

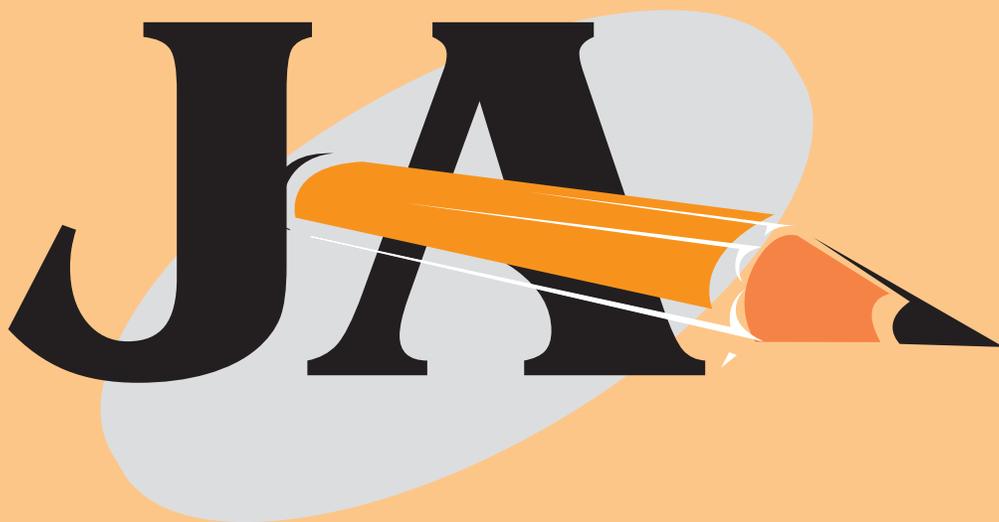
**DOCUMENTOS**

440

ISSN 2176-2937  
Agosto/2021

## XVI Jornada Acadêmica da Embrapa Soja

Resumos expandidos



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Soja  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

## **DOCUMENTOS 440**

# **XVI Jornada Acadêmica da Embrapa Soja Resumos expandidos**

*Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite  
Kelly Catharin*  
Editoras Técnicas

**Embrapa Soja**  
Londrina, PR  
2021

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Soja**  
Rod. Carlos João Strass, s/n  
Acesso Orlando Amaral, Distrito da Warta  
CEP 86001-970  
Caixa Postal 231  
Londrina, PR  
Fone: (43) 3371 6000  
www.embrapa.br/soja  
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

**Comitê Local de Publicações  
da Embrapa Soja**

Presidente  
*Alvadi Antonio Balbinot Junior*

Secretária-Executiva  
*Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite*

Membros  
*Clara Beatriz Hoffmann-Campo, Claudine Dinali Santos Seixas, Ivani de Oliveira Negrão Lopes, Liliane Márcia Mertz-Henning, Marco Antônio Nogueira, Mariangela Hungria da Cunha, Mônica Juliani Zavaglia Pereira e Norman Neumaier*

Supervisão editorial  
*Vanessa Fuzinato Dall' Agnol*

Normalização bibliográfica  
*Valéria de Fátima Cardoso*

Projeto gráfico da coleção  
*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Edição eletrônica e capa  
*Vanessa Fuzinato Dall' Agnol*

**1ª edição**  
PDF digitalizado (2021).

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Embrapa Soja

---

Jornada Acadêmica da Embrapa Soja (16. : 2021: Londrina, PR).

Resumos expandidos [da] XVI Jornada Acadêmica da Embrapa Soja / Regina Maria Villas Boas de Campos Leite, Kelly Catharin, editoras técnicas – Londrina: Embrapa Soja, 2021.

163 p. (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 2176-2937 ; n. 440).

1. Soja-Pesquisa. 2. Pesquisa agrícola. I. Série.

CDD: 630.2515 (21. ed.)

