

**EFEITO DA METILAÇÃO DO DNA NAS VIAS DE BIOSÍNTESE E  
SINALIZAÇÃO DE ABA EM CULTIVARES DE SOJA TOLERANTE  
É SUSCEPTÍVEL AO ESTRESSE OSMÓTICO**

**FELIPE CRUZ PAULA**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO UENF**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO - 2024**

**EFEITO DA METILAÇÃO DO DNA NAS VIAS DE BIOSÍNTESE E  
SINALIZAÇÃO DE ABA EM CULTIVARES DE SOJA TOLERANTE  
É SUSCEPTÍVEL AO ESTRESSE OSMÓTICO**

**FELIPE CRUZ PAULA**

Dissertação apresentada ao Centro de  
Biotecnologia e Biotecnologia da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Mestre em Biotecnologia Vegetal.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Clícia Grativol Gaspar de Matos

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO - 2024

**FICHA CATALOGRÁFICA**

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

P324

Paula, Felipe Cruz.

EFEITO DA METILAÇÃO DO DNA NAS VIAS DE BIOSSÍNTESE E SINALIZAÇÃO DE ABA EM CULTIVARES DE SOJA TOLERANTE E SUSCEPTÍVEL AO ESTRESSE OSMÓTICO / Felipe Cruz Paula. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2024.

95 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2024.

Orientadora: Clícia Grativol Gaspar.

1. Metilação do DNA. 2. 5-azacitidina. 3. Expressão gênica. 4. Ácido Abscísico. 5. *Glycine max*. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 660.6

EFEITO DA METILAÇÃO DO DNA NAS VIAS DE BIOSÍNTESE E  
SINALIZAÇÃO DE ABA EM CULTIVARES DE SOJA TOLERANTE  
E SUSCEPTÍVEL AO ESTRESSE OSMÓTICO

FELIPE CRUZ PAULA

Dissertação apresentada ao Centro de  
Biotecnologia e Biotecnologia da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Mestre em Biotecnologia Vegetal.

Aprovado em 29 de fevereiro de 2024.

Comissão Examinadora:

---

Felipe Astolpho de Almeida (DSc., Biotecnologia Vegetal) - UENF

---

Flávia Thiebaut Andrade Zanon Barroso (DSc., Química Biológica) - UFF

---

Jurandi Gonçalves Oliveira (DSc., Biologia Vegetal) - UENF

---

Clícia Grativol Gaspar de Matos (DSc., Química Biológica) - UENF  
(Orientadora)

## **DEDICATÓRIA**

A Deus, pela vida e a minha família por todo apoio, por serem meus alicerces e sempre apoiarem meus estudos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por estar ao meu lado em todos os momentos, por me guardar, iluminar e guiar os meus passos, e principalmente por ter me ouvido, me dado forças e coragem para seguir e concluir mais uma etapa da minha vida.

Agradeço a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pela oportunidade e estrutura para realização de uma Pós-Graduação gratuita e de qualidade, aos professores, alunos e técnicos do LQFPP.

À FAPERJ pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa.

À minha orientadora Dr<sup>a</sup> Clícia Grativol Gaspar de Matos, por acreditar no meu potencial e por me conceder a oportunidade de participar desta pesquisa. Obrigado pelo apoio, compreensão, ensinamentos, conselhos, orientações e principalmente pela disponibilidade de me orientar com paciência e dedicação.

A minha mãe e toda minha família, por todo amor e apoio, pelo incentivo, por toda dedicação, pelas orações e por estarem sempre comigo.

Aos meus amigos, Israel Felipe, Poliany, Simone e Vinicius, que estiveram sempre ao meu lado, por todo apoio e incentivo, assim compartilhando anseios e aflições durante todo esse tempo.

Agradeço ao núcleo de estudos germinação e meus colegas de laboratório Geovanna, Giulia, Paula, Fernando e Pedro pela convivência e por tornar essa caminhada mais leve.

A minha banca avaliadora, Prof. Dr. Jurandi, Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Flávia e ao Prof. Dr. Felipe por terem aceitado fazer parte dessa jornada e conclusão do meu sonho.

A todos, o meu muito obrigado!

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	12
<b>ABSTRACT</b> .....	14
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	18
2.1 Objetivo geral .....	18
2.2 Objetivos específicos .....	18
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	19
3.1 Cultura da soja: classificação botânica, histórico e importância econômica .....	19
3.2 Cenário de mudanças climáticas e estresses abióticos em plantas .....	21
3.3 Regulação epigenética em plantas .....	24
3.4 Associação entre ácido abscísico e a metilação do DNA no desenvolvimento vegetal .....	27
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
4.1 Identificação e expressão de genes constituintes das vias metabólicas de ABA no genoma de soja .....	31
4.2 Análise do perfil de expressão de genes vinculados à regulação das vias de ABA e de efetores epigenéticos em genótipos de soja suscetíveis e tolerantes ao déficit osmótico .....	31
4.3 Avaliação do efeito da metilação do DNA em plântulas de soja .....	32
4.4 Quantificação dos níveis de metilação global do DNA em plântulas de soja .....	32
4.5 Extração e quantificação de pigmentos cloroplastidiais em plântulas de soja ...	33
4.6 Análise da expressão de genes envolvidos com a biossíntese de ABA em plântulas de soja .....	34
4.7 Análises estatísticas .....	35
<b>5. RESULTADOS</b> .....	37
5.1 Identificação dos genes constituintes das vias metabólicas de ABA no genoma de soja .....	37
5.2 Análise da expressão de genes constituintes das vias metabólicas de ABA no genoma de soja .....	41
5.3 Impacto do perfil de expressão dos genes vinculados à regulação das vias de ABA e de efetores epigenéticos em genótipos de soja suscetíveis e tolerantes ao déficit osmótico .....	48

5.4 Impactos do 5-azaC no crescimento inicial de plântulas de soja tolerante e sensível à seca e quando submetidas ao estresse osmótico .....	51
5.5 Avaliação dos níveis de metilação global do DNA em plântulas de soja .....	57
5.6 Influência do 5-azac e estresse osmótico na expressão de pigmentos cloroplastidiais em plântulas de soja.....	58
5.7 Efeito do 5-azac na expressão de genes relacionados com a biossíntese de ABA em plântulas de soja .....	61
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>66</b>
6.1 Análise do perfil de expressão de genes integrados às vias metabólicas de ABA .....	66
6.2 Perfil de expressão de genes vinculados às vias metabólicas de ABA e de regulação epigenética em genótipos de soja suscetível e tolerante ao déficit osmótico .....	67
6.3 Papel da metilação no desenvolvimento de plântulas de soja .....	69
6.4 Análise do impacto do 5-azac e estresse osmótico na expressão de pigmentos cloroplastidiais em plântulas de soja.....	70
6.5 Efeito do 5-azaC e do estresse osmótico na expressão de genes envolvidos na regulação de ABA em plântulas de soja .....	71
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	<b>76</b>
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>77</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>79</b>
<b>10. APÊNDICE</b> .....	<b>79</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Análise do Valor de Produção da Soja por Região, Estado e Município.....	21
Figura 2: Crosstalk de regulação e modulação epigenética. ....	24
Figura 3: Esquemas das vias de biossíntese, transporte, degradação e sinalização de ABA.....	28
Figura 4: Fluxograma da metodologia utilizada. ....	36
Figura 5: Expressão diferencial de genes na via de biossíntese de ABA em diferentes tecidos e órgãos durante o desenvolvimento da soja. ....	43
Figura 6: Expressão diferencial de genes na via de degradação de ABA em diferentes tecidos e órgãos durante o desenvolvimento da soja. Perfil de expressão de genes ABA em tecidos de soja .....	44
Figura 7: Expressão diferencial de genes na via de transporte de ABA em diferentes tecidos e órgãos durante o desenvolvimento da soja. ....	45
Figura 8: Expressão diferencial de genes na via de sinalização de ABA em diferentes tecidos e órgãos durante o desenvolvimento da soja.. ....	46
Figura 9: Expressão diferencial de genes na via de biossíntese (A) e degradação (B) de ABA em plântulas de soja.. ....	47
Figura 10: Heatmap gerado a partir dos valores de expressão normalizados dos 66 genes efetores epigenéticos.....	49
Figura 11: Heatmap gerado a partir dos valores de expressão normalizados dos 68 genes identificados nas vias metabólicas de ABA. ....	50
Figura 12: Efeito do inibidor da metilação (5-azaC) no desenvolvimento de duas cultivares de soja com 7 dias em diferentes concentrações de 5-azaC .....	51
Figura 13: Análise fenotípica das plântulas de soja controle e tratadas com 5-azaC da cultivar Embrapa 48 com 7 dias. ....	52
Figura 14: Análise fenotípica das plântulas de soja controle e tratadas com 5-azaC da cultivar BR16 com 7 dias.....	53
Figura 15: Análise fenotípica das plântulas de soja tratadas com 5-azaC e submetidas a estresse osmótico da cultivar EM48 com 8 dias. ....	55
Figura 16: Análise fenotípica das plântulas de soja tratadas com 5-azaC e submetidas a estresse osmótico da cultivar BR16 com 8 dias.....	56
Figura 17: Fragmentos obtidos pela digestão com a enzima ALUI.....	57

Figura 18: Teor de pigmentos cloroplastidiais EM48. ....	59
Figura 19: Teor de pigmentos cloroplastidiais BR16. ....	60
Figura 20: Expressão dos genes relacionados a regulação das vias metabólicas de ácido abscísico e de modulação epigenética em raiz de plântulas de soja com 8 dias. ....	64
Figura 21: Correlação da expressão de genes envolvidos na conversão de compostos para síntese de ABA. ....	73
Figura 22: Principais alterações biológicas em plântulas de soja com 8 dias em resposta ao 5-azaC e estresse osmótico. ....	77

## ABREVIATURAS

ABA - Ácido Abscísico

5-azaC – 5-azacitidina

ABA1 - Zeaxantina epoxidase

ABA2 - Xantoxina dehydrogenase

ABA3 - Molybdenum cofator sulfurtransferase

AA03 - Absciscic-aldehyde oxidase

NCED - Betacaroteno dioxygenase / 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase

NSY - Neoxanthin synthase

CYP707A - Absciscic acid 8'-hydroxylase

GmMBD10g - Methyl-CPG-binding domain-containing protein 10

SDIR1 – E3 ubiquitina-proteína ligase

NTR1 – Relacionado ao transportador de oligopeptídeo / proteína nrt1/ família ptr 4.7

HC – ácido abscísico 8'-hidroxilase / aba 8'-hidroxilase

H1- Família não nomeada / ácido abscísico 8'-hidroxilase 1-relacionado.

ADC – Acetoacetato descarboxilase

CHL – Subunidade h da quelatase de magnésio (chlh, bchh)

RING - Proteína tirosina quinase (pkinase\_tyr)

## RESUMO

A soja (*Glycine max*) é uma das culturas de leguminosas mais importantes economicamente, com uma grande relevância para a alimentação global. Ainda assim, parte da cultura da soja é impactada com estresses abióticos, que tendem a aumentar com as mudanças climáticas. Os mecanismos epigenéticos auxiliam nas respostas de plantas a diferentes estresses. A descoberta de como esses mecanismos estão associados com a tolerância a várias condições é de grande importância, uma vez que modulação de padrões de expressão gênica específicos podem ser alvo de ferramentas biotecnológicas. Com o intuito de revelar novas perspectivas sobre a soja em condições de déficit osmótico, esta pesquisa identificou e analisou a expressão de genes da via metabólica de ABA (Ácido Abscísico) em genótipos contrastantes de soja (Embrapa 48 e BR 16), assim como os genes envolvidos na regulação epigenética nos mesmos genótipos. Avaliou também a ação da metilação do DNA em cultivares de soja contrastantes quanto à tolerância à seca quando submetidas ao estresse osmótico e sob a ação de 5-azacitidina (5-azaC), assim como a expressão de genes envolvidos com a biossíntese e degradação de ABA nas mesmas condições. A metodologia envolveu o uso de diferentes ferramentas de bioinformática para filtragem das bibliotecas de RNA-seq, identificação e análise do perfil de expressão gênica. Já para avaliação da ação da metilação do DNA sob a ação de 5-azac e submetidos e estresse osmótico em cultivares de soja, as sementes foram germinadas em tubos de ensaio e após o período de 8 dias foram avaliados parâmetros fenotípicos, fisiológicos e genéticos. Os resultados revelaram diferentes padrões de expressão para os genes do ABA em diferentes tecidos de soja, com destaque para os genes ABA1, H1, NTR1 e CHL. Já os genes SDR1, ABA1, CHLH e NCED3 mostraram alta expressão em condições de estresse osmótico, assim como o gene regulador epigenético GmMBD10g que teve sua expressão aumentada nas mesmas condições. O inibidor de metilação do DNA afetou o desempenho das raízes, mas o tratamento com 5-azaC+manitol resultou em uma leve recuperação radicular. Houve diferenças significativas nos teores cloroplastidiais entre os tratamentos destacando os níveis de clorofila A e B em Embrapa 48 tratada com 5-azaC+manitol. A cultivar Embrapa 48, em tratamentos com inibidor 5-azaC induziu a expressão dos genes relacionados à conversão de compostos para síntese de ABA, especialmente no tratamento 5-azaC+manitol. Além de que diferenças de expressão foram encontradas no

gene GmMBD10g, respondendo de forma oposta ao tratamento de 5-azaC em ambas as cultivares. Esta pesquisa avança nosso entendimento sobre os mecanismos moleculares que conferem tolerância da soja ao déficit osmótico, fornecendo mecanismos para o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas visando o melhoramento genético e aprimoramento da resistência da soja aos estresses abióticos em um contexto de mudanças climáticas globais.

**Palavras-chave:** Metilação do DNA; 5-azacitidina; Expressão gênica; Ácido Abscísico; Estresse osmótico; *Glycine max*.

## ABSTRACT

Soya (*Glycine max*) is a highly significant leguminous crop with global importance in the food industry. However, abiotic stresses can impact the crop, and these stresses are expected to increase with climate change. Epigenetic mechanisms play a crucial role in plant responses to various stresses. Discovering the association between these mechanisms and tolerance to various conditions is important. Modulating specific gene expression patterns can be the target of biotechnological tools. To uncover fresh insights on soybeans in water deficit conditions, this study examined and compared the expression of genes from the ABA (Abscisic Acid) metabolic pathway in two different soybean genotypes (Embrapa 48 and BR 16), as well as the genes responsible for epigenetic regulation in those same genotypes. The study evaluated the effect of DNA methylation on drought tolerance in different soybean cultivars under osmotic stress and with the use of 5-azacytidine (5-azaC). It also examined the expression of genes related to ABA biosynthesis and degradation under the same conditions. The methodology used various bioinformatics tools to filter RNA-seq libraries and analyze gene expression profiles. To evaluate the effect of DNA methylation under the influence of 5-azaC and osmotic stress on soybean cultivars, seeds were germinated in test tubes and phenotypic, physiological, and genetic parameters were evaluated after 8 days. The expression patterns of ABA genes varied across different soybean tissues, with ABA1, H1, NTR1, and CHL genes being the most prominent. Under water stress conditions, SDR1, ABA1, CHLH, and NCED3 genes exhibited high expression levels, as did the epigenetic regulator gene GmMBD10g, which showed increased expression under the same conditions. Treatment with the DNA methylation inhibitor affected root performance, but the application of 5-azaC+mannitol resulted in slight root recovery. Significant differences in photosynthetic levels were observed between the treatments, particularly in the levels of chlorophyll A and B in Embrapa 48 treated with 5-azaC+mannitol. In the treatments with the inhibitor 5-azaC, the cultivar Embrapa 48 induced the expression of genes related to the conversion of compounds for ABA synthesis. This effect was particularly noticeable in the 5-azaC+mannitol treatment. Additionally, differences in expression were observed in the GmMBD10g gene, which responded differently to the 5-azaC treatment in both cultivars. This research enhances our comprehension of the molecular mechanisms that grant soybean tolerance to water deficit. It provides a basis for the development of

biotechnological strategies aimed at genetic improvement and enhancing soybean resistance to abiotic stresses in the context of global climate change.

**Keywords:** DNA methylation; 5-azacitidina; Gene expression; Abscisic acid; Osmotic stress; *Glycine max.*

## 1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max*) pertencente à família Fabaceae, é uma cultura leguminosa de notável importância econômica, desempenhando um papel significativo na alimentação global. Seus grãos apresentam um elevado teor proteico e um considerável conteúdo de óleo, conferindo-lhe relevância também na produção de biocombustíveis. Na safra 2021/2022, os agricultores brasileiros lograram uma produção 123,8 de milhões de toneladas de soja, contemplando uma diversidade de condições climáticas e solo em todo o país, destacando-se em 2023 como o principal produtor global de soja no mundo, superando a Argentina e os Estados Unidos. Já para a safra 2023/2024 está prevista para atingir um recorde de 162,4 milhões de toneladas (CONAB, 2023; Kothari et al., 2022).

O aumento da temperatura global, associado às consequências do efeito estufa, apresentam-se como um desafio significativo para a agricultura. Contudo, não são apenas as catástrofes naturais que causam bilhões de dólares em danos agrícolas a cada ano, mas também as condições persistentemente desfavoráveis, como escassez de água, aumento da salinização de solos aráveis e calor e frio extremos. Além disso, as projeções futuras para a soja brasileira, no contexto do aquecimento global, apontam para um cenário de intensificação dos eventos de seca nas próximas décadas com impactos ainda mais severos às lavouras (Kothari et al., 2022; Nelson et al., 2014).

Entretanto, registros indicaram que as plantas de soja podem se adaptar a essas condições, desencadeando mecanismos de proteção que lhes permitem sobreviver a condições de seca (Bray, 2004). Dois genótipos da soja brasileira (*Glycine max* L. Merrill), Embrapa 48 e BR 16, foram avaliados sob condições de seca em casa de vegetação e no campo (Oya et al., 2004), apontaram que a cultivar Embrapa 48 pode ser caracterizada como tolerante à seca e a cultivar BR16 como sensível à seca.

Na busca por sobrevivência a diferentes ambientes, as plantas passam por alterações moleculares e morfológicas. Neste contexto, a epigenética estuda a regulação gênica herdável que não está relacionada a mudanças na estrutura primária do DNA, mas que permite uma grande gama de regulações da expressão gênica. Os mecanismos epigenéticos podem fornecer recursos para que as plantas se adaptem a

determinados ambientes e conseqüentemente em diferentes estresses, o que resulta em maior capacidade de sobrevivência (Sallam e Moussa, 2021). É um dos mecanismos envolvidos no processo de controle epigenético e de expressão gênica em plantas é a metilação do DNA, que consiste na adição de um grupamento metil no quinto carbono do anel de citocinas (Bond e Finnegan, 2007).

A metilação do DNA é considerada uma marca epigenética conservada em plantas e animais, desempenhando uma ação importante na estabilidade do genoma (He et al., 2011). Nas plantas, a metilação desempenha um papel-chave, influenciando seu desenvolvimento, resposta a estresse, aclimatização e adaptação (Chen et al., 2013). Já a metilação do DNA dependente de RNA (RdDM), uma via de silenciamento transcricional que funciona para direcionar mudanças nas modificações epigenéticas e na expressão gênica nos loci alvo, ocorre em três diferentes contextos CG, CHG e CHH (H pode ser A, C ou T) (Matzke et al., 2015). Assim, quando associados a diferentes ambientes a metilação do DNA pode desencadear distintas respostas genéticas. (Sallam e Moussa, 2021).

O ácido abscísico (ABA) é um regulador chave essencial que regula muitos aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas, incluindo maturação embrionária, dormência e germinação de sementes, indução floral e crescimento radicular. Além de que os processos fisiológicos das plantas podem ser regulados pela modulação da expressão de vários genes responsivos ao ABA (Dong et al., 2015). Nesta perspectiva, destaca-se que poucos trabalhos abordaram o papel da metilação do DNA em cultivares de soja com foco na análise da regulação mediada por ABA. Assim, considerando que a modulação do status de metilação em loci específicos pode levar a mudanças nas respostas de plantas a estresses abióticos, esta pesquisa avaliou o status de metilação do DNA e a expressão de genes associados às vias metabólicas de ABA em cultivares de soja suscetíveis e tolerantes à seca.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a ação da metilação do DNA em cultivares de soja contrastantes quanto à tolerância à seca quando submetidas a estresse osmótico e sua interação com a regulação mediada por ABA.

### 2.2 Objetivos específicos

A - Identificar e analisar a expressão de genes da via metabólica de ABA em diferentes tecidos de *Glycine max* (L.) Merr.

B - Analisar a expressão de genes envolvidos na regulação epigenética em cultivares de soja tolerante e suscetível à seca.

C - Caracterizar parâmetros morfométricos das cultivares de soja contrastantes quanto à tolerância à seca quando submetidas ao estresse osmótico e sob a ação de 5-azaC.

D - Analisar o perfil de metilação global do DNA em cultivares de soja contrastantes quanto à tolerância à seca quando submetidas ao estresse osmótico e sob a ação de 5-azaC.

E - Avaliar a síntese de carotenoides em plântulas de soja quando submetidas a estresse osmótico e sob a ação de 5-azaC.

F - Avaliar a expressão de genes envolvidos com a biossíntese e degradação de ABA nas cultivares de soja tratadas com 5-azaC e submetidas a estresse osmótico.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Cultura da soja: classificação botânica, histórico e importância econômica

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill), é uma leguminosa cultivada no território brasileiro para a obtenção de grãos. A soja caracteriza-se por sua natureza herbácea e método de reprodução autógama, pertencendo à classe Magnoliopsida, à ordem Fabales, à subfamília Faboideae, ao gênero *Glycine* e à espécie *Glycine max* (L.) Merrill (Sedyama et al., 1985). Seu ciclo de vida varia de 75 a 200 dias e altura da dela também exibe variabilidade, oscilando entre 30 e 200 cm (Müller et al., 1981). A estrutura da planta de soja compreende uma raiz axial principal acompanhada por raízes secundárias (Sedyama et al., 1985). Seu caule apresenta características herbáceas, sendo ereto, pubescente e ramificado, e o desenvolvimento tem início a partir do eixo embrionário.

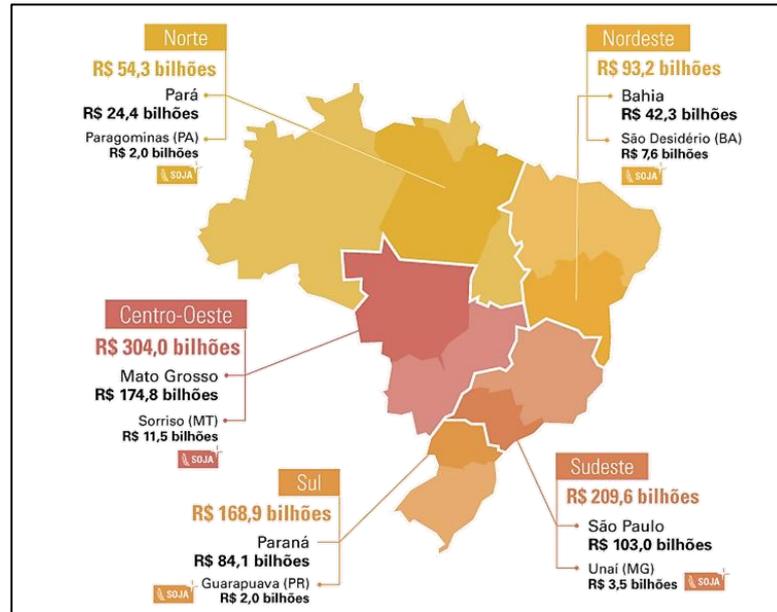
O hábito de crescimento da planta é classificado como determinado, semideterminado ou indeterminado, com base nas características do ápice principal do caule e da cultivar (Müller et al., 1981). Nas características foliares a soja se manifesta em três categorias, sendo cotiledonares, que representam as folhas iniciais, as unifolioladas, que surgem também no estágio inicial do desenvolvimento e as trifolioladas, que surgem imediatamente após as unifolioladas e persistem até o período de senescência (Sedyama et al., 1985). As flores da soja são completas e aparecem em racemos nas extremidades e axilas da planta. Podem ser brancas ou púrpuras, com a intensidade do matiz sujeita a variações genéticas específicas da cultivar (Vernetti; Junior, 2009). Os frutos maduros da soja geralmente têm de 2 a 7 cm de comprimento e 1 a 2 cm de largura, com forma achatada. Podem conter de 1 a 5 grãos por vagem, com a maioria das cultivares apresentando de 2 a 3 sementes por vagem. A capacidade produtiva pode chegar a até 400 grãos por planta, variando de acordo com a cultivar e as condições climáticas (Müller et al., 1981).

Ferh e Caviness (1977), propuseram uma descrição detalhada dos estádios de desenvolvimento da soja, categorizando-os em estádios vegetativos (V) e reprodutivos (R). Os estádios vegetativos são discernidos pela contagem do número de nós no tronco principal, sendo designados como VE, VC, V1, V2 e V3. Durante esses estádios, VE é caracterizado pela emergência dos cotilédones, enquanto VC ocorre

quando os cotilédones estão completamente abertos e expandidos. Por outro lado, os estádios reprodutivos são identificados pela letra R, acompanhada pelos números de um (1) até oito (8), detalhando o período de florescimento/maturação. As fases reprodutivas abrangem R1 e R2 (florescimento), R3 e R4 (desenvolvimento da vagem), R5 e R6 (desenvolvimento do grão) e R7 e R8 (maturação da planta).

A soja, originária da China, possui uma história de utilização desde os primórdios, sendo designada como uma das cinco plantas sagradas pelos chineses, juntamente com arroz, trigo, cevada e milheto. Inicialmente domesticada na China, a soja era predominante na costa leste da Ásia, especialmente na região da Manchúria. Durante os séculos XV e XVI, a disseminação da soja ocorreu por meio das rotas mercantis, resultando na sua introdução em diversas nações, incluindo Japão, Indonésia, Filipinas, Nepal e Índia (Hymowitz, 1970). Embora tenha sido reconhecida como um grão sagrado e integrada de maneira significativa na dieta alimentar do oriente, a prática de cultivar soja no ocidente teve início no século XX, quando os Estados Unidos iniciaram sua exploração comercial da soja. Em 1941, a área destinada ao cultivo de grãos superou aquela destinada à forragem, assim a área destinada à produção de grãos teve um crescimento exponencial, nos Estados Unidos, mas também no Brasil e na Argentina (Dall'Agnol et al., 2010).

No Brasil, sua introdução teve início em 1882 com a experimentação dos primeiros materiais genéticos no Estado da Bahia. No entanto, o germoplasma utilizado revelou-se inadequado para as condições de baixa latitude da região (12°S), resultando no fracasso do plantio. Uma década depois, em 1891, novos materiais foram testados em São Paulo (23°S), obtendo relativo êxito na produção de feno e grãos. Já em 1921, a soja foi novamente testada no Rio Grande do Sul (28°S a 34°S), obtendo sucesso devido às condições climáticas similares à região de origem dos materiais avaliados, localizada no sul dos Estados Unidos (Dall'Agnol et al., 2010). Atualmente, a soja é cultivada em todas as regiões do Brasil, destacando-se o centro-oeste que tem a maior área cultivada e a maior produção do País, sendo que na safra 2021/2022, os agricultores brasileiros lograram uma produção 123,8 milhões de toneladas de soja (CONAB, 2023).



**Figura 1: Análise do Valor de Produção da Soja por Região, Estado e Município:** Mato Grosso, Sorriso, Campo Novo do Parecis e Sapezal, e sua posição de liderança no ranking de produção de soja, milho e algodão no Centro-Oeste (IBGE, 2022).

Nos últimos anos, o Mato Grosso foi a unidade da federação com maior valor de produção agrícola, destacando os municípios de Sorriso (MT), Campo Novo do Parecis (MT) e Sapezal (MT), sendo a soja no topo do ranking de produção seguidos do milho e algodão no centro-oeste (CONAB, 2023). Em contrapartida, foi relatado que as condições climáticas, como o estresse osmótico influenciam a produção e consequentemente acarretam perdas agrícolas, inclusive na soja (Ferrari; Paz; Silva, 2015). Neste contexto, duas cultivares de soja Embrapa 48 e BR 16 caracterizadas como tolerante e sensível à seca respectivamente, se destacam no cenário dos estudos genômicos. Estes estudos podem contribuir com novas tecnologias que aumentam a produtividade e o lucro das colheitas (Oya et al., 2004).

