmônico e de etileno no início de sua infecção, em detrimento da via do ácido salicílico, aparentemente a fim de atrasar a defesa da planta e se estabelecer no tecido vegetal foliar. Há uma necessidade de estudar os efeitos produzidos por *P. pachyrhizi* para compreender como se dá a manipulação fisiológica do hospedeiro e os mecanismos que fundamentam sua patogenicidade, sistemas mais bem explorados em plantas modelo como *N. tabacum*, *Arabidopsis* e tomateiros (QI *et al.*, 2017).

É imprescindível o diagnóstico precoce da ferrugem asiática na lavoura, sendo as práticas de manejo mais efetivas àquelas realizadas com caráter preventivo (SOUZA, 2015). No auxílio

dessas práticas de controle deve-se evitar o plantio em épocas favoráveis a doença e o uso de cultivares precoces, para que o fungo não ataque plantas muito jovens. O controle de plantas invasoras também é importante, pois *P. pachyrhizi*, além da soja, parasita outras espécies de plantas, inclusive daninhas (BROMFIELD, 1984).

Devido a eficiente capacidade reprodutiva do fungo e sua alta variabilidade genética, se torna dificultosa a obtenção de cultivares resistentes para a ferrugem da soja, considerando a existência de inúmeras raças de *P. pachyrhizi*. Estudos realizados no Japão, identificaram 18 raças do patógeno, para as condições daquele país (YAMAOKAL *et al.*, 2002). Dessa forma, a obtenção de um cultivar resistente pode ter essa resistência quebrada facilmente em curto espaço de tempo. O controle químico é eficiente, porém seu uso excessivo provoca seleção de raças resistentes (HEANEY *et al.*, 1994).

2.4. Indutores de resistência em plantas – elicitores

Os elicitores podem ser classificados como abióticos ou bióticos (PATEL; KRISHNAMURTHY, 2013), sendo o último caracterizado ainda como endógeno, quando produzido pela própria planta, ou exógeno, quando proveniente do organismo agressor. Elicitores exógenos são agrupados em: gerais ou específicos, dependendo da sua característica de reconhecimento. Dessa forma, classifica-se os oligogalacturonídeos (OGs) como elicitores químicos, bióticos de origem endógena, pois são oriundos da degradação de compostos da parede celular vegetal e, portanto, especificados como DAMP (*Damage Associated Molecular Patterns*) (PATEL; KRISHNAMURTHY, 2013).

Os OGs são designados como polímeros de alpha-1,4-D *galacturonic acid*. São carboidratos naturalmente oriundos da hidrólise da parede celular vegetal na presença do patógeno, ou seja, são subprodutos da celulose, hemicelulose ou pectina, liberados quando patógenos provocam degradação enzimática da parede para acessar o conteúdo intracelular. A pectina, presente nos tecidos vegetais, é rica do polissacarídeo homogalacturonano (HGA) e a degradação de HGA pelas pectinases secretadas pelos fungos origina as frações de OGs. Os OGs também podem se originar na liberação de enzimas hidrolíticas secretadas pela própria planta em situações de injúria. HGA é sintetizado pelo complexo golgiense e depositado na parede celular, local onde sofre um processo de desesterificação pela ação de enzimas, em diferentes graus dependendo das circunstâncias, o que influencia, posteriormente, na produção dos OGs. A presença de OGs

é uma evidência da existência de um mecanismo de monitoramento de dano tecidual por meio da identificação de HGA degradado (FERRARI *et al.*, 2013).

A elicitação por OGs ocorre por meio do reconhecimento pelos receptores WAKs (quinases associados à parede). Este reconhecimento desencadeia a fosforilação de duas MAPKs: AtMPK2 e AtMPK6, sendo a última descrita como necessária para ativação precoce da transcrição de genes de resistência nas plantas. Domínios N-terminais de ligação na pectina, carregados por WAKs, são capazes de interagir com HGA e OGs não metilesterificados de maneira quimicamente dependente aos níveis de Ca^{+2} . Também, OGs desencadeiam reações oxidativas mediadas por NADPH, o que acarreta a deposição de calose. OGs são capazes de estimular a liberação de sinais endógenos, sistêmicos e de baixa quantidade, promovendo a remodelação da parede celular (FERRARI *et al.*, 2013).

Em Hahn, Darvill e Albersheim (1981), pela primeira vez observaram que plantas expostas a oligossacarídeos (DAMPs), sintetizaram fitoalexinas, compostos com atividade antimicrobiana. Outros estudos identificaram a capacidade de OGs em induzir (elicitar) várias respostas do sistema imune, como a expressão de genes de defesa (FERRARI *et al.*, 2013; SINGH *et al.*, 2019), o aumento na atividade de enzimas glucanase e quitinase (DAVIS; HAHLBROCK, 1987; BROEKAERT; PEUMANS, 1988), deposição de calose, a produção de espécies reativas de oxigênio (BELLINCAMPI *et al.*, 2000; GALLETTI *et al.*, 2008), e de óxido nítrico (RASUL *et al.*, 2012).

A indução de resistência (IR) em plantas vem sendo pensada como uma alternativa para estímulo de mecanismos naturais por meio de agentes bióticos ou abióticos (elicitors/efetores) fazendo uso de fatores inatos, ou seja, genéticos, do hospedeiro vegetal (PASCHOLATI; MELO; DURIGAN, 2015). A indução de resistência em plantas pode provocar um efeito “*priming*” preparando as plantas para a infecção, para que haja uma resposta mais rápida e eficiente quando ocorrer o real contato com o agente patogênico (SINGH *et al.*, 2019).

O uso de compostos indutores de resistência já vem sendo estudado para culturas cítricas como proteção ao huanglongbing (MATTOS JR. *et al.*, 2017), contra *Phytophthora infestans* em culturas de batata (VAN AUBEL *et al.*, 2018), contra oídio (*Sphaerotheca fuliginea*) que acometem pepineiros e videiras (VAN AUBEL *et al.* 2014), etc. Inclusive, já se encontra disponível comercialmente agentes químicos, como por exemplo o produto FytoSave® (LITDA Plant Research) desenvolvido com base em moléculas de pectina e quitosana que, segundo a empresa, a formulação com complexos de oligossacarídeos estimula

preventivamente as defesas das plantas apoiando a realização de uma agricultura ecologicamente intensiva.

O grau de polimerização dos OGs (número de monômeros associados) relaciona-se diretamente com a efetividade do reconhecimento pela planta através PIMS (“sistema de monitoramento da integridade de pectina”). Segundo Côté e Hahn (1994), OGs com grau de polimerização entre 10 e 15 são reconhecidos por *Phaseolus vulgaris*. Moloshok, Pearce e Ryan (1992) observaram que OGs curtos (grau de polimerização de 2 a 6) provocaram elicitação em) tomateiro.

Segundo Ferrari *et al.* (2013) os OGs assumem relevância não somente no sistema de defesa da planta, mas também nos mecanismos reguladores de crescimento. Em 1988, pela primeira vez foi observado que as auxinas, cruciais para o desenvolvimento vegetal, são antagonizadas pelos OGs (BRANCA; DE LORENZO; CERVONE, 1988). OGs são capazes de interferir na ativação de promotores que sofrem regulação de auxinas, inibindo a transcrição de genes, estabelecendo um ciclo de feedback negativo. A aplicação do produto em estágios específicos do desenvolvimento vegetal evita efeitos indesejáveis na cultura.

O presente projeto de mestrado teve como objetivo compreender de forma holística e integrada os processos fisiológicos, bioquímicos e moleculares envolvidos na ativação da resposta imune da planta de soja por OGs, na exposição à *Phakopsora pachyrhizi*.

3. OBJETIVOS

Dentre os principais objetivos deste trabalho estão:

- i) Compreender as respostas moleculares envolvidas no sistema de defesa da planta de soja contra a invasão do patógeno *P. pachyrhizi* por meio do proteoma da soja;
- ii) Explorar as respostas da planta à elicitação promovida pelos OGs através do proteoma da soja;
- iii) Observar os mecanismos de defesa provocados pelos OGs, no patossistema soja – *P. pachyrhizi*, analisando proteínas e metabólitos produzidos pela planta ao longo do tempo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Preparação e caracterização de OGs

A formulação contendo oligômeros de [1-4]- α -D-ácido galacturônico, com grau de polimerização entre 3-8, foi preparada em nosso laboratório utilizando ácido poligalacturônico (PGA) como substrato, tomando-se como base o protocolo proposto por Spiro (1993), procedimento já estabelecido.

A mistura contendo OGs foi quantificada pelo método de quantificação de ácidos urônicos proposto por Blumenkrantz & Asboe-Hansen (1973) e a confirmação da presença dos OGs na mistura com grau ideal de polimerização (DP 3-8) foi feita em modo negativo pela técnica de espectrometria de massas através da análise de ionização por dessorção a laser assistida por matriz seguido pela detecção em um analisador do tipo tempo de voo, MALDI-TOF SCIEX TOF/TOF 5800 System.

4.2. Material vegetal

Duas variedades de soja foram utilizadas neste trabalho. Para os ensaios realizados em câmara de crescimento, foi utilizada a variedade Williams 82, pois se trata de uma cultivar menos empregada em programas de melhoramento, tem seu genoma bem explorado e é suscetível à *P. pachyrhizi* (HAUN *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2010, 2012; NELSON; SHOEMAKER, 2006). As plantas foram conduzidas em câmara de crescimento (Conviroon E15), com fotoperíodo, temperatura e umidade ajustados conforme a programação indicada abaixo (Tabela 1). Nestas condições, a medição de intensidade de luz indicou aproximadamente $250 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Tabela 1: programação de fotoperíodo e temperatura da câmara de crescimento Conviron E15

Horário	Temperatura (°C)	Lâmpadas fluorescentes (40W)	Lâmpadas Incandescentes (60W)
0:00	21	0	0
6:00	22	1	1
6:15	24	2	2
6:30	25	3	3
19:30	24	2	2
19:45	22	1	1
20:00	21	0	0

Para o ensaio realizado em casa de vegetação, a variedade utilizada foi M5917 IPRO, Monsoy®, tendo em vista as características de fotoperíodo da região onde os ensaios foram conduzidos (Piracicaba – São Paulo) e pela susceptibilidade às doenças de final de ciclo. Esta cultivar apresenta precocidade relativa, amplitude de época de plantio e arquitetura ereta, características importantes para a condução dos experimentos em casa de vegetação.

4.3. Obtenção do inóculo

O inóculo de *Phakopsora pachyrhizi* utilizado no ensaio para análises ômicas foi cedido pela Embrapa Soja, Londrina –PR. O inóculo do patógeno, foi multiplicado em plantas de soja da variedade Williams 82, *in vivo* no estágio V3 de desenvolvimento. As plantas foram expostas ao patógeno, por meio de aspersão, depois cobertas com sacos plásticos e mantidas por cerca de 24 horas completamente privadas de luminosidade, sendo a umidade das folhas mantidas a 75% aproximadamente até a esporulação. Em seguida, as plantas foram expostas ao regime de

luz ($200 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$)/escuro de 12/12 h. Os esporos foram coletados em Placa de Petri, com auxílio de pincéis, raspando as pústulas da face abaxial das folhas.

Para a realização do ensaio biológico, os esporos foram coletados no dia anterior e armazenados em -80°C . No dia da montagem do experimento em câmara de crescimento controlado (Conviron E15), foi preparada uma suspensão de esporos em solução salina (NaCl 1%) e, com o auxílio de hematocítmetro (câmara de Neubauer), a quantidade de esporos foi contada e calculada.

Para confirmação da viabilidade, a suspensão de esporos de concentração conhecida foi plaqueada pela técnica de espalhamento em Placas de Petri de 15cm com 10mL de meio sólido ágar-água (1,5%), em três diluições seriadas (diluída 10, 100 e 1000 vezes). Após aproximadamente 24 horas, foi realizada a contagem de esporos que germinaram e que não germinaram, com auxílio de lupa. Foi estimada a taxa de germinação, que, para o experimento foi superior à 85%.

4.4. Ensaio biológico para determinar o impacto dos OGs no desenvolvimento da soja

A fim de mensurar possíveis impactos causados pelos OGs no desenvolvimento da planta de soja, a variedade comercial M5917 foi conduzida em vasos de 8 litros, contendo em cada vaso apenas uma planta. Houve uma seleção prévia das plantas para que houvesse uma homogeneidade no ritmo de desenvolvimento destas.

As plantas foram expostas à pulverização de 10 mL de solução de OGs em água deionizada na concentração de $100 \mu\text{g/mL}$. A diferença entre os tratamentos foi o momento da aplicação: **Controle:** não houve aplicação de OG; **A:** aplicação de OG no estágio V2/V3; **B** aplicação em V5/V6; **C:** aplicação em R1/R2 e **D:** aplicação em R5, durante o enchimento dos grãos. Os vasos foram aleatorizados na casa de vegetação em cinco blocos, contendo em cada bloco 10 plantas. Dentro de cada bloco, haviam duas plantas do mesmo tratamento.

No início do estágio reprodutivo, foi contabilizado o número de flores de cada planta (variável denominada “flores” para posteriores análises); em R4/R5 contou-se as vagens (variável “vagens”) e, próximo a finalização do ensaio, contabilizou-se o número de folhas (“folhas”) e o tamanho das plantas em centímetros (“tamanho”). O ensaio foi finalizado quando

os grãos das vagens pararam de encher e as plantas iniciaram o processo de senescência. Cada planta teve suas vagens colhidas separadamente e armazenadas em sacos de papel. Os grãos foram debulhados, contabilizados e pesados (“sementes” e “peso (mg)”).

Os dados foram sumarizados em tabelas e analisados no programa RStudio (RSTUDIO TEAMS, 2020). Os dados de todas as variáveis analisadas foram submetidos ao teste de normalidade *Shapiro-Wilk*. As variáveis aprovadas no teste de normalidade foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e posteriormente ao teste Tukey para comparação das médias de cada tratamento em relação ao controle. As variáveis reprovadas no teste de normalidade foram submetidas a normalização pela raiz quadrada e, na impossibilidade de normalização, ao teste estatístico *Kruskal-wallis*. Os tratamentos foram considerados diferentes somente onde foi identificado valor de $p \leq 0,05$.