# Novos aspectos da interação *Pratylenchus brachyurus*-soja baseados na predição das proteínas-alvo no hospedeiro

NOMURA, R. B. G.<sup>1</sup>; LOPES-CAITAR, V. S.<sup>2</sup>; HISHINUMA-SILVA, S. M.<sup>3</sup>; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>UEL, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Londrina, PR, rafaeltuayato@gmail.com; <sup>2</sup>Department of Plant Sciences, University of Tennessee, Knoxville, Tennessee, EUA; <sup>3</sup>Pós-doutorado, Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Embrapa Soja; <sup>4</sup>Pesquisador, Embrapa Soja.

## Introdução

O nematoide causador das lesões radiculares *Pratylenchus brachyurus* ocupa atualmente o segundo lugar em relação aos impactos econômicos causados a diversas culturas agrícolas no Brasil (Goulart, 2008; Brum et al., 2019) e vem sendo motivo de grande preocupação no Brasil, especialmente pelas dificuldades encontradas para o seu controle, e pela alta ocorrência em regiões produtoras de soja, o principal produto agrícola brasileiro (Franchini et al., 2014). A rotação de culturas é bastante dificultada por se tratar de uma espécie altamente polífaga (Ferraz et al., 2010), e a utilização de nematicidas químicos, além da baixa eficiência, apresenta riscos de contaminação humana, animal e ambiental.

O sucesso do parasitismo de fitonematoides é dependente de sua capacidade em estabelecer uma relação com seu hospedeiro através da secreção de proteínas efetoras no momento da infecção, que possuem diversas funções associadas, como o rompimento das barreiras físicas e inibição da resposta de defesa, potencializando ainda sua capacidade infectiva. Dessa forma, o entendimento dos mecanismos envolvidos na interação planta-patógeno através da identificação desses efetores é importante para o desenvolvimento de estratégias alternativas para o controle desses patógenos, como aquelas baseadas em ferramentas biotecnológicas, que possibilitem o aumento da produtividade e a redução dos impactos causados pelo uso de nematicidas.

Lopes-Caitar (2018) em análise de RNAseq da interação do nematoide e a soja, realizou a predição do transcriptoma, secretoma e de candidatos a efetores desse nematoide na interação com o hospedeiro. Como resultado,

foram obtidos 115 candidatos com potencial de serem efetores secretados. Destes, ao menos sete apresentam elevado potencial de serem secretados e participarem efetivamente do parasitismo desse nematoide, sendo que 3 se apresentaram importantes para o parasitismo desse nematoide, visto que, quando silenciados via estratégias de RNA interferente, comprometeram significativamente sua taxa reprodutiva em plantas de soja (Nomura, 2021).

Além da identificação das proteínas do patógeno que estão relacionadas a sua capacidade infectiva, estudos envolvendo a identificação das proteínas-alvo no hospedeiro podem ampliar o entendimento dos mecanismos envolvidos na interação patógeno-hospedeiro, além de fornecer novas possibilidades de abordagem para o controle destes organismos (Gassmann; Bhattacharjee, 2012).

Estudos de interação proteína-proteína são realizados por diferentes metodologias, tais como o ensaio do duplo-híbrido em levedura (Yeast Two-Hybrid – Y2H), co-imunoprecipitação (Co-IP) e BiFC (Fields; Song, 1989; Kerppola, 2008), que vem possibilitando a identificação de alvos de proteínas importantes a diferentes fitopatógenos, incluindo alvos de efetores de fitonematoídes (Yang et al., 2019a).

Além das ferramentas descritas, estratégias *in silico* visando a predição de interações proteína-proteína através de ferramentas de bioinformática também são aplicadas e vem fornecendo “insights” no mecanismo de ação de diferentes organismos em seus hospedeiros (Shah; Chen, 2021).

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo, realizar predição das proteínas-alvo de cinco candidatos a efetores de *P. brachyurus* na soja.