### 3.2 Cenário de mudanças climáticas e estresses abióticos em plantas

A insegurança alimentar acarretado pelas mudanças climáticas surgem como um dos desafios do século XXI, e em decorrência a essas condições, observa-se uma intensificação dos impactos ambientais sobre a produtividade das plantas, resultantes tanto dos efeitos diretos quanto indiretos dos estresses abióticos (Alpino et al., 2022). Estima-se que mais de 800 milhões de indivíduos enfrentam os impactos

adversos da desnutrição, sendo uma barreira para os programas voltados ao desenvolvimento sustentável e para a realização da meta global de erradicação da fome até o ano de 2030 (ONU, 2015). Diante do aumento da temperatura global constatou-se uma diminuição significativa na produção das principais culturas agrícolas, em contrapartida projeta-se um crescimento populacional para aproximadamente 9 bilhões de habitantes até o ano de 2050, correspondendo um aumento de 85% das demandas alimentares (FAOSTAT, 2017; Raza et al., 2019).

Com o aumento das temperaturas globais, tende a desencadear transformações climáticas substanciais, resultando no agravamento de tensões abióticas. Essas mudanças ambientais, intrinsecamente danosas, apresentam diversas ameaças às espécies agrícolas naturalmente predominantes (Espeland; Kettenring, 2018). Em ambientes de cultivo, a seca e o calor destacam-se como os principais fatores de estresse, exercendo efeitos notáveis nas plantas. As oscilações de temperatura exercem uma influência marcante nas funções fisiológicas das plantas (Zandalinas et al., 2018). O estresse osmótico afeta adversamente a fisiologia do vegetal, já o estresse térmico impacta negativamente a produção e o rendimento de grãos, enquanto o estresse pelo frio resulta em esterilidade da planta. Estas oscilações climáticas impactam no desenvolvimento e produção das plantas, desencadeando amplas respostas a níveis moleculares, bioquímicos, fisiológicos e morfológicos (Raza et al., 2019).

Embora as modificações na fisiologia das plantas tenham demonstrado ser benéficas em contextos climáticos específicos, as flutuações ambientais podem apresentar riscos substanciais para esses organismos vegetais. Os mecanismos morfológicos, biológicos e bioquímicos das plantas são impactados pelos estresses abióticos, e assim destaca-se que a faixa de temperatura considerada ideal para o desenvolvimento das plantas situa-se entre 10 e 35 °C (Tkemaladze; Makhashvili, 2016). O aumento da temperatura até uma determinada faixa favorece a produção de energia em excesso pelas plantas, mas os altos níveis na temperatura resultam no retardamento do crescimento das plantas e na redução da taxa de fotossíntese para níveis considerados letais. Nesse contexto, o estresse osmótico limita a pressão de turgor, atrasando o desenvolvimento celular, assim como a falta de água prejudica a função das enzimas fotossintéticas e diminui a capacidade metabólica (Zargar et al., 2017).

A insuficiência hídrica é uma ocorrência mais prevalente durante a estação seca, caracterizada pela escassez de água no solo e pela incapacidade das raízes das plantas em realizar a absorção hídrica. Esse cenário resulta na redução da atividade fisiológica das plantas resultando em culturas menores e mais fracas, assim persistindo a escassez de água pode acarretar a mortalidade das plantas (Campos et al., 2021). Em plantas frutíferas, o estresse osmótico impacta desde a germinação, pois a água atua na quebra da dormência de algumas sementes e embebição ou hidratação da semente, etapa em que a semente absorve a água do solo para germinar e se desenvolver. Já nas leguminosas, a deficiência hídrica causa a diminuição da capacidade estomática, resultando na redução do fornecimento de CO<sub>2</sub> para o processo de fotossíntese, baixo rendimento dos grãos e vagens, plantas pecioladas, haste alongada, não germinação da semente, dentre outros (Tonello; Teixeira, 2012).

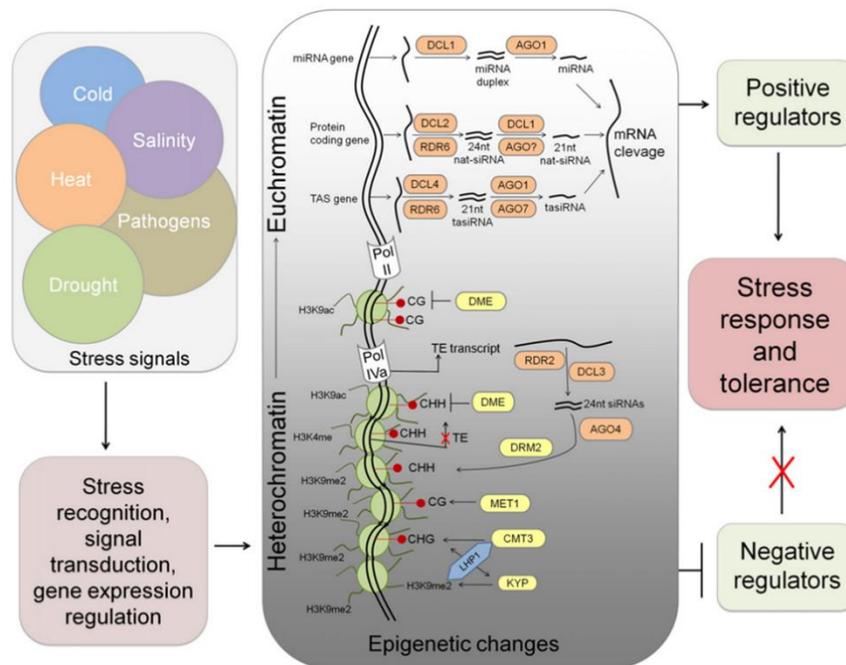
Entretanto, já foi relatado que as plantas de soja podem se adaptar a essas condições, desencadeando mecanismos de proteção que lhes permitem sobreviver a condições de seca (Bray, 2004). O desenvolvimento de dois genótipos da soja brasileira Embrapa 48 e BR 16, que foram avaliadas sob condições de seca em casa de vegetação e no campo (Oya et al., 2004), mostraram que a cultivar Embrapa 48 pode ser caracterizada como tolerante à seca e a cultivar BR 16 como sensível à seca. Sendo a primeira espécie da família Fabaceae a ter o genoma sequenciado, possuindo um total de 20 cromossomos e cerca de 1115 Mb (Schmutz *et al.*, 2010), assim contribuindo para o desenvolvimento de novas técnicas visando o incremento desta cultura. Além disso, a soja também é considerada uma espécie modelo para estudos em leguminosas, o que a torna um bom alvo para investigações em áreas como genética e biologia molecular (Ferguson; Gresshoff, 2009).

Neste contexto, (Kim *et al.*, 2015) investigaram o papel da metilação do DNA na regulação dos genes após eventos de poliploidia e especiação em soja e feijão comum, demonstrando que os genes metilados na soja estavam principalmente associados aos genes duplicados e observaram padrões de metilação divergentes ligados a elementos transponíveis indicando que podem desempenhar um papel na regulação da expressão gênica. Outro estudo investigou se a metilação do DNA está associada à regulação da expressão gênica dependente do ácido abscísico em resposta ao estresse osmótico, utilizando o mutante vp10 de milho deficiente em ABA e para identificar mudanças na metilação do DNA induzidas pelo estresse osmótico

(Sallam; Moussa, 2021).

### 3.3 Regulação epigenética em plantas

A epigenética constitui a regulação gênica herdável, desvinculada de alterações na estrutura primária do DNA. As principais modificações epigenéticas compreendem as alterações pós-traducionais nas histonas, como metilação, acetilação, fosforilação, entre outras, os RNAs não codificadores e a metilação do DNA, que consiste na adição de um grupamento metil no quinto carbono do anel de citosinas (Bond; Finnegan, 2007; Franco, 2017). Dada a associação dessas modificações a um crosstalk de regulação, indica-se que estão relacionadas ao controle da expressão e regulação gênica (Grativol et al., 2012). Nas plantas, que são desafiadas com diversos estresses abióticos, a busca por sobrevivência a esses ambientes promove mudanças moleculares e morfológicas no organismo. Com esse enfoque, os mecanismos epigenéticos fornecem recursos que permitem que as plantas se adaptem a determinados ambientes e conseqüentemente em diferentes estresses, o que resulta em maior capacidade de sobrevivência (Sallam; Moussa,2021).



**Figura 2: Crosstalk de regulação e modulação epigenética:** Interação epigenética na regulação da tolerância ao estresse, sinais de estresse podem modular a expressão gênica por meio de mudanças epigenéticas, incluindo metilação de DNA, modificações de histonas e pequenos RNAs (Grativol et al., 2012).

Com os diferentes estresses, as plantas buscam mecanismos de prevenção e proteção celular, acionando genes que estão envolvidos com a modulação e resposta à seca (Reis *et al.*, 2020). Destacando três mecanismos em diferentes níveis, as modificações de histonas (cromatina), a metilação do DNA (genômica) e a metilação do DNA dirigida por RNA (RdDM), que resultam na metilação de loci homólogos sendo considerados mecanismos epigenéticos que afetam a regulação da expressão gênica diferencial. As pressões ambientais ocasionam a remodelação da cromatina, proporcionando às células vegetais a capacidade de ajustar temporária ou permanentemente os perfis de expressão para se adaptarem (Kumar; Rani, 2023).

A abertura do DNA para a transcrição é controlada pela localização do nucleossomo, formado por um octâmero de histonas que incluem H4, H3, H2A e H2B. Dependendo do grau de compactação do nucleossomo, a histona H1 conecta o DNA não empacotado a nucleossomos de comprimentos variáveis, assim as modificações pós-transcricionais nas caudas das histonas alteram as interações com o DNA (Agarwal *et al.*, 2020). Ao mesmo tempo, fenômenos denominados código de histonas controlam as condensações da cromatina e a acessibilidade do DNA, ocasionando mudanças reversíveis, como metilação, desmetilação, acetilação e desacetilação de histonas, sendo que a ativação transcricional está integrada a padrões específicos de acetilação e metilação, enquanto a repressão está ligada à metilação e desacetilação de histonas. Dessa forma, diferentes genes são silenciados e expressos em resposta a vários estímulos abióticos nas plantas, o que é uma tática crucial de sobrevivência nas plantas (Kumar; Rani, 2023).

A metilação do DNA é uma marca epigenética conservada em plantas e animais e, desempenha papel importante na estabilidade do genoma, no desenvolvimento e em vários fenômenos mutagênicos (He *et al.*, 2011). Nas plantas, a metilação desempenha um papel-chave, influenciando seu desenvolvimento, resposta a estresse, aclimatização e adaptação (Chen *et al.*, 2013). Pode contribuir também para o silenciamento transcricional de elementos transponíveis e DNA/RNA exógeno, mantendo a estabilidade do genoma e controlando a transcrição de genes (Lukens; Zhan, 2007). Os transposons compõem uma porção significativa dos genomas das plantas e podem ser ativados por aspectos ambientais através da desmetilação do DNA, assim como estresses ambientais que também podem induzir alterações na

expressão de genes através de hipometilação ou hipermetilação do DNA (Chinnusamy; Zhu, 2009).

Neste contexto, o padrão de metilação do DNA, apresentam-se tanto de forma simétrica (CNG/CG) quanto assimétrica (CNN, onde N pode ser C, A ou T), onde a metilação simétrica evidencia-se pela sua facilidade durante o processo de replicação do DNA, enquanto a metilação assimétrica é recriada a cada ciclo de replicação (Zhang; Lang; Zhu, 2018). Nesse cenário, as enzimas METIL TRANSFERASE1 (MET1) e CROMOMETILASE3 (CMT3) assumem papéis distintos, realizando a metilação nas posições CG e CHG nas plantas. Já a metilação do DNA dirigida por RNA (RdDM), ocorre devido à presença de moléculas de RNA de fita dupla (ds-RNA), as quais estimulam a metilação de sequências específicas no DNA (Meister; Tuschl, 2004). Considerando a relação entre o RdDM e a interferência de RNA (RNAi), sugere-se que os RNAs curtos desempenham um papel importante na ativação e orientação da metilação da citosina, tais como o silenciamento de RNA e na regulação pós-transcricional da expressão gênica em plantas (Kumar; Rani, 2023).

Liu et al., (2022), demonstraram em seu estudo, que os níveis de metilação do genoma do arroz diminuíram significativamente após o tratamento com 5-azaCitidina, sugerindo que ele é um inibidor eficaz da metilação do DNA que pode influenciar a metilação do genoma e causar uma série de variações epigenéticas. O estudo conduzido por Sammarco et al., (2022), utilizando tratamentos com 5-azaCitidina em plantas, destaca-se por apresentar uma abordagem experimental de desmetilação em condições naturais, abrangendo uma ampla gama de condições climáticas locais. Já, Koetle et al., (2023), avaliou a tolerância à seca de dez epimutantes obtidos in vitro através de desmetilação de 5-azaCitidina e subsequente remetilação com imidaclopride, sob estresse osmótico por polietilenoglicol e estresse térmico, assim as análises morfofisiológicas destacaram que os epimutantes demonstraram maior tolerância ao estresse osmótico e rápida recuperação pós-estresse.

A partir disso, estudos demonstraram que inibidores químicos de metilação, como a 5-azaCitidina (5-azaC), são considerados análogos a nucleosídeos de citosina e que alteram as bases do DNA e capturam covalentemente a metiltransferase para esgotar sua atividade, causando desmetilação principalmente no contexto de CG (Christman, 2002). Contudo, mesmo sabendo de seu potencial em estudos fenotípicos

de plantas, pouco se sabe sobre os impactos específicos do inibidor (5-azaC) no nível de metilação de todo o genoma e como a planta responde ao tratamento com ele (Liu et al., 2022). Nesta perspectiva, sugere-se que quando associados a diferentes ambientes a metilação do DNA pode desencadear distintas respostas genéticas (Sallam; Moussa, 2021).

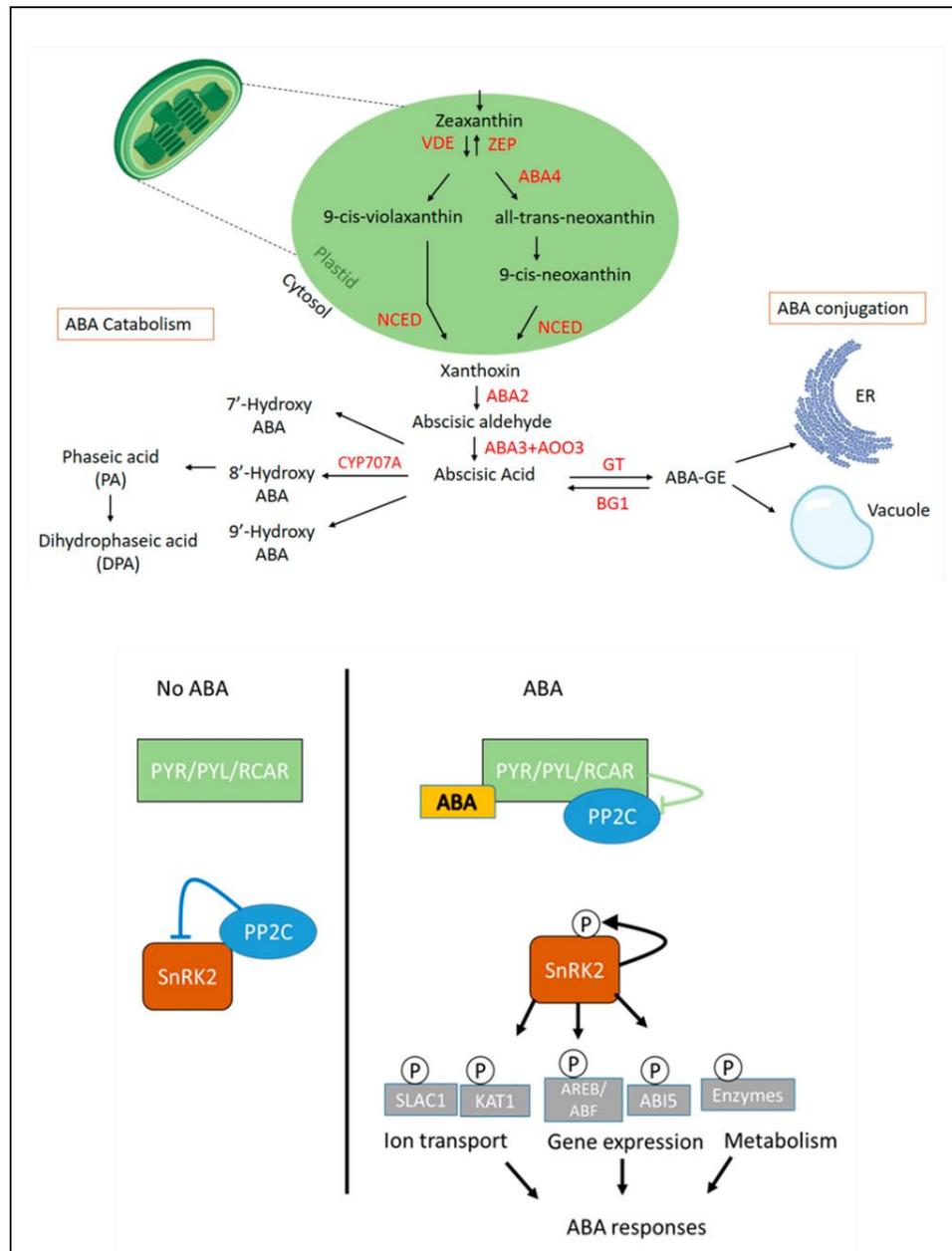
### **3.4 Associação entre ácido abscísico e a metilação do DNA no desenvolvimento vegetal**

O metabolismo vegetal dispõe de mecanismos bioquímicos, anatômicos, genéticos e epigenéticos que auxiliam na eliminação de radicais livres, no transporte e reserva de água e garantem respostas mais rápidas à desidratação (Almeida, 2018). Assim, ambientes com maior incidência luminosa geralmente apresentam temperaturas mais elevadas e conseqüentemente maiores índices de déficit de pressão de vapor, intensificando os efeitos da falta d'água no metabolismo vegetal. Nestas condições, os estômatos normalmente se fecham para diminuir a perda de água para o ambiente, resultando na menor captação de CO<sub>2</sub> e conseqüentemente menor taxa fotossintética (Favaretto et al., 2011). Desta forma, o fechamento estomático é uma resposta essencial para a sobrevivência da planta sob condição de deficiência hídrica, desencadeando a ação diferentes hormônios vegetais, assim como o ácido abscísico (ABA).

O ABA é um apocarotenoide sintetizado a partir da clivagem de carotenoides, controlando a maturação das sementes e as respostas ao estresse abiótico, incluindo o estresse osmótico nas plantas (Sallam; Moussa, 2021). É conhecido como o hormônio geral do estresse osmótico e promove alterações na planta quando o suprimento de água diminui, como o ajuste osmótico, funções no crescimento e desenvolvimento, regula respostas adaptativas como a baixa disponibilidade de água, além de evitar a perda osmótica por transpiração (Aasamaa; Söber, 2011; Xiong et al., 2002). O fitohormônio ABA se acumula durante o estresse abiótico, sinalizando alterações transcricionais que desencadeiam diferentes respostas fisiológicas e suas vias metabólicas, as quais têm sido amplamente estudadas em quase todas as etapas enzimáticas (Cheng *et al.*, 2002)

A cascata de sinalização PYR/PYL/RCAR-PP2C-SnRK2 é reconhecida como um componente-chave gerado pela ação do ABA, e em condições de seca, o crescimento das plantas é retardado, resultando no aumento da concentração de ABA

nas células. O acúmulo de ABA exerce controle sobre a transpiração e inibe a abertura estomática, assim esse hormônio desencadeia mecanismos fisiológicos nas plantas em resposta à seca, induzindo a expressão de genes responsivos ao estresse e essa cascata de sinalização é composta por três unidades principais, SnRK2/OST1 (proteína quinase), PP2C (proteína fosfatases) e as proteínas PYR/PYL/RCAR (Kuromori et al., 2018).



**Figura 3: Esquemas das vias de biossíntese, transporte, degradação e sinalização de ABA:** sintetizado a partir de  $\beta$ -caroteno, convertido em xantoxina por enzimas nos plastos (Ali et al., 2020).

Utilizada como via indireta, as plantas usam os carotenóides para sintetizar ABA. Essa biossíntese começa pela zeaxantina epoxidase (ZEP) que converte a zeaxantina em violaxantina, seguidos pelo ABA4 que codifica a neoxantina sintase e uma isomerase desconhecida para converter toda trans-violaxantina em 9'-cis-neoxantina através de uma via all-trans-neoxantina. Após essa codificação, tanto a 9-cis-xantina quanto a 9-cis-violaxantina atuam como substrato para a xantoxina, operando com um inibidor de crescimento, a reação é catalisada pela (NCEDs) (Ali et al., 2020). Dessa forma, a xantoxina produzida é então realocada do plastídio para o citoplasma que é convertida através da ação enzimática em aldeído abscísico pelo (ABA2), por fim, a aldeído abscísico oxidase (AAO) converte o aldeído abscísico em ácido abscísico. Estudos demonstraram que o NCED3 é a enzima essencial para a síntese de ABA e em *Arabidopsis* os genes NCED apresentaram expressão em diferentes regiões das plantas, como o NCED2 e NCED3 nas raízes, enquanto a expressão de NCED5, NCED6 e NCED9 ocorre durante a maturação tardia (Martínez; Andújar et al., 2011)

O catabolismo do ácido abscísico desempenha uma ação importante nos níveis endógenos dessa substância, influenciando vários aspectos do crescimento e respostas adaptativas ao estresse abiótico nas plantas. O controle do nível de ABA ocorre por meio de processos de hidroxilação catalítica e conjugação. Na via de hidroxilação, o ABA é degradado em três grupos metil em diferentes posições (C-7', C-8', C-9') sendo C-8' a posição predominante, resultando na formação de 8'-hidroxi ABA (8'OH-ABA) (Eggels et al., 2018). Além disso, a concentração de ABA é aumentada pela hidrólise do éster glicosil (ABA-GE), uma forma conjugada do ABA com glicose. O processo de produção de ABA a partir de ABA-GE é realizado por enzimas no citosol, como a uridina difosfato glucosiltransferase, que convertem o ABA em uma forma inativa de ABA-GE e essa forma inativa acumula-se no vacúolo e no retículo endoplasmático, contribuindo para as necessidades fisiológicas das plantas (Ali et al., 2020; Dong et al., 2014).

A cascata de sinalização do ABA é um processo regulatório em três etapas, envolvendo receptor, mediador de proteína quinase e alvos. O componente-chave na percepção e sinalização do ABA é o complexo PYR/PYL/RCAR de proteínas START, responsável por desencadear a resposta celular ao ABA (Papacek; Christmann; Grill, 2017). Os receptores associados ao ABA desempenham um papel crucial ao sequestrar a proteína PP2C, um regulador negativo da via de sinalização do ABA. Na ausência de

ABA, PP2C interage com SnRK2, inativando-o por desfosforilação. Quando o ABA está presente, os receptores PYR/PYL/RCAR5 formam um complexo com PP2C, dissociando PP2C de SnRK2, permitindo sua ativação por autofosforilação. A proteína quinase ativa SnRK2, por sua vez, ativa efetores de sinalização subsequentes, como fatores de transcrição ABF (Hao *et al.*, 2011). Esse processo modula a expressão de genes responsivos ao estresse, podendo estar envolvido nas vias de sinalização do ABA (Ali *et al.*, 2020).

Há registros de que a metilação do DNA desempenha um papel significativo na modulação da expressão gênica regulada pela presença do ABA (Bennett; Cleaves; Hwezi, 2021). Estudos relataram um aumento modesto na metilação de CHH em supostos loci MOP1-RdDM em resposta ao ABA, sugerindo que a variação epigenética pode influenciar as respostas transcricionais induzidas pelo ambiente em genótipos de milho (Vendramin *et al.*, 2020). Já foi mostrado que a diminuição de carotenóides bloqueia a biossíntese de ABA (Xu *et al.*, 2017). Em nosso grupo de estudos, foi observado que o 5-azaC impacta a produção de carotenóides e ABA em soja (Coelho *et al.*, 2022). Dessa forma, compreender o efeito da metilação especialmente quando relacionada a cultivares que são suscetíveis e tolerantes à seca, pode auxiliar na compreensão deste processo.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Identificação e expressão de genes constituintes das vias metabólicas de ABA no genoma de soja**

Para identificar os genes que integram as vias de ABA no genoma de soja, foi realizada uma busca no software MapMan (<https://mapman.gabipd.org>). Foram utilizados como base, os arquivos mapeados (X4.4 *Glycine max*). Os genes foram posteriormente, submetidos à consulta de versões antigas com o auxílio do SoyBase (<https://soybase.org>) para confirmar e monitorar a atualização das anotações gênicas. Por fim, os genes foram divididos em quatro categorias correspondentes das vias metabólicas de ácido abscísico: biossíntese, sinalização, transporte e degradação.

Para análise do perfil de expressão dos genes que compõem as vias metabólicas de ABA, foram utilizados dados de RNA-seq disponíveis no Atlas de Expressão da Soja (<https://soyatlas.venanciogroup.uenf.br/>) (Machado *et al.*, 2020). A análise da expressão dos genes foi realizada em diferentes tecidos de soja como cotilédone, semente, tegumento, embrião, flor, vagem, plântula, raiz, endosperma, folhas, hipocótilo, parte aérea, inflorescências e nódulo.

### **4.2 Análise do perfil de expressão de genes vinculados à regulação das vias de ABA e de efetores epigenéticos em genótipos de soja suscetíveis e tolerantes ao estresse osmótico**

Os dados transcriptômicos relacionados à cultura de soja (EM48 e BR16) em condições de estresse osmótico foram adquiridos do banco de dados NCBI Sequence Read Archive (SRA) no (Acesso: PRJNA615913). Posteriormente, foi efetuada à filtragem dos reads por meio da ferramenta FASTX toolkit, seguida do mapeamento desses reads utilizando o genoma da soja (*Glycine max* Wm82.a2. v1), através do software Hisat2. Os transcritos foram categorizados por biblioteca utilizando a ferramenta Stringtie. As ferramentas stringtie merge e gffcompare foram adotadas para a comparação e integração das anotações gênicas, com base nos arquivos GFF. Por fim, os dados foram normalizados por Transcripts Per Million (TPM), e o programa feature counts foi utilizado para identificar as leituras mapeadas por características genômicas. Este processo resultou na construção de dois Heatmapper (software R)

destinado à análise da expressão gênica em tecidos expostos a condições de déficit osmótico, com foco nos genes que compõem as vias do ABA e que estão intrinsecamente associados à modulação epigenética.

### **4.3 Avaliação do efeito da metilação do DNA em plântulas de soja**

Sementes de soja das cultivares Embrapa 48 e BR-16 (cedidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) foram germinadas em tubos de ensaio contendo meio MS ½ força com sacarose em BOD com fotoperíodo de 12/12 h, temperatura controlada a 28°C e 60% de umidade relativa. Foram submetidas a diferentes concentrações (0, 25, 50 e 100 µM) do inibidor de metilação 5-azaCytidina (5-azaC).

Para obtenção de plântulas de soja com 8 dias, as sementes foram germinadas em tubos de ensaio 150 x 25 mm contendo 20 ml de meio MS ½ força com sacarose (30 g/L) com concentração de inibidor 5-azaC previamente testada. Para induzir o estresse osmótico, após 7 dias de desenvolvimento as plântulas foram transferidas para tubos contendo meio líquido com manitol a 300mM e meio MS, onde permaneceram por 24 horas. Ao final totalizando o período de 8 dias, as plântulas foram avaliadas quanto ao comprimento (cm) da parte aérea e da raiz. Já para determinar a massa da matéria fresca e massa da matéria seca, as plantas foram armazenadas em saquinhos de papel e levadas para estufa de secagem a 70°C, onde foram mantidas até atingirem massa constante e, assim, pesadas com o auxílio de uma balança.

### **4.4 Quantificação dos níveis de metilação global do DNA em plântulas de soja**

A extração de DNA foi executada utilizando o protocolo (Doyle e Doyle, 1987) com modificações, onde foram adicionados aos tubos contendo as amostras 1 ml do tampão de extração pré-aquecido contendo 2 % CTAB, 1,4 mol L<sup>-1</sup> NaCl, 20 mmol L<sup>-1</sup> EDTA, 100 mmol L<sup>-1</sup> Tris HCl (pH 8,0), 1 % PVP e 0,2 % β- mercaptoetanol. Este material foi incubado a 65°C por 1 hora. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 8000 rcf durante 10 minutos. O sobrenadante (cerca de 800 µl) foi transferido para um novo tubo devidamente identificado e adicionado igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Em seguida, foram realizadas suaves inversões do material durante aproximadamente 10 minutos até ficar turbado. A fase orgânica foi

separada por centrifugação, a 8000 rcf por 10 minutos. O sobrenadante foi conduzido para um novo tubo, subsequentemente, adicionado dois terços (400µl) do volume de isopropanol gelado, e incubado por 20 minutos a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Após essa etapa, o precipitado foi sedimentado por centrifugação, a 8000 rcf por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com 300 µl etanol a 75 % com acetato de amônio, para retirada de sal presente (entre cada lavagem, o material foi centrifugado a 8000 rcf durante 5 minutos). Após o descarte do último sobrenadante, o material foi seco em condições naturais, até que o etanol fosse removido. Em seguida, o material foi ressuscitado em 50 µl de água ultrapura com RNase em uma concentração final de  $10\ \mu\text{g mL}^{-1}$  e incubado em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. A concentração e integridade do RNA foi medida usando um espectrofotômetro NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific). Para detectar os níveis de metilação global do DNA, foi utilizado o protocolo da enzima ALUI segundo o fabricante.