4.5. Ensaios biológicos para análises ômicas

A fim de compreender as respostas moleculares das plantas de soja tratadas com OGs e expostas a *P. pachyrhizi* por meio de análises de proteoma e metaboloma, plantas de soja da variedade Williams 82 foram cultivadas em condições controladas, conforme descrito em 4.2. As plantas foram submetidas à tratamento quando 50% dos indivíduos atingiram o estágio R1/R2 de desenvolvimento fenológico (PURCELL; SALMERON; ASHLOCK, 2014). Cada experimento foi realizado com quatro tratamentos diferentes: **T1**) plantas não expostas ao patógeno nem aos OGs, somente água; **T2**) plantas expostas aos OGs e não ao patógeno; **T3**) Plantas expostas ao patógeno e não aos OGs e **T4**) plantas expostas ao patógeno de *P. pachyrhizi* e aos OGs. Cada tratamento foi aplicado em 6 plantas, sendo ao todo 24 plantas aleatorizadas dentro de 6 blocos dentro da câmara de crescimento (Figura 2).

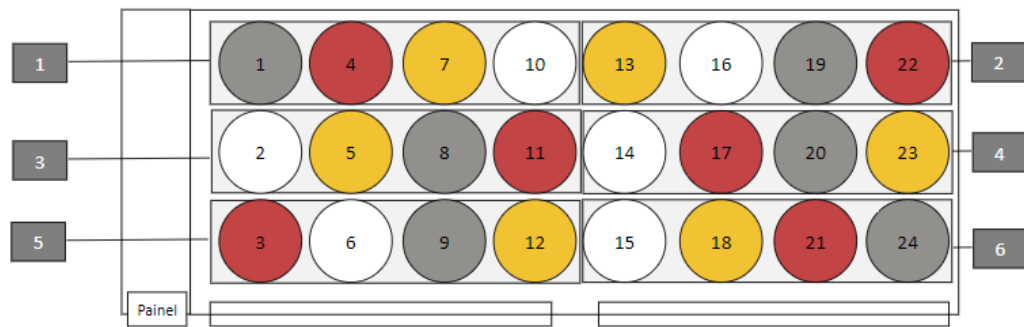


Figura 2: Croqui da disposição dos vasos dentro da câmara de crescimento. Os vasos foram aleatorizados dentro de seis blocos, sendo os círculos em branco a representação do tratamento **T1** (controle), **T2** cinza (plantas tratadas somente com OGs); **T3** amarelo (somente com ferrugem) e **T4** vermelho (OGs e ferrugem). Os retângulos enumerados nas laterais da imagem indicam os blocos de aleatorização dos vasos.

No dia da realização dos ensaios, as plantas foram ensacadas e o sistema de fotoperíodo da câmara de crescimento foi interrompido. Na primeira aplicação, nos tratamentos T2 e T4 as plantas foram aspergidas com 10mL da solução de OGs na concentração de 100µg/mL, ao passo que, simultaneamente, nos tratamentos T1 e T3, o mesmo volume de água deionizada foi aplicado (controle).

Após 1 hora da primeira aplicação, realizou-se a segunda aplicação em que, as plantas dos tratamentos T3 e T4, foram expostas a uma suspensão de $6,38 \times 10^6$ esporos/mL e aspergidas até o encharcamento. Simultaneamente, nos tratamentos T1 e T2, o mesmo volume de água deionizada foi asperso. As plantas permaneceram ensacadas durante as aplicações para impedir infecção cruzada.

Amostras de material biológico (folhas) foram coletadas previamente (1h) e após a inoculação em 6, 12, 24 e 48 horas. As folhas foram coletadas e imediatamente colocadas em nitrogênio líquido para posterior preservação em *ultrafreezer* (-80°C). Em 6 e 12 horas tem-se o período crítico de resposta da elicitação induzida por OGs (DENOUX *et al.*, 2008; OSORIO *et al.*, 2008) e os tempos de coletas subsequentes foram realizados a fim de confirmar o perfil diferencial da infecção das plantas.

4.5.1. Testemunhas do ensaio biológico para análises ômicas

Tendo em vista que as coletas de amostras nas condições supracitadas destruíram as plantas de soja submetidas ao tratamento, das seis plantas expostas a cada tratamento, em apenas cinco foram realizadas as coletas e uma foi deixada como testemunha para confirmar infecção por *P. pachyrhizi*. A progressão da doença foi acompanhada visualmente realizando registros fotográficos e avaliando através de escalas de notas segundo Godoy, Koga e Canteri (2006), sem caráter estatístico.

4.6. Análise de proteôma

Em um moinho de bolas (Retch MM400), 100 mg de tecido foliar foi macerado por 1 min à 20 Hz e homogeneizado em 0,8 mL de tampão de extração de proteínas (0,5M Tris-HCl pH 7,5; 0,7M Sacarose; 0,1M KCl; 50 mM EDTA; 1mM PMSF; 2% (v/v) β -mercaptoetanol e 1% (m/v) PVPP). Posteriormente, foi adicionado 0,8 mL de solução fenólica concentrada em Tris-HCl (pH 7,5), e as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm e 4 °C por 30 min. O sobrenadante foi recuperado e este processo repetido por três vezes. A precipitação das proteínas foi realizada em 1,2 mL de solução 0,1M de acetato de amônio em metanol e os pellets foram lavados com a mesma solução (duas vezes) e acetona (uma vez). Após a última centrifugação, os pellets foram secos e as proteínas ressuspensas em 0,4 mL de tampão de solubilização (7M ureia, 2M tiourea, 10 mM DTT e 0,4% v/v Triton X-100). As proteínas do sobrenadante foram dessalinizadas em tampão bicarbonato de amônio 50mM (pH 8,5) em filtro Amicon 3 kDa (Millipore) e quantificadas utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976). Para averiguação da qualidade das amostras e confirmação da quantidade, foram realizados géis de poliacrilamida 12% corados com Comassie Blue G250, utilizando albumina bovina (BSA) como padrão interno (LAEMMLI, 1970).

Para cada 50 μ g de proteínas, foram adicionados 25 μ L de *RapiGest* SF 2% (Waters). As amostras foram incubadas à 80 °C por 15 min, posteriormente reduzidas em 2,5 μ L de 100 mM DTT por 30 min à 60 °C e alquiladas em 2,5 μ L IAA por 30 min no escuro. Proteínas foram digeridas em 10 μ L de solução de tripsina (50 ng/ μ L) a 37 °C por 16 h, e a reação interrompida utilizando 10 μ L de solução 5% TFA. As amostras foram centrifugadas à 14.000 rpm, 6 °C, por 30 min, e o sobrenadante contendo os peptídeos foi transferido para novos tubos para

concentração utilizando *SpeedVac*. Os peptídeos foram ressuspensos em 50 μL de 0,1% TFA, purificadas utilizando micro-colunas de fase reversa (Zip-Tip C18, Millipore) e secas.

As amostras foram injetadas em uma coluna *Aurora 2 C18 trap column* (1.6 μm , 250mm x 75 μm), da ionOpticks, Austrália, em alíquotas de 1 μL contendo aproximadamente 200ng de peptídeos digeridos. Um gradiente típico RP (Solvente A: 0.1% AF, 99.9% H_2O MilliQ; Solvente B: 0.1% AF, 99.9% CH_3CN) foi estabelecido em um sistema de *nanofluxo* de cromatografia líquida e separado a uma taxa de fluxo de 250nL.min⁻¹. A temperatura da coluna foi mantida em 50°C. A corrida cromatográfica foi de 120 min (2% a 15% do Solvente B durante 60 min; elevada a 25% aos 90 min; elevada a 37% aos 100 min; elevada a 95% aos 110 min e finalmente 95% por 10 min para lavagem da coluna). As análises de espectrometria de massas foram realizadas com o auxílio do sistema cromatográfico *nanoElute nanoflow*, da Bruker Daltonics, Bremen, Germany, acoplado *online* a um espectrômetro de massas *hybrid trapped ion mobility spectrometry-quadrupole time-of-flight mass spectrometer-timsTof Pro*, da Bruker Daltonics

No modo *online*, a coluna foi acoplada ao tims-TOF-Pro juntamente com uma fonte de íons *CaptiveSpray*, ambos da Bruker Daltonics GmbH. Ajustou-se a temperatura da linha de transferência capilar de íons para 180°C. O acúmulo de íons, por 123ms e a separação por mobilidade foram obtidos com uma rampa de potencial de entrada de -160V a -20V dentro dos 123s.

Para habilitar o método PASEF, *i.e.*, durante a aquisição a fragmentação dos íons, as informações de precursor de m/z e mobilidade foram derivadas de um experimento de *full scan Tims-MS*, com uma faixa de m/z de 100-1700. Foram excluídos precursores monocarregados por sua posição no plano m/z -*ion* de mobilidade, e os precursores que atingiram o valor alvo de 20.000 *a.u.* foram dinamicamente excluídos por 0,4 min. O modo operacional do Tims-ToF, MS e PASEF foi controlado e sincronizado com o auxílio do *software* OtofControl 5.1 de controle instrumental da Bruker Daltonics ®.

Utilizando-se o Software MaxQuant (Version 2.1.3.0) foi realizado o processamento dos dados, a identificação de proteínas e as análises de quantificação relativa. Os parâmetros de processamento incluíram: carbamidometilação da cisteína como modificação fixa de aminoácidos. Já a oxidação da metionina e acetilação da região N-terminal, foram consideradas como variações mutáveis. A tripsina foi utilizada como enzima proteolítica, com o máximo de três possíveis erros de clivagem. Foi aceita uma taxa máxima de falso positivo (FDR) de 1%

para identificação de peptídeos e proteínas, considerando-se como critério, ao menos um peptídeo único para identificação de proteínas. Todas as proteínas foram identificadas com um grau de confiança $\geq 95\%$, utilizando-se o algoritmo do MaxQuant Software, realizando busca dentro da base de dados de proteínas de “*Glycine max* Wm82.a4.v1 – soybean” (Phytozome v.13). Análise subsequente, foi desenvolvida com auxílio do Software Perseus (Version 2.0.6.0). Os arquivos “proteinGroups.txt” gerados pelo processamento do MaxQuant foram utilizados para as análises, e todas as linhas listadas como sendo: *Reverse*, *Only identified by site* e *Potential contaminat*, foram removidas. Somente as proteínas identificadas em $>80\%$ das cinco repetições biológicas, de pelo menos um grupo amostral, foram consideradas para a análise estatística, realizada com auxílio do Software Metaboanalyst 5.0.

4.7. Análise estatística de proteínas

Para compreender os impactos da ferrugem na planta de soja (tópico 5.1 – comparação entre os tratamentos T3 e T1) uma análise univariada foi aplicada nos dados de 24 horas pós inoculação (hpi). Este horário foi definido considerando alguns fatores: i) o alto número de proteínas diferencialmente abundantes; ii) LEE *et al.* (2009) observaram que plantas de soja após 6 horas da infecção por *P. pachyrhizi* ainda não haviam estabelecido infecção na planta e iii) em 12 horas os resultados podem ser confusos pois, por se tratar de uma coleta noturna, há alterações fisiológicas da planta decorrentes do ciclo circadiano (MARCOLINO-GOMES *et al.*, 2014); iv) em 48 horas algumas alterações podem ser decorrentes da destruição da planta durante as coletas de folhas nos horários anteriores.

Para explorar o impacto dos OGs no desenvolvimento da planta de soja (tópico 5.2 – comparação entre os tratamentos T2 e T1) uma análise univariada foi aplicada nos dados de 6 hpi. Este horário foi definido considerando também que em 12 horas os resultados podem ser influenciados pelo ciclo circadiano e em 48 horas há efeitos decorrentes da destruição da planta. Além disso, considerou-se trabalhos que demonstram que os OGs são capazes de estimular a superexpressão de genes relacionados à fenilalanina amônia liase em até 4 horas (ASLAM *et al.*, 2009) e dados indicaram que o máximo de transcritos induzidos por OGs é obtido entre 2 e 5 horas (AZIZ; HEYRAUD; LAMBERT, 2004). Em 1 hora houve uma quantidade menor de proteínas diferencialmente abundantes do que em 6 horas, portanto, 6 horas foi o tempo selecionado.

Para explorar quais proteínas tiveram suas abundâncias alteradas nos horários selecionados, aplicou-se a análise *T-test*, observando a plotagem das proteínas por meio do *Volcano Plot* que associa as análises ao valor *Fold Change* (FC). Possíveis *outliers* foram anotados com a análise *RandomForest*, dentre análises univariadas do Metaboanalyst 5.0. Foram consideradas como proteínas diferencialmente abundantes aquelas que apresentaram o valor de $p < 0,05$. Por meio de iPCA foi analisado o padrão de variação dos dados. Através das mesmas ferramentas obteve-se um panorama da quantidade de proteínas reguladas positivamente e negativamente em cada horário de coleta.

Para compreender o efeito do OG na presença de *P. pachyrhizi* (tópico 5.3 – comparação entre os tratamentos T4 e T3), uma análise multivariada do Metaboanalyst 5.0 foi aplicada em todos os horários de coleta com o objetivo de estabelecer um *time course*. A análise de ASCA (*ANOVA-simultaneous component analysis*) permite explorar a variação entre os tratamentos ao longo do tempo através da análise ANOVA de dois fatores. A análise de variância considerou os fatores: “grupos” (T4 e T3) e “tempo” (pontos de coleta), para estabelecimento do *time course*. Foi realizada a validação dos dados através de 20 permutações entre os tratamentos. Foi possível excluir proteínas que variaram somente de acordo com o tempo, isolando proteínas relacionadas ao efeito do desenvolvimento natural da planta de soja, fatores como luminosidade etc. Tanto na análise univariada como na multivariada, os dados foram transformados por log de base 10 e submetidos a *pareto scaling*.

4.8. Análise funcional de proteínas

Para compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos na resposta da planta de soja aos dois fatores (tempo e tratamento), todas as proteínas apontadas como diferencialmente abundantes nas análises estatísticas descritas acima foram submetidas à análise funcional. Para isso, o programa Blast2Go Basic 6.0 foi utilizado para busca dos termos GOs. Os termos GOs das proteínas diferencialmente abundantes foram analisados usando o AgriGO 2.0 (<<http://systemsbiology.cpolr.cn/agriGOv2/>>) (TIAN *et al.*, 2017). A metodologia de análise foi a SEA (*Singular enrichment analysis*) (BATISTA *et al.*, 2017). Termos GOs foram considerados significativos quando apresentaram $FDR < 0,05$.