## **Material e Métodos**

### **Predição das proteínas-alvo de candidatos a efetores na soja**

A predição dos alvos dos candidatos a efetores no hospedeiro (soja) foi realizada pelo software InterSPPI-AraPathogen, aplicando os parâmetros “all host (*Arabidopsis thaliana*) proteins” com 0.97 de especificidade (Yang, et

al., 2019b). Após a identificação das proteínas em *A. thaliana*, foi realizada a busca pelos ortólogos na soja através do Phytozome12-Biomart<sup>1</sup>.

Os candidatos a efetores foram obtidos em trabalho de RNAseq da interação *P. brachyurus*/soja (Lopes-Caitar, 2018). Os cinco candidatos foram preditos como tendo elevado potencial de serem secretados durante o parasitismo e de participarem diretamente do processo infeccioso no hospedeiro e foram anotados como unknown (PB1365),  $\beta$ 1,4-endoglucanase (PB1953), cellulase-8 (PB3189), 14-3-3 protein (PB6584) e LGMN (PB6638).

### **Anotação funcional (Gene ontology), domínios e rotas metabólicas**

As proteínas-alvo preditas foram mapeadas com base em sua anotação (Gene ontology), nas categorias Processo Biológico, Função Molecular e Componente Celular através do software Omicsbox aplicando os parâmetros padrão. A fim de expandir o alcance dos GO terms e garantir a consistência das diferentes proteínas, foi aplicado o parâmetro de nível 2. A busca por domínios foi realizada via InterProScan.

Já a busca por possíveis rotas metabólicas afetadas foi realizada pelo software KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Para isso, as KEGG IDs dos genes preditos foram obtidas no banco de dados Phytozome12-Biomart<sup>2</sup> e submetidos ao KEGG Mapper<sup>3</sup>.

### **Rede de interações proteína-proteína**

Para identificar uma possível rede de interações proteína-proteína entre os alvos preditos, foi utilizado o software String (versão 11.0) aplicando a opção “busca por múltiplas proteínas”. A fim de selecionar somente as interações significativas, foi aplicado o filtro “high confidence cutoff (0.7)”, na categoria “minimum required interaction score”.

---

<sup>1</sup> <https://phytozome.jgi.doe.gov/biomart>

<sup>2</sup> <https://phytozome.jgi.doe.gov/biomart/martview>

<sup>3</sup> [https://www.genome.jp/kegg/tool/map\\_pathway1.html](https://www.genome.jp/kegg/tool/map_pathway1.html)

## Resultados e Discussão

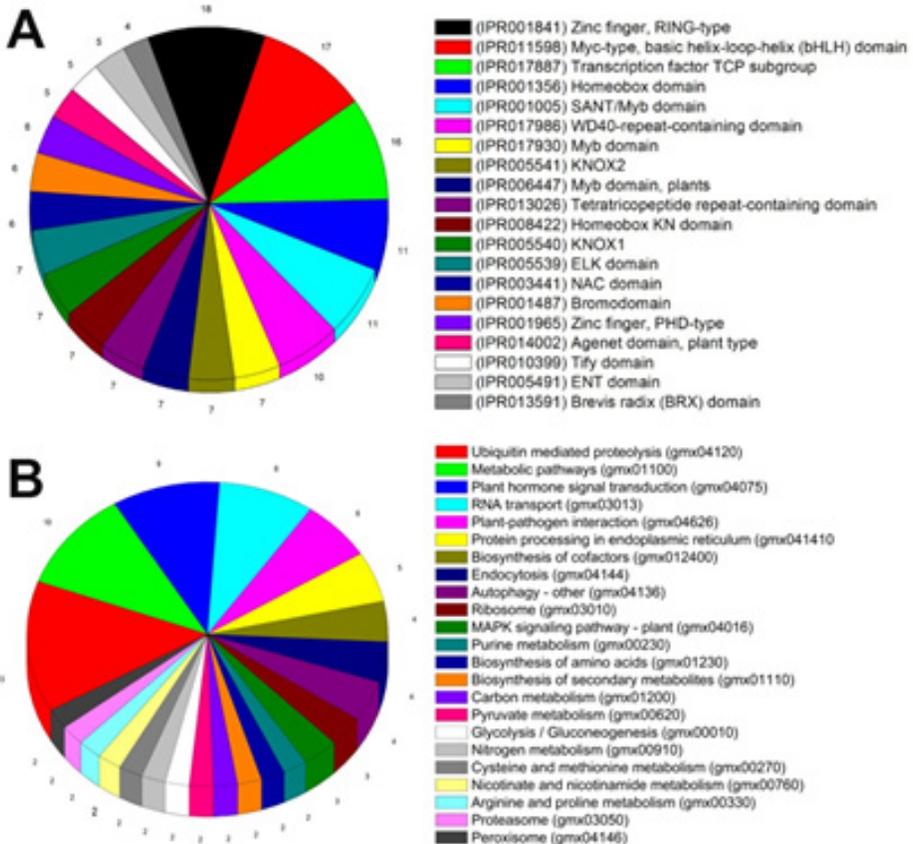
Após a predição das proteínas-alvo para cada candidato a efetor, as sequências redundantes foram removidas, e as proteínas restantes foram concatenadas em um único painel contendo 302 sequências únicas.