#### 4.5 Extração e quantificação de pigmentos cloroplastidiais em plântulas de soja

Plântulas controle e tratadas com 8 dias de desenvolvimento foram utilizadas para a extração dos pigmentos cloroplastidiais. Aproximadamente 20 mg de massa fresca de folha foram submersas em 300 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e mantidas no escuro por 2 dias à  $23^{\circ}\text{C}$  até a extração total dos pigmentos cloroplastidiais. Os teores de clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*) e carotenoides (CR) foram determinados através da leitura no espectrofotômetro em comprimento de onda de 665, 649 e 480 nm, respectivamente. Os teores de pigmentos por área foliar em mg/g foram estimados utilizando as seguintes equações proposta por Wellburn (1994):

$$\text{Clorofila } a = C_a = 12,19 A_{665} - 3,45 A_{649}$$

$$\text{Clorofila } b = C_b = 21,99 A_{649} - 5,32 A_{665}$$

$$\text{Carotenoides} = C_{x+c} = (1000 A_{480} - 2,14 C_a - 70,16 C_b) / 220$$

#### **4.6 Análise da expressão de genes envolvidos com a biossíntese de ABA em plântulas de soja**

A extração de RNA foi realizada com protocolo do Trizol® (Invitrogen), onde as amostras foram maceradas com o auxílio do nitrogênio líquido. O material macerado foi transferido para um microtubo, juntamente com a adição de 1000 µl de trizol. Logo depois, foi homogeneizado e deixado em repouso por 5 minutos. Depois Foi adicionado 200 µl de clorofórmio e centrifugado por 15 minutos a 12000 rcf em temperatura ambiente, posteriormente descartada a fase sólida e foi transferido o sobrenadante para um novo microtubo, onde foi adicionado 500 µl de isopropanol deixado em repouso por 10 minutos.

Em seguida a amostra foi centrifugada novamente por 10 minutos a 12000 rcf, descartado o sólido e acrescentado 1ml da solução (etanol e água) por amostra. Em momento subsequente, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 7500 rcf, descartado o sobrenadante e deixado na capela de exaustão aproximadamente por 10 minutos ou até que o etanol evaporasse. Ao pellet foi adicionado 50 µl de água ultrapura e a concentração e integridade do RNA foram medidas usando um espectrofotômetro NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific).

A síntese de cDNA foi conduzida conforme especificado no kit do fabricante Promega®, utilizando 5 µg do RNA de cada amostra. Os níveis de expressão de genes envolvidos com a biossíntese de ABA foram avaliados utilizando PCR com o Kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) conforme as recomendações do fabricante. A reação foi executada em uma placa de 96 poços (MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems). Em cada poço foram adicionados 1 µL da reação de primeira fita de cDNA diluída 2 vezes, 5 µL da solução mix do kit e 4 µL de uma mistura dos dois oligonucleotídeos (forward e reverse), específicos para os genes candidatos a diferencialmente expressos, com concentração de 5 µM cada um. Utilizando o gene EEF2 de soja como controle interno. Os primers usados foram desenhados na região 3` não traduzida dos genes utilizando o software PrimerExpress da Applied Biosystems (Tabela 1).

**Tabela 1:** Desenho dos primers dos genes de ABA.

<b>Target</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
ABA1	CACTGGATGCTTCACCTTTTG	TCTTGGAACAGAGCTTGTCAC
ABA2	GTAGGACGAGAAAGTAGACACAG	ATGGATATGGAAGAGGCGC
ABA3	ACTCCGAACGTTGAACATGG	GGATGCTAAAGTTGCCAAAGG
AA03	TGACCCTTCAATCACTTTACTCG	GTACAATGTCCAGTCCGCAG
NCED3	GTCACCAACGACCTCCAC	AGTGCCGTGAAACCCATAAG
NSY	CTTTTCCCATTCTCCATTGGC	TGATGGCATGACTAAGAACCC
CYP707A	TCTCTTCATTGTTCTCTTCAGGG	CCATTCTTTGCACCCACAAC
GmMBD10g	TGAACGGCGAAAATGTGATTG	CAGTCTCCGCAGTATTAGCAG

#### 4.7 Análises estatísticas

Os dados adquiridos foram submetidos a uma análise estatística por meio do Teste t, com um nível de significância estabelecido em 95% ( $P < 0,05$ ). O software GraphPad Prism, versão 10.0, foi empregado para conduzir a referida análise estatística.



## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Identificação dos genes constituintes das vias metabólicas de ABA no genoma de soja**

A busca pelos *IDS* dos genes associados as vias metabólicas de ABA no genoma de soja revelaram 95 genes. Dentre esses, 17 estão vinculados a via de biossíntese de ABA, 60 integrados à via de sinalização, 10 envolvidos na via de degradação e 8 inseridos na via de transporte de ABA, conforme apresentado (Tabela 2.)

**Tabela 2:** Genes integrados as vias metabólicas de ABA no genoma da soja.

Descrição do gene	Identificação do gene		Via de ABA
	Wm82.v2	Wm82.v4	
ABA1	Glyma17g20020	Glyma.17g174500	Biossíntese de ABA
ABA1	Glyma11g05960	Glyma.11g055700	Biossíntese de ABA
ABA1	Glyma09g00260	Glyma.09g000600	Biossíntese de ABA
ABA1	Glyma.01g186200	Glyma.01g186200	Biossíntese de ABA
ABA4	Glyma19g06540	Glyma.19g047800	Biossíntese de ABA
ABA4	Glyma08g48091	Glyma.08g365700	Biossíntese de ABA
ABA4	Glyma18g53400	Glyma.18g296600	Biossíntese de ABA
NXD1	Glyma13g33920	Glyma.13g264200	Biossíntese de ABA
NCED3	Glyma.15g250100	Glyma.15g250100	Biossíntese de ABA
NCED2	Glyma08g10190	Glyma.08g096200	Biossíntese de ABA
NCED2	Glyma05g27250	Glyma.05g140900	Biossíntese de ABA
ABA2	Glyma11g21180	Glyma.11g151700	Biossíntese de ABA
ABA2	Glyma11g21160	Glyma.11g151400	Biossíntese de ABA
ABA3	Glyma09g00460	Glyma.09g002300	Biossíntese de ABA
AA03	Glyma14g04950	Glyma.14g045100	Biossíntese de ABA
AA03	Glyma02g43993	Glyma.02g272200	Biossíntese de ABA
AA03	Glyma02g44000	Glyma.02g272400	Biossíntese de ABA
PYL1	Glyma09g33700	Glyma.09g204100	Sinalização de ABA
PYL4	Glyma18g43676	Glyma.18g206000	Sinalização de ABA
PYL4	Glyma01g31320	Glyma.01g124700	Sinalização de ABA
PYL2	Glyma06g05440	Glyma.06g051800	Sinalização de ABA
PYL4	Glyma07g19120	Glyma.07g155500	Sinalização de ABA
Polyketide_cyc2	Glyma14g06100	Glyma.14g056300	Sinalização de ABA
PYL7	Glyma16g02910	Glyma.16g025900	Sinalização de ABA
PYL11	Glyma15g08930	Glyma.15g083200	Sinalização de ABA
PYL11	Glyma13g30210	Glyma.13g229300	Sinalização de ABA
PYL1	Glyma08g36770	Glyma.08g272500	Sinalização de ABA
PYL	Glyma14g30260	Glyma.03g066200	Sinalização de ABA
PYL2	Glyma17g34800	Glyma.17g229900	Sinalização de ABA
PYL1	Glyma01g12970	Glyma.01g097000	Sinalização de ABA
PYL10	Glyma06g13150	Glyma.06g126100	Sinalização de ABA
PYL1	Glyma01g02290	Glyma.01g018800	Sinalização de ABA
PYL7	Glyma07g06270	Glyma.07g056900	Sinalização de ABA
PYL5	Glyma11g35670	Glyma.11g233300	Sinalização de ABA
PYL10	Glyma13g08120	Glyma.13g041800	Sinalização de ABA

**Tabela 2:** Genes integrados as vias metabólicas de ABA no genoma da soja.

Descrição do gene	Identificação do gene		Via de ABA
	Wm82.v2	Wm82.v4	
PYL2	Glyma14g10730	Glyma.14g093700	Sinalização de ABA
PYL5	Glyma02g42990	Glyma.02g261900	Sinalização de ABA
PYL2	Glyma04g05380	Glyma.04g050900	Sinalização de ABA
Fosfatase 2C	Glyma17g33410	Glyma.17g218700	Sinalização de ABA
Fosfatase 2C	Glyma09g07650	Glyma.09g066500	Sinalização de ABA
Fosfatase 2C	Glyma17g06030	Glyma.17g052500	Sinalização de ABA
Fosfatase 2C	Glyma04g05661	Glyma.04g053800	Sinalização de ABA
Fosfatase 2C	Glyma13g16640	Glyma.13g106800	Sinalização de ABA
Fosfatase 2C	Glyma15g18851	Glyma.15g172500	Sinalização de ABA
Fosfatase 2C	Glyma06g05670	Glyma.06g054000	Sinalização de ABA
Fosfatase 2C	Glyma14g13020	Glyma.14g108400	Sinalização de ABA
Fator (CAR)	Glyma08g05890	Glyma.08g054500	Sinalização de ABA
Fator (CAR)	Glyma19g19260	Glyma.19g070700	Sinalização de ABA
Fator (CAR)	Glyma19g19040	Glyma.19g070800	Sinalização de ABA
Fator (CAR)	Glyma07g34480	Glyma.07g219900	Sinalização de ABA
Fator (CAR)	Glyma18g04470	Glyma.18g039700	Sinalização de ABA
Fator (CAR)	Glyma11g33760	Glyma.11g216900	Sinalização de ABA
Fator (CAR)	Glyma07g11540	Glyma.07g102400	Sinalização de ABA
Fator (CAR)	Glyma09g30750	Glyma.09g176900	Sinalização de ABA
Fator (CAR)	Glyma09g20030	Glyma.09g117100	Sinalização de ABA
Fator (CAR)	Glyma05g33800	Glyma.05g246400	Sinalização de ABA
FAF-LIKE	Glyma12g10100	Glyma.12g095200	Sinalização de ABA
FAF-LIKE	Glyma12g31520	Glyma.12g189300	Sinalização de ABA
FAF-LIKE	Glyma13g38870	Glyma.13g312500	Sinalização de ABA
Receptor (GTG)	Glyma11g11730	Glyma.11g109900	Sinalização de ABA
Receptor (GTG)	Glyma12g01740	Glyma.12g014800	Sinalização de ABA
Ligase AIP2	Glyma14g12380	Glyma.14g105900	Sinalização de ABA
Ligase AIP2	Glyma17g33631	Glyma.17g220500	Sinalização de ABA
Ligase RHA2	Glyma10g41480	Glyma.10g268900	Sinalização de ABA
Ligase RHA2	Glyma20g25761	Glyma.20g122200	Sinalização de ABA
Pkinase_Tyr	Glyma04g16980	Glyma.04g134700	Sinalização de ABA
Pkinase_Tyr	Glyma04g17020	Glyma.04g134800	Sinalização de ABA
Pkinase_Tyr	Glyma13g26470	Glyma.13g195200	Sinalização de ABA
Pkinase_Tyr	Glyma11g25680	Glyma.11g157400	Sinalização de ABA

**Tabela 2:** Genes integrados as vias metabólicas de ABA no genoma da soja.

Descrição do gene	Identificação do gene		Via de ABA
	Wm82.v2	Wm82.v4	
SDIR1	Glyma11g34130	Glyma.11g220200	Sinalização de ABA
SDIR1	Glyma18g04160	Glyma.18g037200	Sinalização de ABA
SDIR1	Glyma12g06471	Glyma.12g060800	Sinalização de ABA
CHLH	Glyma03g29330	Glyma.03g137000	Sinalização de ABA
CHLH	Glyma19g32070	Glyma.19g139300	Sinalização de ABA
CHLH	Glyma10g20570	Glyma.10g097800	Sinalização de ABA
PPR	Glyma17g30780	Glyma.17g205100	Sinalização de ABA
8'-hydroxylase	Glyma.01g153300	Glyma.01g153300	Degradação de ABA
8'-hydroxylase	Glyma.16g109300	Glyma.16g109300	Degradação de ABA
8'-hydroxylase	Glyma.02g132200	Glyma.02g132200	Degradação de ABA
8'-hydroxylase	Glyma.09g218600	Glyma.09g218600	Degradação de ABA
8'-hydroxylase	Glyma.09g282900	Glyma.09g282900	Degradação de ABA
8'-hydroxylase	Glyma.14g082900	Glyma.14g082900	Degradação de ABA
8'-hydroxylase	Glyma.17g133900	Glyma.17g133900	Degradação de ABA
8'-hydroxylase	Glyma.17g242200	Glyma.17g242200	Degradação de ABA
8'-hydroxylase	Glyma.16g076600	Glyma.16g076600	Degradação de ABA
8'-hydroxylase	Glyma.07g212700	Glyma.07g212700	Degradação de ABA
NTR1	Glyma05g01380	Glyma.05g029900	Transporte de ABA
NTR1	Glyma17g10500	Glyma.17g096800	Transporte de ABA
NTR1	Glyma08g40730	Glyma.08g296000	Transporte de ABA
NTR1	Glyma08g40740	Glyma.08g296100	Transporte de ABA
NTR1	Glyma01g04900	Glyma.01g042100	Transporte de ABA
NTR1	Glyma18g16370	Glyma.18g126500	Transporte de ABA
NTR1	Glyma02g02620	Glyma.02g022200	Transporte de ABA
G	Glyma18g07080	Glyma.18g063400	Transporte de ABA

## 5.2 Análise da expressão de genes constituintes das vias metabólicas de ABA no genoma de soja

Considerando as quatro vias metabólicas do ABA, foram examinadas as variações nos perfis de expressão gênica em diferentes tecidos e órgãos durante o desenvolvimento da soja. Os padrões de expressão dos genes relacionados às distintas vias do ABA, nomeadamente biossíntese, sinalização, degradação e transporte, foram visualizados por meio de heatmap, e associado a essas expressões à localização específica desses genes em cada segmento das vias metabólicas do ABA.

Na via de biossíntese de ABA, foi observado diferentes agrupamentos de expressão em tecidos e órgãos de soja. O gene ABA1 (Glyma.17g174500) destacou-se como mais expresso em quase todos os tecidos, com uma notável predominância nas folhas e broto, mas com expressão reduzida na raiz. Os genes nomeados AA03 (Glyma.02g272400), ADC (Glyma.13g264200), ABA3 (Glyma.09g002300) e ABA2 (Glyma.11g151400) também exibiram níveis variados de expressão nas folhas e brotos, apresentando expressão diminuída na raiz. Em contrapartida, o gene NECED2 (Glyma.05g140900), demonstrou ser o de menor expressão em todos os tecidos analisados da via de biossíntese (Figura 5).

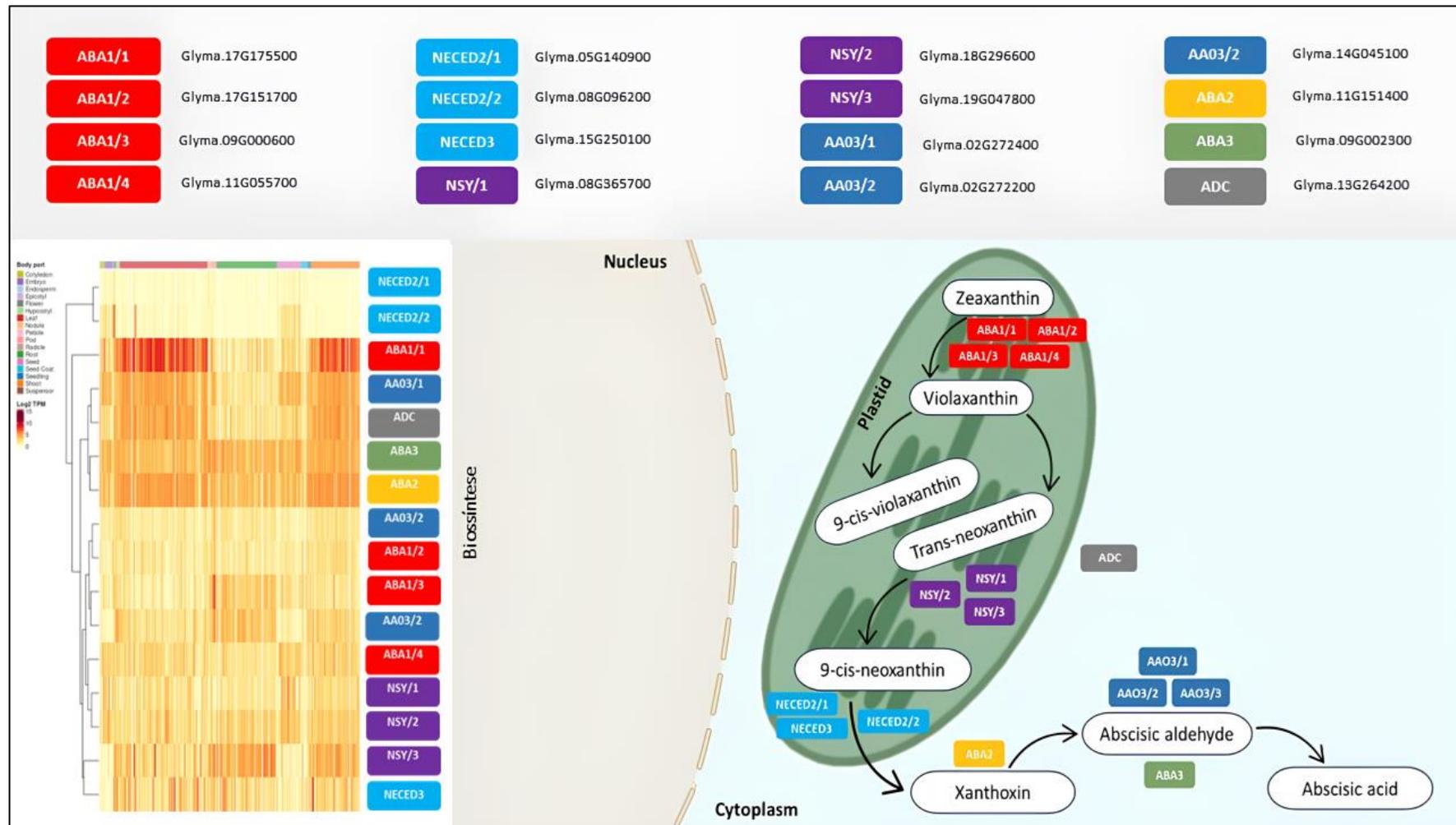
Ao examinarmos a via de degradação do ABA, notamos que o gene pertencente ao grupo H1 (Glyma.01g153300) apresentou uma expressão mais elevada em determinados tecidos, especialmente na raiz e na semente, enquanto evidenciou uma expressão diminuída nos brotos e nas folhas. Mas quando analisado o grupo de menor expressão, observa-se o gene Hc (Glyma.02g132200) demonstrando ser o de menor expressão em todos os tecidos analisados da via de degradação (Figura 6).

Na análise da via de transporte do ABA, destaca-se o gene NTR1 (Glyma.17G096800) que se revelou como o mais expresso em comparação com os demais genes, principalmente nas folhas. Por outro lado, observou-se a raiz foi o tecido que teve menor expressão neste gene. Já ao examinar o perfil de expressão do gene que demonstrou a menor expressão em relação aos demais, identificou-se o ABC-G31 (Glyma.18G063400) como aquele com expressão reduzida em praticamente todos os tecidos analisados na via de transporte do ABA (Figura 7).

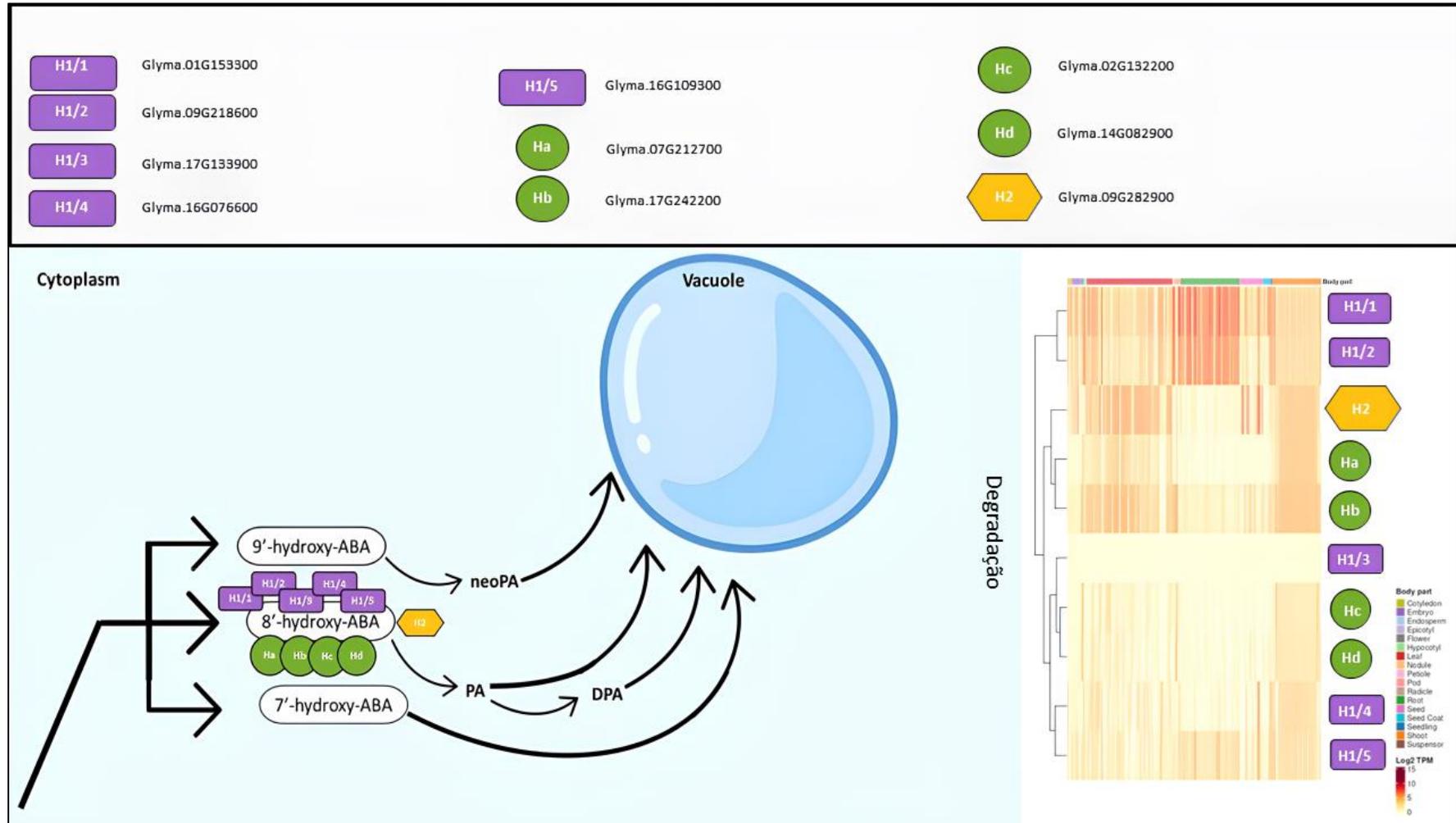
Ao examinarmos os genes pertencentes à via de sinalização de ABA, o gene

CHL (Glyma.03G137000) demonstrou expressões mais elevadas em folhas, hipocótilo e brotos. No entanto, sua expressão na raiz foi reduzida. Em contraste, ao analisarmos o gene que apresentou a menor expressão nos tecidos avaliados, identificamos o RING (Glyma.04G134700) (Figura 8). Esses resultados sugerem uma regulação diferencial dos genes ao longo dos tecidos de soja nas vias metabólicas de ABA.

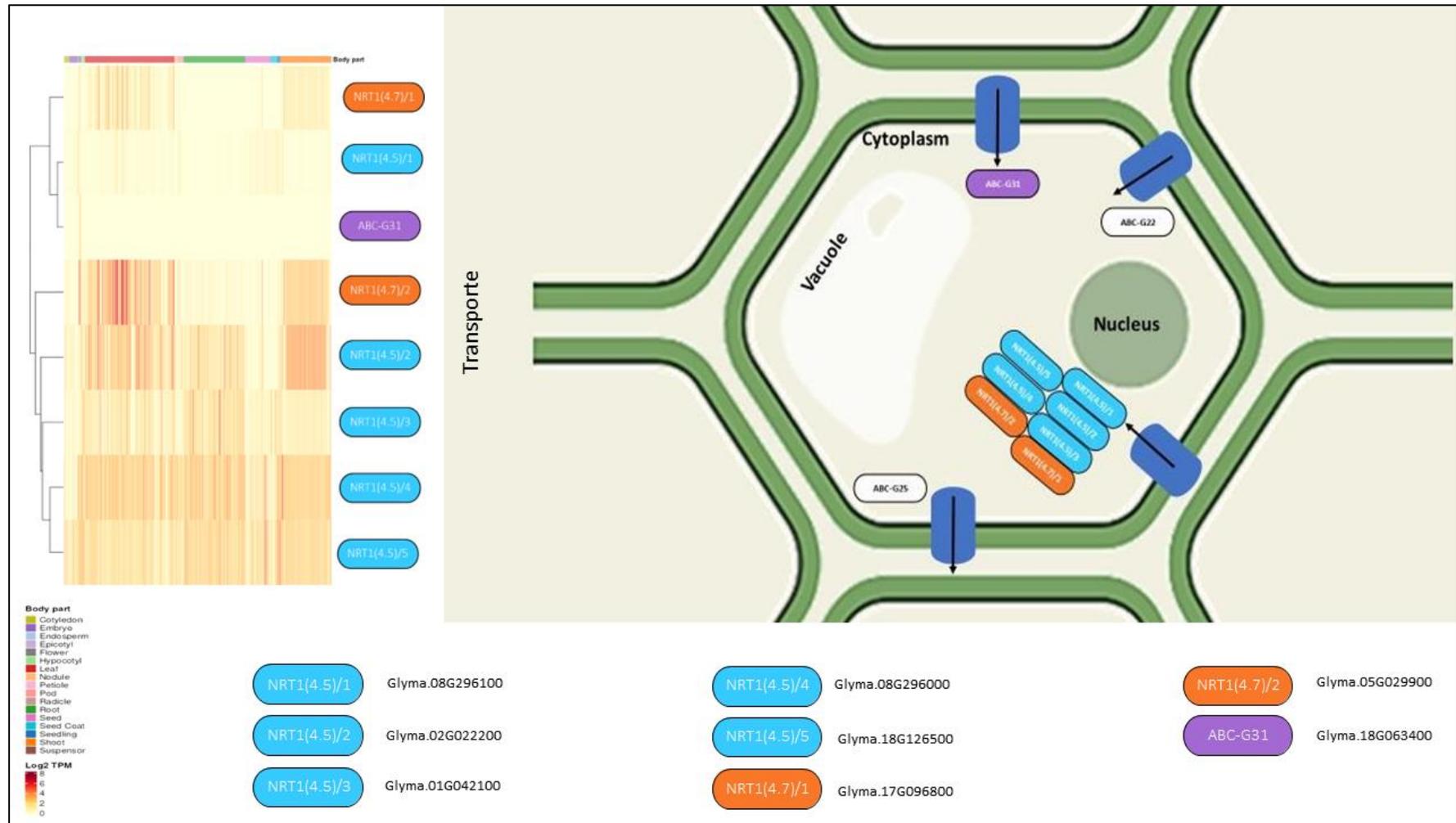
Em busca de analisar o perfil de expressão em plântulas de soja nas vias de biossíntese e degradação de ABA, utilizamos heatmap para visualização dos dados. Sabendo que o objeto desta pesquisa foca em plântulas de soja, os genes ABA2 (Glyma.11g151400) e ABA3 (Glyma.09g002300) foram os que mais expressaram na via de biossíntese de ABA nesta fase de desenvolvimento. Em contrapartida, o grupo dos genes NECED2 (Glyma.05g140900) foram os que menos expressam quando analisado em plântulas. Ao examinar os genes presentes na via de degradação de ABA, ressaltou-se a expressão elevada dos genes do grupo H1 (Glyma.01g153300) em comparação com os demais, evidenciando sua relevância nesse processo durante o estágio de plântulas. Por outro lado, o gene Hc (Glyma.02g132200) indicou-se com menor expressão em plântulas na via de degradação de ABA.