4.9. Análise metabolômica: GC-MS

As amostras obtidas no ensaio biológico, foram maceradas manualmente em almofariz com nitrogênio líquido para posterior homogeneização em moinho de bolas (Retch MM400) por 1 min à 20 Hz. A extração dos metabólitos foi conduzida seguindo o estabelecido por (GULLBERG *et al.*, 2004), utilizando 20 mg de material vegetal e 400 µL de solução extratora composta de clorofórmio: água: metanol (1:1:3) contendo ácido succínico (D4, 98%), ácido mirístico (1,2,3-¹³C3, 99%) e ácido palmítico (1,2,3,4-¹³C4, 98%) como padrões internos.

As amostras foram submetidas a sonicator por 15 min, acrescido de gelo para garantia da integridade do material. Em seguida, foram centrifugadas por 10 min a 4 °C e 16.000 g, e o sobrenadante foi filtrado (Millipore PVDF 0,22 µm) para a remoção de contaminantes. Alíquotas de 100 µL foram liofilizadas a -50 °C e derivatizadas como descrito por (BUDZINSKI *et al.*, 2019). Após a derivatização, 30 µL de heptano foi adicionado às amostras para análise em cromatógrafo gasoso Agilent 7890A, equipado com colunas DB-5 (20 m x 0,18 mm i.d., 0,18 µm) utilizadas como coluna primária, e RX1-17 (Restek, Bellefonte, USA) (0,69 m x 0,1 mm i.d., 0,10 µm), utilizadas como coluna secundária, acopladas a um espectrômetro de massas GCxGC/TOF-MS (Pegasus 4D, Leco Corp., St. Joseph, USA), seguindo-se os parâmetros definidos por (PINHEIRO, 2020). As temperaturas da *transfer-line* e da fonte iônica foram de 280 e 250 °C, respectivamente. Íons foram gerados por um feixe de elétrons de 70-eV, sob uma corrente de ionização de 2.0 mA, e os espectros foram registrados entre 45-800 *m/z*.

Os parâmetros para a correção da linha de base, detecção dos picos e tempo de retenção foram fixados também conforme definido por Pinheiro (2020). A correspondência com a biblioteca foi ajustada para mínimo de similaridade de 700, realizada utilizando o Banco de Dados NIST v.11, por meio do *software* Leco ChromaTOF (versão 3.25). As intensidades dos metabólitos foram normalizadas pelo TIC (soma das contagens iônicas totais). Siloxanos e metabólitos ausentes em no mínimo 80% das amostras de um grupo foram excluídos.

4.10. Análise estatística de metabólitos

A metabolômica das plantas foi explorada para compreender os impactos dos OGs na planta de soja na presença de *P. pachyrhizi* (tópico 5.3.3.) comparando os tratamentos T4 e T3. Foi realizada uma análise de variância de dois fatores: “grupos” (T4 e T3) e “tempo” (pontos de

coleta), para estabelecimento do *time course*. A análise de ASCA foi aplicada e o modelo foi validado através de 20 permutações. Os metabólitos aqui avaliados foram os apontados como “*well-modelled*” pela análise de ASCA. Resultados foram considerados significativos quando FDR ajustado teve valor $p < 0,05$.

As análises univariadas de todos os horários de coleta foram desenvolvidas por meio do Metaboanalyst 5.0 (PANG *et al.*, 2022) buscando entender como os metabólitos, apontados como diferencialmente abundantes na análise multivariada, variaram ao longo do tempo. Em cada horário de coleta de amostras, a quantidade de metabólitos diferencialmente abundantes foi obtida por meio da análise *T-test*, observando a plotagem dos metabólitos por meio do *Volcano Plot* que associa as análises ao valor *Fold Change* (FC). Metabólitos *outliers* foram verificados através da análise *RandomForest*. Foram considerados metabólitos relevantes aqueles que apresentaram o valor de p menor que 0,1, sendo ajustado o limite de FC para 2.0. Tanto nas análises univariadas como nas multivariadas, os dados foram transformados por log de base 10 e submetidos a transformação *pareto scaling*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Impacto da ferrugem na planta de soja - análise de proteoma

Para melhor entender os impactos do patógeno da ferrugem asiática na planta de soja, análises univariadas foram aplicadas nos dados obtidos em cada tempo de coleta dos tratamentos T3 (plantas expostas à *P. pachyrhizi*) e T1 (controle). A figura 3 sumariza a quantidade de proteínas induzidas (que tiveram aumento de sua abundância) e suprimidas (diminuição da abundância) em cada tempo, de acordo com o resultado apresentado pela análise de *T-test*.

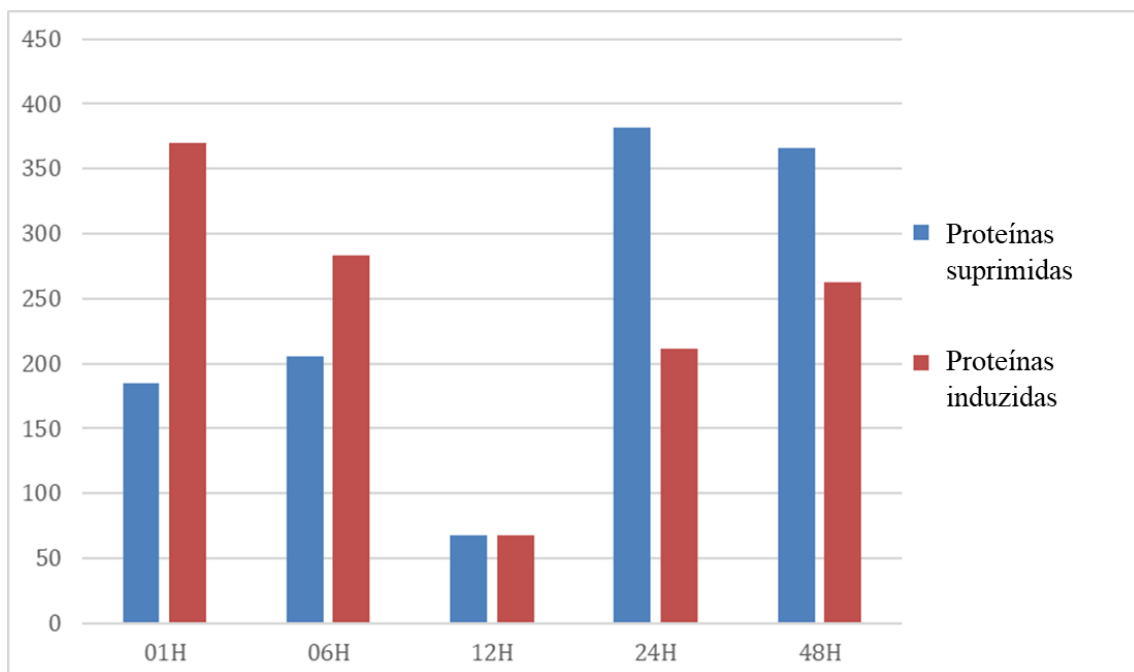


Figura 3: Sumarização da quantidade de proteínas suprimidas e induzidas em cada horário de amostragem comparando os tratamentos com e sem o patógeno (T3 e T1), em que T3: plantas expostas à *P. pachyrhizi* e T1 controle.

Como previsto, em 12 horas observa-se uma baixa quantidade de proteínas diferencialmente abundantes, o que pode ser efeito do ciclo circadiano e uma menor resposta metabólica à infecção.

É possível observar que em 1 e 6 hpi há um maior número de proteínas com abundância aumentada, ao passo que, em 24 e 48 horas os resultados se invertem, e tem-se um maior número de proteínas suprimidas. Como mencionado anteriormente, nas primeiras 6 horas de

infecção, *P. pachyrhizi* dificilmente se estabelece na planta (LEE *et al.*, 2009). Portanto, essa mobilização inicial na transcrição de proteínas pode ser uma resposta de defesa da planta e, nos momentos posteriores na infecção (em 24 e 48 horas) tem-se uma mobilização de vias que provavelmente foram suprimidas pela infecção do patógeno.

Explorando os dados obtidos em 24 hpi, a análise de componentes principais (PCA) explica a variação dos dados obtidos agrupando os dois tratamentos aqui observados conforme ilustrado na figura 4.

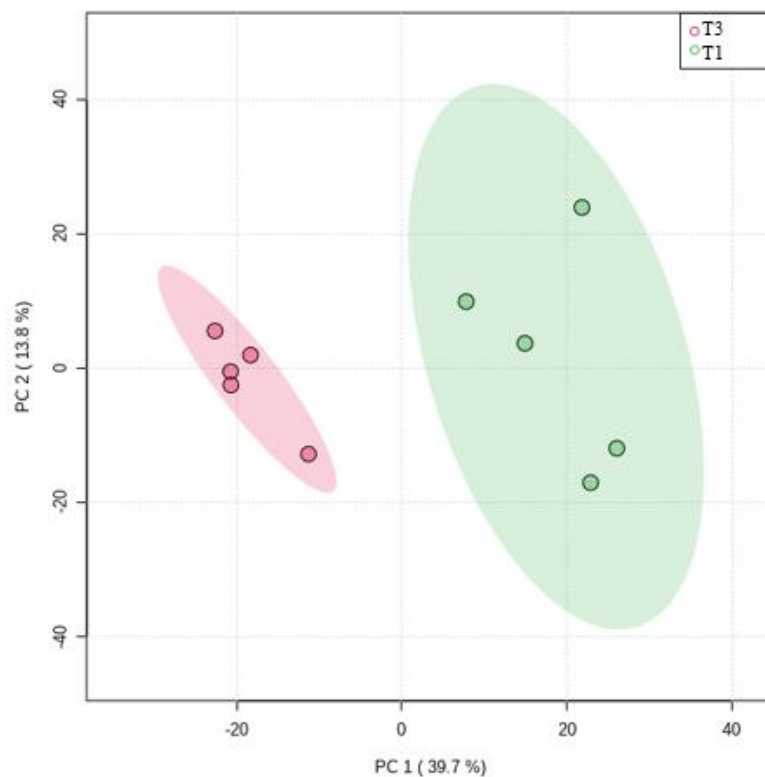


Figura 4: Plotagem de pontuações de componentes principais. As variações explicadas são mostradas entre parênteses nas legendas do eixo X e Y, em que T3: plantas expostas à *P. pachyrhizi* e T1 controle.

A análise de *T-test* retornou 593 proteínas diferencialmente abundantes em 24 hpi, sendo que 382 tiveram sua abundância diminuída na presença de ferrugem e 211 delas induzidas. O termo GO dessas proteínas foi processado pelo AgriGO 2.0 retornando a listagem abaixo com a sumarização dos processos biológicos (tabela 2).

Tabela 2: Listagem dos termos GOs significativos ($p > 0,05$) referente à processos biológicos da comparação entre os tratamentos T3 e T1.

Termo GO	Descrição	<i>P-value</i>
GO:0043574	Transporte peroxissomal	6,40E-10
GO:0006625	Proteína direcionada ao peroxissomo	6,40E-10
GO:0006749	Processo metabólico da glutathione	2,10E-09
GO:0006575	Processo metabólico derivado de aminoácidos celulares	1,30E-08
GO:0007031	Organização de peroxissomos	3,10E-08
GO:0017038	Importação de proteínas	5,50E-08
GO:0015996	Processo catabólico da clorofila	3,80E-06
GO:0046149	Processo catabólico de pigmento	3,80E-06
GO:0006979	Resposta ao estresse oxidativo	3,60E-06
GO:0006605	Direcionamento de proteína	1,00E-05
GO:0006787	Processo catabólico da porfirina	1,30E-05
GO:0033015	Processo catabólico do tetrapirrol	1,30E-05
GO:0051187	Cofator de processo catabólico	1,30E-05
GO:0015994	Processo metabólico da clorofila	3,60E-05
GO:0006790	Processo metabólico de enxofre	3,20E-04
GO:0042221	Resposta ao estímulo químico	4,20E-04
GO:0006066	Processo metabólico do álcool	4,10E-04
GO:0006778	Processo metabólico da porfirina	8,80E-04
GO:0044106	Processo metabólico da amina celular	8,80E-04
GO:0042440	Processo metabólico do pigmento	1,30E-03

Os termos GOs relacionados à processos biológicos mais enriquecidos foram: GO:0017038 (importação de proteínas); GO:0006625 (direcionamento de proteína ao peroxissomo); GO:0006749 (processo metabólico da glutatona); GO:0015996 (processo catabólico de clorofila); GO:0006979 (resposta a estresse oxidativo) e GO:0044106 (processo metabólico da amina celular). Estes termos estão indicados como extremidades finais no diagrama acima (figura 5).

Uma das principais respostas ao ataque de patógenos a plantas é a produção de espécies reativas do oxigênio. Estes, promovem mecanismos de defesa primários como reações para fortalecimento da parede vegetal, desintoxicação no combate de estresse oxidativo, resposta de hipersensibilidade (HR), entre outros (EMBRAPA, 2013). Observa-se uma alteração na abundância de proteínas relacionadas a peroxidases, transporte e organização peroxissomal e resposta a estresse oxidativo, congruente com resultados de outros trabalhos que exploraram proteínas em interações planta-patógeno (GILL; TUTEJA, 2010; JING *et al.* 2015).

O processo metabólico da amina celular é relacionado ao metabolismo de nitrogênio e à produção de aminoácidos. Segundo Van loon *et al.* (2006) posteriormente às primeiras respostas de defesa, eventos secundários incluem altas taxas de transcrição de proteínas PR, proteínas relacionadas à resposta de defesa que se acumulam na presença de patógenos.

Enzimas de glutatona S-transferase são descritas como indutíveis na planta em condições de estresse, destacando-se nas relações com patógenos. O papel desse metabolismo associa-se com a desintoxicação, modificando os sintomas da doença na indução de resistência sistêmica (GULLNER *et al.*, 2018).

A via catabólica da porfirina está relacionada a reciclagem do nitrogênio pela planta e outros nutrientes durante a senescência foliar (HÖRTENSTEINER, 2009). Além disso, também atua na defesa das plantas contra herbívoros e patógenos. Estudos recentes mostraram que o acúmulo de intermediários da porfirina, como o Mg-dequelatase e o “catabólito vermelho da clorofila”, são capazes de desencadear cascatas de sinalizadoras, induzindo a expressão de genes defesa vegetal e ativando a produção de ROS e fitormônios, como o ácido jasmônico e ácido salicílico (RYTER & TYRRELL, 2000).