Para a identificação de proteínas com potencial de serem associadas ao processo infeccioso de *P. brachyurus*, foi realizada a anotação funcional através de Gene Ontology (GO) para todas as proteínas preditas, que foram então mapeadas nas categorias de Processo Biológico, Função Molecular e Componente Celular (Tabela 1). Na categoria Processo Biológico, termo mais abundante foi “response to stress”. Outros termos que também incluem “anatomical structure development”, “signal transduction” e “immune system process”. Em Função Molecular, o termo mais abundante foi “DNA binding”. Já na categoria Componente Celular, o termo mais presente foi “nucleus”.

**Tabela 1.** Top 10 GO terms obtidos a partir do painel de 302 potenciais proteínas-alvo preditas.

| Processo biológico                           | #Seqs | Função molecular                          | #Seqs | Componente celular         | #Seqs |
|--|-------|---|-------|----------------------------|-------|
| response to stress                           | 159   | DNA binding                               | 88    | nucleus                    | 113   |
| Reproduction                                 | 147   | DNA-binding transcription factor activity | 63    | cytosol                    | 91    |
| biosynthetic process                         | 127   | molecular_function                        | 59    | protein-containing complex | 82    |
| cellular nitrogen compound metabolic process | 107   | enzyme binding                            | 54    | plasma membrane            | 78    |
| cell differentiation                         | 103   | ion binding                               | 47    | nucleoplasm                | 50    |
| anatomical structure development             | 100   | transcription factor binding              | 25    | cytoskeleton               | 36    |
| signal transduction                          | 95    | cytoskeletal protein binding              | 24    | endosome                   | 30    |
| cellular protein modification process        | 69    | mRNA binding                              | 16    | Plastid                    | 30    |
| immune system process                        | 61    | lipid binding                             | 16    | mitochondrion              | 29    |
| embryo development                           | 60    | protein-macromolecule adaptor activity    | 14    | endoplasmic reticulum      | 29    |

A busca por domínios através da ferramenta InterProScan revelou a ocorrência de 106 domínios. Dentre eles, o domínio Zinc finger, RING-type (IPR001841) foi o mais abundante, seguido de Myc-type, basic helix-loop-helix (bHLH) domain (IPR011598), Transcription factor TCP subgroup (IPR017887), Homeobox domain (IPR001356), SANT/Myb domain (IPR001005) e WD40-repeat-containing domain (IPR017986) (Figura 1A).