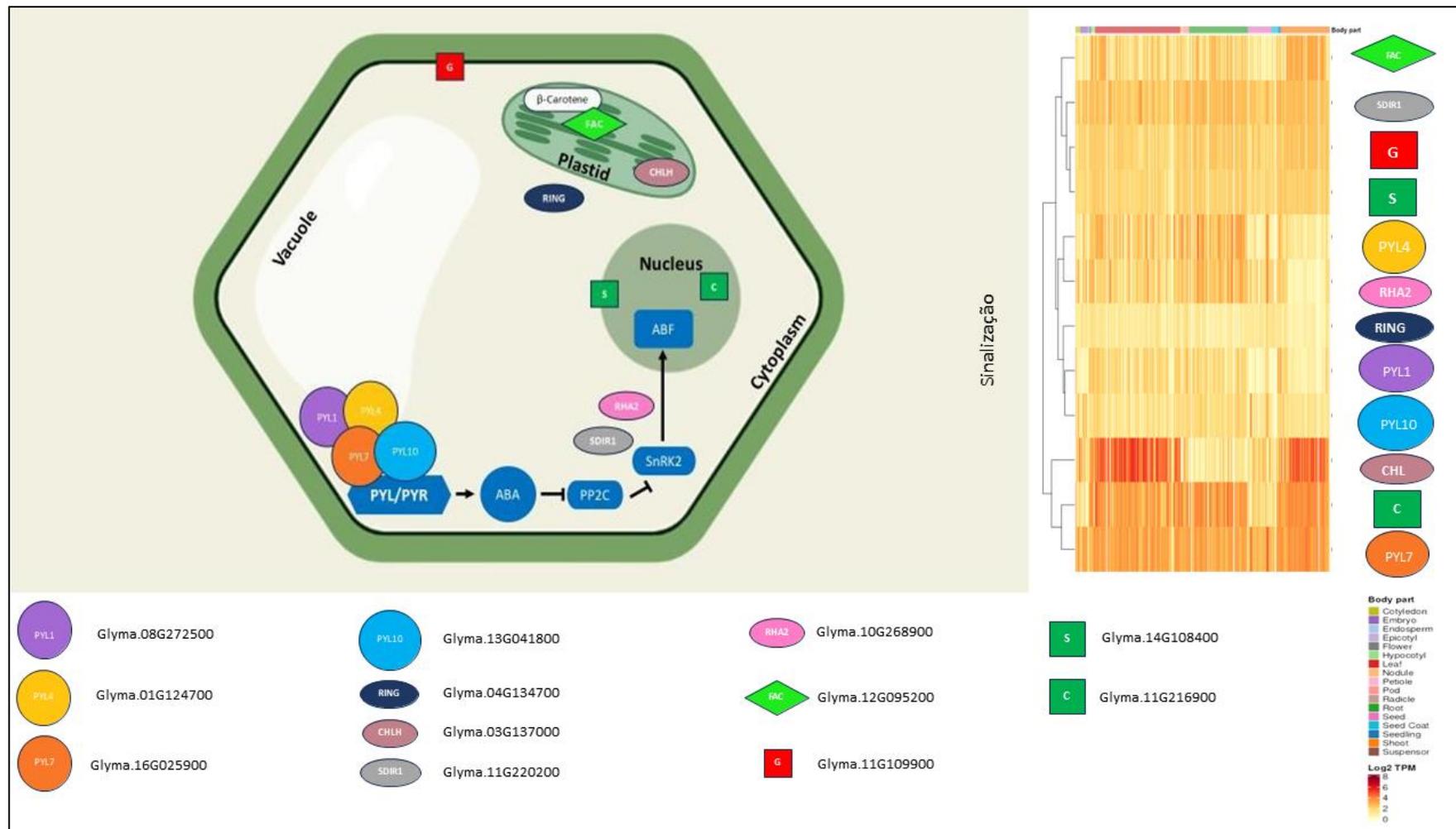
**Figura 5: Expressão diferencial de genes na via de biossíntese de ABA em diferentes tecidos e órgãos durante o desenvolvimento da soja.** Perfil de expressão de genes ABA em tecidos de soja. A barra de escala de cores na parte superior do mapa representa os valores de TPM transformados em log2.



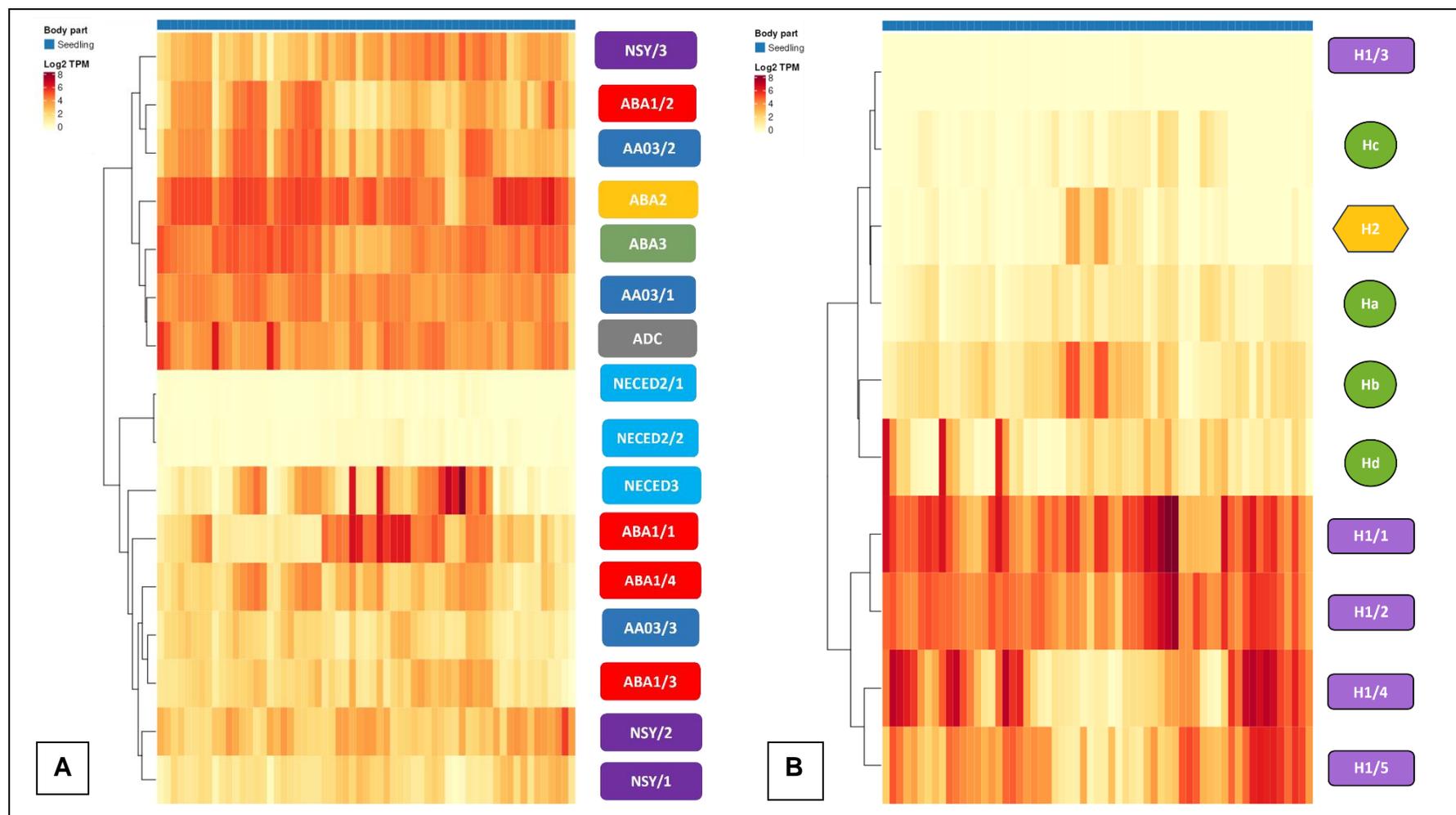
**Figura 6: Expressão diferencial de genes na via de degradação de ABA em diferentes tecidos e órgãos durante o desenvolvimento da soja. Perfil de expressão de genes ABA em tecidos de soja. A barra de escala de cores na parte superior do mapa representa os valores de TPM transformados em log2.**



**Figura 7: Expressão diferencial de genes na via de transporte de ABA em diferentes tecidos e órgãos durante o desenvolvimento da soja.** Perfil de expressão de genes ABA em tecidos de soja. A barra de escala de cores na parte superior do mapa representa os valores de TPM transformados em log2.



**Figura 8: Expressão diferencial de genes na via de sinalização de ABA em diferentes tecidos e órgãos durante o desenvolvimento da soja. Perfil de expressão de genes ABA em tecidos de soja. A barra de escala de cores na parte superior do mapa representa os valores de TPM transformados em log<sub>2</sub>.**

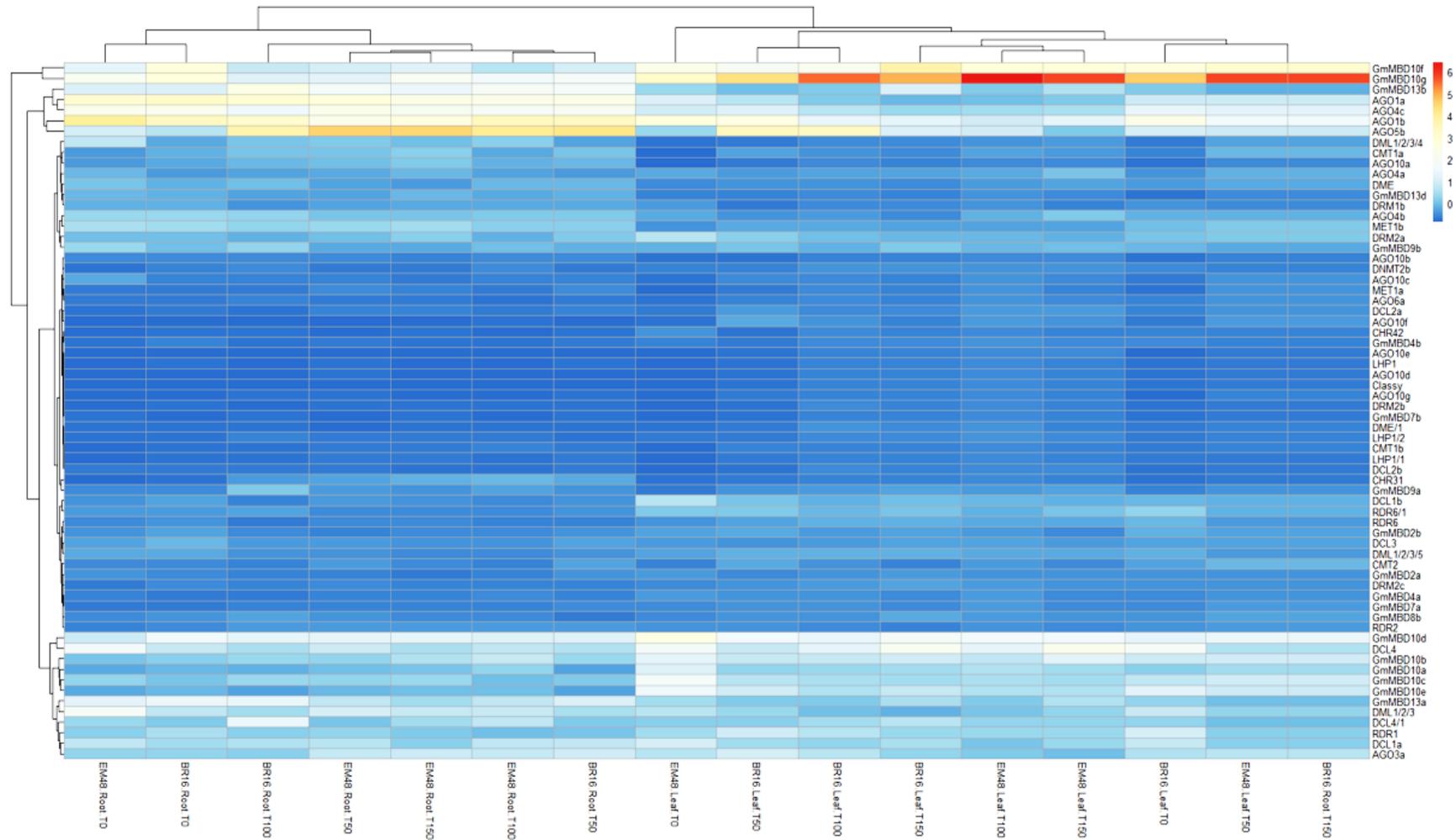


**Figura 9: Expressão diferencial de genes na via de biossíntese (A) e degradação (B) de ABA em plântulas de soja. A barra da escala de cor no mapa representa os valores de TPM transformados em log<sub>2</sub>.**

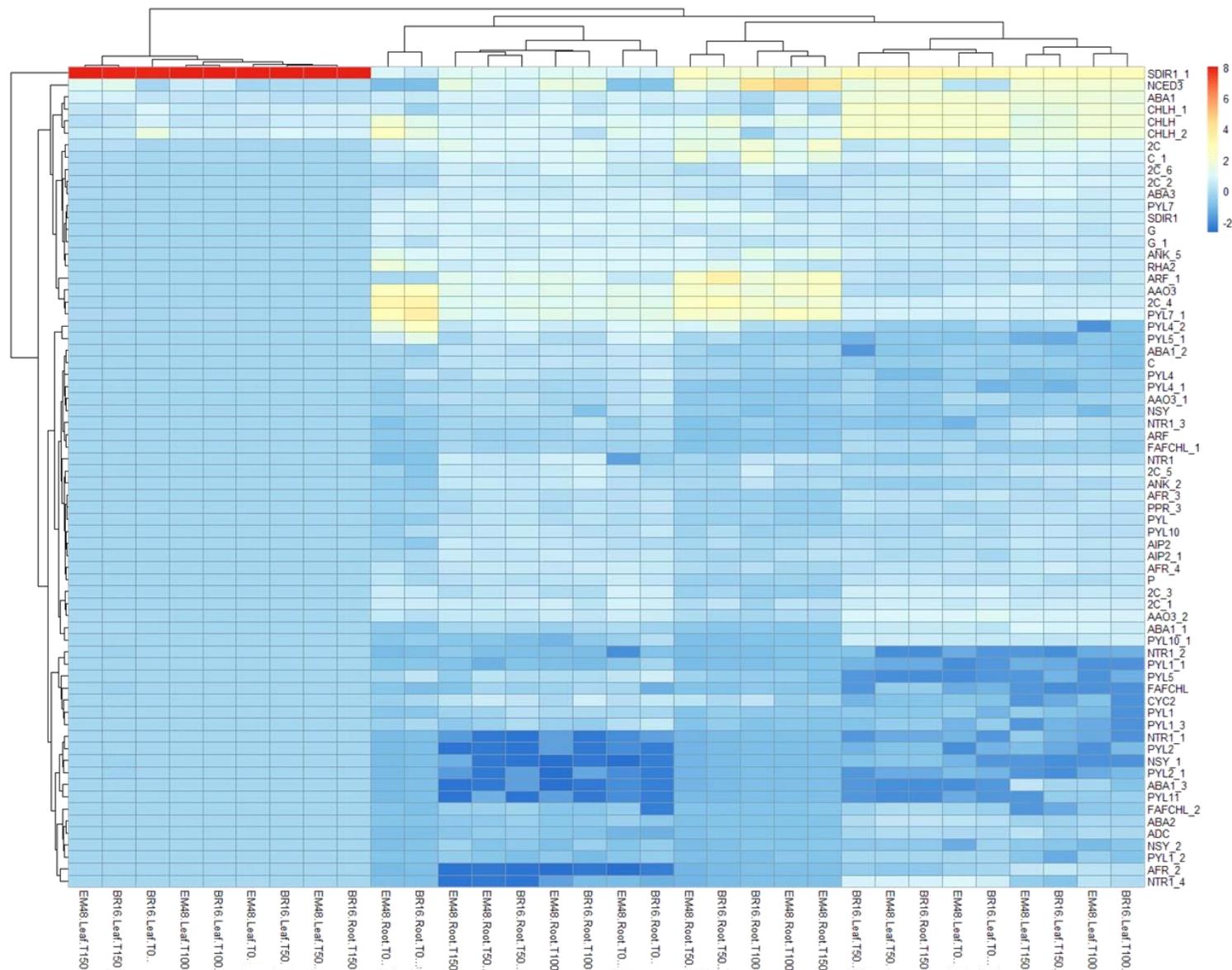
### **5.3 Impacto do perfil de expressão dos genes vinculados à regulação das vias de ABA e de efetores epigenéticos em genótipos de soja suscetíveis e tolerantes ao déficit osmótico**

A análise dos valores de expressão dos genes reguladores epigenéticos revela padrões distintos em resposta à deficiência hídrica em diferentes tecidos da cultivar Embrapa 48. Os genes GmMBD10f/g mostram uma expressão mais elevada nos tecidos foliares sob deficiência hídrica, enquanto o gene AGO5b exibe níveis aumentados nos tecidos radiculares nessas condições. O gene MET1b demonstra uma expressão pouco elevada tanto nos tratamentos controle quanto nos sujeitos à deficiência hídrica em ambas as cultivares, nos tecidos radiculares. Por outro lado, o gene DRM2a apresenta uma expressão aumentada no tratamento controle nos tecidos foliares da cultivar Embrapa 48, sugerindo uma regulação diferenciada da expressão gênica em resposta ao estresse osmótico. A disparidade na resposta entre as amostras de folhas e raízes das cultivares Embrapa 48 e BR 16 é evidente e pode estar relacionado ao desempenho superior da cultivar Embrapa 48 em condições de seca. De fato, as folhas da Embrapa 48 apresentaram um número mais expressivo de genes "up-regulated", indicando que essa cultivar responde de maneira mais ágil ao estresse osmótico em comparação com a BR 16, apresentando mais genes diferencialmente expressos desde os níveis moderados.

A partir dos valores de expressão normalizados obtidos dos genes identificados nas vias de ABA, foram construídos *heatmaps* para avaliar o perfil de expressão de raízes e folhas das cultivares Embrapa 48 e BR 16 em diferentes níveis de estresse osmótico (Figura 11). Cada linha representa um gene identificado de ABA, já as colunas correspondem a um tratamento de estresse osmótico em raiz e folha. Dentre os principais genes, SDR1, ABA1, CHLH e NCED3, destacaram-se devido aos elevados níveis de expressão. Notavelmente, o gene SDR1 apresentou um perfil de expressão consistentemente alto em comparação com outros genes, em todos os tratamentos sob estresse osmótico, com exceção dos tratamentos de raiz controle em ambas as cultivares. Em contraste, o gene PYL11 demonstrou a menor expressão, embora tenha apresentado oscilações nos tratamentos de folhas BR16 em estresse osmótico de 100 e 150 min, e na folha Embrapa 48 em 100 min sob estresse osmótico.



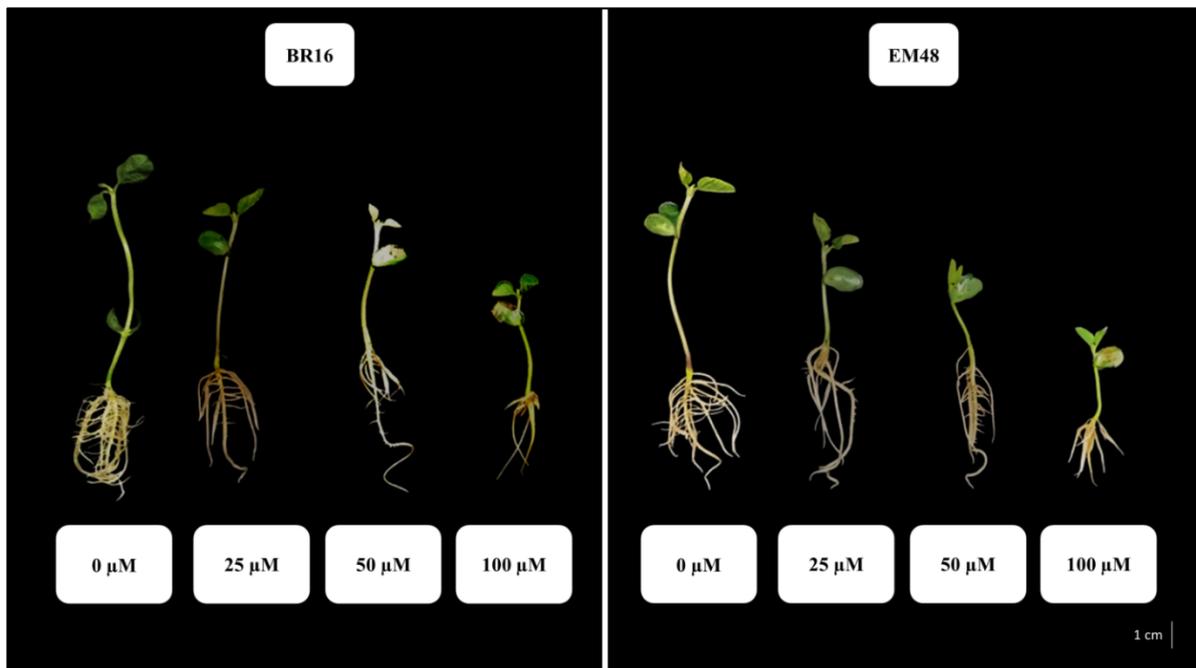
**Figura 10:** Heatmap gerado a partir dos valores de expressão normalizados dos 66 genes efetores epigenéticos. Cada coluna corresponde a um tratamento de estresse osmótico em raiz e folha. As linhas representam os genes vinculados a regulação epigenética e os níveis de expressão foram convertidos em  $\log_2$ , representados do azul ao vermelho, que correspondem a baixa, moderada e alta expressão.



**Figura 11: Heatmap gerado a partir dos valores de expressão normalizados dos 68 genes identificados nas vias metabólicas de ABA. Cada coluna corresponde a um tratamento de estresse osmótico em raiz e folha. As linhas representam os genes de ABA e os níveis de expressão foram convertidos em log2, representados nas cores azul, branco e vermelho, que correspondem a baixa, moderada ou alta expressão**

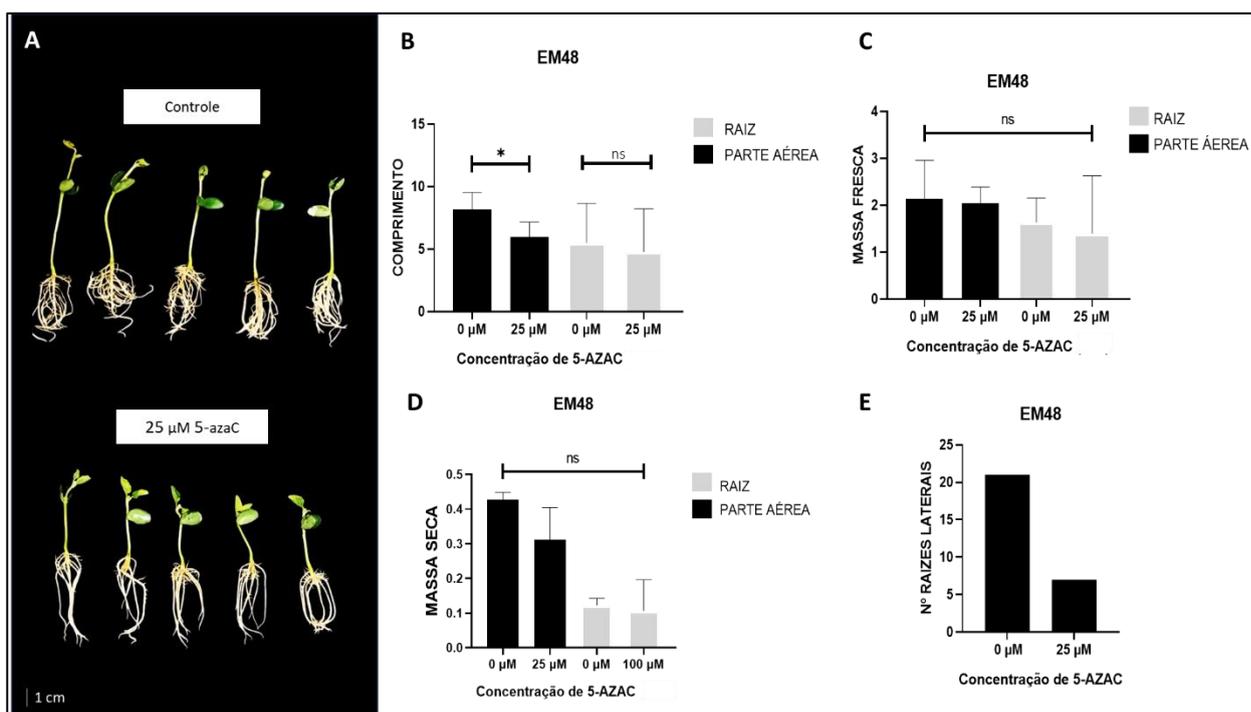
#### 5.4 Impactos do 5-azaC no crescimento inicial de plântulas de soja tolerante e sensível à seca e quando submetidas ao estresse osmótico

Para investigar a influência da metilação do DNA no desenvolvimento de plântulas de soja, as cultivares BR16 e Embrapa 48 foram submetidas ao crescimento em diferentes concentrações do inibidor de metilação 5-azaC. O fenótipo das plântulas de soja foi avaliado após 7 dias de exposição às concentrações de 0  $\mu\text{M}$  (controle), 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  de 5-azaC. Observou-se uma redução proporcional no crescimento da parte aérea e das raízes com o aumento da concentração de 5-azaC, sendo a concentração de 100  $\mu\text{M}$  aquela que resultou na maior redução no tamanho das plântulas (Figura 12). Esses resultados sugerem uma correlação entre a metilação do DNA e o desenvolvimento das plântulas de soja, indicando que a inibição desse processo pode impactar negativamente o crescimento das plantas.



**Figura 12: Efeito do inibidor da metilação (5-azaC) no desenvolvimento de duas cultivares de soja com 7 dias em diferentes concentrações de 5-azaC (0, 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$ ). Escala da barra = 1 cm.**

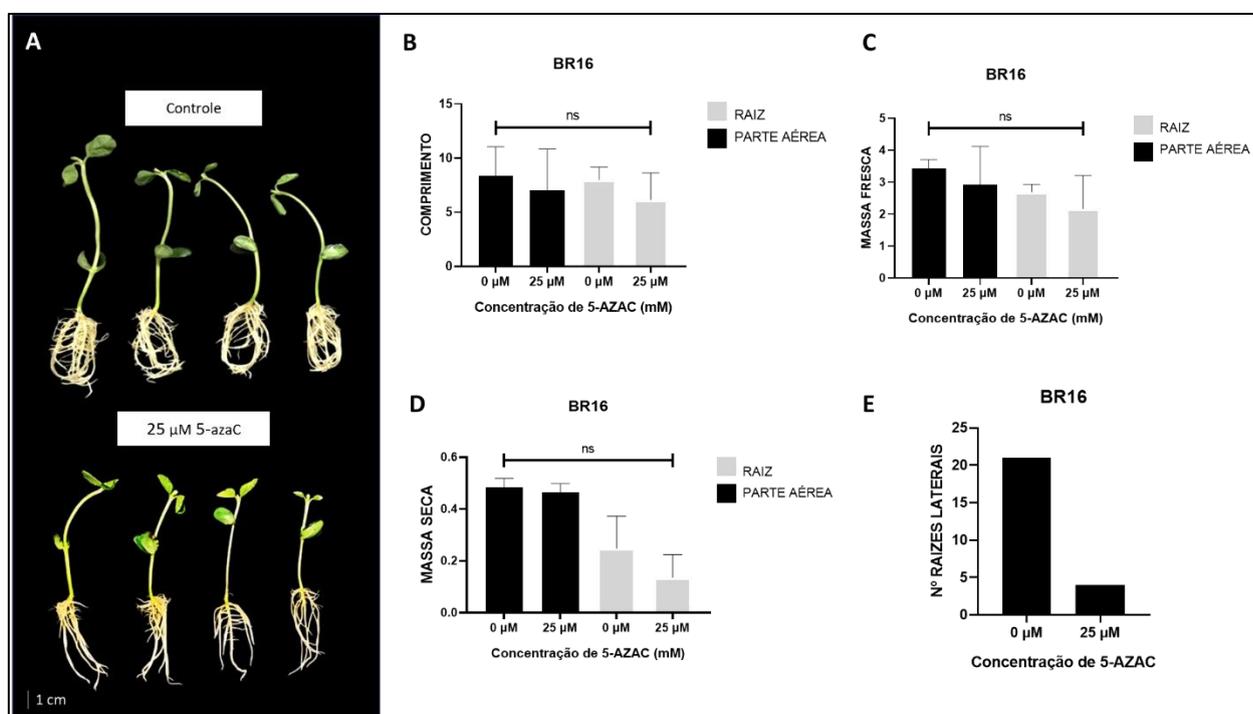
Estabelecendo a concentração de menor impacto na plântula, 25  $\mu\text{M}$  de 5-azaC na cultivar Embrapa 48, demonstrou uma redução no tamanho das plântulas, conforme evidenciado na (Figura 13A). Nesse tratamento, observou-se uma diminuição significativa no comprimento da parte aérea. Entretanto, na massa fresca e massa seca tanto da parte aérea quanto das raízes não obtiveram diferença significativa, como ilustrado nas (Figuras 13B, 13C e 13D). Notavelmente, o número de raízes laterais foi o parâmetro que apresentou o maior impacto fenotípico, como destacado na (Figura 13E). Esses resultados indicam que a exposição a 25  $\mu\text{M}$  de 5-azaC exerceu efeitos significativos sobre aspectos do desenvolvimento das raízes das plântulas, evidenciando a sensibilidade desse processo aos níveis elevados desse inibidor de metilação.