Segundo (WANG *et al.*, 2012) proteínas relacionadas ao processo fotossintético podem ser negativamente reguladas em plantas de soja infectadas com *P. pachyrhizi*. A ativação dos

mecanismos de defesa da planta demanda fontes de energia e, portanto, perturba alguns processos metabólicos

5.2. Impacto dos OGS na planta de soja

5.2.1. Ensaio biológico

A plantas tratadas com OGS em cinco estádios diferentes (tratamentos A, B, C e D, V2/V3; V5/V6; R1/R2 e R5, respectivamente) foram submetidas a avaliações preliminares de possíveis impactos dos OGS no desenvolvimento e produtividade da soja. Os testes reprovaram a parametricidade das variáveis que denominamos “tamanho”, “flores” e “folhas”. Foi possível transformar as variáveis “tamanho” e “flores” por normalização pela raiz quadrada. Para os dados paramétricos uma comparação de médias foi realizada por meio do teste ANOVA.

O tamanho das plantas não apresentou diferença estatística entre os cinco tratamentos ($p=0,614$), assim como a quantidade de flores ($p=0,418$), quantidade de vagens ($p=0,919$), quantidade de sementes ($p=0,949$) e o peso das sementes ($p=0,967$) (Figura 7).

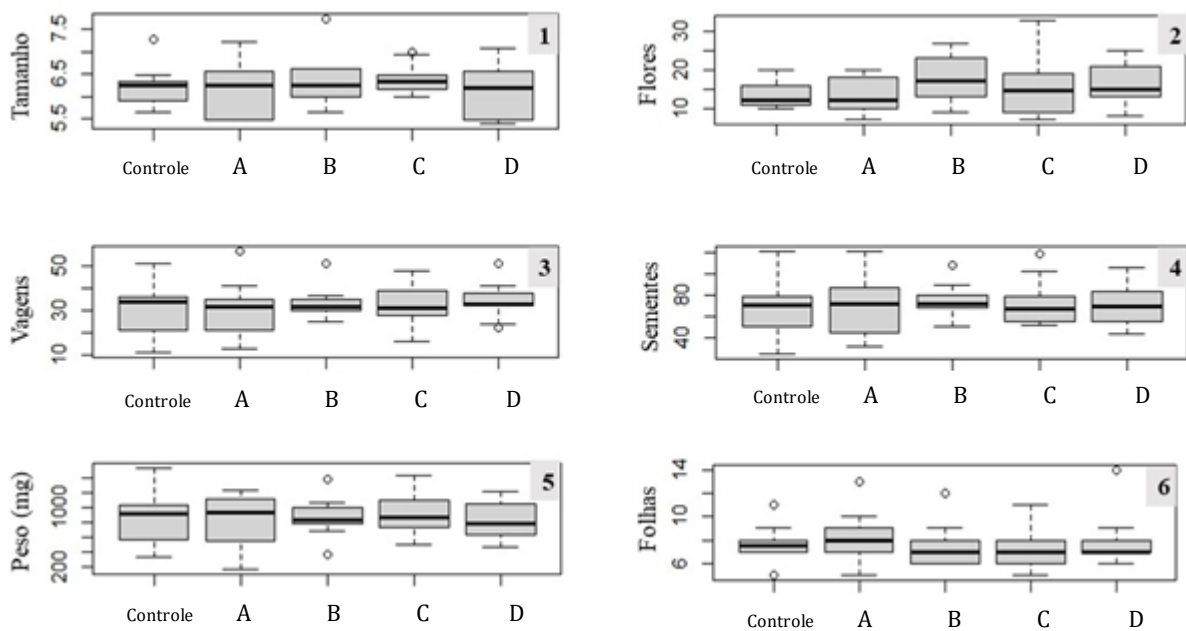


Figura 6: *boxplots* da variação dos dados obtidos durante o ensaio realizado em casa de vegetação, em que tratamento **Controle**: não houve aplicação de OGs; **A**: aplicação de OG no estágio V2/V3; **B** em V5/V6; **C**: a em R1/R2 e **D**: aplicação em R5. No gráfico: 1- tamanhos das plantas de cada tratamento; 2- quantidade de flores das plantas de cada tratamento; 3- a quantidade de vagens das plantas de cada tratamento; 4- quantidade de sementes das plantas de cada tratamento; 5- peso das sementes de cada tratamento; 6- folhas das plantas de cada tratamento.

Os dados não paramétricos, referentes à quantidade de folhas, foram submetidos ao teste qui-quadrado. A quantidade de folhas (Figura 6) não apresentou diferença estatística ($p=0,8052$).

A variável peso sementes foi dividida pela quantidade de sementes debulhadas em cada planta e as razões obtidas foram aprovadas no teste de parametricidade. Estes valores foram submetidos ao teste ANOVA e não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos ($p=0,6$) (Figura 7).

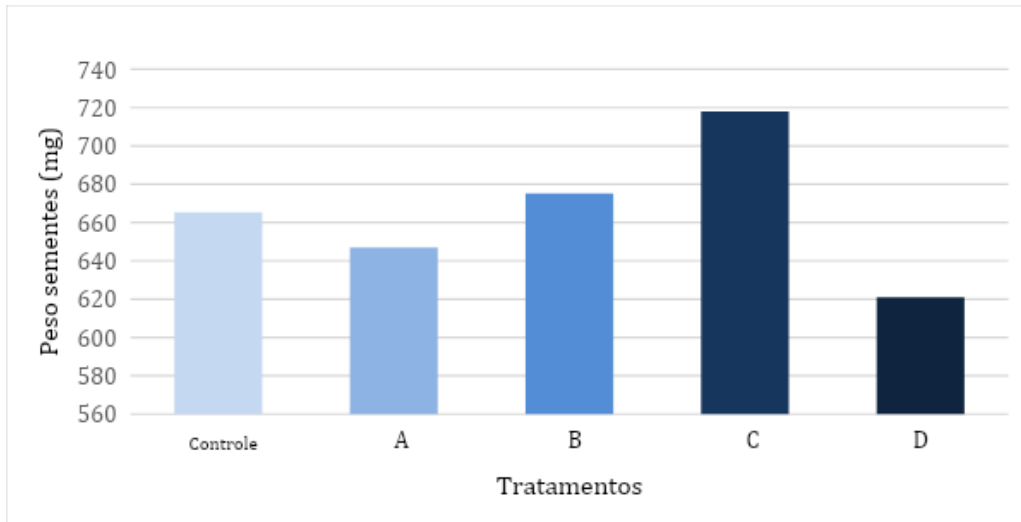


Figura 7: média do peso total de sementes (mg) produzidas por cada planta de cada tratamento ($p=0,967$), em que, tratamento Controle: não houve aplicação de OGs; A: aplicação de OG no estádio V2/V3; B em V5/V6; C: a em R1/R2 e D: aplicação em R5.

A ausência de diferença estatística entre os tratamentos nas variáveis observadas aponta para uma baixa ou nenhuma interferência dos OGs no desenvolvimento da planta de soja (variedade M5917) nas condições aqui observadas.

5.2.2. Análise do proteoma

A figura 8 sumariza a quantidade de proteínas induzidas e suprimidas em cada tempo amostrado, na comparação dos dados obtidos dos tratamentos T2 (plantas submetidas aos OGs) e T1 (Controle). Observa-se em 6 hpi a maior quantidade de proteínas que tiveram sua abundância aumentada em relação aos outros horários. Em 24 e 48 horas é observado um alto número de proteínas suprimidas, possivelmente resultantes de um feedback negativo ao desencadeamento de resposta de defesa nos primeiros momentos pós exposição da planta aos OGs.

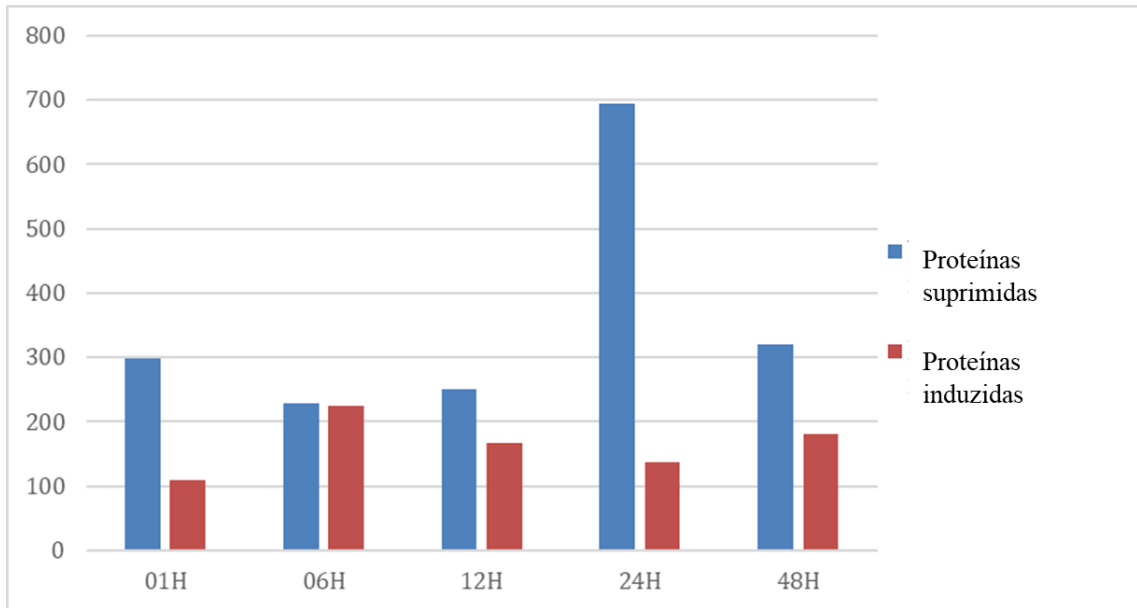


Figura 8: Sumarização da quantidade de proteínas suprimidas e induzidas em cada horário de amostragem comparando os tratamentos T2 e T1, em que T2: plantas tratadas com OGs, T1: controle.

Explorando os dados obtidos em 6 hpi, a análise de componentes principais (PCA) explica a variação dos dados obtidos agrupando os dois tratamentos aqui observados conforme ilustrado na figura 9.

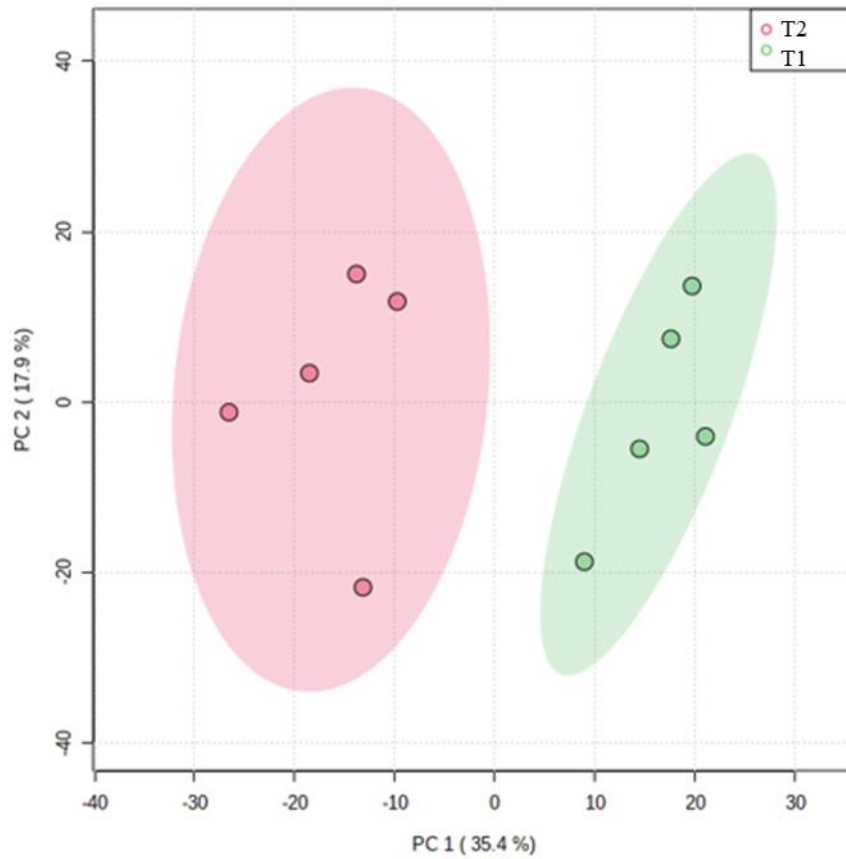


Figura 9: Plotagem de pontuações de componentes principais. As variações explicadas são mostradas entre parênteses nas legendas do eixo X e Y, em que T2: plantas tratadas com OGs, T1: controle.

A análise *T-test* retornou 453 proteínas diferencialmente abundantes em 6 hpi, sendo 224 induzidas na presença dos OGs e 229 delas suprimidas. O termo GO dessas proteínas foi processado pelo AgriGO 2.0 retornando a listagem abaixo com a sumarização dos processos biológicos (tabela 3).

Tabela 3: Listagem dos termos GOs significativos ($p > 0,05$) referente à processos biológicos da comparação entre os tratamentos T2 e T1.

