

DINÂMICA DA REGULAÇÃO DE GENES ASSOCIADOS À  
DEPOSIÇÃO DE CALOSE EM PLÂNTULAS DE SOJA SUBMETIDAS  
A ESTRESSES BIÓTICOS E ABIÓTICOS

**SARA SANGI MIRANDA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO – 2022

DINÂMICA DE REGULAÇÃO DE GENES ASSOCIADOS À  
DEPOSIÇÃO DE CALOSE EM PLÂNTULAS DE SOJA SUBMETIDAS  
A ESTRESSES BIÓTICOS E ABIÓTICOS

**SARA SANGI MIRANDA**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Doutora em Genética e Melhoramento  
de Plantas.”

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

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO - 2022

### **FICHA CATALOGRÁFICA**

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

M672

Miranda, Sara Sangi.

Dinâmica da regulação de genes associados à deposição de calose em plântulas de soja expostas a estresses bióticos e abióticos / Sara Sangi Miranda. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2018.

98 f.

Bibliografia: 59 - 76.

Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2018.  
Orientadora: Clícia Grativol Gaspar.

1. Parede Celular. 2. GSL. 3. Expressão Gênica. 4. Estresse Osmótico. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 631.5233

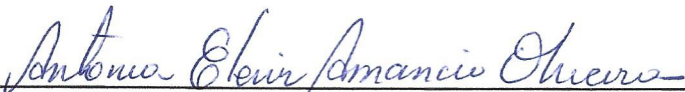
DINÂMICA DE REGULAÇÃO DE GENES ASSOCIADOS À  
DEPOSIÇÃO DE CALOSE EM PLÂNTULAS DE SOJA SUBMETIDAS  
A ESTRESSES BIÓTICOS E ABIÓTICOS


**SARA SANGI MIRANDA**


“Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Doutora em Genética e Melhoramento  
de Plantas.”

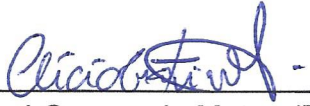
Aprovada em: 18 de fevereiro de 2022.

Comissão Examinadora:

  
Prof.ª Antônia Elenir Amâncio Oliveira (D.Sc., Biociências e Biotecnologia) - UENF

  
Prof. Daniel Basílio Zandonadi (D.Sc., Biociências e Biotecnologia) - UFRJ

  
Prof.ª Valdirene Moreira Gomes (D.Sc., Ciências Biológicas) - UENF

  
Prof.ª Clícia Grativol Gaspar de Matos (D.Sc., Química Biológica) - UENF  
(Orientadora)

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Jorcy e Lucinéia, pelo amor, incentivo, apoio, e por não medirem esforços para que eu tivesse a melhor educação possível.

À minha família, por torcerem pelo meu sucesso e orarem por mim.

Aos meus companheiros de moradia, Mariana Ramos, Júlia Rosa e Leandro Silva, pelas conversas, pela amizade e vida partilhada.

À minha orientadora, Clícia Grativol, pela dedicação, suporte, impulsão e ensinamentos.

Aos meus amigos Marcílio Zanetti, Priscila Pires, Sara Nállia e Carolina da Matta, pelos conselhos, momentos, alegrias e angústias divididas.

Aos meus colegas de laboratório, Paula Machado, Fernanda Silva, Geovanna Olímpio, Juliana Lopes, Giulia e Caroline Costa, pelas diversas manhãs e tardes compartilhadas e experiências trocadas.

Ao LBCT, em especial à professora Maura, à Dr<sup>a</sup> Camilla Alexandrino e ao professor Fábio Olivares, pela disponibilidade, paciência e colaboração.

Aos professores Gonçalo Apolinário e Valdirene Gomes, pela colaboração e contribuição para realização deste trabalho.

Aos professores do LQFPP, pela estrutura, disponibilidade e contribuições para realização deste trabalho.

A todos os professores que fizeram parte da minha jornada na UENF, obrigada por contribuírem para minha formação.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF a ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, por toda estrutura e oportunidades.

À CAPES, CNPq e FAPERJ, pelo apoio financeiro.

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

A todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

Às energias positivas que me fortaleceram, me ampararam e contribuíram para conclusão deste ciclo.