**Figura 13: Análise fenotípica das plântulas de soja controle e tratadas com 5-azaC da cultivar Embrapa 48 com 7 dias (A).** (B) Comprimento (cm) da parte aérea e raiz das plântulas. (C) Massa fresca da parte aérea e raiz das plântulas. (D) Massa seca da parte aérea e raiz das plântulas. (E) Número de raízes laterais das plântulas. A escala da barra = 1cm. \* - indica diferença significativa do tratamento com 5-azaC em relação ao controle  $P < 0,001$  e ns – indica não significativo de acordo com o teste t.

Ao analisar a concentração de 25  $\mu\text{M}$  de 5-azaC na cultivar BR16, foram observadas diferenças significativas nas plântulas, conforme evidenciado na (Figura 14A). Nesse tratamento específico, não foram observadas diferenças significativas no

comprimento, na massa fresca e na massa seca tanto da parte aérea quanto das raízes, como ilustrado nas (Figuras 14B, 14C e 14D). Assim como a cultivar Embrapa 48, o parâmetro que apresentou o maior impacto fenotípico foi o número de raízes laterais, como destacado na (Figura 14E). Esses resultados sugerem que a concentração de 25  $\mu\text{M}$  de 5-azaC pode não ter afetado de maneira significativa o desenvolvimento das plântulas da cultivar BR16 em comparação com a concentrações mais elevadas, indicando uma possível resposta divergente entre as diferentes concentrações do inibidor de metilação.

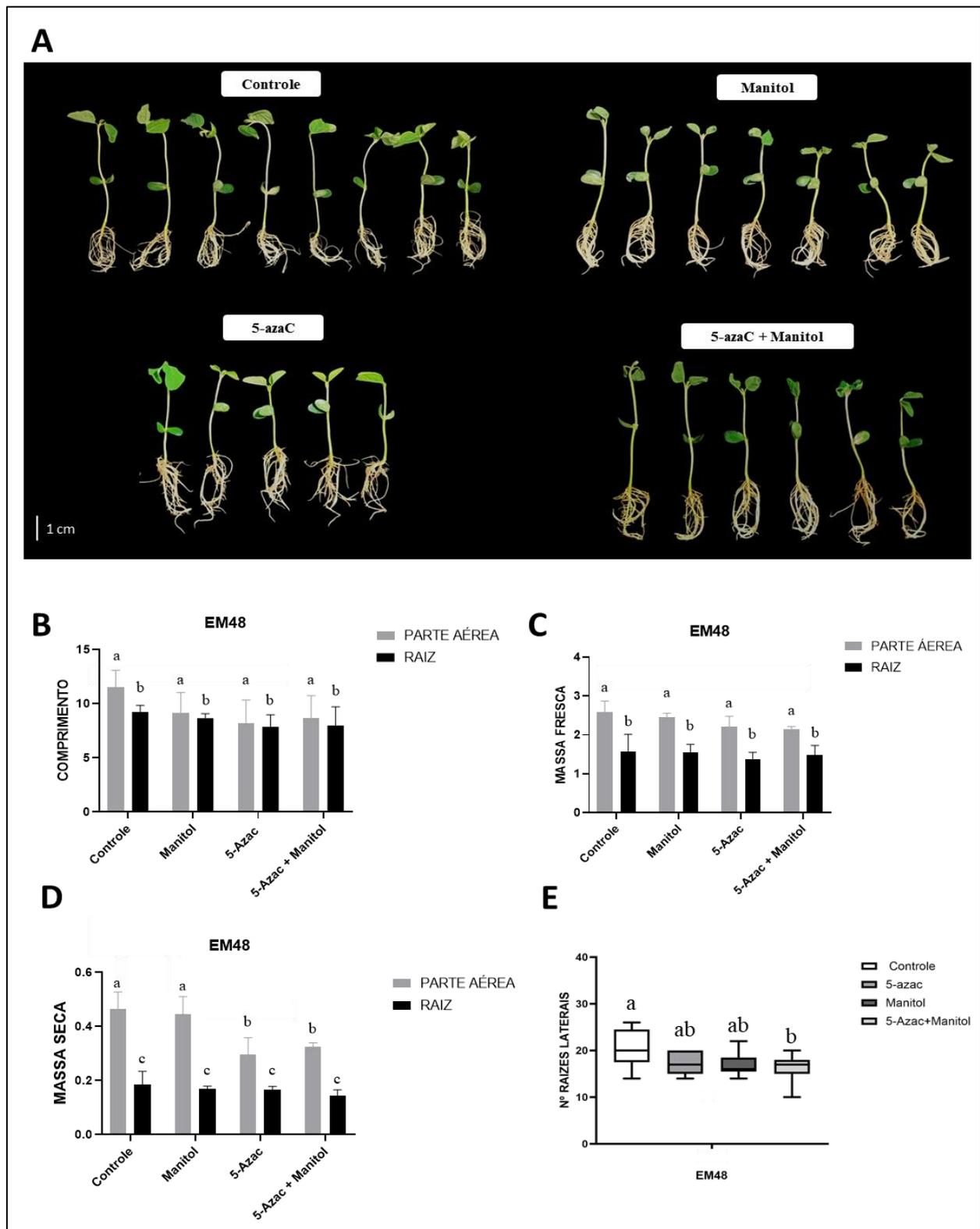


**Figura 14: Análise fenotípica das plântulas de soja controle e tratadas com 5-azaC da cultivar BR16 com 7 dias (A).** (B) Comprimento (cm) da parte aérea e raiz das plântulas. (C) Massa fresca da parte aérea e raiz das plântulas. (D) Massa seca da parte aérea e raiz das plântulas. (E) Número de raízes laterais das plântulas. A escala da barra = 1cm. \* - indica diferença significativa do tratamento com 5-azaC em relação ao controle  $P < 0,001$  e ns – indica não significativo de acordo com o teste t.

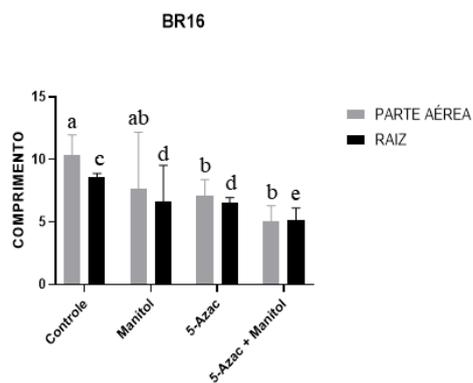
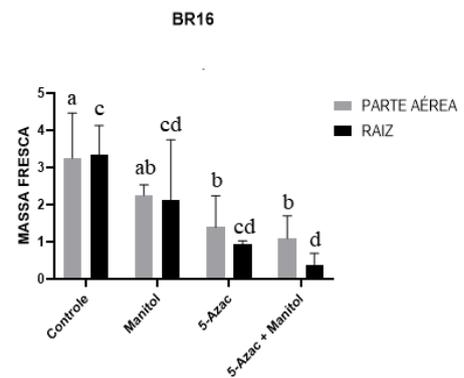
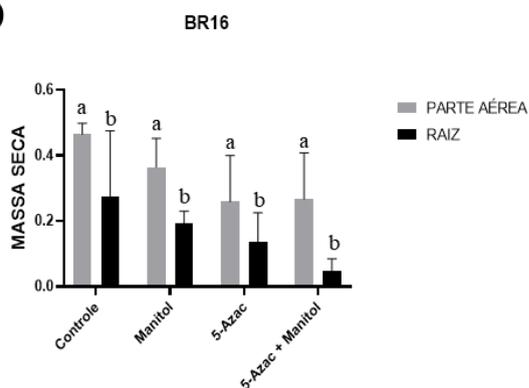
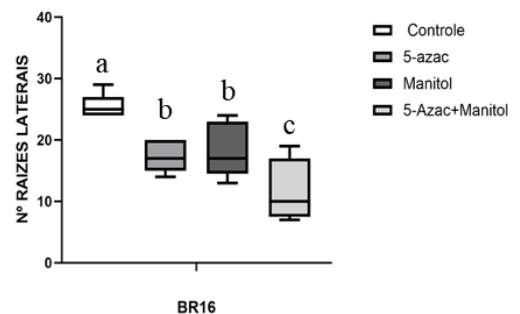
Com o propósito de investigar a influência da metilação do DNA no crescimento de plântulas de soja sob estresse osmótico, nas variedades BR16 e Embrapa 48, designadas como resistentes e suscetíveis à seca, foram aplicados 25  $\mu\text{M}$  de 5-azaC e uma concentração de 300mM de manitol (Figura 15 e 16). Na cultivar

Embrapa 48, quando sujeitas aos tratamentos com manitol, 5-azaC e manitol+5-azaC, não foram observadas diferenças significativas no comprimento e na massa fresca, tanto para as raízes quanto para a parte aérea (Figura 15B e 15C). Entretanto, ao avaliar os mesmos tratamentos quanto à massa seca, constatou-se diferença significativa para a parte aérea nos tratamentos com 5-azaC e 5-azaC+manitol, ao contrário desses mesmos tratamentos na raiz em massa seca. Esses resultados sugerem que, para a parte aérea, os tratamentos de 5-azaC e 5-azaC + Manitol mostraram diferenças significativas em comparação com o grupo de controle e com os grupos que receberam tratamento com Manitol. No entanto, entre 5-azaC e 5-azaC + Manitol, não houve diferenças significativas. Para a massa seca da raiz, nenhum dos tratamentos apresentou diferenças significativas em comparação com o controle (Figura 15D). Dado que o tratamento com 25  $\mu$ M de 5-azaC afetou o desenvolvimento das plântulas de soja, com maior impacto na raiz, procedeu-se à análise do número de raízes laterais nesses tratamentos, em comparação com o controle (Figura 15E). As raízes submetidas à ação do 5-azaC apresentaram desempenho inferior em relação às demais, porém, quando submetidas ao tratamento com 5-azaC+manitol, houve uma leve recuperação.

Com o objetivo de investigar a influência da metilação do DNA no crescimento de plântulas de soja sob estresse osmótico, na cultivar BR16 (Figura 16A), observamos diferenças significativas no comprimento e na massa fresca da raiz no tratamento com 5-azaC + manitol, enquanto no tratamento com 5-azaC a significância foi observada apenas na massa fresca (Figura 16B e 16C). Ao analisar a morfologia da parte aérea, notamos que os tratamentos com 5-azaC e 5-azaC+manitol foram estatisticamente significativos em relação à massa seca, quando comparados ao tratamento controle (Figura 16D). Devido ao impacto do tratamento com 25  $\mu$ M de 5-azaC no desenvolvimento das plântulas de soja, especialmente na raiz, procedemos à análise do número de raízes laterais nesses tratamentos, em comparação com o controle (Figura 16E). Assim como na cultivar Embrapa 48, as raízes submetidas à ação do 5-azaC apresentaram desempenho inferior em relação às demais, impactando também nas raízes adventícias. No entanto, quando submetidas ao tratamento com 5-azaC+manitol, observou-se uma leve recuperação nas raízes laterais.



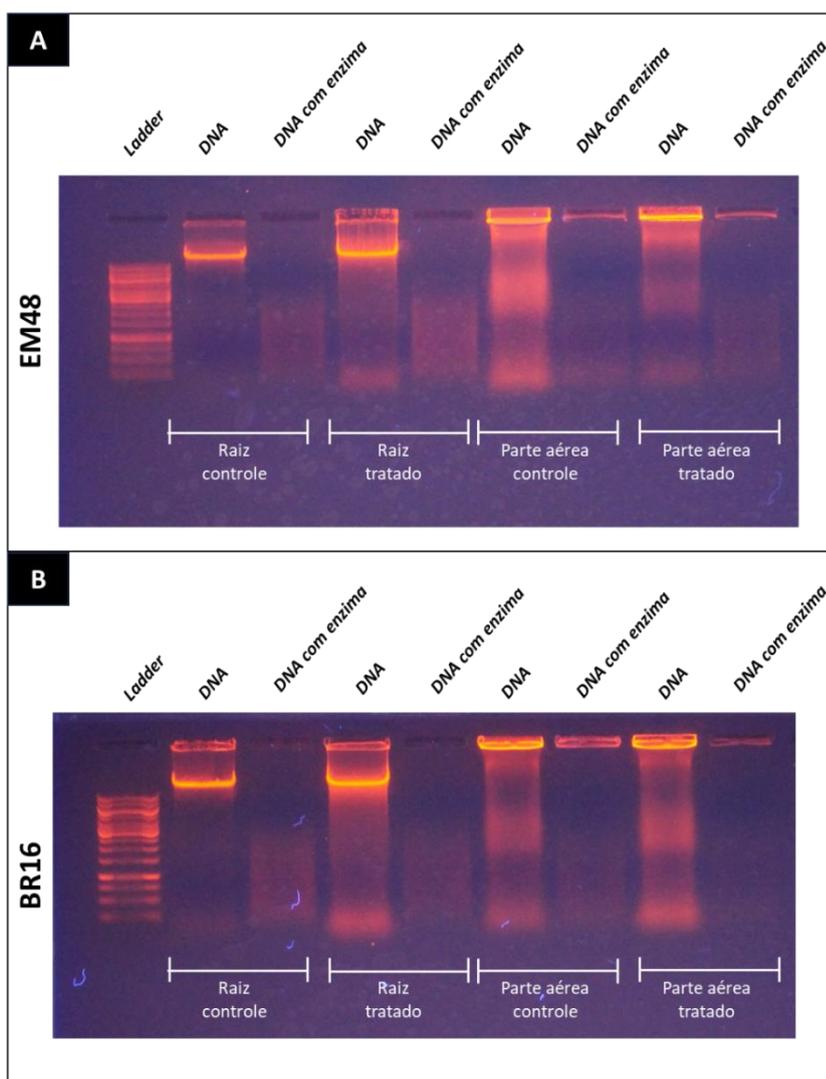
**Figura 15: Análise fenotípica das plântulas de soja tratadas com 5-azaC e submetidas a estresse osmótico da cultivar EM48 com 8 dias (A). (B) Comprimento (cm) da parte aérea e raiz das plântulas. (C) Massa fresca da parte aérea e raiz das plântulas. (D) Massa seca da parte aérea e raiz das plântulas. (E) Número de raízes laterais das plântulas. A escala da barra = 1cm. Médias seguidas de letras iguais - indica que não houve significância estatísticas. Médias seguidas de letras diferentes apresentaram diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ), de acordo com o teste t.**

**A****B****C****D****E**

**Figura 16: Análise fenotípica das plântulas de soja tratadas com 5-azaC e submetidas a estresse osmótico da cultivar BR16 com 8 dias (A). (B) Comprimento (cm) da parte aérea e raiz das plântulas. (C) Massa fresca da parte aérea e raiz das plântulas. (D) Massa seca da parte aérea e raiz das plântulas. (E) Número de raízes laterais das plântulas. A escala da barra = 1 cm. Médias seguidas de letras iguais - indica que não houve significância estatísticas. Médias seguidas de letras diferentes apresentaram diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ), de acordo com o teste t.**

## 5.5 Avaliação dos níveis de metilação global do DNA em plântulas de soja

A detecção da metilação do DNA por meio da utilização de enzimas de restrição é uma abordagem fundamentada na sensibilidade diferencial à metilação do DNA. Ao verificar os níveis de metilação global do DNA em plântulas de soja das cultivares Embrapa 48 e BR16 em plântulas controle e tratadas com inibidor de metilação, observou-se que quando submetidos a enzima ALUI o DNA é clivado representando um arraste no gel de agarose (Figura 17A e 17B). O DNA extraído de plântulas BR 16 tratadas com 5-azaC apresentou um padrão reduzido de arraste quando comparado ao controle.

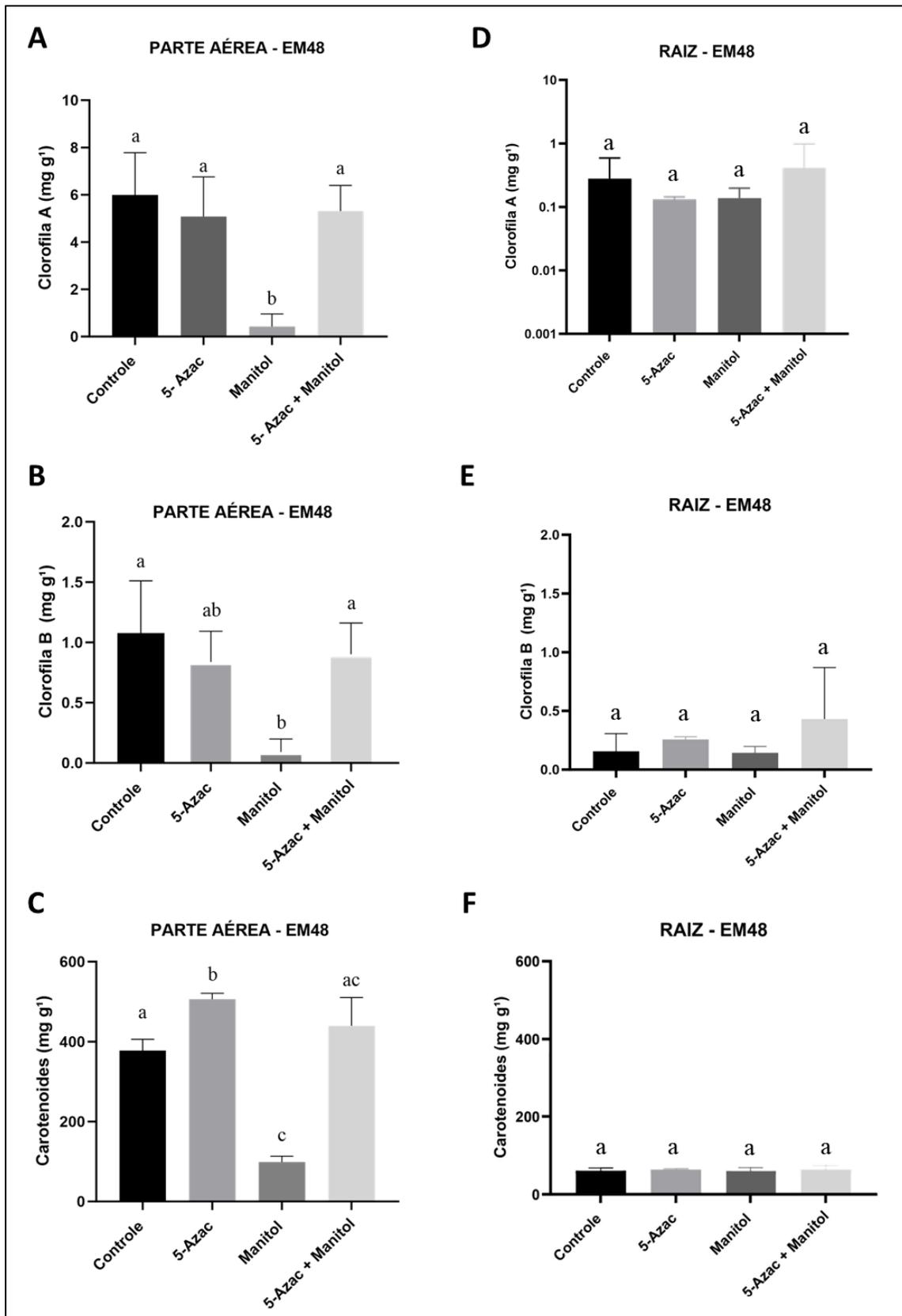


**Figura 17: Fragmentos obtidos pela digestão com a enzima ALUI: nos tratamentos controle e tratado, após eletroforese de DNA em gel de agarose.**

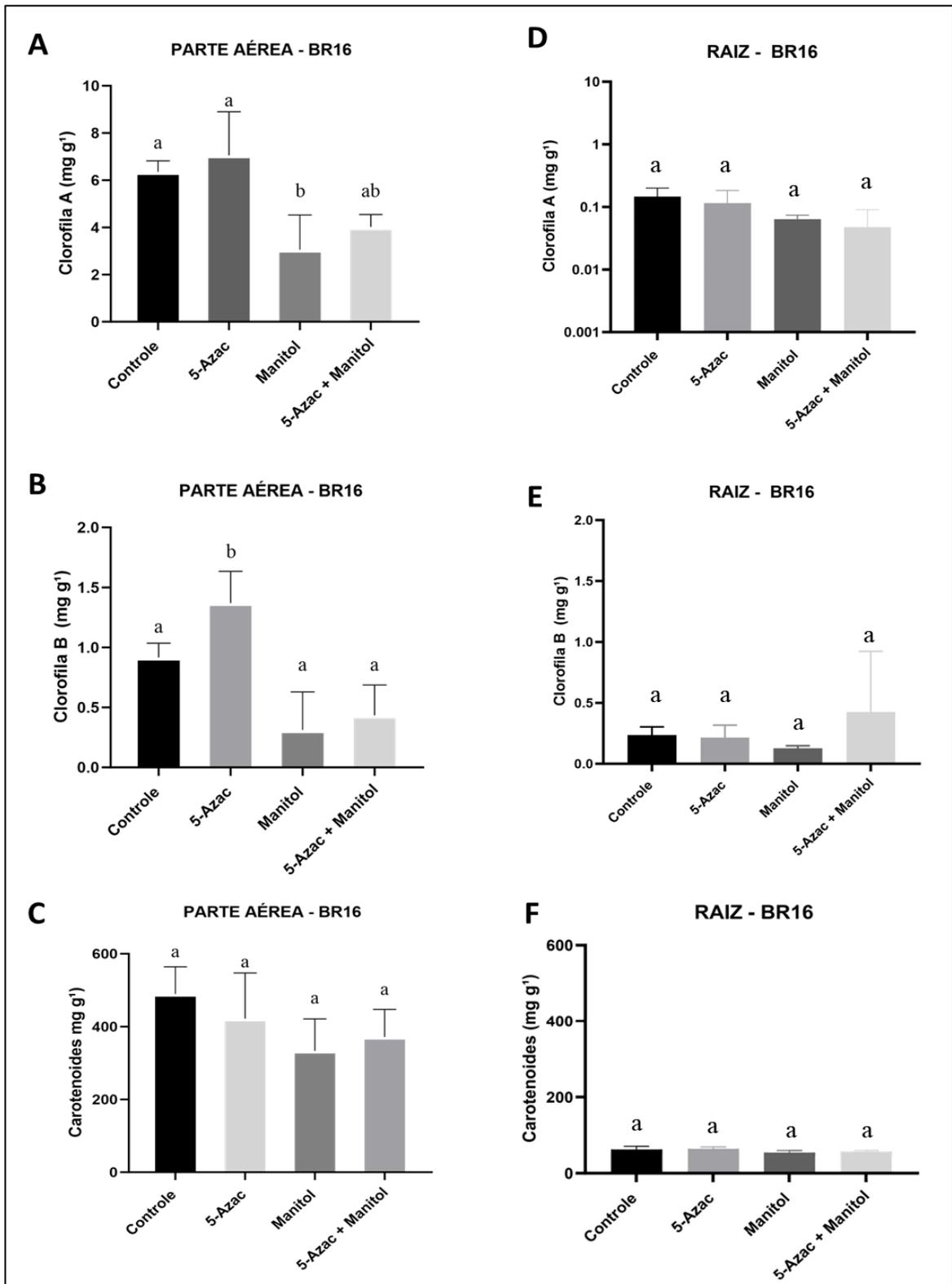
## **5.6 Influência do 5-azaC e estresse osmótico na expressão de pigmentos cloroplastidiais em plântulas de soja**

Os pigmentos cloroplastidiais das cultivares contrastantes foram submetidos à análise em tratamentos com 5-azaC e sujeitos a estresse osmótico (Figura 18 e 19). Na cultivar Embrapa 48, caracterizada como tolerante à seca, observou-se, na parte aérea, uma diferença significativa nos teores de clorofila *a* e clorofila *b* quando associados ao tratamento com manitol, indicando que esse agente osmótico reduz as taxas desses pigmentos (Figura 18A e 18B). Além disso, ao analisar os teores de carotenoides, o tratamento com 5-azaC e outro com manitol apresentou alterações em comparação com o tratamento controle (Figura 18C). Vale ressaltar que, ao contrário do manitol, o inibidor de metilação induziu ao aumento desses mesmos pigmentos. Diferentemente da parte aérea, não foram evidenciadas diferenças significativas nas raízes em nenhum dos tratamentos, assim como em relação aos pigmentos cloroplastidiais analisados (Figura 18D, 18E e 18F).

Na cultivar BR16, caracterizada como sensível à seca, foi observada uma diferença significativa nos teores de clorofila *a* e clorofila *b* na parte aérea, tanto no tratamento com manitol quanto no tratamento 5-azaC+manitol (Figura 19A e 19B). Isso sugere que, semelhante a cultivar Embrapa 48, o estresse osmótico resulta na diminuição das taxas desses pigmentos. Em contrapartida, ao analisar os teores de carotenoides, não foram identificadas diferenças significativas para esta cultivar, diferenciando-se da cultivar resistente à seca (Figura 19C). Quanto à análise dos mesmos pigmentos nas raízes da cultivar BR16, não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos tratamentos, assim como em relação aos diversos pigmentos cloroplastidiais avaliados (Figura 19D, 19E e 19F). Esses resultados evidenciam as diferentes respostas dos pigmentos cloroplastidiais às condições de estresse osmótico, revelando nuances específicas nas cultivares analisadas.



**Figura 18: Teor de pigmentos cloroplastidiais EM48.** Parte aérea: (A) clorofila a, (B) clorofila b e (C) carotenoides. Raiz: (D) clorofila a, (E) clorofila b e (F) carotenoides, nas folhas e raízes de plântulas da cultivar Embrapa 48 com 8 dias de desenvolvimento. Médias seguidas de letras iguais - indica que não houve significância estatísticas. Médias seguidas de letras diferentes apresentaram diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ), de acordo com o teste t.



**Figura 19: Teor de pigmentos cloroplastidiais BR16.** Parte aérea: (A) clorofila a, (B) clorofila b e (C) carotenoides. Raiz: (D) clorofila a, (E) clorofila b e (F) carotenoides, nas folhas e raízes de plântulas da cultivar BR16 com 8 dias de desenvolvimento. Médias seguidas de letras iguais - indica que não houve significância estatísticas. Médias seguidas de letras diferentes apresentaram diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ), de acordo com o teste t.

## **5.7 Efeito do 5-azaC na expressão de genes relacionados com a biossíntese de ABA em plântulas de soja**

Sabendo que carotenoides são precursores de ABA, prosseguiu-se para a análise dos perfis de expressão de genes relacionados a regulação das vias metabólicas de ácido abscísico (ABA1, ABA2, ABA3, AA03, NCED, NSY e CYP707A) e de modulação epigenética (GmMBD10g) em raízes de plântulas tratadas e não tratadas com 5-azaC e submetidas a estresse osmótico por 8 dias, para as cultivares contrastantes Embrapa 48 e BR16 em raízes (Figura 20).