Termo GO	Descrição	P-value
GO:0006749	Processo metabólico da glutathione	9.20E-12
GO:0007031	Organização de peroxissomos	1.90E-10
GO:0017038	Importação de proteínas	6.00E-08
GO:0006575	Processo metabólico derivado de aminoácidos	1.30E-07
GO:0042180	Processo metabólico de cetona celular	7.70E-07
GO:0015996	Processo catabólico de clorofila	1.00E-06
GO:0046149	Processo catabólico de pigmento	1.00E-06
GO:0006787	Processo catabólico de porfirina	3.70E-06
GO:0033015	Processo catabólico de tetrapirrol	3.70E-06
GO:0051187	Cofator de processo metabólico	3.70E-06
GO:0006605	Direcionamento de proteínas	7.40E-06
GO:0006790	Processo metabólico de enxofre	7.40E-06
GO:0015994	Processo metabólico de clorofila	1.00E-05
GO:0044106	Processo metabólico de amina celular	2.60E-05
GO:0009309	Processo de biossíntese de aminas	4.70E-05
GO:0006778	Processo metabólico de porfirina	2.60E-04
GO:0042440	Processo metabólico de pigmento	4.00E-04
GO:0051186	Cofator de processo metabólico	5.40E-04
GO:0009308	Processo metabólico da amina	1.10E-03
GO:0033013	Processo metabólico do tetrapirrol	2.30E-03
GO:0046700	Processo metabólico heterocíclico	2.50E-03
GO:0044270	Processo catabólico de nitrogênio celular	3.10E-03
GO:0003723	Ligação de RNA	1.80E-31

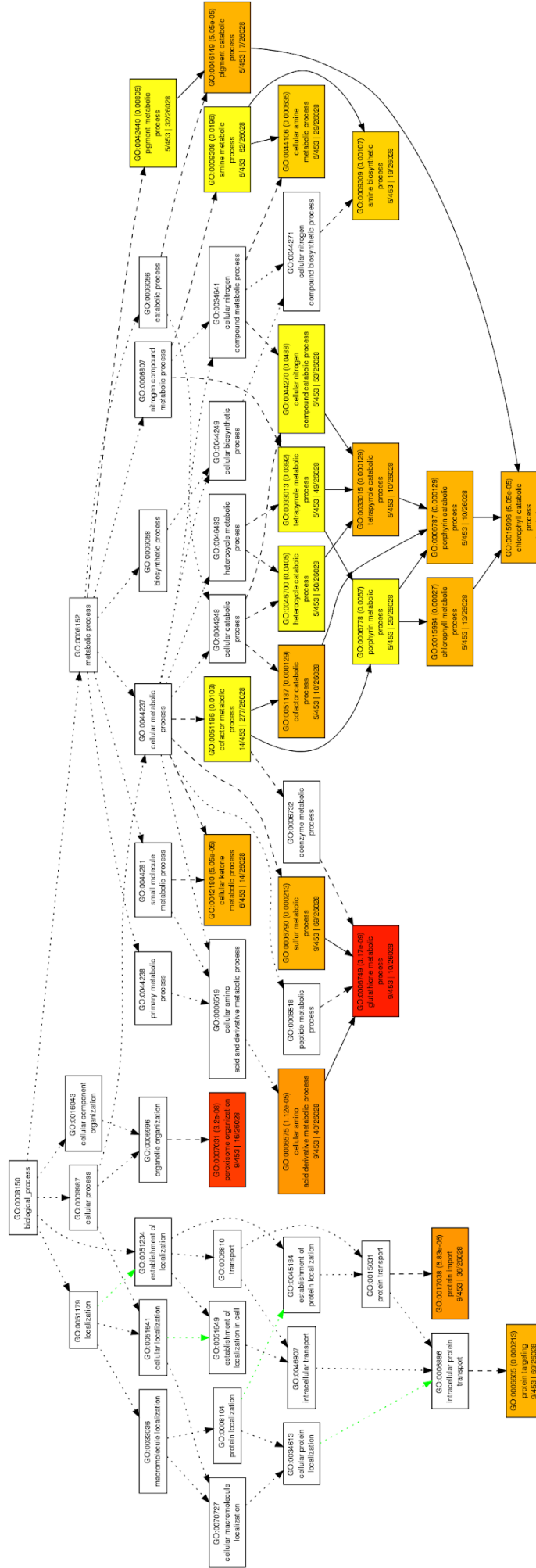


Figura 10: diagrama de termos GOs da comparação entre o tratamento com OG e sem, resumizando os processos biológicos em que, quanto mais avermelhados os retângulos, mais significativo é o processo.

Os termos GOs relacionados a processos biológicos mais enriquecidos e indicados como extremidades finais do diagrama acima (figura 10) foram: GO:0006605 (direcionamento de proteínas); GO:0017038 (importação de proteínas); GO:0007031 (organização de peroxissomo); GO:0006749 (processo metabólico da glutatona); GO:0042180 (processo metabólico de cetona celular); GO:0042440 (processo catabólico da clorofila) e GO:0006575 (processo metabólico de amina celular).

Assim como nas respostas ativadas pelo patógeno da ferrugem, a exposição da planta ao OG mobilizou atividades peroxissomais, processos metabólicos relacionados ao pigmento como catabolismo de clorofila e o metabolismo da glutatona. A mobilização desses mecanismos concomitantes à infecção com patógeno em soja corrobora com a hipótese de que os OGs ativam vias de defesa da planta (ROJAS *et al.*, 2014).

Segundo Capaldi *et al.* (2015) o enxofre é um importante composto na produção fotossintética de oxigênio e na resposta ao estresse abiótico e biótico pela planta. O enxofre está na composição de aminoácidos, como a cisteína e metionina, vitaminas e cofatores. Esse elemento é absorvido na parte aérea das plantas na forma de sulfato e é assimilado por meio de uma reação de redução a compostos orgânicos intermediários, para posterior incorporação. Compostos sulfonados, como a glutatona e as fitoquelatinas, atuam como antioxidantes importantes do processo de resposta de defesa em plantas (SETH *et al.*, 2012).

O metabolismo de corpos cetônicos é associado ao metabolismo de ácidos graxos e a sinalizações extracelulares. Lipídeos superficiais das plantas contém hidrocarbonetos, ceras e álcoois. A oxidação desses elementos lipídicos pode originar metil-cetonas (FORNEY & MARKOVETZ, 1971). Compostos cetônicos também estão relacionados a reação de isopreno com espécies reativas de oxigênio (JARDINE *et al.*, 2012). O isopreno é um composto relacionado a proteção de plantas ao estresse por meio de efeito antioxidante contra espécies reativas de oxigênio (ROS). A reação de oxidação que ROS causa em isopreno tem como produto a liberação de metil-vinil-cetona. Sendo assim, a regulação na abundância de proteínas relacionadas a processos metabólicos cetônicos pode indicar impacto dos OGs na proteção mecânica das folhas da planta contra invasão de patógenos.

5.3. Impacto dos OGs na planta de soja na presença de *P. pachyrhizi*

5.3.1. Testemunhas do ensaio biológico

O acompanhamento da evolução da infecção por *P. pachyrhizi* nas plantas testemunhas do ensaio biológico foi realizada por meio de registros fotográficos (Figura 11) e escala de notas. As notas apresentadas na Figura 12 são as médias das notas das cinco folhas, ou 15 folíolos, de cada planta testemunha.

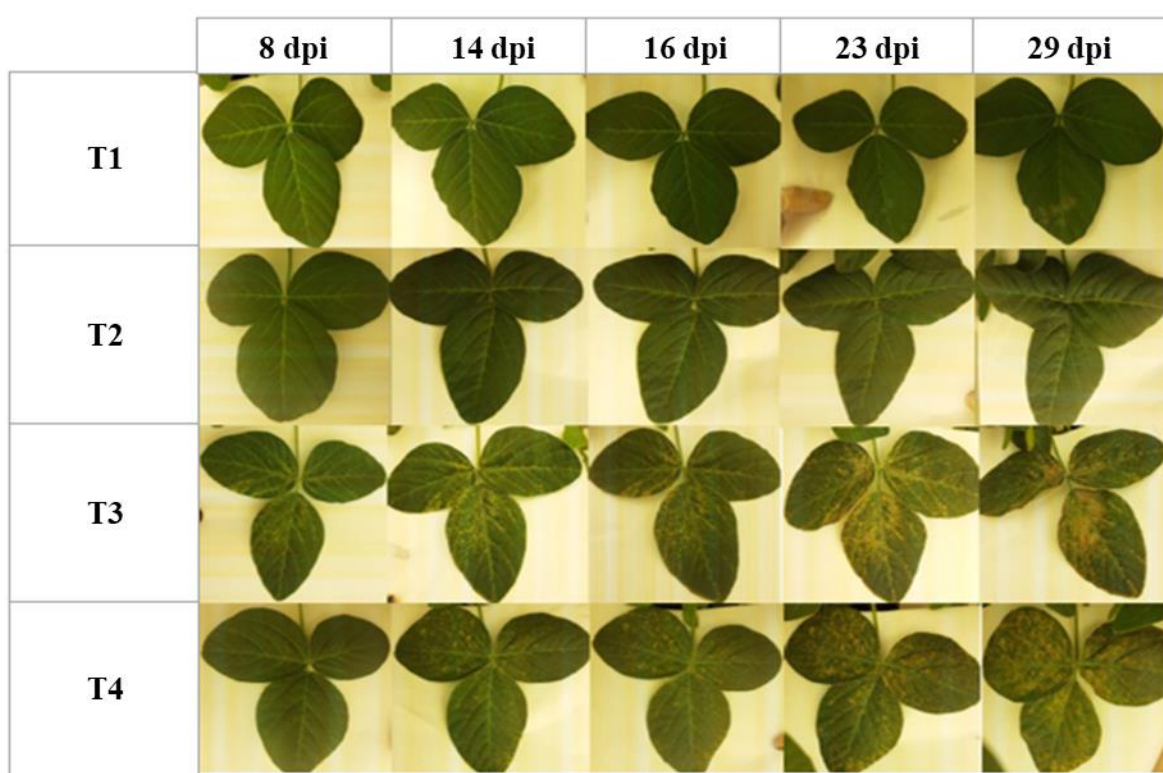


Figura 11: Registro fotográfico ao longo do tempo pós exposição da planta à *P. pachyrhizi* do segundo trifólio das plantas de soja testemunhas do ensaio biológico, em que, T1: plantas controle; T2: plantas tratadas somente com OGs; T3: somente com *P. pachyrhizi*; T4: OGs e ferrugem.

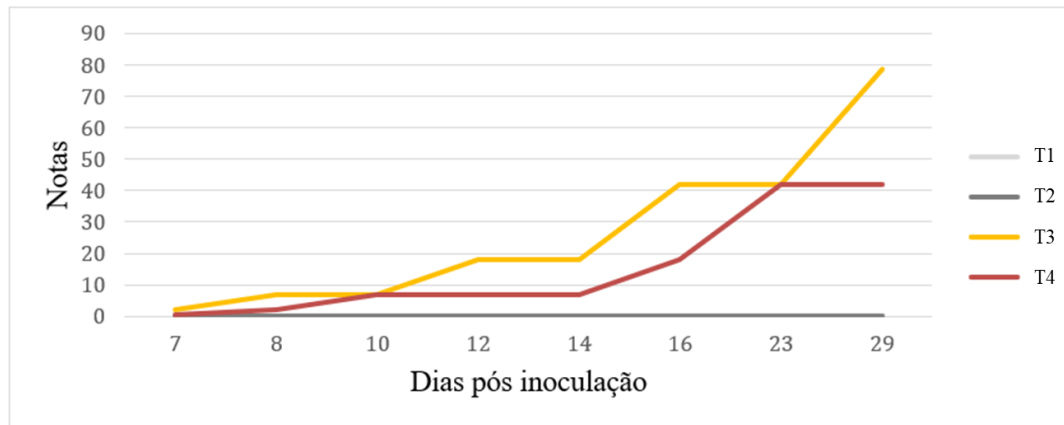


Figura 12: gráfico da progressão da doença pós-infecção por *P. pachyrhizi* mensurada por meio de escala de notas nas plantas de soja testemunhas do ensaio biológico, em que, T1: plantas controle; T2: plantas tratadas somente com OGs; T3: somente com *P. pachyrhizi*; T4: OGs e *P. pachyrhizi*.

As plantas testemunhas avaliadas demonstraram efetividade na infecção por *P. pachyrhizi* e desenvolvimento da doença e indicaram que, ao menos nestas plantas avaliadas, a progressão da doença foi retardada na presença de OG. As plantas não submetidas ao patógeno, referentes aos tratamentos controle T1 e T2, não apresentaram sintomas de doença.

5.3.2. Análises do proteoma

No gráfico abaixo (Figura 13) está a sumarização da quantidade de proteínas induzidas e suprimidas em cada tempo, na comparação entre os tratamentos T4 (plantas expostas à *P. pachyrhizi* e aos OGs) e T3 (plantas expostas à *P. pachyrhizi*).

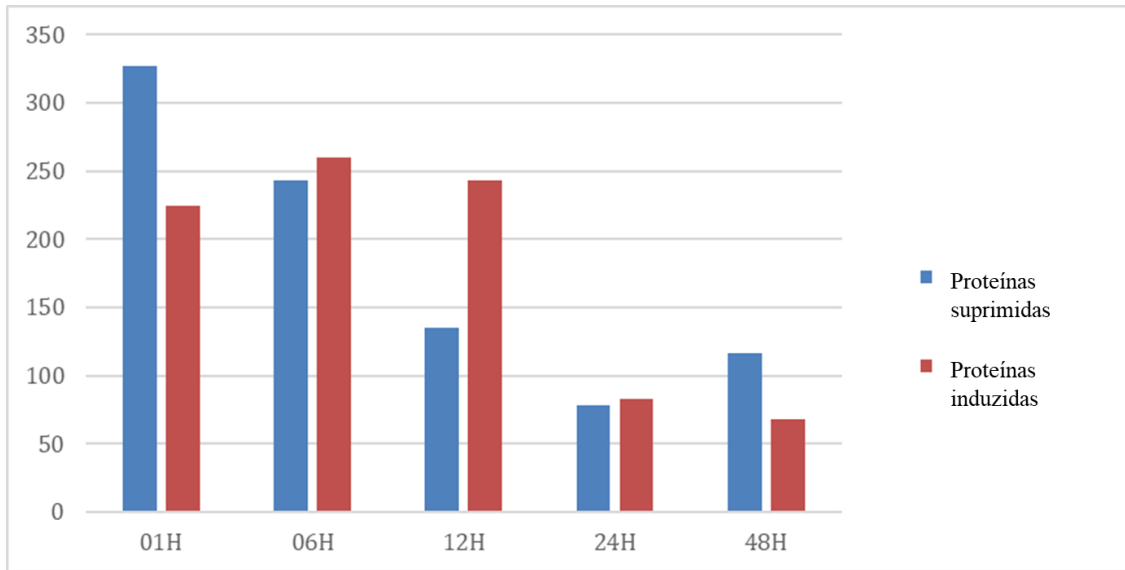


Figura 13: Sumarização da quantidade de proteínas suprimidas e induzidas em cada horário de amostragem comparando os tratamentos T4 e T3, em que T4: plantas tratadas com OG e *P. pachyrhizi* e T3: plantas tratadas apenas com *P. pachyrhizi*.

Na figura 13 é possível observar uma diminuição na quantidade de proteínas suprimidas e induzidas ao longo do tempo. Diferentemente das comparações entre os tratamentos T3-T1 e T2-T1, aqui em 24 horas tem-se a menor quantidade de proteínas diferencialmente abundantes. Similarmente aos dados de T2-T1 em que se observou somente a ação dos OGs na planta de soja, no primeiro horário de coleta há uma alta taxa de proteínas com abundância diminuída, corroborando com as evidências de que as respostas das plantas aos OGs ocorrem em um curto intervalo de tempo.