*"Levanta-te, toma o teu leito, e anda."*

## SUMÁRIO

RESUMO .....	xii
ABSTRACT .....	xiv
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>4</b>
2.1. Aspectos gerais do cultivo de soja .....	4
2.2. Estratégias das plantas aos estresses ambientais .....	6
2.2.1. Estratégia das plantas aos estresses bióticos .....	8
2.2.2. Estratégia das plantas aos estresses abióticos .....	9
2.3. Parede Celular Vegetal .....	11
2.4. Calose .....	15
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
3.1. Objetivo geral .....	19
3.2. Objetivos específicos .....	19
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
4.1. Identificação dos genes da família GSL no genoma de soja .....	20
4.2. Análise da estrutura gênica e domínios proteicos conservados .....	20
4.3. Análise filogenética da família GSL .....	21
4.4. Duplicação gênica e estimativa das taxas de substituição sinônimas e não sinônimas dos genes GSL em soja .....	21
4.5. Análise de perfil de expressão de genes GSL em soja .....	22
4.6. Material vegetal e condições de crescimento .....	22



4.6.1. Tratamento com flg22.....	22
4.6.2. Tratamento com manitol.....	23
4.6.3. Tratamento com manitol e flg22 .....	24
4.7. Processamento das sementes de soja e observação microscópica.....	24
4.8. Ensaio de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e concentração relativa de EROS.....	25
4.9. Extração e determinação de calose.....	26
4.10. Ensaio de atividade da enzima $\beta$ -1,3-glucanase .....	26
4.11. Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR quantitativa em tempo real ....	27
4.12. Análises estatísticas .....	28
<b>5. RESULTADOS</b> .....	29
5.1. Identificação dos genes GSL no genoma de soja.....	29
5.2. Análise estrutural e relações filogenéticas da família GSL em soja.....	30
5.3. Duplicação dos genes GmGSL.....	33
5.4. Perfil geral de expressão dos genes GmGSL.....	34
5.5. Flg22 induz produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e calose em plântulas de soja .....	36
5.6. Manitol induz produção de calose em plântulas de soja.....	41
5.7. Manitol e flg22 induzem produção de calose em plântulas de soja .....	45
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	50
6.1. Soja tem 23 genes GSL .....	50
6.2. Perfis de expressão e regulação da família de genes GSL em soja .....	52
6.3. Enzimas $\beta$ -1,3-glucanase regulam a deposição de calose .....	54
6.4. Acúmulo de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e deposição de calose em raízes e folhas de plântulas de soja induzido por flg22 e manitol .....	55
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
APÊNDICE.....	77

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Produção de soja no Brasil na safra de 2020/21. O mapa exibe a quantidade de grãos de soja (em milhões de toneladas) produzida em cada estado brasileiro. Adaptado de CONAB (2021). .....5
- Figura 2.** Impacto das mudanças climáticas na área plantada de soja no Brasil. Em verde são exibidos os locais previstos como de baixo risco para o impacto das variações. Em vermelho são os locais altamente vulneráveis às mudanças climáticas. Adaptado de The World Bank (2020). .....7
- Figura 3.** Resumo das respostas morfológicas, fisiológicas e bioquímicas desencadeadas pelo estresse hídrico em plantas. As respostas morfofisiológicas resultam na redução do crescimento da planta. As respostas bioquímicas englobam uma série de respostas celulares e moleculares. Adaptado de Barnabas (2008) e Kumar (2018). ..... 10
- Figura 4.** Modelo esquemático da parede celular vegetal. O modelo apresenta os principais constituintes da parede celular primária e secundária. Adaptado de Zhao, 2019. .... 12
- Figura 5.** Modelo esquemático das interações e vias de sinalização durante um estresse abiótico. Durante a interação da planta com o estresse três diferentes vias de sinalização podem ser ativadas: via de sinalização por EROs, Reconhecimento

de Danos à parede celular e a sinalização hormonal. Adaptado de Novaković (2018).....14

**Figura 6.** Representação esquemática das subunidades que atuam como reguladores da  $\beta$ -1,3-glucano sintase. Rop1 e UGT1 interagem com proteínas semelhantes à anexina (ANN) e podem modular a atividade do complexo calose sintase, enquanto a sacarose sintase (SuSy) pode fazer parte do complexo para fornecer substrato para a síntese de calose. G, potenciais sítios de glicosilação. CP, locais de fosforilação. TP, locais potenciais de fosforilação de tirosina; PRD, domínio rico em prolina.....16