O gene ABA1 (Glyma.17g174500), que regula a biossíntese de ácido abscísico, localizado na região do plastídio (zeaxantina), demonstrou uma elevação em sua expressão tanto no tratamento com manitol quanto no tratamento com 5-azaC+manitol na cultivar Embrapa 48. Em contraste, quando avaliado na cultivar BR16, não revelou alteração significativa nos níveis de expressão em nenhum dos tratamentos (Figura 20A).

Na análise do gene ABA2 (Glyma.11g151400), responsável pela regulação da biossíntese de ácido abscísico (xantoxina), conduzida nos mesmos tratamentos e nas mesmas cultivares contrastantes, notou-se alterações significativas nos níveis de expressão tanto na Embrapa quanto na BR16, especificamente nos tratamentos com manitol e plântulas tratadas com 5-azaC+manitol, apresentando expressão notavelmente elevada nas raízes das plântulas quando submetidas ao tratamento com manitol, em ambas as cultivares (Figura 20B).

Ao investigar a expressão do gene ABA3 (Glyma.09g002300), responsável pela regulação da biossíntese de ácido abscísico (aldeído abscísico), observou-se que, na cultivar Embrapa 48, tanto no tratamento com manitol quanto no tratamento com 5-azaC+manitol, houve um aumento significativo na expressão desse gene. Entretanto, na cultivar BR16, apenas no tratamento com 5-azaC+manitol foi observada uma expressão significativa em comparação ao controle, apresentando uma expressão notavelmente elevada nas raízes das plântulas quando submetidas ao tratamento com 5-azaC, em ambas as cultivares (Figura 20C).

Ao examinar o gene AA03 (Glyma.02g272400), responsável pela regulação da biossíntese de ácido abscísico (aldeído abscísico), observou-se que na cultivar BR16, tanto no tratamento com manitol quanto no tratamento com 5-azaC+manitol,

houve um aumento significativo na expressão desse gene, apresentando uma expressão notavelmente elevada nas raízes das plântulas quando submetidas a tratamentos contendo manitol (Figura 20D).

Quando verificado o gene NCED (Glyma.15g250100), responsável pela regulação da biossíntese de ácido abscísico (9-cis-neoxantina), constatou-se que na cultivar Embrapa 48 não revelaram expressões significativas em nenhum dos tratamentos avaliados. Em contrapartida, na cultivar BR16 nos tratamentos com 5-azaC e 5-azaC+manitol foi observada uma expressão significativa em comparação ao controle, apresentando uma expressão notavelmente elevada nas raízes das plântulas quando submetidas ao tratamento com 5-azaC em BR16 (Figura 20E).

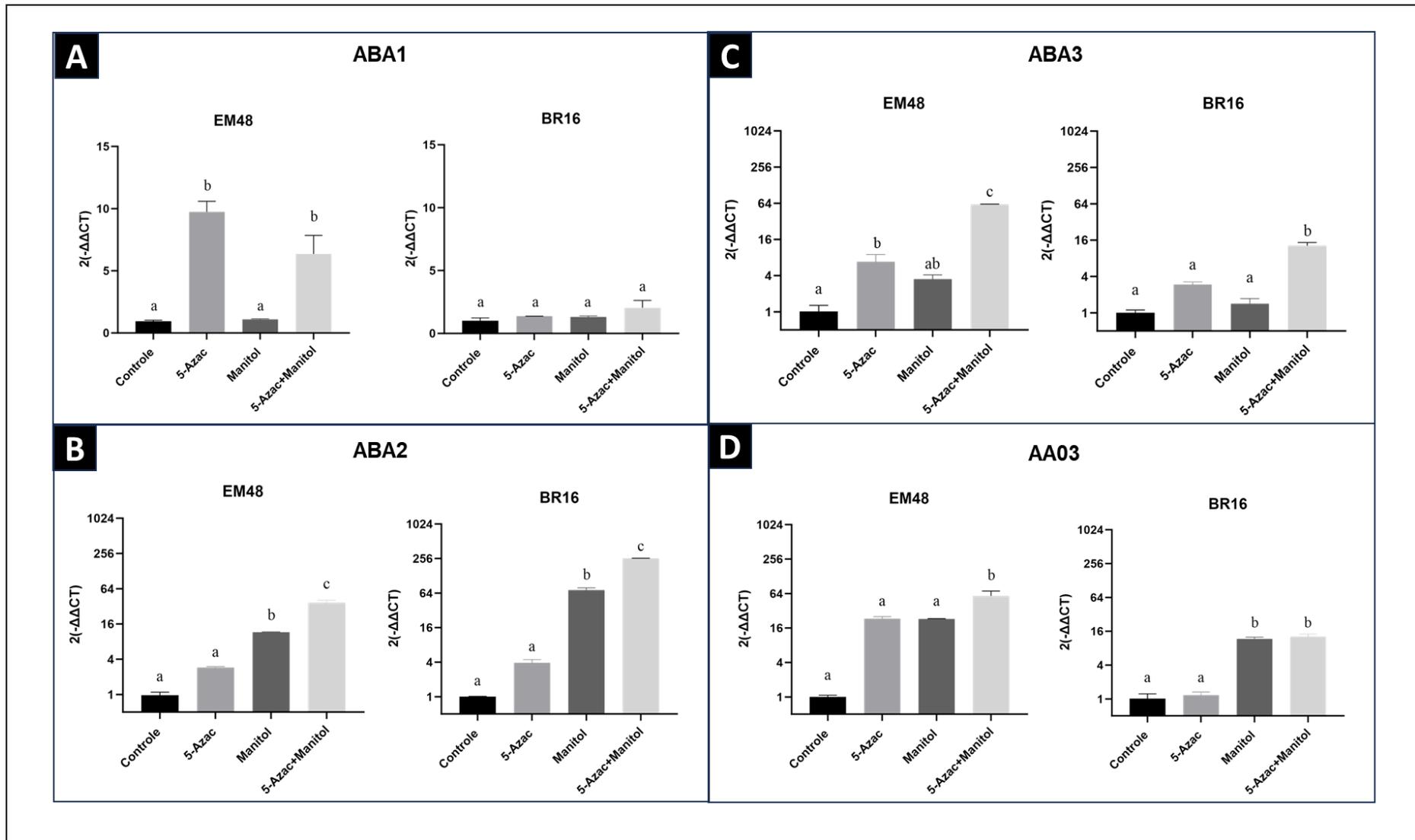
O gene NSY (Glyma.19g047800), responsável pela regulação da biossíntese de ácido abscísico (trans-neoxantina), apresentou expressões significativas em todos os tratamentos na cultivar BR16, ao contrário da Embrapa 48 que se mostrou significativamente expresso apenas 5-azaC+manitol quando comparados com o tratamento controle, apresentando uma expressão notavelmente elevada nas raízes das plântulas quando submetidas a tratamentos com 5-azaC, em ambas as cultivares (Figura 20F).

Com o propósito de avaliar a expressão do gene CYP707A (Glyma.01g153300), responsável pela regulação da via de degradação do ácido abscísico (8'-hydroxy-ABA) identificado como H1 na (Figura 6), observou-se que esse gene apresentou diferenciação na expressão em ambas as cultivares, abrangendo todos os tratamentos aplicados. Notavelmente, evidenciou-se um aumento na expressão nos tratamentos com 5-azaC. O gene CYP707A exibiu uma expressão elevada nas raízes das plântulas quando submetidas aos tratamentos com 5-azaC, tanto na cultivar Embrapa 48 quanto na BR16 (Figura 20G).

Considerando a análise do gene GmMBD10g (Glyma.15G007700), em dados de RNA-seq relacionados a reguladores epigenéticos, observou-se uma expressão mais elevada nos tratamentos sujeitos à deficiência hídrica, sem apresentar altas variações nas raízes da cultivar BR16. Concordando com esses resultados, a expressão na cultivar Embrapa 48 foi consistentemente mais elevada nos tratamentos avaliados com manitol. Já a cultivar BR16 apresentou expressão significativa apenas no tratamento com 5-azaC em comparação com o tratamento controle. Além disso, destaca-se que, na cultivar tolerante à seca, o manitol, representando um agente de

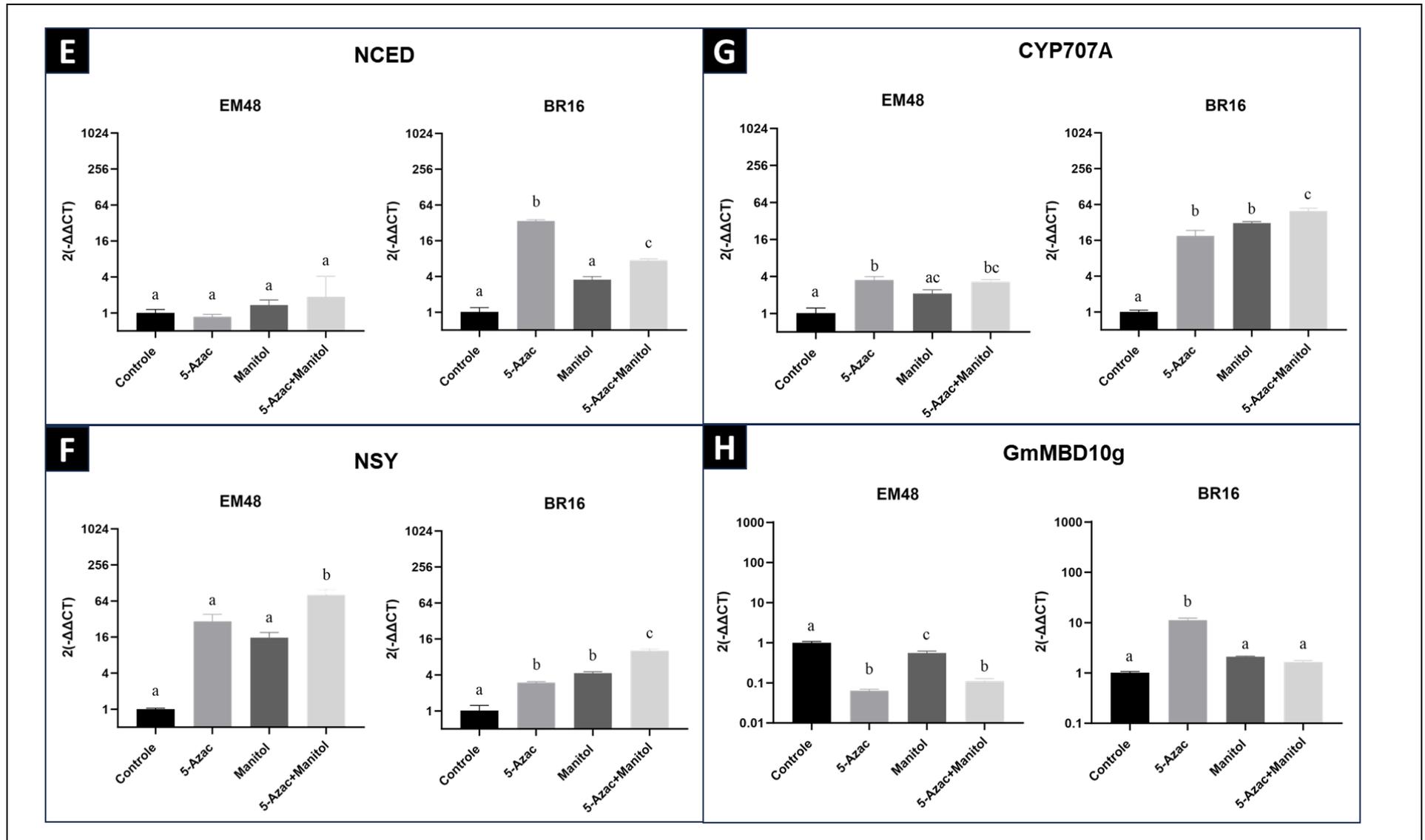
estresse osmótico, induziu o aumento da expressão desse gene. Em contrapartida, na cultivar caracterizada como sensível à seca, o 5-azaC, atuando como um inibidor de metilação, também induziu o aumento da expressão desse gene, apresentando respostas diferenciadas na expressão do gene GmMBD10g entre as cultivares.

Esses resultados indicam uma resposta diferencial nos padrões de expressão gênica entre as cultivares e tratamentos aplicados, oferecendo descobertas relevantes para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos nas respostas ao estresse osmótico.



**Figura 20: Expressão dos genes relacionados a regulação das vias metabólicas de ácido abscísico (ABA1, ABA2, ABA3, AA03, NCED, NSY e CYP707A) e de modulação epigenética (GmMBD10g) em raiz de plântulas de soja com 8 dias. Médias seguidas de letras iguais - indica que não houve significância estatísticas. Médias seguidas de letras diferentes apresentaram diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ), de acordo com o teste t.**

Figura 20 - Continuação.



## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Análise do perfil de expressão de genes integrados às vias metabólicas de ABA

O ABA desempenha um papel fundamental em toda a vida das plantas e regula não apenas seu crescimento e desenvolvimento, mas também as respostas aos estresses bióticos e abióticos (Ma *et al.*, 2018). Sabendo que a regulação desse fitohormônio é equilibrada pelas vias metabólicas desse composto, (Li *et al.*, 2021) identificaram genes associados à biossíntese, catabolismo e transdução de sinal do ABA por meio da análise do transcriptoma. Além disso, destacam que componentes celulares, como enzimas, transportadores e outras moléculas, desempenham funções essenciais nessa rede regulatória (Dong *et al.*, 2015).

Em nosso estudo, quando analisada a via de biossíntese de ABA, observamos diferentes agrupamentos de expressão em tecidos e órgãos de soja e os genes ABA3 e AA03 que exibiram níveis variados de expressão nas folhas e brotos, apresentando expressão diminuída na raiz. Em contrapartida, o gene NECED2 demonstrou ser o de menor expressão dentre os tecidos analisados. De acordo com (Yue *et al.*, 2011), observaram a superexpressão de *Arabidopsis* LOS5/ABA3 em tabaco transgênico e ele codifica o cofator sulfurase de molibdênio, que é um regulador chave da biossíntese de ABA, e quando submetidas ao estresse por déficit osmótico, as plantas transgênicas apresentaram menor murchamento, mantiveram maior teor de água, melhor integridade da membrana celular e acumularam maiores quantidades de ABA. Nos estudos conduzidos por (Li *et al.*, 2013), verificaram que a expressão de ABA3 foi regulada positivamente pelo estresse osmótico, e levou ao aumento da atividade de AA03 (aldeído oxidase) observando um aumento notável na acumulação de ABA. Além disso foi destacado que a superexpressão de ABA3 aumentou a expressão de genes regulados pelo estresse. Já (Tan *et al.*, 2003), demonstrou que o gene NCED2 apresentou altos níveis de expressão em raízes e folhas e baixos níveis durante o desenvolvimento inicial.

Ao examinarmos a via de degradação do ABA, notamos que o gene CYP707A, identificado como H1 na (Figura 6), apresentou uma expressão mais elevada em determinados tecidos, especialmente na raiz e na semente, enquanto evidenciou uma expressão diminuída nos brotos e nas folhas. Outros estudos também evidenciaram

tais resultados, (Kushiro *et al.*, 2004) revelaram que o CYP707A2 foi responsável pela rápida diminuição do nível de ABA durante a embebição das sementes e a expressão desse gene desempenha um papel regulador importante no controle do nível de ABA nas plantas. Em concordância, (Okamoto *et al.*, 2006) relataram que o CYP707A é responsável pela regulação dos níveis de ABA desde a maturação tardia até a germinação. Além disso, esse gene também demonstra estar envolvido no crescimento pós-germinação. Dessa forma, é correto dizer que esses genes exercem papéis distintos e cruciais ao longo do crescimento e desenvolvimento das plantas e em situações desafiadoras, como o estresse osmótico, as plantas respondem com um aumento rápido nos níveis celulares de ácido abscísico, resultante da indução de genes responsáveis pela produção desses compostos.

## **6.2 Perfil de expressão de genes vinculados às vias metabólicas de ABA e de regulação epigenética em genótipos de soja suscetível e tolerante ao déficit osmótico**

O ácido abscísico desempenha um papel crucial como regulador central no controle de diversos aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo que suas funções abrangem desde a maturação embrionária, dormência e germinação de sementes, até a indução floral e o crescimento radicular (Ma *et al.*, 2018). Além disso, o ABA desempenha um papel significativo na mitigação dos efeitos adversos do estresse, especialmente em condições de seca, permitindo que as espécies vegetais se adaptem a ambientes dinâmicos e mantenham processos fisiológicos sob estresse, assim os processos fisiológicos das plantas podem modular a expressão de diversos genes responsivos ao ABA, os quais influenciam diretamente os mecanismos de abertura e fechamento dos estômatos (Ali *et al.*, 2020).

Diante das análises de RNA-seq, para examinar a expressão de raízes e folhas em diferentes níveis de estresse osmótico em genótipos de soja suscetível e tolerante à seca, foram identificados genes vinculados às vias metabólicas de ABA. Nossos resultados indicaram que dentre os principais genes, SDR1, ABA1, CHLH e NCED3, destacaram-se devido aos elevados níveis de expressão. Mas, o gene SDR1 localizado na via de sinalização de ABA que possui expressão mediada por SnRK2, apresentou um perfil de expressão consistentemente alto em comparação com outros genes, em quase todos os tratamentos analisados sob estresse osmótico. Algumas

pesquisas relataram resultados semelhantes, em resposta a sinais ambientais ou de desenvolvimento, o ABA promove a interação de PYR/PYL/RCAR e PP2C, resultando na inibição de PP2C e ativação da expressão SnRK2 (Umezawa *et al.*, 2010). Já nos estudos de Yoshida *et al.*, 2015, evidenciaram que em *Arabidopsis* a expressão de genes mediados por SnRK2D, incluem muitos genes que funcionam em respostas ao estresse osmótico e tolerância durante o crescimento vegetativo. Ainda em *Arabidopsis* (Fujita *et al.*, 2009), demonstraram que SnRK2D funcionam como principais reguladores positivos, e sugerem que a sinalização ABA é controlada pela modulação dupla de SnRK2D e PP2Cs.

Ao analisarmos os dados de RNA-seq para os valores de expressão dos genes reguladores epigenéticos em genótipos de soja suscetível e tolerante à seca, destaca-se que o gene GmMBD10g demonstrou uma expressão mais elevada nos tratamentos sujeitos à deficiência hídrica, além de que as folhas da cultivar tolerante apresentaram um número mais expressivo de genes "up-regulated", indicando que essa cultivar responde de maneira mais ágil ao estresse osmótico em comparação com a cultivar sensível à seca. De acordo com (Jin *et al.*, 2011; Coelho *et al.*, 2022), descreveram que os genes GmMBD mediados por fatores de transcrição, estão envolvidos no desenvolvimento vegetal, regulação do desenvolvimento das flores, germinação de sementes e resposta ao estresse abiótico. Na pesquisa de (Becker, 2003) relata que o gene MADS-box possui fatores de transcrição semelhantes aos genes GmMBD, assim controlando diversos processos de desenvolvimento em plantas com flores, desde a raiz até o desenvolvimento da flor e do fruto. Na pesquisa conduzida por (Coelho *et al.*, 2022), foram analisados o perfil de expressão gênica em RT-qPCR e em dados de RNA-Seq, demonstrando que o gene GmMBD10g apresentou expressão diferencial entre eixo embrionário e folhas de soja em ambas as análises, indicando o tecido foliar como mais expresso, assim corroborando com resultados destacados em nosso estudo.

Esses resultados destacam a importância do ABA e dos genes relacionados nas respostas das plantas ao estresse osmótico. Além de que estudos mais aprofundados sobre as interações entre os genes reguladores epigenéticos e as redes de ABA, mostra-se como relevantes, principalmente para o desenvolvimento de culturas mais resilientes as mudanças climáticas.

### 6.3 Papel da metilação no desenvolvimento de plântulas de soja

Os mecanismos epigenéticos podem ter uma influência significativa na resposta ao estresse abiótico e outros desafios ambientais, e sabe-se que o epigenoma da planta responde rapidamente aos sinais ambientais e às mudanças de desenvolvimento. Um desses mecanismos é a metilação do DNA conhecida por ser uma marca epigenética importante e por regular diversos processos biológicos (Yaish et al., 2011). Nesta pesquisa, as cultivares Embrapa 48 e BR16 tratadas com 5-azaC e submetidas a estresse osmótico demonstraram uma redução no tamanho das plântulas, conforme evidenciado na (Figura 12A), e o número de raízes laterais foi o parâmetro que apresentou o maior impacto fenotípico, como destacado na (Figura 12E).

A 5-azaCitosina, é um análogo do nucleotídeo citosina que é incorporado aleatoriamente em uma fita do DNA recém-sintetizada no lugar da citosina, possuem uma notável capacidade de induzir alterações hereditárias na expressão genética e fenotípica. Neste contexto, (Munsamy *et al.*, 2013) demonstraram que o inibidor de metilação induziu variação epigenética na cana-de-açúcar e após nove meses de crescimento em campo, as plantas exibiram diferenças fenotípicas em comparação com os controles. Assim como (Liu et al., 2022) observaram que o desenvolvimento das plântulas de arroz e o crescimento das raízes foram significativamente prejudicados em decorrência da aplicação de 5-azaC, resultando em um aspecto estiolado tanto no caule quanto nas folhas. Semelhantemente, (Puy *et al.*, 2018) relataram que o tratamento com 5-azaC afetou o desenvolvimento das mudas e prejudicou a formação de um sistema radicular funcional, afetando em última análise o crescimento de toda a planta. De acordo com isso (Kanchanaketu; Hongtrakul, 2015) verificaram que as plantas de *Jatropha curcas L.* quando tratadas com 5-azaC, foram impactadas no crescimento e desenvolvimento, com algumas plantas exibiram anormalidades morfológicas, como caule e redução da altura da planta, e destacaram que o efeito mais grave nas plantas tratadas foi a falha significativa no desenvolvimento das raízes.

As raízes submetidas à ação do 5-azaC apresentaram desempenho inferior em relação aos demais tratamentos, impactando também nas raízes adventícias e quando submetidas ao tratamento com 5-azaC+manitol, observou-se uma leve recuperação nas raízes laterais. Em concordância, os estudos conduzidos por (Sammarco et al., 2022) evidenciaram uma abordagem experimental de desmetilação

em condições naturais, abrangendo uma ampla gama de condições climáticas locais com 5-azaC, observaram uma correlação positiva entre a sobrevivência das plantas e a metilação natural do DNA. Já (Koetle et al., 2022) avaliaram a tolerância à seca de dez epimutantes obtidos *in vitro* através de desmetilação de 5-azaCitidina e subsequente remetilação com imidaclopride, sob estresse osmótico por polietilenoglicol e estresse térmico, destacaram que os epimutantes demonstraram maior tolerância ao estresse osmótico e rápida recuperação pós-estresse.

De acordo com (Luján-soto; Dinkova, 2021), o estágio pós-germinativo é caracterizado pela transferência do produto de armazenamento do endosperma para o eixo do embrião, além da ocorrência de uma segunda fase de absorção de água e crescimento das plântulas. Sabendo que esse processo é relevante para desenvolvimento inicial, sugere-se que o 5-azaC além de atuar no desenvolvimento da radícula e na redução do seu comprimento, o agente desmetilante inibe a metilação do DNA em regiões específicas durante o primeiro estágio de desenvolvimento da planta.

#### **6.4 Análise do impacto do 5-azaC e estresse osmótico na expressão de pigmentos cloroplastidiais em plântulas de soja**

O crescimento normal das plantas é prejudicado pelo estresse osmótico, que perturba as relações hídricas e reduz a eficiência do uso da água, sendo a fotossíntese o primeiro processo afetado por esse estresse, ela se torna essencial para a sobrevivência das plantas (Razi; Muneer, 2021). Em resposta a tais condições adversas, o cloroplasto desempenha um papel crucial, neutralizando os efeitos nocivos do estresse osmótico, atuando como um sensor crítico das mudanças ambientais. Neste contexto, foram analisados os teores de clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b) e carotenoides (CR) de plântulas de soja contratantes à seca, em tratamentos com 5-azaC e sujeitos a estresse osmótico.

Nas cultivares Embrapa 48 e BR16, caracterizadas como tolerante e sensível à seca respectivamente, observou-se, na parte aérea, uma diferença significativa nos teores de clorofila *a* e clorofila *b* quando associados ao tratamento com manitol, indicando que esse estresse osmótico reduz as taxas desses pigmentos. Já ao analisar os teores de carotenoides, o tratamento com manitol apresentou alterações em comparação com o tratamento controle. Quando averiguados essas análises para a

raízes, não foram evidenciadas diferenças significativas em nenhum dos tratamentos, em relação aos pigmentos cloroplastidiais analisados.

Outros pesquisadores encontraram resultados semelhantes em suas pesquisas, (Mohammadkh et al., 2007) descreveram na cultura do milho, que o teor de clorofila a, b e clorofila total diminuíram significativamente, mas o teor de carotenóides aumentou sob estresse osmótico. Em concordância, (Wang et al., 2020) demonstraram em leguminosas que as concentrações de clorofila a e clorofila b diminuíram com o desenvolvimento das paredes das vagens, e o estresse osmótico impediu a síntese de pigmentos cloroplastidiais, assim como a absorção de luz é limitada devido à supressão da síntese de proteínas de ligação à clorofila a/b pelo estresse osmótico. Em contrapartida, o estresse osmótico aumentou os teores de clorofila e carotenoides em *Populus alba* (Gao et al., 2017).

### **6.5 Efeito do 5-azaC e do estresse osmótico na expressão de genes envolvidos na regulação de ABA em plântulas de soja**

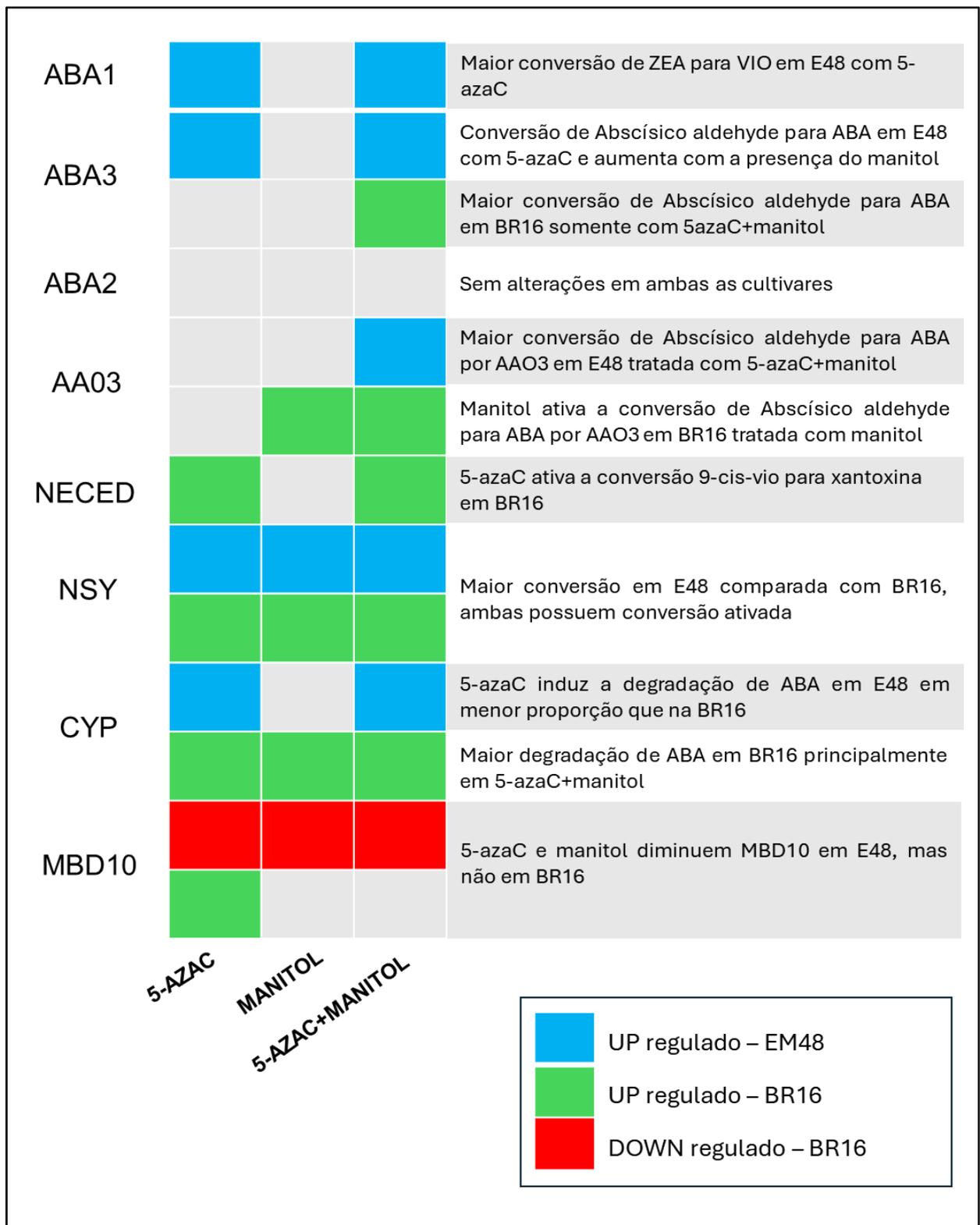
Um elemento essencial para que as plantas se adaptem aos desafios apresentados pelas condições de estresse e para enfrentarem as transformações ambientais consiste na habilidade de ajustar de forma precisa a expressão genética em resposta a essas alterações (Petrillo et al., 2014). Dessa forma, a análise dos perfis de expressão dos genes relacionados à regulação das vias metabólicas de ABA e à modulação epigenética proporcionou uma visão abrangente das respostas das cultivares Embrapa 48 e BR16 ao estresse osmótico induzido por manitol, com e sem tratamento com 5-azaC.