Buscando compreender os mecanismos de resposta ao OG na presença de *P. pachyrhizi* ao longo do tempo, na análise multivariada, ASCA retornou uma lista de 327 proteínas “bem modeladas” na razão que leva em conta a interação entre dois fatores: tempo e tratamento (Figura 14). O termo GO dessas proteínas foi processado pelo AgriGO 2.0 retornando a listagem da tabela 4 com a sumarização dos processos biológicos.

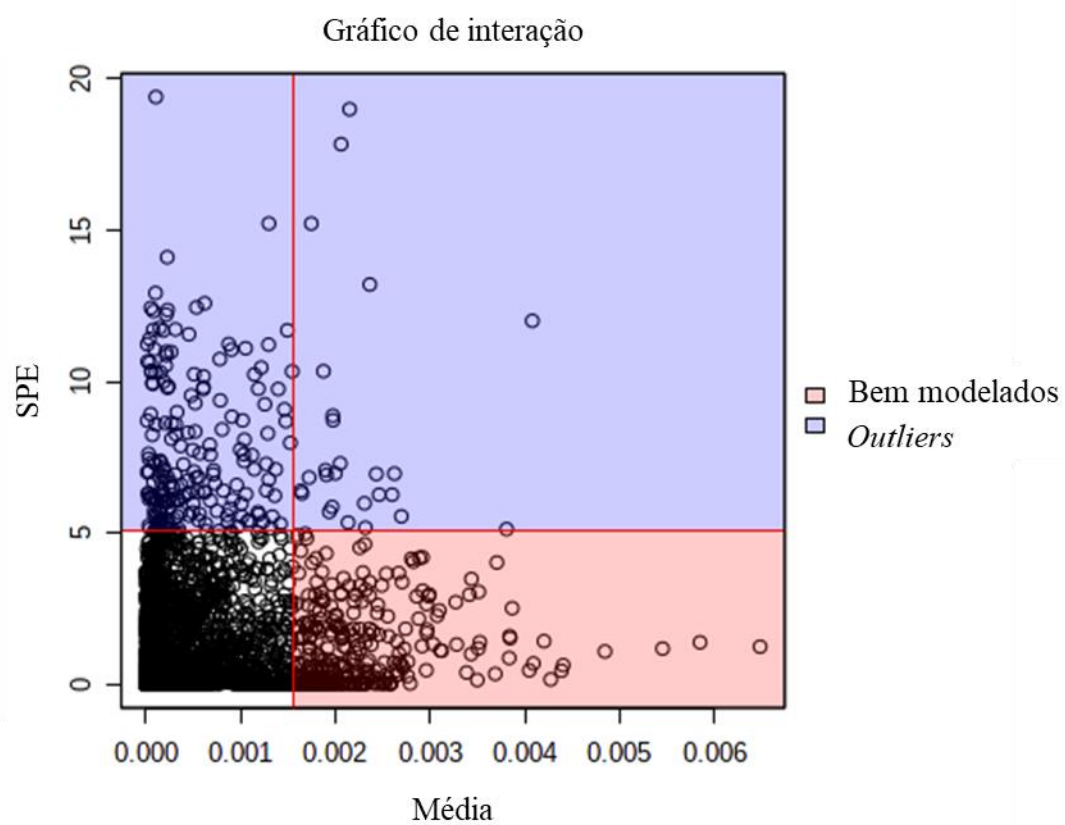


Figura 14: Proteínas que variaram de forma significativa entre dois fatores segundo a análise de ASCA.

Tabela 4: Listagem dos termos GO significativos ($p > 0,05$) referente à processos biológicos da comparação entre os tratamentos T4 e T3.

Termo GO	Descrição	P-value	FDR
GO:0006575	Processo metabólico derivado de aminoácidos celulares	2,70E-11	6,50E-09
GO:0006749	Processo metabólico da glutathiona	7,30E-10	8,80E-08
GO:0015996	Processo catabólico de clorofila	5,50E-09	3,30E-07
GO:0046149	Processo catabólico de pigmento	5,50E-09	3,30E-07
GO:0043574	Transporte de peroxissomo	9,50E-09	3,80E-07
GO:0006625	Direcionamento de proteína ao peroxissomo	9,50E-09	3,80E-07
GO:0051187	Cofator de processo catabólico	2,50E-08	6,60E-07
GO:0006787	Processo catabólico da porfirina	2,50E-08	6,60E-07
GO:0033015	Processo catabólico do tetrapirrol	2,50E-08	6,60E-07
GO:0015994	Processo metabólico da clorofila	8,10E-08	2,00E-06
GO:0007031	Organização de peroxissomo	2,20E-07	4,70E-06
GO:0006778	Processo metabólico da porfirina	4,10E-06	8,30E-05
GO:0042440	Processo metabólico do pigmento	6,80E-06	1,30E-04
GO:0017038	Importação de proteínas	1,20E-05	2,10E-04
GO:0006790	Processo metabólico do enxofre	4,40E-05	7,00E-04
GO:0033013	Processo metabólico com tetrapirrol	6,00E-05	9,00E-04
GO:0046700	Processo metabólico heterocíclico	6,60E-05	9,40E-04
GO:0051186	Cofator de processo metabólico	7,30E-05	9,90E-04
GO:0044270	cellular nitrogen compound catabolic process	8,90E-05	1,10E-03
GO:0006605	Direcionamento de proteína	3,40E-04	4,10E-03
GO:0044248	Processo catabólico celular	4,00E-03	4,60E-02

Os termos GOs relacionados a processos biológicos mais enriquecidos e indicados como extremidades finais do diagrama acima (figura 15) foram: GO:0006575 (processo metabólico derivado de aminoácidos celulares); GO:0006625 (direcionamento de proteínas ao peroxissomo); GOGO:0006749 (processo metabólico da glutatona) e GO:0015996 (processo catabólico de clorofila).

Esses quatro processos biológicos e seus relatos são também apontados nas análises entre os tratamentos T3-T1 (ao observar o impacto de *P. pachyrhizi* na planta de soja) e T2-T1 (ao observar isoladamente o impacto dos OGs na planta de soja). Há um forte indício de que os OGs na presença do patógeno influencie as mesmas vias de transcrição de proteínas, diretamente relacionadas a mecanismos de resposta de defesa da planta de soja.

Dentre os termos GOs apontados como enriquecidos pelo AgriGO 2.0, observam-se processos biológicos relacionados com o catabolismo de compostos, assim como o GO:0044248, correspondente ao catabolismo celular. O colapso de tecidos são características de reações de hipersensibilidade em resposta à ativação do sistema imune vegetal (AGRIOS, 2004), assim como a supressão de processos biológicos basais, como a fotossíntese (ROJAS *et al.*, 2014), similarmente ao observado nos dois tópicos anteriores (6.1 e 6.2).

5.3.3. Análises de metaboloma

Na figura 16 está a sumarização da quantidade de metabólitos induzidos e suprimidos em cada tempo, na comparação entre os tratamentos T4 e T3.

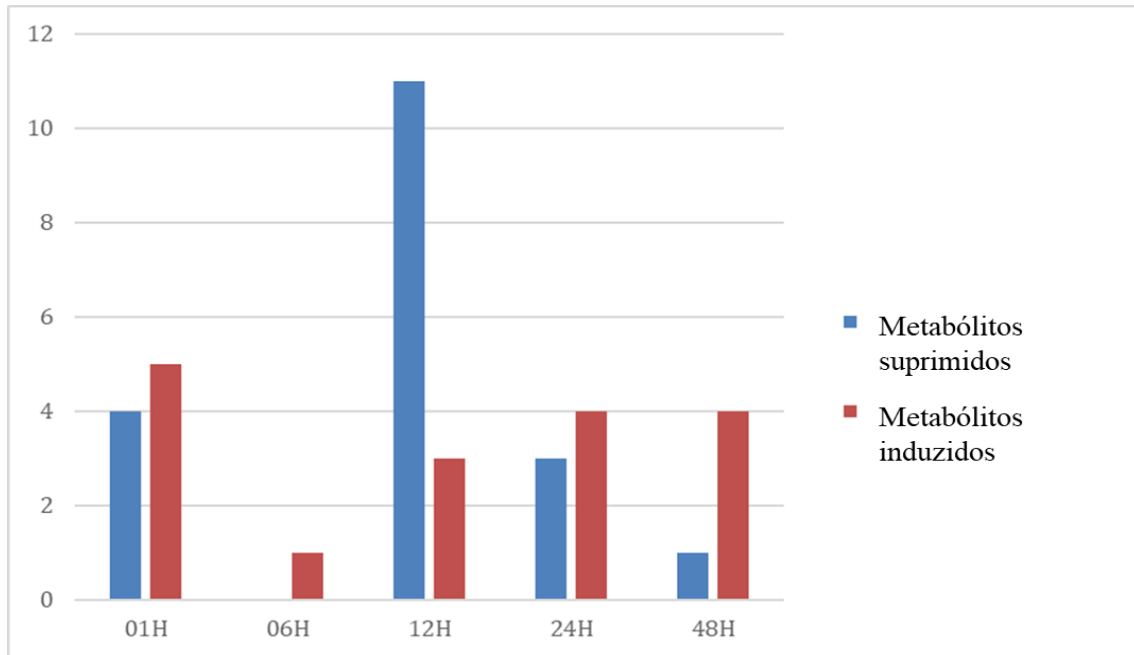


Figura 16: Sumarização da quantidade de metabólitos suprimidos e induzidos em cada horário de amostragem comparando os tratamentos T4 e T3, em que T4: plantas tratadas com OGs e *P. pachyrhizi* e T3: plantas tratadas apenas com *P. pachyrhizi*.

Observamos que em 6 hpi não há metabólitos negativamente regulados e somente um teve sua abundância aumentada, segundo as análises de *T-test*. Em 12 horas houve a maior quantidade de metabólitos suprimidos, ao passo que na primeira hora de coleta um total de cinco metabólitos apresentou abundância positiva, maior número dentre todos os horários de coleta.

Submetendo os dados obtidos em GC-MS dos tratamentos T4 e T3 à análise multivariada, do total de 131 metabólitos identificados, 4 são bem modelados na interação entre tempo e tratamento segundo a análise de ASCA (Figura 17 e Tabela 5). Realizando análise univariada hora a hora e obtendo os valores de FC dos metabólitos destacados no *time course* é possível explorar de que maneira ocorreu a modulação da abundância desses metabólitos ao longo dos horários de coleta (Tabela 5). A classificação dos metabólitos foi feita de acordo com o trabalho de Pinheiro (2020) (Tabela 6).

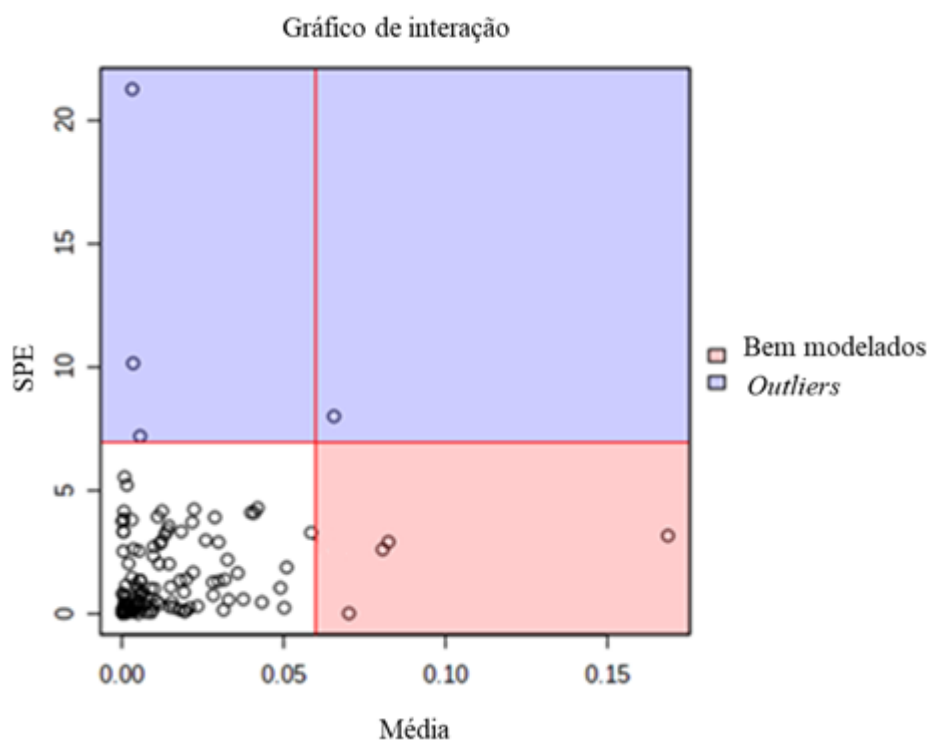


Figura 17: Metabólitos que variaram de forma significativa entre dois fatores segundo a análise de ASCA.

Tabela 5: listagem de metabólitos diferencialmente abundantes retornados pela análise ASCA na comparação entre os tratamentos T4 e T3.

Metabólito	Classe	Leverage	SPE
Xilitol	Açúcares	0.16885	31.499
Alanina, N-metil-n-butoxicarbonil-octil éster	Derivados de aminoácidos	0.082365	28.998
Ácido etanodióico	Ácido orgânico	0.070142	0.004267
Eritritol	Álcoois ou Polióis	0.066535	26.242

Tabela 6: listagem de metabólitos diferencialmente abundantes na comparação entre os tratamentos T4 e T3 considerando os valores de FC ao longo dos momentos de coleta de amostras.

Metabólito	Log2(FC)				
	01H	06H	12H	24H	48H
Xilitol					52,3
Alanina, N-metil-n-butoxicarbonil-octil éster			-10,8		-96,6
Ácido etanodióico				34,0	1,5
Eritritol				49,1	21,8

A Alanina, N-metil-n-butoxicarbonil-octil éster teve sua abundância diminuída em dois momentos de coleta. Segundo Zeier (2013) glucosinolatos alifáticos são derivados principalmente dos aminoácidos Ala, Leu, Ile, Val e Met. Tierens *et al.* (2001) aponta glucosinolatos como importantes moléculas na resistência contra patógenos em *Arabidopsis*. Derivados de aminoácidos podem ser impactados na presença de OGs devido a supressão da fotossíntese durante a estimulação do sistema imune vegetal (WANG *et al.*, 2012).

É possível observar que há uma semelhança na resposta ao longo do tempo de ácido etanodióico e eritritol, os quais apresentam aumento em suas abundâncias nos últimos horários de coleta. Segundo Dumschott *et al.* (2017), os polióis, como o Eritritol, são substâncias muito importantes na regulação osmótica intracelular vegetal, sendo um dos principais componentes solúveis da planta. Estes compostos estão relacionados ao aumento da tolerância da planta à presença de espécies reativas de oxigênio (DUMSCHOTT *et al.*, 2017). Segundo LIU *et al.* (2019), os níveis de eritritol aumentam em folhas mais velhas de soja.