**Figura 7.** Modelo esquemático detalhando as condições de crescimento das plântulas de soja utilizadas para análise. (A) Detalhes do tratamento das plântulas controle, sem nenhuma condição estressante. (B) Detalhes do tratamento das plântulas controle, crescidas durante 7 dias no meio com manitol, porém sem flg22. (C) Detalhes do tratamento das plântulas com flg22. (D) Detalhes do tratamento das plântulas tratadas durante 7 dias no meio com manitol e posteriormente 24h com flg22. ....23

**Figura 8.** Relação filogenética, estrutura gênica e arquitetura de domínio dos GmGSL em soja. (A) Relação filogenética dos GSL identificados em soja. (B) Estrutura gênica das 23 sequências de GSL em soja. Os CDSs são representados em retângulos pretos e os introns, em linhas pretas. O comprimento de CDSs e introns pode ser estimado usando a escala mostrada abaixo. (C) Representação esquemática da arquitetura do domínio das proteínas GSL. O tamanho das proteínas pode ser estimado usando a escala mostrada abaixo. ....31

**Figura 9.** Relação filogenética dos genes GSL em soja, *Arabidopsis*, *Citrus sinensis*, *Vitis vinifera*, *Physcomitrella patens* e *Phaseolus vulgaris*. A árvore filogenética foi conduzida usando o servidor web IQ-Tree pelo método de Máxima Verossimilhança. O valor nas ramificações representa valores de bootstrap de 1000 réplicas. Diferentes grupos da família GSL são divididos em cores diferentes. Cinza, verde, azul e amarelo são os grupos I, II, III e IV, respectivamente.....32

**Figura 10.** Perfis de expressão dos genes GmGSL em diferentes tecidos e órgãos de soja. As cores amarela e azul indicam alta e baixa expressão, respectivamente.....35

**Figura 11.** Análises fenotípicas das plântulas tratadas com flg22. (A) Plântulas controle. (B) Plântulas tratadas com flg22. (C) Tamanho das plântulas. (D) Massa fresca das plântulas. (E) Massa seca das plântulas. Barra de escala em 1cm.....37

**Figura 12.** Avaliação dos níveis de EROs e detecção histoquímica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em folhas e raízes de plântulas de soja. (A) Folhas de controle tratadas com água destilada. (B) Folhas tratadas com flg22 por 30 min. (C) Raízes das plântulas controle. (D) Raízes das plântulas tratadas com flg22 por 30 min. (E) Intensidade relativa de fluorescência DCFH-DA em folhas e raízes de soja tratadas com flg22 por 30 min. \*\*Indica a diferença significativa em relação ao controle conforme determinado pelo teste t de Student ( $p < 0,01$ ). Os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes com resultados semelhantes. Barra de escala em 1cm. ..38

**Figura 13.** Deposição de calose em raízes de soja tratadas com flg22. (A) Corte longitudinal da ponta da raiz controle. (B) Região central das raízes controle. (C) Corte longitudinal da ponta da raiz tratada com flg22. (D) Região média das raízes tratadas com flg22. (E) Conteúdo de calose das folhas, raízes e parte aérea tratadas e não tratadas com flg22. Experimentos repetidos tiveram resultados semelhantes. As imagens selecionadas são representativas para a deposição de calose em raízes de plântulas de soja tratadas com flg22 por 24 h após examinar pelo menos 10 seções para cada região de tecido. \*Indica a diferença significativa em relação ao controle conforme determinado pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ). \*\*Indica a diferença significativa em relação ao controle conforme determinado pelo teste t de Student ( $p < 0,01$ ). Barra de escala em 100  $\mu$ m. Objetiva de 20X. ....39

**Figura 14.** Atividade das enzimas  $\beta$ -1,3-glucanase na parte aérea, folhas e raízes de plântulas de soja tratadas por 24 h com flg22. \*Indica diferença significativa em relação ao controle conforme determinado pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ). Os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes com resultados semelhantes.....40