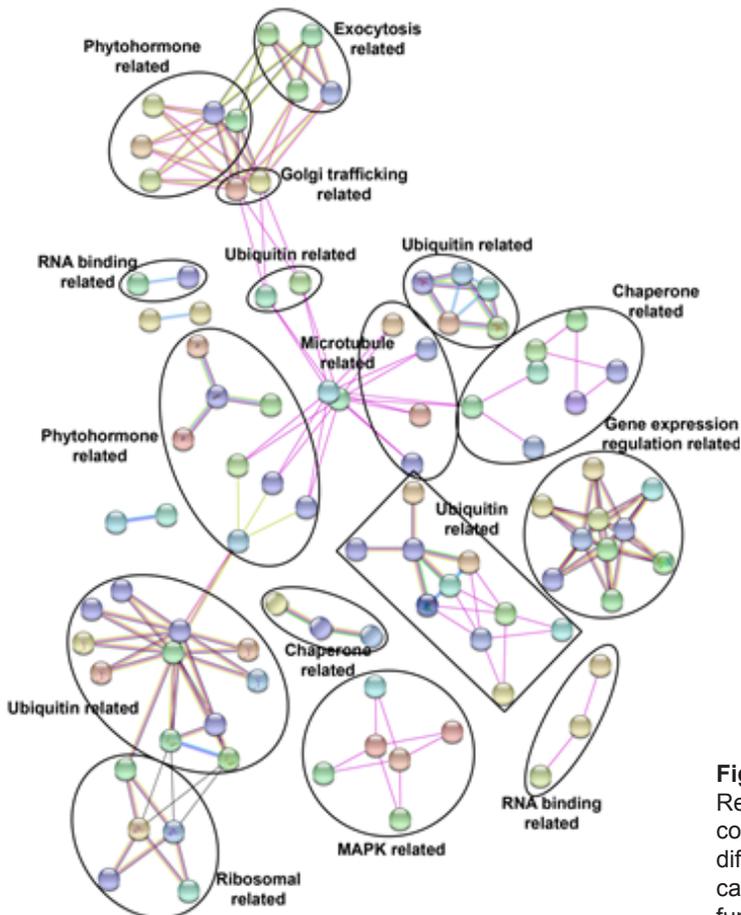


**Figura 1.** Domínios identificados entre as proteínas-alvo preditas (A); Rotas metabólicas identificadas entre as proteínas-alvo preditas (B).

A fim de se entender os possíveis mecanismos envolvidos na atividade dos candidates a efetores no tecido do hospedeiro, foi realizada a busca por rotas metabólicas, e dentre elas, Ubiquitin mediated proteolysis (gmx04120), seguido de Metabolic pathways (gmx01100) e Plant hormone signal transduc-

tion (gmx04075) foram os mais abundantes. Outras categorias relacionadas a defesa vegetal também foram identificadas, como plant-pathogen interaction (gmx04626), protein processing in endoplasmic reticulum (gmx04141), MAPK signaling pathway (gmx04016), proteasome (gmx03050) e peroxisome (gmx04146) (Figura 1B).

Através da análise de possíveis interações entre as proteínas preditas pelo software String, foi possível observar a ocorrência de “redes gênicas” envolvendo diferentes categorias funcionais que podem estar sendo afetadas por *P. brachyurus*, tais como proteínas relacionadas a fitormônios, regulação da expressão gênica, chaperonas, ubiquitinas, MAPK, entre outras (Figura 2).



**Figura 2.** Rede gênica compreendendo diferentes categorias funcionais.

É de conhecimento que efetores estão diretamente envolvidos na manipulação de processos celulares do hospedeiro, como ciclo celular, expressão gênica e imunidade. A predição dos potenciais alvos dos efetores na soja revelou que *P. brachyurus* pode interferir tanto na resposta Imunidade Desencadeada por PAMPs (PTI) como Imunidade Desencadeada por Efetores (ETI) através da interação com proteínas conhecidamente relacionadas a defesa vegetal e já descrita como alvo de efetores em outras espécies, tais como as ubiquitinas relacionadas a proteólise, reguladores de fitormônios, proteínas de ligação ao cálcio, fatores de transcrição myb e chaperonas (HSP20) (Groll et al., 2008; Kim; Hwang, 2015).