Segundo Dutton e Evans (1996), o ácido etanodióico, também conhecido como ácido oxálico pode ser oriundo de duas vias em plantas, uma delas é o Ciclo do Ácido Cítrico (TCA) onde sofre hidrólise formando oxalato e ácido acético pela enzima oxaloacetase. O ácido etanodióico foi notado como um inibidor de desenvolvimento de *Pseudomonas syringae* por atuar como um quelante de ferro, metal requerido para a sobrevivência deste patógeno (SUNDIN & MURILLO, 2002). Essa molécula também pode atuar como sinalizadora da resposta de defesa da planta, induzindo a expressão do gene PR1 (*pathogenesis-related protein 1*), como observado em *Arabidopsis thaliana* (MHAMDI *et al.*, 2010). Esse metabólito também foi apontado como capaz de aumentar a resistência da planta a alguns patógenos, incluindo agentes fúngicos e vírus (CAO *et al.*, 1994; HAFRÉ *et al.*, 2017).

A produção de energia pelo TCA pode ter sido suprimida pelo patógeno nos primeiros horários de coleta e, o aumento da abundância de ácido etanodióico em 24 e 48 hpi pode indicar que, na presença de OG, a planta tem suas atividades fotossintéticas menos abaladas do que na ausência de OG. O Ácido etanodióico também pode se originar da desidrogenação do ácido glicólico, que é produzido pelo metabolismo do etileno-glicol. O etileno está presente em vias de defesa da planta na resposta contra injúrias.

O xilitol, oriundo da fixação de carbono promovida pela fotossíntese, teve sua abundância positivamente regulada apenas no último horário de coleta em plantas expostas aos

OGs. Semelhantemente ao ácido etanodióico, para o xilitol também hipotetiza-se que na presença do OG, a fotossíntese suprimida pelo patógeno seja retomada mais rapidamente..

6. CONCLUSÃO

A identificação de proteínas e metabólitos importantes no sistema de resposta da planta de soja - tanto no patossistema soja-ferrugem, como ao explorar o papel dos elicitores – nos fornece informações importantes sobre a articulação dos processos biológicos envolvidos. Nossos resultados apontam para uma maior quantidade de proteínas induzidas na presença de *P. pachyrhizi* nos primeiros horários de amostragem. Os processos biológicos mais enriquecidos estão relacionados à importação de proteínas, processo metabólico da glutatona, processo catabólico de clorofila, resposta à estresse oxidativo e processo metabólico da amina celular

Nos ensaios em casa de vegetação não foi possível observar o efeito dos OGs em parâmetros de desenvolvimento da planta de soja independente do estágio fenológico de aplicação do produto. As análises de proteoma indicaram que os OGs foram capazes de induzir maior regulação positiva de proteínas em 6 hpi e, em 24 hpi, a maior quantidade de proteínas negativamente reguladas. Nestas comparações, os termos GOs enriquecidos foram semelhantes aos observados no estudo do proteoma da soja exposta à *P. pachyrhizi*, além, do metabolismo do enxofre e do processo metabólico de cetona celular; corroborando para a hipótese de que houve elicitação das vias de defesa da planta.

No estudo das duas variáveis deste trabalho em conjunto logo nas primeiras horas após inoculação tem-se as maiores quantidades de proteínas induzidas e suprimidas. Mais uma vez os termos GOs mais enriquecidos foram relacionados ao direcionamento de proteínas ao peroxissomo, processo metabólico da glutatona e processo catabólico de clorofila. Os OGs na presença do patógeno estimulam vias que se relacionam à ativação do sistema imune da planta de soja, semelhantemente às proteínas encontradas nas análises do impacto dos OGs e de *P. pachyrhizi*, separadamente. Além disso, temos indícios de que na presença de OG, a planta tem suas atividades fotossintéticas menos abaladas do que na ausência de OG, quando infectada pelo patógeno. Em 12 hpi, observamos a maior quantidade de metabólitos negativamente regulados. Eritritol foi um metabólito que apresentou indução em 24 e 48 hpi e que pode estar relacionado ao aumento de resistência pela planta à presença de EROs; assim como houve regulação positiva de Ácido etanodiólico, que pode estar relacionado ao metabolismo de etileno.

7. REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. San Diego, California: Elsevier Academic Press, 2004.
- AIME, M. C.; MCTAGGART, A. R.; MONDO, S. J. Phylogenetics and phylogenomics of rust fungi. **Advances in Genetics**, v. 100, 2017.
- ASLAM, S. N.; ERBS, G.; MORRISSEY, K. L.; NEWMAN, M. A.; CHINCHILLA, D.; BOLLER, T.; MOLINARO, A.; JACKSON, R. W.; COOPER, R. M. Microbe-associated molecular pattern (MAMP) signatures, synergy, size and charge: influences on perception or mobility and host defence responses. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, n. 3, p. 375–387, 2009.
- AZIZ, A.; HEYRAUD, A.; LAMBERT, B. Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. **Planta**, v. 218, n. 5, p. 767–774, 2014.
- BATISTA, R.; FONSECA, C.; PLANCHON, S.; NEGRÃO, S.; RENAUT, J.; OLIVEIRA, M. M. Environmental stress is the major cause of transcriptomic and proteomic changes in GM and non-GM plants. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.
- BELLINCAMPI, D.; DIPIERRO, N.; SALVI, G.; CERVONE, F.; DE LORENZO, G. Extracellular H₂O₂ induced by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated rolB gene expression in tobacco leaf explants. **Plant Physiology**, v. 122, n. 4, p. 1379–1386, 2000.
- BENT, A. F.; MACKEY, D. Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. **Annual Review of Phytopathology**, v. 45, p. 399–436, 2007.
- BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G. New method for quantitative determination of uronic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 5, p. 484–489, 1973.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BRANCA, C.; DE LORENZO, G.; CERVONE, F. Competitive inhibition of the auxin-induced elongation by α -D-oligogalacturonides in pea stem segments. **Physiol. Plant.**, v. 72, p. 409–504, 1988.
- BROEKAERT, W. F.; PEUMANS, W. J. Pectic polysaccharides elicit chitinase accumulation in tobacco. **Physiologia Plantarum**, v. 74, n. 4, p. 740–744, 1 dez. 1988.
- BROMFIELD, K. R. **Soybean rust**. American Phytopathological Society, 1984.
- BUDZINSKI, I. G. F.; DE MORAES, F. E.; CATALDI, T. R.; FRANCESCHINI, L. M.; LABATE, C. A. Network analyses and data integration of proteomics and metabolomics from leaves of two contrasting varieties of sugarcane in response to drought. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. 1524, 2019.

CAMPE, R.; LOEHRER, M.; CONRATH, U.; GOELLNER, K. *Phakopsora pachyrhizi* induces defense marker genes to necrotrophs in *Arabidopsis thaliana*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 87, p. 1-8, 2014.

CAO, H.; BOWLING, S. A.; GORDON, A. S.; DONG, X. Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, v. 6, p. 1583–1592, 1994.

CAPALDI, F. R.; GRATÃO, P. L.; REIS, A. R.; LIMA, L. W.; AZEVEDO, R. A. Sulfur metabolism and stress defense responses in plants. **Tropical Plant Biology**, v. 8, n. 3, p. 60–73, 12 jul. 2015.

CASTRO, P. R. de C.; KLUGE, R.; SESTARI. **Manual de fisiologia vegetal: fisiologia de cultivos**. Piracicaba: Editora Agronômica Ceres, 2008.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira - grãos safra 2022/2023**, 2º levantamento. Boletim da Safra, v. 9, n. Terceiro levantamento, p. 60, 2022. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/>>.

CÔTÉ, F.; HAHN, M. G. Oligosaccharins: structure and signal transduction. **Plant Molecular Biology**, v. 26, p. 1379-1411, 1994.

DALIO, R. J. D.; MAGALHÃES, D. M.; ATÍLIO, L. B.; RODRIGUES, C. M.; BRETON, M. C.; PICHI, S.; PASCHOLATI, S. F.; MACHADO, M. A. Efeitos nas interações planta-patógenos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 22, p. 22–68, 2014.

DAVIS, K. R.; HAHNBROCK, K. Induction of defense responses in cultured parsley cells by plant cell wall fragments. **Plant Physiology**, v. 84, n. 4, p. 1286–1290, 1 ago. 1987.

DE ALMEIDA BARROS, V.; FONTES, P. P.; BARCELOS DE SOUZA, G.; GONÇALVES, A. B.; DE CARVALHO, K.; RINCÃO, M. P.; DE OLIVEIRA NEGRÃO LOPES, I.; DALBIANCO LAMAS COSTA, M.; ALVES, M. S.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; FIETTO, L. G. *Phakopsora pachyrhizi* triggers the jasmonate signaling pathway during compatible interaction in soybean and GmbZIP89 plays a role of major component in the pathway. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 151, p. 526–534, 2020.

DENOUEX, C.; GALLETI, R.; MAMMARELLA, N.; GOPALAN, S.; WERCK, D.; DE LORENZO, G.; FERRARI, S.; AUSUBEL, F. M.; DEWDNEY, J. Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in *Arabidopsis* seedlings. **Molecular Plant**, v. 1, n. 3, p. 423–445, 2008.

DUMSCHOTT, K.; RICHTER, A.; LOESCHER, W.; MERCHANT, A. Post photosynthetic carbon partitioning to sugar alcohols and consequences for plant growth. **Phytochemistry**, v. 144, p. 243–252, 2017.

DUTTON, M. V.; EVANS, C. S. Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 9, p. 881–895, 1996.

EMBRAPA. **Soja** (2020). Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1>>. Acesso em: 16 jul. 2021.

EMPRAPA. **Ferrugem da soja: manejo e prevenção** (2018). Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/ferrugem>>. Acesso em: 16 jul. 2021.

FERNANDES, C. F.; VIEIRA-JÚNIOR, J. R.; SILVA, D. S. G.; ALVES, R. C. Estresse oxidativo e o mecanismo de defesa de plantas contra patógenos. EMBRAPA - Documentos 157, Porto Velho, RO, 2013

FERRARI, S.; SAVATIN, D. V.; SICILIA, F.; GRAMEGNA, G.; CERVONE, F.; DE LORENZO, G. Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. 49, 2013a.

FERREIRA, R. B.; MONTEIRO, S.; FREITAS, R.; SANTOS, C. N.; CHEN, Z.; BATISTA, L. M.; DUARTE, J.; BORGES, A.; TEIXEIRA, A. R. Fungal pathogens: the battle for plant infection. **Plant Sciences**, v. 25, n. 6, p. 505–524, 2007.

FLOR; H., H. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. **Phytopathology**, v. 32, p. 653–669, 1942.

FORNEY, F. W.; MARKOVETZ, A. J. The biology of methyl ketones. **Journal of Lipid Research**, v. 12, n. 4, p. 383–395, 1971.

GALLETTI, R.; DENOUX, C.; GAMBETTA, S.; DEWDNEY, J.; AUSUBEL, F. M.; DE LORENZO, G.; FERRARI, S. The atrbohD-mediated oxidative burst elicited by oligogalacturonides in Arabidopsis is dispensable for the activation of defense responses effective against Botrytis cinerea. **Plant Physiology**, v. 148, n. 3, p. 1695–1706, 2008.

GARCIA, A.; CALVO, E. S.; KIIHL, R. A. S.; HARADA, A.; HIROMOTO, D. M.; VIEIRA, L. G. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. **Theoretical and Applied Genetics**, V. 117, p. 545-553, 2008

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, i. 12, p. 909 – 930, 2010.

GODOY, C. V.; UTIAMADA, C. M.; MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; LOPES, N. I. de O.; DIAS, A. R.; MUHL, A.; WESP-GUTERRES, C.; PIMENTA, C. B.; JUNIOR, E. R. de A.; MORESCO, E.; KONAGESKI, F. T.; BONANI, J. C.; TRENTINI, J. M.; ROY; GRIGOLLI, J. F. J.; JUNIOR, J. N.; ARRUDA, J. H.; NAVARINI, L.; BELUFI, L. M. de R.; SILVA, L. H. C. P. da; LUIZ; SATO, N.; JÚNIOR, M. M. G.; SENGER, M.; MÜLLER, M. A.; DEBORTOLI, M. P.; MÔNICA CAGNIN MARTINS, N. R. T.; SILVEIRO, R. B.; MADALOSSO, T.; KONAGESKI, T. F.; CARLIN, V. J. **Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2019/2020: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos**. Embrapa Soja - Circular Técnica (INFOTECA-E), p. ISSN 2176-2864, 2020.

GODOY, C. V.; MARTINS, M. C. M.; KOGA, L. J.; TOMAZ, J. P.; BROMMONSCHENKEL, S. H. Host range of *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of soybean rust. **Plant Pathology**, v. 69, n. 4, p. 657–666, 2020.

GODOY, C. V.; KOGA, L. J.; CANTERI, M. G. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 63–68, 2006.

GOELLNER, K.; LOEHRER, M.; LANGENBACH, C.; CONRATH, U.; KOCH, E.; SCHAFFRATH, U. *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 2, p. 169–177, 2010.

GULLBERG, J.; JONSSON, P.; NORDSTRÖM, A.; SJÖSTRÖM, M.; MORITZ, T. Design of experiments: an efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 331, n. 2, p. 283–295, 2004.

GULLNER, G.; KOMIVES, T.; KIRÁLY, L.; SCHRÖDER, P. Glutathione S-transferase enzymes in plant-pathogen interactions. **Frontiers in Plant Science**, v. 871, p. 1836, 2018.

HAFRÉ, A.; HOFIUS, D.; RÖ, G.; SONNEWALD, U.; MÄ KINEN, K. HSP70 and its cochaperone CIP promote potyvirus infection in *Nicotiana benthamiana* by regulating viral coat protein functions. **The Plant Cell**, v. 29, n. 10, p. 2200–2214, 2017.

HAHN, M. G.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions: XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. **Plant Physiology**, v. 68, n. 5, p. 1161–1169, 1981.

HARTMAN, G. L.; WEST, E. D.; HERMAN, T. K. Crops that feed the World 2. Soybean-worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. **Food Security**, v. 3, n. 1, p. 5–17, 2011.