Diante da análise da expressão dos genes ABA1 e ABA3 em Embrapa 48 quando submetidas aos tratamentos com inibidor de metilação foi evidenciado um aumento significativo de expressão. Para a cultivar BR16 os genes NCED, NSY e CYP707A evidenciaram um aumento significativo em sua expressão nas raízes quando submetidas aos tratamentos com inibidor de metilação. Esse fenômeno sugere uma interação complexa entre os processos de regulação genética e resposta ao estresse, indicando que a modulação epigenética desempenha um papel específico na regulação desses genes. Por outro lado, ao explorar a expressão dos genes ABA2 e AA03 nos mesmos tratamentos, observou-se um aumento significativo na expressão desses genes nas raízes de ambas as cultivares em resposta ao agente de estresse osmótico.

Esse achado ressalta a influência direta do estresse ambiental na ativação desses genes relacionados à síntese de ácido abscísico.

Considerando o cenário de expressão gênica nos estresses abióticos, Barrero et al., 2006 evidenciaram em *Arabidopsis*, que a clivagem do 9-cis-epoxicarotenoide é o principal ponto regulatório na biossíntese de ABA induzida por NaCl e a significativa indução de NCED3 por NaCl foi observada mesmo em mutantes com deficiência severa de ABA, indicando uma via de indução independente de ABA para o NCED3, a qual é sensível à presença de NaCl. Assim, na ausência do feedback positivo mediado por ABA a via independente dela desempenha um papel relevante na indução dos principais genes, tais como NCED3, AAO3 e ABA1. Também analisado em *Arabidopsis*, (Wan; Li, 2006) indicam que a expressão constitutiva do gene NCED de tipo selvagem resulta num aumento da acumulação de ABA em plantas transgênicas em resposta ao stress osmótico, assim sugerindo que a expressão desse gene desempenha um papel importante na regulação do nível de ABA durante o estresse osmótico e a tolerância a esse estresse pode acarretar o acúmulo de ABA endógeno na planta. Por fim, Seo et al., 2004 destacaram que em estudos comparativos sobre a família de genes da (aldeído oxidase) AA03 de *Arabidopsis* desempenharam um papel importante na biossíntese de ABA em sementes de bem como em folhas dessa espécie.

A análise do perfil de expressão do gene GmMBD10g revela diferenças marcantes entre as cultivares Embrapa 48 e BR16. Na cultivar Embrapa 48, a expressão deste gene foi consistentemente menor nos tratamentos com 5-azaC e manitol, enquanto na cultivar BR16, foi observada expressão aumentada no tratamento com 5-azaC em comparação com o tratamento controle. No estudo anterior realizado por Coelho et al., 2022, sobre a evolução e conservação da família de proteínas de ligação a metil-CpG (MBD) em plantas, mostrou que o gene GmMBD10g foi expresso em quase todos os tecidos, exceto no hipocótilo e na germinação do embrião. Interessantemente, este gene responde de forma oposta ao tratamento de 5-azaC em E48 comparada com BR16 (Figura 20H) e parece ser influenciado também pelo manitol. Essas descobertas destacam a variabilidade na regulação da expressão deste gene em diferentes cultivares e em resposta a diferentes tratamentos. Mais estudos serão necessários para desvendar as diferenças no status epigenético entre E48 e BR16.



**Figura 21: Correlação da expressão de genes envolvidos na conversão de compostos para síntese de ABA.** Indicando em azul para “up regulado em EM48” e verde para “up regulado em BR16”.

De acordo com (Figura 21), existem correlações entre a expressão de genes e a conversão de compostos para a síntese do ácido abscísico. O gene ABA1 demonstrou uma significativa conversão de zeaxantina para violaxantina em plantas Embrapa 48 quando tratadas com 5-azaC. Já o gene ABA3 evidenciou uma notável

conversão de aldeído abscísico para ABA em plantas Embrapa 48, também sob a influência de 5-azaC, e essa conversão foi ampliada na presença de manitol. Similarmente, observou-se uma maior conversão de aldeído abscísico para ABA em plantas BR16 quando tratadas apenas com 5-azaC e manitol. O gene AA03 indicou uma maior conversão de aldeído abscísico para ABA por AA03 em plantas Embrapa 48 tratadas com 5-azaC e manitol, enquanto o manitol parece ativar essa conversão em plantas BR16 também tratadas com manitol. Por outro lado, o gene NCED demonstrou que o 5-azaC ativa a conversão de 9-cis-violaxantina para xantoxina em plantas BR16. O gene NSY apresentou uma conversão maior em plantas Embrapa 48 em comparação com as BR16, embora em ambas tenha sido observada ativação da conversão. Em relação ao gene CYP707A, observou-se que o 5-azaC induz a degradação do ABA em plantas Embrapa 48 em uma proporção menor do que em BR16, sendo que a degradação foi mais pronunciada em BR16, especialmente na presença de 5-azaC e manitol. Por fim, o gene MBD10 indicou que tanto o 5-azaC quanto o manitol diminuem a expressão de MBD10 em plantas Embrapa 48, mas não em BR16. Esses resultados apontam para uma interação complexa entre os genes relacionados à síntese e degradação de ABA, influenciados por diferentes condições ambientais e tratamentos.

Alguns estudos relataram que os genes envolvidos na biossíntese desse fitohormônio, como ABA1, ABA3 e AA03 se mostraram induzidas pelo estresse, assim como em nossos resultados (Figura 21). No estudo conduzido por (Seo *et al.*, 2000) em folhas de *Arabidopsis*, quando as folhas da roseta foram destacadas e expostas à desidratação, a expressão do mRNA de AA03 aumentou rapidamente dentro de 3 horas após o tratamento, sugerindo que o produto do gene AA03, atua como um aldeído oxidase abscísico em folhas de roseta de *Arabidopsis*. Na pesquisa realizada por (Li *et al.*, 2013) foi constatado que a expressão do gene ABA3 foi positivamente regulada em resposta ao estresse osmótico, resultando em um aumento na atividade da enzima AA03 o que levou a um aumento significativo na acumulação de ácido abscísico. Assim como, (Xiong *et al.*, 2001) demonstraram em sua pesquisa, que o gene ABA3 é expresso de forma onipresente em diferentes partes da planta, e o nível de expressão aumenta em resposta à seca, sendo regulador chave da biossíntese de ABA e da expressão genética responsiva tolerância ao estresse.

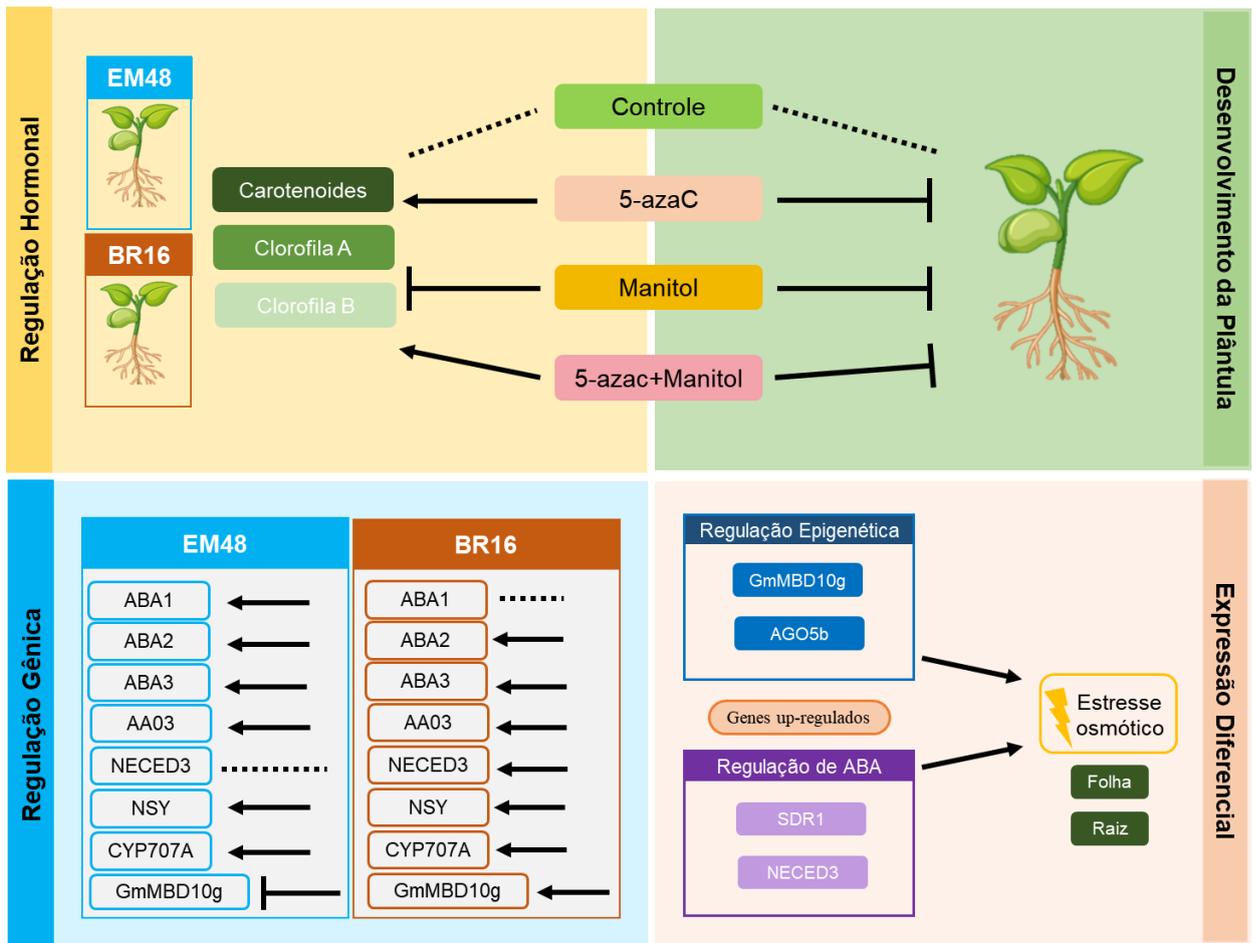
O gene ABA2 não demonstrou correlação de expressão entre as duas

cultivares em resposta aos diferentes tratamentos (Figura 21). Essa observação já havia sido mencionada anteriormente, quando o padrão de expressão de ABA2 se assemelhou aos resultados de outros estudos. Isso ocorre porque a enzima codificada por ABA2 é expressa constitutivamente e não é induzida por condições de estresse osmótico (González-Guzmán *et al.*, 2002).

Segundo (Priest *et al.*, 2006) quando os níveis de ABA aumentam, a enzima 9-neoxantina cis-epoxicarotenóide dioxigenase (NCED) é ativada, promovendo a conversão de 9-neoxantina em xantoxina. Em contrapartida, para degradar o ABA, ele é quebrado em 8'-OH-ABA pela enzima ABA 8'-hidroxilase (CYP707A), que então é transformado espontaneamente em ácido fásico (PA) e, em seguida, em ácido desidrofásico (DPA). Em nossos resultados (Figura 21), observamos que o tratamento com 5-azaC induziu a biossíntese e conversão de 9-cis-vio para xantoxina no gene NCED da cultivar BR16. Além disso, constatamos que houve maior degradação de ABA nos tratamentos com 5-azaC+manitol em BR16 em comparação com a cultivar Embrapa 48, conforme observado no gene CYP707A. Na mesma perspectiva (Zandalinas *et al.*, 2016) também corroboram essas descobertas, quando analisaram a tolerância das plantas cítricas em relação à modulação nos níveis de ácido abscísico e encontraram um acúmulo maior de ABA em plantas sob estresse osmótico. Eles observaram que a regulação positiva de CYP707A foi responsável pela inibição do acúmulo de ABA durante os estresses, o que está em concordância com nossos resultados, onde também observamos uma correlação positiva entre a regulação de CYP707A e a degradação de ABA.

## 7. CONCLUSÃO

Nesta pesquisa, foram analisados 66 genes efetores epigenéticos e 68 genes relacionados às vias metabólicas do ABA. A avaliação da ação da metilação do DNA em plântulas de soja revelou que o inibidor da metilação do DNA, 5-azaC, teve um impacto significativo no desenvolvimento dessas plântulas, especialmente nas raízes de ambas as cultivares estudadas. As raízes submetidas à ação do 5-azaC mostraram um desempenho inferior em comparação com os demais tratamentos, afetando também o crescimento das raízes laterais, embora tenha sido observada uma leve recuperação quando tratadas com 5-azaC+manitol. As plântulas de soja apresentaram diferenças significativas nos níveis cloroplastidiais entre os tratamentos, com destaque para o aumento dos níveis de clorofila A e B em E48 tratada com 5-azaC+manitol. Em Embrapa 48 foi observado que o 5-azaC induziu a expressão de genes relacionados a conversão de compostos para formação de ABA, principalmente no tratamento 5-azaC+manitol. Em geral, a indução da conversão em alguma etapa da via de biossíntese de ABA na BR16 está mais relacionada à presença do manitol. Além disso, foi observado que a degradação de ABA parece estar mais ativa na BR16 comparada com E48 em todos os tratamentos, mais principalmente em 5-azaC+manitol. Esses resultados contribuem para uma melhor compreensão do papel da metilação do DNA na regulação das vias metabólicas do ABA em resposta ao estresse osmótico durante o desenvolvimento de plântulas de soja.



**Figura 22: Principais alterações biológicas em plântulas de soja com 8 dias em resposta ao 5-azaC e estresse osmótico. Seta tracejada – sem alterações; seta preta contínua – aumento; Seta preta com barra – inibição;**

## **8. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Com base nas análises realizadas, este estudo oferece contribuições significativas para o avanço do conhecimento sobre como a soja responde aos estresses abióticos, especialmente ao déficit osmótico, um desafio cada vez mais relevante diante das mudanças climáticas. Os resultados obtidos revelaram variações significativas na expressão dos genes do ABA em diferentes tecidos da soja, destacando genes específicos que desempenham papéis-chave na resposta a esse estresse osmótico. Adicionalmente, o estudo proporciona uma visão abrangente da influência da metilação do DNA em plântulas de soja, indicando que a redução dessa metilação pode afetar a fisiologia dessas plântulas, resultando em alterações nos níveis cloroplastidiais quando submetidas a estresse osmótico. As próximas etapas deste trabalho incluirão a quantificação dos teores de ABA em plântulas de soja tratadas com 5-azaC e expostas ao estresse osmótico, bem como a avaliação do papel da metilação do DNA em relação ao estado de memória epi-alélica em cultivares de soja com diferentes níveis de tolerância à seca sob estresses abióticos. Essas descobertas abrem novas oportunidades para avanços significativos no desenvolvimento de estratégias destinadas a aumentar a resistência da soja aos estresses abióticos, proporcionando assim importantes contribuições para enfrentar os desafios agrícolas impostos pelas mudanças climáticas.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AASAMAA, K.; SÖBER, A. Stomatal sensitivities to changes in leaf water potential, air humidity, CO<sub>2</sub> concentration and light intensity, and the effect of abscisic acid on the sensitivities in six temperate deciduous tree species. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, n. 1, p. 72–78, abr. 2011.
- AGARWAL, G. et al. Epigenetics and epigenomics: underlying mechanisms, relevance, and implications in crop improvement. **Functional & Integrative Genomics**, v. 20, n. 6, p. 739–761, 21 nov. 2020.
- ALI, S. et al. Implications of Abscisic Acid in the Drought Stress Tolerance of Plants. **Agronomy**, v. 10, n. 9, p. 1323, 4 set. 2020.
- ALMEIDA, L. F. R. DE. **Respostas fisiológicas e estruturais em plantas submetidas a estresse hídrico recorrente em diferentes condições de luz**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2018.
- ALPINO, T. DE M. A. et al. Os impactos das mudanças climáticas na Segurança Alimentar e Nutricional: uma revisão da literatura. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 27, n. 1, p. 273–286, jan. 2022.
- BECKER, A. The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 29, n. 3, p. 464–489, dez. 2003.
- BENNETT, M.; CLEAVES, K.; HEWEZI, T. Expression Patterns of DNA Methylation and Demethylation Genes during Plant Development and in Response to Phytohormones. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 18, p. 9681, 7 set. 2021.
- BOND, D. M.; FINNEGAN, E. J. Passing the message on: inheritance of epigenetic traits. **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 5, p. 211–216, maio 2007.
- BRAY, E. A. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 407, p. 2331–2341, 10 set. 2004.
- CAMPOS, A. J. DE M.; SANTOS, S. M.; NACARATH, I. R. F. F. Estresse hídrico em plantas: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, p. e311101523155, 19 nov. 2021.
- CHEN, Q. et al. Research of total levels on DNA methylation in plant based on HPLC analysis. **American Journal of Molecular Biology**, v. 03, n. 02, p. 98–101, 2013.
- CHENG, W.-H. et al. A Unique Short-Chain Dehydrogenase/Reductase in *Arabidopsis* Glucose Signaling and Abscisic Acid Biosynthesis and Functions. **The Plant Cell**, v. 14, n. 11, p. 2723–2743, nov. 2002.
- CHINNUSAMY, V.; ZHU, J.-K. Epigenetic regulation of stress responses in plants. **Current**

**Opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 2, p. 133–139, abr. 2009.

CHRISTMAN, J. K. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. **Oncogene**, v. 21, n. 35, p. 5483–5495, 12 ago. 2002.

COELHO, F. S. et al. Methyl-CpG binding proteins (MBD) family evolution and conservation in plants. **Gene**, v. 824, p. 146404, maio 2022.

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos. **COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO**, v. 10, n. 11, 2023.

DALL'AGNOL, A.; LAZAROTTO, J. J.; HIRAKURI, M. H. **Desenvolvimento, Mercado e Rentabilidade da Soja Brasileira**. Londrina, PR: [s.n.].

DONG, T. et al. Abscisic Acid Uridine Diphosphate Glucosyltransferases Play a Crucial Role in Abscisic Acid Homeostasis in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 165, n. 1, p. 277–289, maio 2014.

DONG, T.; PARK, Y.; HWANG, I. Abscisic acid: biosynthesis, inactivation, homeostasis and signalling. **Essays in Biochemistry**, v. 58, p. 29–48, 15 set. 2015.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11–15, 1987.

EGGELS, S. et al. Assay for abscisic acid 8'-hydroxylase activity of cloned plant cytochrome P450 oxidases in *Saccharomyces cerevisiae*. **Analytical Biochemistry**, v. 553, p. 24–27, jul. 2018.

EPELAND, E. K.; KETTENRING, K. M. Strategic plant choices can alleviate climate change impacts: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 222, p. 316–324, set. 2018.

FAOSTAT. Disponível online: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>. 2017.

FAVARETTO, V. F. et al. Differential responses of antioxidant enzymes in pioneer and late-successional tropical tree species grown under sun and shade conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 70, n. 1, p. 20–28, jan. 2011.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. Stages of soybean development. **Iowa State University of Science and Technology**, p. 11, 1977.

FERGUSON, B. J.; GRESSHOFF, P. M. Soybean as a model legume. **Grain Legumes**, v. 53, p. 7, 2009.

FERRARI, E.; PAZ, A.; SILVA, A. C. Déficit Hídrico no Metabolismo da Soja em Semeaduras Antecipadas no Mato Grosso. **Nativa**, v. 3, n. 1, p. 67–77, 26 mar. 2015.

FRANCO, M. Epigenética no melhoramento genético e reprodução animal. **Arquivos Latino-Americanos de Produção Animal**, v. 25, n. 1–2, 2017.

- FUJITA, Y. et al. Three SnRK2 Protein Kinases are the Main Positive Regulators of Abscisic Acid Signaling in Response to Water Stress in Arabidopsis. **Plant and Cell Physiology**, v. 50, n. 12, p. 2123–2132, dez. 2009.
- GAO, F. et al. Water stress mitigates the negative effects of ozone on photosynthesis and biomass in poplar plants. **Environmental Pollution**, v. 230, p. 268–279, nov. 2017.
- GONZÁLEZ-GUZMÁN, M. et al. The Short-Chain Alcohol Dehydrogenase ABA2 Catalyzes the Conversion of Xanthoxin to Abscisic Aldehyde[W]. **The Plant Cell**, v. 14, n. 8, p. 1833–1846, 1 ago. 2002.
- GRATIVOL, C.; HEMERLY, A. S.; FERREIRA, P. C. G. Genetic and epigenetic regulation of stress responses in natural plant populations. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1819, n. 2, p. 176–185, fev. 2012.
- HAO, Q. et al. The Molecular Basis of ABA-Independent Inhibition of PP2Cs by a Subclass of PYL Proteins. **Molecular Cell**, v. 42, n. 5, p. 662–672, jun. 2011.
- HE, X.-J.; CHEN, T.; ZHU, J.-K. Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. **Cell Research**, v. 21, n. 3, p. 442–465, 15 mar. 2011.
- HYMOWITZ, T. On the domestication of the soybean. **Economic Botany**, v. 24, n. 4, p. 408–421, out. 1970.
- IBGE. Valor da produção: por grande região, Estado destaque e Município destaque. **Produção agrícola mundial**, 2022.
- JIN, Y. et al. An AT-hook gene is required for palea formation and floral organ number control in rice. **Developmental Biology**, v. 359, n. 2, p. 277–288, nov. 2011.
- KANCHANAKETU, T.; HONGTRAKUL, V. Treatment of 5-Azacytidine as DNA Demethylating Agent in *Jatropha curcas* L. **Agriculture and Natural Resources**, v. 49, n. 4, p. 524–535, 2015.
- KIM, K. DO et al. A Comparative Epigenomic Analysis of Polyploidy-Derived Genes in Soybean and Common Bean. **Plant Physiology**, v. 168, n. 4, p. 1433–1447, ago. 2015.
- KOETLE, M. J.; SNYMAN, S. J.; RUTHERFORD, R. S. Ex vitro Morpho-Physiological Screening of Drought Tolerant Sugarcane Epimutants Generated Via 5-Azacytidine and Imidacloprid Treatments. **Tropical Plant Biology**, v. 15, n. 4, p. 288–300, 10 dez. 2022.
- KOETLE, M. J.; SNYMAN, S. J.; RUTHERFORD, R. S. Rapid identification of drought tolerant sugarcane epimutants via in vitro chimera dissolution and near infrared screening ex vitro. **Plant Stress**, v. 9, p. 100200, set. 2023.
- KOTHARI, K. et al. Are soybean models ready for climate change food impact assessments? **European Journal of Agronomy**, v. 135, p. 126482, abr. 2022.
- KUMAR, M.; RANI, K. Epigenomics in stress tolerance of plants under the climate change. **Molecular Biology Reports**, v. 50, n. 7, p. 6201–6216, 9 jul. 2023.

- KUROMORI, T.; SEO, M.; SHINOZAKI, K. ABA Transport and Plant Water Stress Responses. **Trends in Plant Science**, v. 23, n. 6, p. 513–522, jun. 2018.
- KUSHIRO, T. et al. The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. **The EMBO Journal**, v. 23, n. 7, p. 1647–1656, 7 abr. 2004.
- LI, D. et al. Comparative analysis of the gene expression profile under two cultivation methods reveals the critical role of ABA in grape quality promotion. **Scientia Horticulturae**, v. 281, p. 109924, abr. 2021.
- LI, Y. et al. Expression of an *<scp>A</scp>* *rabidopsis* molybdenum cofactor sulphurase gene in soybean enhances drought tolerance and increases yield under field conditions. **Plant Biotechnology Journal**, v. 11, n. 6, p. 747–758, 13 ago. 2013.
- LIU, S. et al. The Methylation Inhibitor 5-Aza-2'-Deoxycytidine Induces Genome-Wide Hypomethylation in Rice. **Rice**, v. 15, n. 1, p. 35, 2 dez. 2022.
- LUJÁN-SOTO, E.; DINKOVA, T. D. Time to Wake Up: Epigenetic and Small-RNA-Mediated Regulation during Seed Germination. **Plants**, v. 10, n. 2, p. 236, 26 jan. 2021.
- LUKENS, L. N.; ZHAN, S. The plant genome's methylation status and response to stress: implications for plant improvement. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, n. 3, p. 317–322, jun. 2007.
- MA, Y. et al. Molecular Mechanism for the Regulation of ABA Homeostasis During Plant Development and Stress Responses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, p. 3643, 19 nov. 2018.
- MACHADO, F. B. et al. Systematic analysis of 1298 RNA-Seq samples and construction of a comprehensive soybean (*Glycine max*) expression atlas. **The Plant Journal**, v. 103, n. 5, p. 1894–1909, 13 ago. 2020.
- MARTÍNEZ-ANDÚJAR, C. et al. Induction of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase in *Arabidopsis thaliana* seeds enhances seed dormancy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 41, p. 17225–17229, 11 out. 2011.
- MATZKE, M. A.; KANNO, T.; MATZKE, A. J. M. RNA-Directed DNA Methylation: The Evolution of a Complex Epigenetic Pathway in Flowering Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 66, n. 1, p. 243–267, 29 abr. 2015.
- MEISTER, G.; TUSCHL, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 343–349, 15 set. 2004.
- MOHAMMADKH, N.; . R. H. Effects of Water Stress on Respiration, Photosynthetic Pigments and Water Content in Two Maize Cultivars. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 22, p. 4022–4028, 1 nov. 2007.
- MÜLLER, L.; MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. A soja no Brasil. **Instituto de Tecnologia de Alimentos**, p. 65–104, 1981.

- MUNSAMY, A. et al. 5-Azacytidine as a tool to induce somaclonal variants with useful traits in sugarcane (*Saccharum* spp.). **Plant Biotechnology Reports**, v. 7, n. 4, p. 489–502, 18 out. 2013.
- NELSON, G. C. et al. Agriculture and climate change in global scenarios: why don't the models agree. **Agricultural Economics**, v. 45, n. 1, p. 85–101, jan. 2014.
- OKAMOTO, M. et al. CYP707A1 and CYP707A2, Which Encode Abscisic Acid 8'-Hydroxylases, Are Indispensable for Proper Control of Seed Dormancy and Germination in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 141, n. 1, p. 97–107, 1 maio 2006.
- ONU. Transformando nosso mundo: a agenda 2030 para o desenvolvimento sustentável. **Organização das Nações Unidas (ONU)**, 2015.
- OYA, T. et al. Drought Tolerance Characteristics of Brazilian Soybean Cultivars— Evaluation and characterization of drought tolerance of various Brazilian soybean cultivars in the field —. **Plant Production Science**, v. 7, n. 2, p. 129–137, 3 jan. 2004.
- PAPACEK, M.; CHRISTMANN, A.; GRILL, E. Interaction network of <sc>ABA</sc> receptors in grey poplar. **The Plant Journal**, v. 92, n. 2, p. 199–210, 4 out. 2017.
- PETRILLO, E. et al. Let there be light: Regulation of gene expression in plants. **RNA Biology**, v. 11, n. 10, p. 1215–1220, 3 out. 2014.
- PRIEST, D. M. et al. Use of the glucosyltransferase UGT71B6 to disturb abscisic acid homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 46, n. 3, p. 492–502, 30 maio 2006.
- PUY, J. et al. Improved demethylation in ecological epigenetic experiments: Testing a simple and harmless foliar demethylation application. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 9, n. 3, p. 744–753, 16 mar. 2018.
- RAZA, A. et al. Impact of Climate Change on Crops Adaptation and Strategies to Tackle Its Outcome: A Review. **Plants**, v. 8, n. 2, p. 34, 30 jan. 2019.
- RAZI, K.; MUNEER, S. Drought stress-induced physiological mechanisms, signaling pathways and molecular response of chloroplasts in common vegetable crops. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 41, n. 5, p. 669–691, 4 jul. 2021.
- REIS, R. R. et al. Differential gene expression in response to water deficit in leaf and root tissues of soybean genotypes with contrasting tolerance profiles. **Genetics and Molecular Biology**, v. 43, n. 2, 2020.
- SALLAM, N.; MOUSSA, M. DNA methylation changes stimulated by drought stress in ABA-deficient maize mutant vp10. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 160, p. 218–224, mar. 2021.
- SAMMARCO, I.; MÜNZBERGOVÁ, Z.; LATZEL, V. DNA Methylation Can Mediate Local Adaptation and Response to Climate Change in the Clonal Plant *Fragaria vesca*: Evidence From a European-Scale Reciprocal Transplant Experiment. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 28 fev.