- Figura 15.** Expressão relativa dos genes GmGSL em tecido radicular de soja tratada com flg22. SUMO foi usado como um gene de referência. A linha tracejada representa a expressão normalizada das plantas controle. \*Indica diferença significativa em relação ao controle conforme determinado pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ).....41
- Figura 16.** Análises fenotípicas das plântulas tratadas com manitol. (A) Plântulas controle. (B) Plântulas tratadas com manitol. (C) Tamanho das plântulas. (D) Massa fresca das plântulas. (E) Massa seca das plântulas. Barra de escala em 1cm. \*Indica diferença significativa em relação ao controle conforme determinado pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ). \*\*Indica diferença significativa em relação ao controle conforme determinado pelo teste t de Student ( $p < 0,01$ ). .....42
- Figura 17.** Deposição de calose em raízes de soja tratadas com manitol. (A) Corte longitudinal da ponta da raiz controle. (B) Corte longitudinal da ponta da raiz tratada com flg22. (C) Conteúdo de calose das raízes e parte aérea tratadas e não tratadas com flg22. Experimentos repetidos tiveram resultados semelhantes. \*\*Indica a diferença significativa em relação ao controle conforme determinado pelo teste t de Student ( $p < 0,01$ ). Barra de escala em 100  $\mu$ m. Objetiva de 20X.....43
- Figura 18.** Atividade das enzimas  $\beta$ -1,3-glucanase na parte aérea e raízes de plântulas tratadas com manitol durante 7 dias. \*Indica diferença significativa em relação ao controle conforme determinado pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ). Os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes com resultados semelhantes .....44
- Figura 19.** Expressão relativa dos genes GmGSL em tecido radicular de soja tratada com manitol durante 7 dias. METK4 foi usado como um gene de referência. A linha tracejada representa a expressão normalizada das plantas controle. \*Indica diferença significativa em relação ao controle conforme determinado pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ). .....44
- Figura 20.** Análises fenotípicas das plântulas tratadas durante 7 dias com manitol e, posteriormente, 24h em flg22. (A) Plântulas controle. (B) Plântulas tratadas com manitol e flg22. (C) Tamanho das plântulas. (D) Massa fresca das plântulas. (E) Massa seca das plântulas. Barra de escala em 1cm. \*Indica diferença significativa

em relação ao controle conforme determinado pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ).  
\*\*Indica diferença significativa em relação ao controle conforme determinado pelo teste t de Student ( $p < 0,01$ ).....46

**Figura 21.** Deposição de calose em raízes de soja tratadas durante 7 dias com manitol e, posteriormente, 24h em flg22. (A) Corte longitudinal da ponta da raiz controle. (B) Corte longitudinal da ponta da raiz tratadas com manitol e flg22. (C) Conteúdo de calose das raízes e parte aérea tratadas e não tratadas com manitol e flg22. Experimentos repetidos tiveram resultados semelhantes. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos da parte aérea e raiz usando ANOVA e teste Tukey HSD, com nível de significância de 95%......47

**Figura 22.** Comparação do conteúdo relativo de calose entre os três tratamentos realizados.....48

**Figura 23.** Atividade das enzimas  $\beta$ -1,3-glucanase na parte aérea, folhas e raízes de plântulas tratadas com manitol durante 7 dias e flg22 durante 24h. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos da parte aérea e raiz usando ANOVA e teste Tukey HSD, com nível de significância de 95%. .....48

**Figura 24.** Expressão relativa de genes GmGSL em tecido radicular de soja tratada durante 7 dias com manitol e 24h com flg22. METK4 foi usado como um gene de referência. A linha tracejada representa a expressão normalizada das plantas controle. \*Indica diferença significativa em relação ao controle conforme determinado pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ). .....49

## RESUMO

MIRANDA, SARA SANGI; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; fevereiro, 2022. Dinâmica da regulação de genes associados a deposição de calose em plântulas de soja submetidas a estresses bióticos e abióticos. Orientadora: Clícia Grativol Gaspar de Matos; Conselheiros: Valdirene Moreira Gomes e Thiago Motta Venâncio.