HAUN, W. J.; HYTEN, D. L.; XU, W. W.; GERHARDT, D. J.; ALBERT, T. J.; RICHMOND, T.; JEDDELOH, J. A.; JIA, G.; SPRINGER, N. M.; VANCE, C. P.; STUPAR, R. M. The composition and origins of genomic variation among individuals of the soybean reference cultivar Williams 82. **Plant Physiology**, v. 155, n. 2, p. 645–655, 2011.

HEANEY, S. P.; HALL, A. A.; DAVIES, S. A.; OLAYA, G. Resistance to fungicides in the Qol-STAR cross-resistance group: current perspectives. Farnham: BCPC & BSPP, p. 755–762, 2000.

HÖRTENSTEINER, S. Stay-green regulates chlorophyll and chlorophyll-binding protein degradation during senescence. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 3, p. 155–162, 2009.

JARDINE, K. J.; MONSON, R. K.; ABRELL, L.; SALESKA, S. R.; ARNETH, A.; JARDINE, A.; ISHIDA, F. Y.; SERRANO, A. M. Y.; ARTAXO, P.; KARL, T.; FARES, S.; GOLDSTEIN, A.; LORETO, F.; HUXMAN, T. Within-plant isoprene oxidation confirmed by direct emissions of oxidation products methyl vinyl ketone and methacrolein. **Global Change Biology**, v. 18, n. 3, p. 973–984, 2012.

JING, M.; MA, H.; LI, H.; GUO, B.; ZHANG, X.; YE, W.; WANG, H.; WANG, Q.; WANG, Y. Differential regulation of defense-related proteins in soybean during compatible and incompatible interactions between *Phytophthora sojae* and soybean by comparative proteomic analysis. **Plant Cell Reports**, v. 34, p. 1263 - 1280, 2015.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323–329, 2006.

KIM, M. Y.; LEE, S.; VAN, K.; KIM, T. H.; JEONG, S. C.; CHOI, I. Y.; KIM, D. S.; LEE, Y. S.; PARK, D.; MA, J.; KIM, W. Y.; KIM, B. C.; PARK, S.; LEE, K. A.; KIM, D. H.; KIM, K. H.; SHIN, J. H.; JANG, Y. E.; KIM, K. Do; LIU, W. X.; CHAISAN, T.; KANG, Y. J.; LEE, Y. H.; KIM, K. H.; MOON, J. K.; SCHMUTZ, J.; JACKSON, S. A.; BHAK, J.; LEE, S. H. Whole-genome sequencing and intensive analysis of the undomesticated soybean (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.) genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 51, p. 22032–22037, 2010.

KIM, M. Y.; SHIN, J. H.; KANG, Y. J.; SHIM, S. R.; LEE, S. H. Divergence of flowering genes in soybean. **Journal of Biosciences**, v. 37, n. 5, p. 857–870, 2012.

KOCH, E.; EBRAHIMNESBAT, F.; HOPPE, H. H. Light and electron microscope studies on the development of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd) in susceptible soybean leaves. **Phytopathology**, v. 106, p. 302-320, 1983.

KRUGNER, T. L.; BACCHI, L. M. A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronomica Ceres, p. 46–95, 1995.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LANGENBACH, C.; CAMPE, R.; BEYER, S. F.; MUELLER, A. N.; CONRATH, U. Fighting Asian soybean rust. **Front. Plant. Sci**, v. 7, 2016.

LEE, J.; FENG, J.; CAMPBELL, K. B.; SCHEFFLER, B. E.; GARRETT, W. M.; THIBIVILLIERS, S.; STACEY, G.; NAIMAN, D. Q.; TUCKER, M. L.; PASTOR-CORRALES, M. A.; COOPER, B. Quantitative proteomic analysis of bean plants infected by a virulent and avirulent obligate rust fungus. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 8, n. 1, p. 19–31, 2009.

LEITE, T. F. **Estabelecimento de um patossistema modelo e análise da interação molecular planta-patógeno entre *Eucalyptus grandis* e *Puccinia psidii winter* por meio da técnica de RNA-Seq**. 2012. Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2012.

LIU, Y.; LI, M.; XU, J.; LIU, X.; WANG, S.; SHI, L. Physiological and metabolomics analyses of young and old leaves from wild and cultivated soybean seedlings under low-nitrogen conditions. **BMC Plant Biology**, v. 19, n. 1, p. 1–15, 2019.

LORENZO, O; SOLANO, R. Molecular players regulating the jasmonate signalling network. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, i. 5, p. 532 – 540, 2004.

MARCOLINO-GOMES, J.; RODRIGUES, F. A.; FUGANTI-PAGLIARINI, R.; BENDIX, C.; NAKAYAMA, T. J.; CELAYA, B.; MOLINARI, H. B. C.; OLIVEIRA, M. C. N.; HARMON, F. G.; NEPOMUCENO, A. Diurnal oscillations of soybean circadian clock and drought responsive genes. **Plos One**, v. 9, i.1, e86402, 2014.

MARCHETTI, M.A.; MELCHING, J.S.; BROMFIELD, K.R. The effects of temperature and dew period on germination and infection by uredospores of *Phakopsora pachyrhizi*. **Phytopathology**, v.66, p.461-463, 1976.

MATTOS JR., J. A. D.; BOARETTO, Q. & R. M.; BOARETTO, J. A. Q. & R. M.; JR., D. M.; BOARETTO, J. A. Q. & R. M. Uso de elicitores para defesa em plantas cítricas. **Citrus Research & Technology**, v. 31, n. 1, p. 65–74, 2017.

MESQUITA, C. M.; REZENDE, J. E.; CARVALHO, J. S.; JÚNIOR, M. A. F.; MORAES, N. C.; DIAS, P. T.; CARVALHO, R. M.; ARAÚJO, W. G. **Manual do café: distúrbios fisiológicos, pragas e doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. Belo Horizonte: Emater, 2016.

MHAMDI, A.; QUEVAL, G.; CHAOUCH, S.; VANDERAUWERA, S.; BREUSEGEM, F. Van; NOCTOR, G. Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 15, p. 4197–4220, 2010.

MOLOSHOK, T.; PEARCE, G.; RYAN, C. A. Oligouronide signaling of proteinase inhibitor genes in plants: structure-activity relationships of di- and trigalacturonic acids and their derivatives. **Archives of biochemistry and biophysics**, v.2, p 731-735, 1992.

NELSON, R. T.; SHOEMAKER, R. Identification and analysis of gene families from the duplicated genome of soybean using EST sequences. **BMC Genomics**, v. 7, n. 1, p. 1–15, 9 ago. 2006.

NEPOMUCENO, A. L.; FARIAS, J. R. B.; NEUMAIER, N. **Árvore do conhecimento: soja**. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/soja/arvore/CONTAG01_24_271020069131.html>. Acesso em: 16 jul. 2021.

OSORIO, S.; CASTILLEJO, C.; QUESADA, M. A.; MEDINA-ESCOBAR, N.; BROWNSEY, G. J.; SUAU, R.; HEREDIA, A.; BOTELLA, M. A.; VALPUESTA, V. Partial demethylation of oligogalacturonides by pectin methyl esterase-1 is required for eliciting defence responses in wild strawberry (*Fragaria vesca*). **The Plant Journal**, v. 54, n. 1, p. 43–55, 2008.

PANDEY, D.; RAJENDRAN, S. R. C. K.; GAUR, M.; SAJEESH, P. K.; KUMAR, A. Plant defense signaling and responses against necrotrophic fungal pathogens. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 35, n. 4, p. 1159–1174, 2016.

PANG, Z.; ZHOU, G.; EWALD, J.; CHANG, L.; HACARIZ, O.; BASU, N.; XIA, J. Using MetaboAnalyst 5.0 for LC–HRMS spectra processing, multi-omics integration and covariate adjustment of global metabolomics data. **Nature Protocols**, v. 17, n. 8, p. 1735–1761, 2022.

PASCHOLATI, S. F.; MELO, T. A. De; DURIGAN, J. Indução de resistência contra patógenos: definição e perspectivas de uso. **Visão Agrícola**, n. 13, p. 110–112, 2015.

PATEL, H.; KRISHNAMURTHY, R. Elicitors in plant tissue culture. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 2, n. 2, 2013.

PELIN, C.; WORDELL FILHO, J. A.; NESI, C. N. Ferrugem asiática da soja: etiologia e controle. **Agropecuária Catarinense**, v. 33, n. 3, p. 18–21, 2020.

PIETERSE, C. M. J.; VAN DER DOES, D.; ZAMIOUDIS, C.; LEON-REYES, A.; VAN WEES, S. C. M. Hormonal modulation of plant immunity. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 28, p. 489–521, 2012.

PINAZZA, L. A. **Cadeia produtiva da soja**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, v.2, 2007.

PINHEIRO, A. L. M. **Coexpression network analysis of proteins and metabolites time-course of two contrasting *Eucalyptus grandis* responses to *Austropuccinia psidii***. 2020. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2020.

PURCELL, L. C.; SALMERON, M.; ASHLOCK, L. **Soybean growth and development**. In: Arkansas Soybean Production Handbook. 4. ed. [s.l: s.n.]. p. 1–8.

QI, M.; GRAYCZYK, J. P.; SEITZ, J. M.; LEE, Y.; LINK, T. I.; CHOI, D.; PEDLEY, K. F.; VOEGELE, R. T.; BAUM, T. J.; WHITHAM, S. A. Suppression or activation of immune responses by predicted secreted proteins of the soybean rust pathogen *Phakopsora pachyrhizi*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 31, n. 1, p. 163–174, 2017.

RASUL, S.; DUBREUIL-MAURIZI, C.; LAMOTTE, O.; KOEN, E.; POINSSOT, B.; ALCARAZ, G.; WENDEHENNE, D.; JEANDROZ, S. Nitric oxide production mediates oligogalacturonide-triggered immunity and resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. **Plant, Cell & Environment**, v. 35, n. 8, p. 1483–1499, 2012.

ROJAS, C. M.; SENTHIL-KUMAR, M.; TZIN, V.; MYSORE, K. S. Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. FEB, p. 17, 10 fev. 2014.

RSTUDIO TEAMS. **RStudio: integrated development for R**. RStudio. Disponível em: <<http://www.rstudio.com/>>.

RYTER, S. W.; TYRRELL, R. M. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity: heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 2, p. 289–309, 2000.

SEDIYAMA, T.; TEIXEIRA, R. C.; REIS, M. S. Melhoria de espécies cultivadas. In: **Melhoramento da soja**. Viçosa, MG: Editora UFV, p. 808, 1999.

SETH, C. S.; REMANS, T.; KEUNEN, E.; JOZEF CZAK, M.; GIELEN, H.; OPDENAKKER, K.; WEYENS, N.; VANGRONSVELD, J.; CUYPERS, A. Phytoextraction of toxic metals: a central role for glutathione. **Plant, Cell & Environment**, v. 35, n. 2, p. 334–346, 2012.

SINGH, R. R.; CHINNASRI, B.; DE SMET, L.; HAECK, A.; DEMEESTERE, K.; VAN CUTSEM, P.; VAN AUBEL, G.; GHEYSEN, G.; KYNDT, T. Systemic defense activation by COS-OGA in rice against root-knot nematodes depends on stimulation of the phenylpropanoid pathway. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 142, p. 202–210, 2019.

SOUZA, L. L. P. **Efeito do momento de aplicação de fungicida e da época de semeadura no controle da ferrugem asiática da soja**. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

SPIRO, M. D.; KATES, K. A.; KOLLER, A. L.; O'NEILL, M. A.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G. Purification and characterization of biologically active 1,4-linked α -D-oligogalacturonides after partial digestion of polygalacturonic acid with endopolygalacturonase. **Carbohydrate Research**, v. 247, n. C, p. 9–20, 1993.

SUNDIN, G. W.; MURILLO, J. The role of iron in the pathogenesis of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strain B728a on bean. **Journal of Plant Pathology**, v. 84, n. 1, p. 9–18, 2002.

TIAN, T.; LIU, Y.; YAN, H.; YOU, Q.; YI, X.; DU, Z.; XU, W.; SU, Z. agriGO v2.0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. W1, p. W122–W129, 2017.

TIERENS, K. F. M. J.; THOMMA, B. P. H. J.; BROUWER, M.; SCHMIDT, J.; KISTNER, K.; PORZEL, A.; MAUCH-MANI, B.; CAMMUE, B. P. A.; BROEKAERT, W. F. Study of the role of antimicrobial glucosinolate-derived isothiocyanates in resistance of *Arabidopsis* to microbial pathogens. **Plant Physiology**, v. 125, n. 4, p. 1688–1699, 2001.

VAN AUBEL, G.; BUONATESTA, R.; VAN CUTSEM, P. COS-OGA: A novel oligosaccharidic elicitor that protects grapes and cucumbers against powdery mildew. **Crop Protection**, v. 65, p. 129–137, 2014.

VAN AUBEL, G.; SERDERIDIS, S.; IVENS, J.; CLINCKEMAILLIE, A.; LEGRÈVE, A.; HAUSE, B.; CUTSEM, P. Van. Oligosaccharides successfully thwart hijacking of the salicylic acid pathway by *Phytophthora infestans* in potato leaves. **Plant Pathology**, v. 67, n. 9, p. 1901–1911, 2018.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 135–162, 2006.

WANG, Y.; YUAN, X.; HU, H.; LIU, Y.; SUN, W.; SHAN, Z.; ZHOU, X. Proteomic Analysis of Differentially Expressed Proteins in Resistant Soybean Leaves after *Phakopsora pachyrhizi* Infection. **Journal of Phytopathology**, v. 160, n. 10, p. 554–560, 2012.

WELFORT, V. R. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 5. ed., São Paulo: Agronômica Ceres, p. 355–360, 2011.

WESZ, V. J. Strategies and hybrid dynamics of soy transnational companies in the Southern Cone. **The Journal of Peasant Studies**, v. 43, p. 286–312, 2016.

YAMAOKAL, Y.; FUJIWARAL, Y.; KAKISHIMA, M.; KATSUYA1P3, K.; YAMADA1, K.; HAGIWARA2, H. Pathogenic races of *Phakopsora pachyrhizi* on soybean and wild host plants collected in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, v. 68, n. 1, p. 52–56, 2002.

ZAEAMELA, L. S. **Caracterização do secretoma de *Phakopsora pachyrhizi* expresso durante a interação com soja**. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade Federal de Viçosa, 2011.

ZEIER, J. New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways. **Plant, Cell & Environment**, v. 36, n. 12, p. 2085–2103, 2013.