2022.

SCHMUTZ, J. et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. **Nature**, v. 463, n. 7278, p. 178–183, jan. 2010.

SEDIYAMA, T. et al. Botânica, descrição da planta e cruzamentos artificia. p. 5–6, 1985.

SEO, M. et al. Abscisic aldehyde oxidase in leaves of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 23, n. 4, p. 481–488, 25 ago. 2000.

TAN, B. et al. Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9 -*cis* epoxycarotenoid dioxygenase gene family. **The Plant Journal**, v. 35, n. 1, p. 44–56, 30 jul. 2003.

TKEMALADZE, G. S.; MAKHASHVILI, K. A. Climate changes and photosynthesis. **Annals of Agrarian Science**, v. 14, n. 2, p. 119–126, jun. 2016.

TONELLO, K. C.; TEIXEIRA FILHO, J. ECOFISIOLOGIA DE TRÊS ESPÉCIES ARBÓREAS NATIVAS DA MATA ATLÂNTICA DO BRASIL EM DIFERENTES REGIMES DE ÁGUA. **IRRIGA**, v. 17, n. 1, p. 85, 16 abr. 2012.

UMEZAWA, T. et al. Molecular Basis of the Core Regulatory Network in ABA Responses: Sensing, Signaling and Transport. **Plant and Cell Physiology**, v. 51, n. 11, p. 1821–1839, 1 nov. 2010.

VENDRAMIN, S. et al. Epigenetic Regulation of ABA-Induced Transcriptional Responses in Maize. **G3 Genes|Genomes|Genetics**, v. 10, n. 5, p. 1727–1743, 1 maio 2020.

VERNETTI, F. J.; JUNIOR, F. J. V. Genética da soja: caracteres quantitativos e diversidade genética. **Embrapa Informação Tecnológica**, p. 221, 2009.

WANG, H.; ZHOU, Q.; MAO, P. Ultrastructural and Photosynthetic Responses of Pod Walls in Alfalfa to Drought Stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 12, p. 4457, 23 jun. 2020.

XIONG, L. et al. The *Arabidopsis* *LOS5/ABA3* Locus Encodes a Molybdenum Cofactor Sulfurase and Modulates Cold Stress– and Osmotic Stress–Responsive Gene Expression. **The Plant Cell**, v. 13, n. 9, p. 2063–2083, set. 2001.

XIONG, L.; SCHUMAKER, K. S.; ZHU, J.-K. Cell Signaling during Cold, Drought, and Salt Stress. **The Plant Cell**, v. 14, n. suppl 1, p. S165–S183, maio 2002.

XU, J. et al. Dynamic changes in methylome and transcriptome patterns in response to methyltransferase inhibitor 5-azacytidine treatment in citrus. **DNA Research**, v. 24, n. 5, p. 509–522, 1 out. 2017.

YAISH, M. W.; COLASANTI, J.; ROTHSTEIN, S. J. The role of epigenetic processes in controlling flowering time in plants exposed to stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 11, p. 3727–3735, 1 jul. 2011.

YOSHIDA, T. et al. Four *A* *rabidopsis* AREB / ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of SnRK2 kinases in abscisic acid signalling in response to osmotic stress. **Plant, Cell & Environment**, v. 38, n. 1, p. 35–49, 22 jan. 2015.

YUE, Y. et al. Arabidopsis LOS5/ABA3 overexpression in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc) results in enhanced drought tolerance. **Plant Science**, v. 181, n. 4, p. 405–411, out. 2011.

ZANDALINAS, S. I. et al. Tolerance of citrus plants to the combination of high temperatures and drought is associated to the increase in transpiration modulated by a reduction in abscisic acid levels. **BMC Plant Biology**, v. 16, n. 1, p. 105, 27 dez. 2016.

ZANDALINAS, S. I. et al. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. **Physiologia Plantarum**, v. 162, n. 1, p. 2–12, 22 jan. 2018.

ZARGAR, S. M. et al. Impact of drought on photosynthesis: Molecular perspective. **Plant Gene**, v. 11, p. 154–159, set. 2017.

ZHANG, H.; LANG, Z.; ZHU, J.-K. Dynamics and function of DNA methylation in plants. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 8, p. 489–506, 21 ago. 2018.

## 10. APÊNDICE

**Tabela suplementar 1:** Genes envolvidos com a regulação epigenética por modificação no DNA, modificação em histonas e silenciamento por RNA.

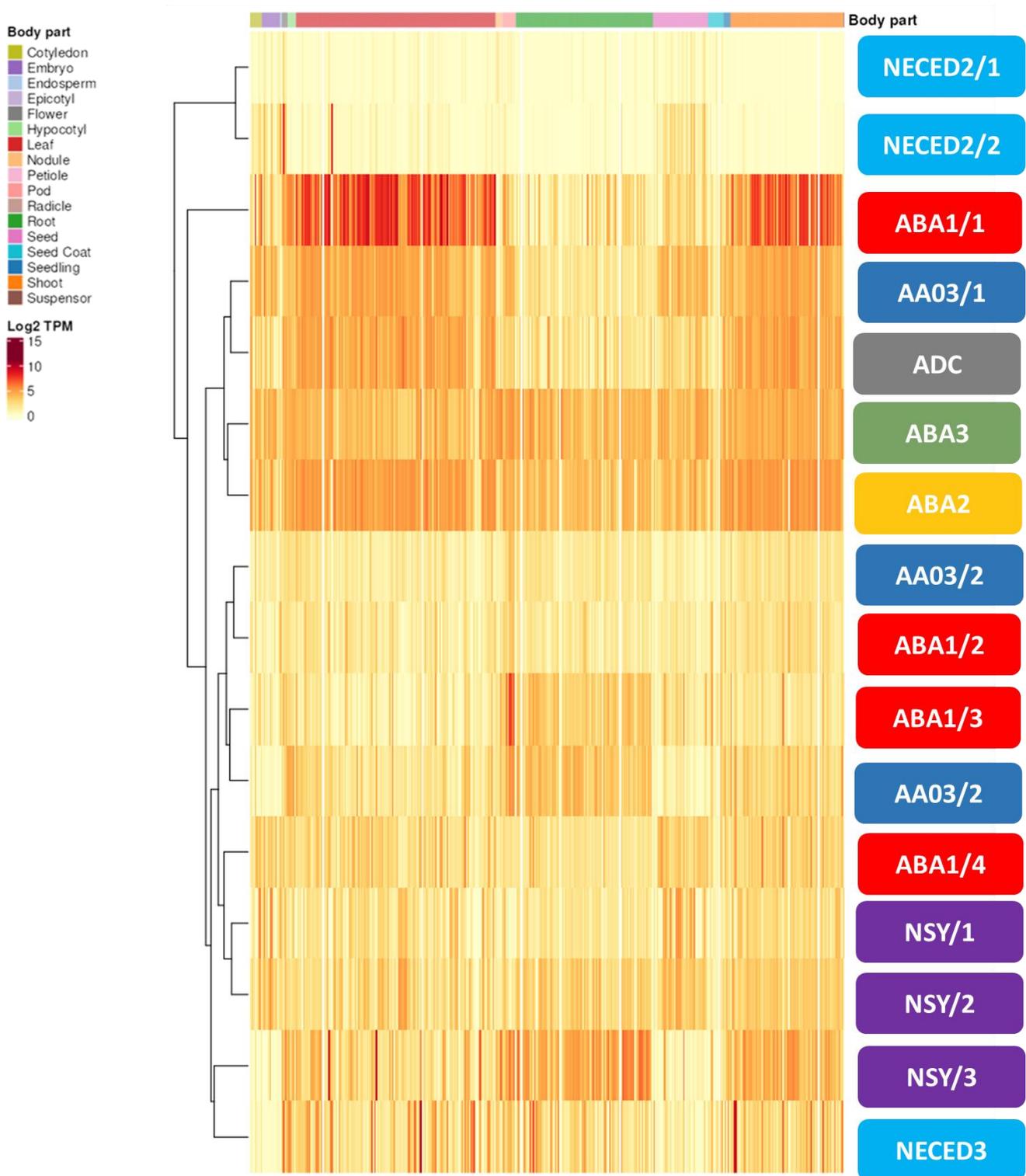
Gene ID old	Gene ID	Gene name
Glyma01g01120	Glyma.01G007800	CMT3
Glyma01g36500	Glyma.01G160300	CMT1a
Glyma11g08861	Glyma.11G083600	CMT1b
Glyma16g17720	Glyma.16G103500	CMT2
Glyma10g34595	Glyma.10G202200	DME
Glyma09g09381	Glyma.09G079800	
Glyma03g34860	Glyma.03G190800	
Glyma10g34595	Glyma.10G202200	DML1/2/3
Glyma10g07601	Glyma.10G065900	DML1/2/3
Glyma13g21460	Glyma.13G151000	DML1/2/3
Glyma19g37561	Glyma.19G191300	DML1/2, ROS1
Glyma20g32960	Glyma.20G188300	DML1/2/3
Glyma08g18955	Glyma.08G177800	DNMT2a
Glyma15g06040	Glyma.15G054900	DNMT2b
Glyma02g04060	Glyma.02G035700	DRM1a
Glyma05g08740	Glyma.05G005600	DRM2a
Glyma07g36081	Glyma.07G233200	DRM2b
Glyma17g04254	Glyma.17G038300	DRM2c
Glyma19g00250	Glyma.19G006100	DRM1b
Glyma01g00520	Glyma.01G002200	GmMBD2a
Glyma02g16930	Glyma.02G150300	GmMBD4a
Glyma04g10976	Glyma.04G101200	GmMBD8a
Glyma04g23780	Glyma.04G154300	GmMBD10a
Glyma04g23980	Glyma.04G154500	GmMBD10b
Glyma05g38075	Glyma.05G205100	GmMBD13a
Glyma06g10800	Glyma.06G102900	GmMBD8b
Glyma06g25310	Glyma.06G217500	GmMBD10c
Glyma06g30350	Glyma.06G224300	GmMBD10d
Glyma06g30590	Glyma.06G224700	GmMBD10e
Glyma07g13260	Glyma.07G118700	GmMBD7a
Glyma07g15620	Glyma.07G130300	GmMBD2b
Glyma08g01500	Glyma.08G012000	GmMBD13b
Glyma10g02860	Glyma.10G023600	GmMBD4b
Glyma11g02765	Glyma.11G025500	GmMBD13c
Glyma13g23910	Glyma.13G170000	GmMBD9a

Glyma13g40850	Glyma.13G333300	GmMBD7b
Glyma13g44230	Glyma.13G365500	GmMBD10f
Glyma15g01040	Glyma.15G007700	GmMBD10g
Glyma16g31908	Glyma.16G194400	GmMBD13d
Glyma19g01310	Glyma.19G010200	GmMBD9b
Glyma04g36150	Glyma.04G187600	MET1a
Glyma06g18790	Glyma.06G178200	MET1b
Glyma03g23260	Glyma.03G094200	LHP1
Glyma03g26285	Glyma.03G111600	LHP1
Glyma04g00340	Glyma.04G002100	LHP1
Glyma06g00400	Glyma.06G001700	LHP1
Glyma16g08860	Glyma.16G079900	LHP1
Glyma18g02720	Glyma.18G023900	CLSY 38
Glyma08g45333	Glyma.08G339800	CHR31
Glyma08g4534	Glyma.08G339900	CHR31
Glyma09g36380	Glyma.09G229400	CHR31
Glyma12g00951	Glyma.12G006900	CHR31
Glyma02g42980	Glyma.02G261800	CHR42
Glyma12g31380	Glyma.12G188200	HDA08/HDA8
Glyma14g25215	Glyma.14G157100	HDA1/HDA19/histone deacetylase 1
Glyma11g00220	Glyma.11G000300	HDA1/HDA19/histone deacetylase 1
Glyma0006s50	Glyma.06G000100	HDA1/HDA19/histone deacetylase 1
Glyma13g06010	Glyma.04G000200	HDA1/HDA19/histone deacetylase 1
Glyma11g19290	Glyma.11G187800	HDA09/HDA9
Glyma12g09190	Glyma.12G086700	HDA09/HDA9
Glyma05g32600	Glyma.05G192600	ATHDA14/HDA14
Glyma12g09000	Glyma.12G084700	HD2C/HDT3/
Glyma12g30600	Glyma.12G181400	HD2C/HDT3/
Glyma17g05340	Glyma.13G319500	HD2C/HDT3/
Glyma19g37540	Glyma.19G191000	HD2C/HDT3/
Glyma03g34850	Glyma.03G190700	HD2C/HDT3/
Glyma11g19480	Glyma.11G189500	ATHD2B,HD2,HD2B,HDA4,HDT02,HDT2
Glyma17g34770	Glyma.17G229600	HDA2
Glyma05g00460	Glyma.05G021400	ATHDA5,HDA05,HDA5
Glyma17g08581	Glyma.17G078000	ATHDA5,HDA05,HDA5
Glyma05g02540	Glyma.05G040600	ATHDA6/HDA6/
	Glyma.06G178700	ATHDA6/HDA6/
Glyma17g09320	Glyma.17G085700	ATHDA6/HDA6/
Glyma13g25640	Glyma.13G186800	SUVH3/SU(VAR)3-9 homolog 3/H3K9 methyltransferase
Glyma15g35450	Glyma.15G224400	SUVH3/SU(VAR)3-9 homolog 3/H3K9 methyltransferase
Glyma19g30390	Glyma.19G124100	SUVH3/SU(VAR)3-9 homolog 3/H3K9 methyltransferase
Glyma20g00810	Glyma.20G005400	SUVH9
Glyma20g16736	Glyma.20G069300	SUVH5

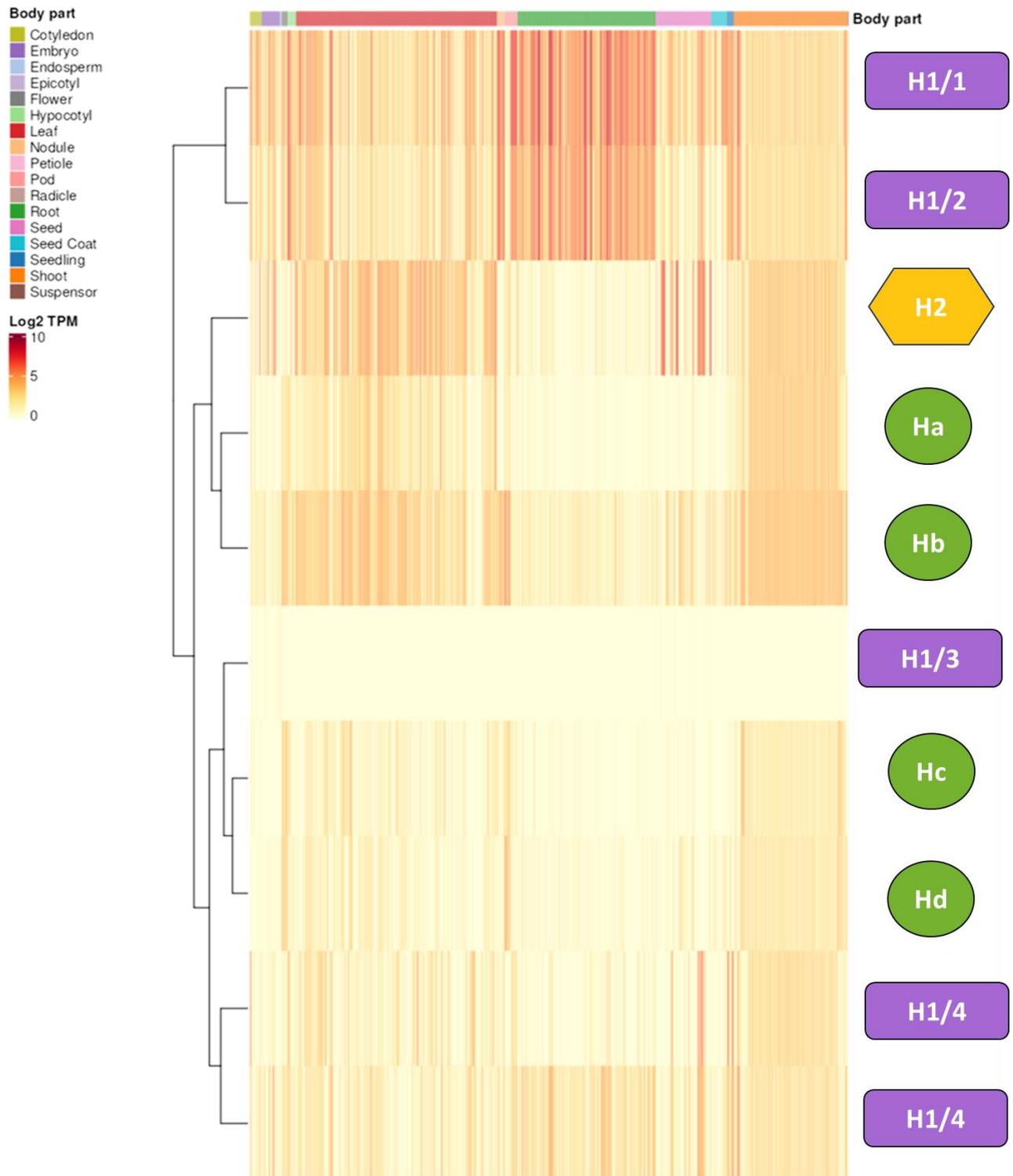
Glyma19g27706	Glyma.19G103600	SUVH4
	Glyma.19G103500	SUVH4
Glyma16g18500	Glyma.16G100200	SUVH9
	Glyma.16G047800	SUVH4
Glyma13g23490	Glyma.13G166000	SUVH4
Glyma01g34971	Glyma.01G147300	SUVH4
Glyma01g41120	Glyma.01G202700	SUVH6
Glyma01g41340	Glyma.01G204900	SUVH6
Glyma03g27441	Glyma.03G119900	SUVH3
Glyma04g15120	Glyma.04G125500	SUVH3
Glyma06g47055	Glyma.06G313300	SUVH1
Glyma07g19420	Glyma.07G157400	SUVH9
Glyma09g32703	Glyma.09G194500	SUVH4
Glyma11g04071	Glyma.11G038000	SUVH6
Glyma11g04301	Glyma.11G040100	SUVH6
Glyma04g41500	Glyma.04G236500	ATX5
	Glyma.14G112700	ATX5
Glyma17g32895	Glyma.17G215200	ATX5
Glyma19g17516	Glyma.19G066800	ATX5
Glyma06g13330	Glyma.06G127800	ATX4
Glyma16g34300	Glyma.16G217300	AGO1a
Glyma09g29720	Glyma.09G167100	AGO1b
Glyma20g02820	Glyma.20G022900	AGO3a
Glyma15g13260	Glyma.15G126700	AGO3b
Glyma14g04510	Glyma.14G041100	AGO4a
Glyma02g44260	Glyma.02G274900	AGO4b
Glyma20g12070	Glyma.20G052500	AGO4c
Glyma12g08860	Glyma.12G083500	AGO5a
Glyma11g19650	Glyma.11G190900	AGO5b
Glyma13g26240	Glyma.13G193200	AGO6a
Glyma01g06370	Glyma.01G05310	AGO7a
Glyma02g12430	Glyma.02G111600	AGO7b
Glyma06g47230	Glyma.06G314500	GmAGO9
Glyma20g28970	Glyma.20G151400	AGO10a
Glyma10g38770	Glyma.10G242800	AGO10b
Glyma02g00510	Glyma.02G002500	AGO10c
Glyma06g23920	Glyma.06G213300	AGO10d
Glyma05g08170	Glyma.05G011300	AGO10e
Glyma17g12850	Glyma.17G119400	AGO10f
Glyma04g21450	Glyma.04G150900	AGO10g
Glyma19g45060	Glyma.19G261200	DCL1a
Glyma03g42290	Glyma.03G262100	DCL1b
Glyma09g02930	Glyma.09G025400	DCL2a

Glyma09g02920	Glyma.09G025300	DCL2b
Glyma04g06060	Glyma.04G057400	DCL3
Glyma13g22450	Glyma.13G156500	DCL4
Glyma17g11235	Glyma.17G104100	DCL4
Glyma02g09470	Glyma.02G086100	RDR1
Glyma07g26900	Glyma.07G171400	RDR1
Glyma05g02000	Glyma.05G035900	RDR2
Glyma17g09920	Glyma.17G091500	RDR2
Glyma04g07151	Glyma.04G067300	RDR6
Glyma06g07251	Glyma.06G068900	RDR6

**Figura suplementar 1:** Expressão diferencial de genes na via de biossíntese de ABA em diferentes tecidos e órgãos durante o desenvolvimento da soja.



**Figura suplementar 2:** Expressão diferencial de genes na via de degradação de ABA em diferentes tecidos e órgãos durante o desenvolvimento da soja.



**Figura suplementar 3:** Expressão diferencial de genes na via de transporte de ABA em diferentes tecidos e órgãos durante o desenvolvimento da soja.



**Figura suplementar 4:** Expressão diferencial de genes na via de sinalização de ABA em diferentes tecidos e órgãos durante o desenvolvimento da soja.

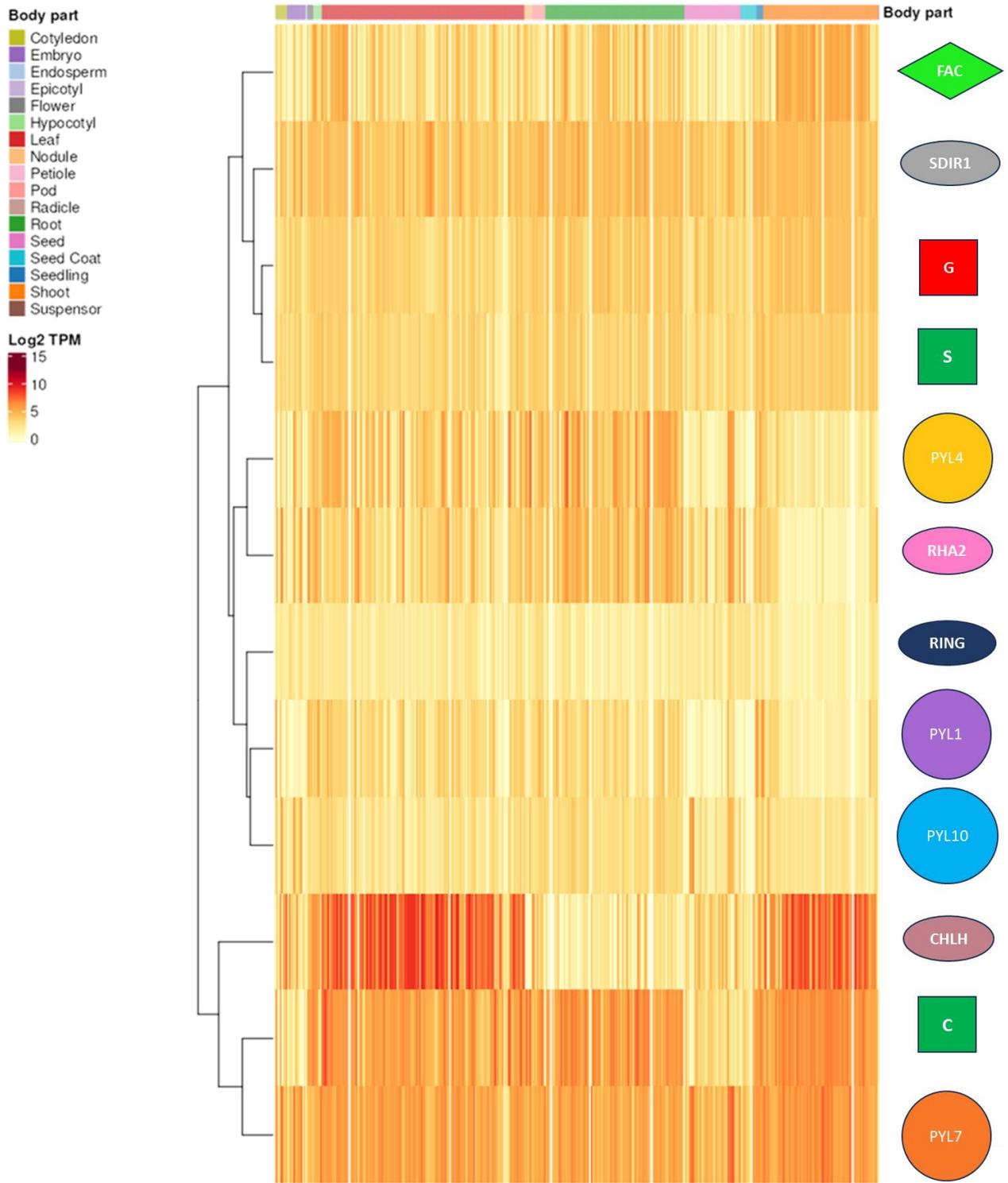
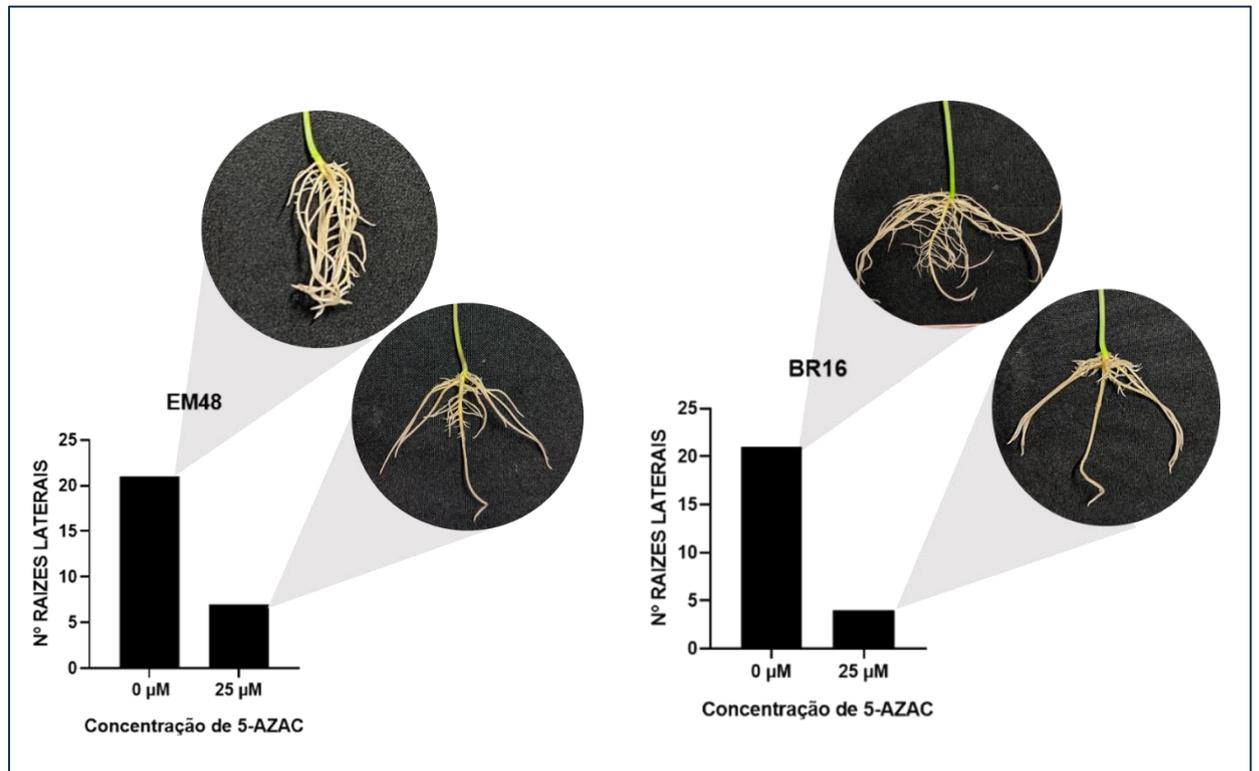


Figura suplementar 5: Impacto das plantas tratadas com 5-azaC no desenvolvimento das raízes.



**Figura suplementar 6:** Expressão por tecido dos principais genes da via de biossíntese e degradação de ABA em plântulas de soja e que foram validados por RT-qPCR.