## Conclusão

Através das análises *in silico*, foi possível identificar diversas proteínas com potencial de serem afetadas por *P. brachyurus* durante o seu parasitismo, que necessitam de validação *in vivo*.

## Referências

- BRUM, D.; MARCHI, P. M.; GONÇALVES, M. A.; CRUZ, F. F.; ANTUNES, L. E. C.; GOMES, C. B. Reaction of strawberry cultivars to root-knot and root-lesion nematodes. **Horticultura Brasileira**, v. 37, n. 1, p. 65-68, 2019.
- FERRAZ, S.; FREITAS, L. G. de; LOPES, E. A.; DIAS-ARIEIRA, C. R. (Ed.). **Manejo sustentável de fitonematóides**. Viçosa: Editora UFV, 2010. 304 p.
- FIELDS, S.; SONG, O.-K. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. **Nature**, v. 340, n. 6230, p. 245-246, 1989.
- FRANCHINI, J. C.; DEBIASI, H.; DIAS, W. P.; RAMOS JUNIOR, E. U.; SILVA, J. F. V. Perda de produtividade da soja em área infestada por nematoide das lesões radiculares na região médio norte do Mato Grosso. In: BERNARDI, A. C. de C.; NAIME, J. de M.; RESENDE, A. V. de; BASSOI, L. H.; INAMASU, R. Y. (Ed.). **Agricultura de precisão: resultados de um novo olhar**. Brasília, DF: Embrapa, 2014. p. 274-278.
- GASSMANN, W.; BHATTACHARJEE, S. Effector-triggered immunity signaling: from gene-for-gene pathways to protein-protein interaction networks. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 25, n. 7, p. 862-868, 2012.
- GOULART, A. M. C. **Aspectos gerais sobre nematóides das lesões radiculares (gênero *Pratylenchus*)**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008. (Embrapa Cerrados. Documentos, 219).

GROLL, M.; SCHELLENBERG, B.; BACHMANN, A.; ARCHER, C. R.; HUBER, R.; POWELL, T. K.; LINDOW, S.; KAISER, M.; DUDLER, R. A plant pathogen virulence factor inhibits the eukaryotic proteasome by a novel mechanism. **Nature**, v. 452, n. 7188, p. 755-758, 2008.

KERPPOLA, T. K. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. **Annual Review of Biophysics**, v. 37, p. 465-487, 2008.

KIM, N. H.; HWANG, B. K. Pepper heat shock protein 70a interacts with the type III effector AvrBsT and triggers plant cell death and immunity. **Plant Physiology**, v. 167, n. 2, p. 307-322, 2015.

LOPES-CAITAR, V. S. **Estudos moleculares do patossistema *Glycine max-Pratylenchus brachyurus*: de estratégias de infecção do patógeno e de defesa do hospedeiro, à interação proteína-proteína**. 2018. 105 f. Tese (Doutorado) - Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

NOMURA, R. B. G. **Análise funcional de candidatos a efetores de *Pratylenchus brachyurus* em soja via estratégias de RNAi e predição das proteínas-alvo no hospedeiro**. 2021. 169 f. Tese (Doutorado) - Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

SHAH, P.; CHEN, C.-S. Systematic identification of protein targets of Sub5 using *Saccharomyces cerevisiae* proteome microarrays. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 2, p. 760, 2021.

YANG, S.; LI, H.; HE, H.; ZHOU, Y.; ZHANG, Z. Critical assessment and performance improvement of plant-pathogen protein-protein interaction prediction methods. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 1, p. 274-287, 2019b.

YANG, S.; PAN, L.; CHEN, Y.; YANG, D.; LIU, Q.; JIAN, H. *Heterodera avenae* GLAND5 effector interacts with Pyruvate Dehydrogenase Subunit of plant to promote nematode parasitism. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1241, 2019a.