As plantas estão expostas constantemente a diversos estresses. Como são organismos sésseis, elas desenvolveram mecanismos capazes de detectar as variações ambientais e desencadear respostas específicas para minimizar o dano sofrido. Entre os mecanismos de resposta ao estresse desencadeado pelas plantas está a deposição de calose na parede celular. A calose é um polímero necessário ao crescimento e desenvolvimento da planta. A calose é sintetizada por genes da família da calose sintase - *Glucan Synthase Like* (GSL) - e responde dinamicamente a vários tipos de estresses, podendo inibir a infecção patogênica, no caso de estresses bióticos, e manter o turgor celular e enrijecer a parede, no caso de estresses abióticos. Neste estudo, relatamos a identificação de 23 genes GSL (GmGSL) no genoma de soja. Realizamos análises filogenéticas, predição da estrutura do gene, padrões de duplicação e perfis de expressão em várias bibliotecas de RNA-Seq. Avaliamos a deposição de calose e a atividade da  $\beta$ -(1,3)-glucanase desencadeada pela flg22 e pelo manitol na parte aérea (segmento total acima das raízes) e nas raízes de plântulas de soja. Mostramos que a calose é induzida tanto pelo manitol quanto pela flg22 e está relacionada à atividade de  $\beta$ -

1,3-glucanases. Usamos PCR quantitativo em tempo real para analisar a expressão dos genes GSL para determinar o papel desses genes durante a interação das raízes de soja com manitol e flg22. O gene GmGSL23 foi regulado positivamente tanto no estresse osmótico quanto em resposta à infecção por flg22, mostrando o papel essencial desse gene na resposta de defesa da planta a organismos patogênicos e ao estresse osmótico. Além disso, os genes GmGSL4 e GmGSL5 foram regulados positivamente na junção dos dois estresses. Nossos resultados fornecem uma compreensão importante do papel da deposição de calose e da regulação dos genes GSL em resposta ao estresse osmótico e à infecção por flg22 em plântulas de soja.

Palavras-chave: parede celular; GSL; expressão gênica, estresse osmótico;



## ABSTRACT

MIRANDA, SARA SANGI; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; February, 2022. Dynamics of gene regulation associated with callose deposition in soybean seedlings under biotic and abiotic stresses. Advisor: Clícia Grativol Gaspar de Matos; Counselors: Valdirene Moreira Gomes e Thiago Motta Venâncio.

Plants are constantly exposed to different stresses. As they are sessile organisms, they have developed mechanisms that are capable of detecting environmental variations and triggering specific responses to minimize the damage suffered. Among the stress response mechanisms triggered by plants is the deposition of callose on the cell wall. Callose is a polymer necessary for plant growth and development. Callose is synthesized by genes of the callose synthase family - Glucan Synthase Like (GSL) - and dynamically responds to various types of stress, being able to inhibit pathogenic infection, in the case of biotic stresses, and maintain cell turgor and stiffen the wall, in the case of abiotic stresses. In this study, we report the identification of 23 GSL genes (GmGSL) in the soybean genome. We performed phylogenetic analyses, gene structure prediction, duplication patterns and expression profiles on several RNA-Seq libraries. We evaluated callose deposition and  $\beta$ -(1,3)-glucanase activity triggered by flg22 and mannitol in the shoot (total segment above the roots) and in the roots of soybean seedlings. We show that callose is induced by both mannitol and flg22 and is related to the activity of  $\beta$ -1,3-glucanases. We used real-time quantitative PCR to analyze the expression of GSL

genes to determine the role of these genes during the interaction of soybean roots with mannitol and flg22. The GmGSL23 gene was upregulated both in osmotic stress and in response to flg22 infection, showing the essential role of this gene in the plant's defense response to pathogenic organisms and osmotic stress. In addition, the genes GmGSL4 and GmGSL5 were upregulated at the junction of the two stresses. Our results provide an important understanding of the role of callose deposition and regulation of GSL genes in response to osmotic stress and flg22 infection in soybean seedlings.

Key words: cell wall, osmotic stress, flagellin, soybean

## 1. INTRODUÇÃO

A população mundial cresce a cada ano. Em 2050, é previsto que a população mundial chegue a 9,8 bilhões de pessoas. Para alimentar tantas pessoas nos próximos 30 anos, a agricultura deverá pelo menos dobrar sua produção (FAO, 2009; OECD-FAO, 2020). No entanto, a produção atual de alimento é insuficiente para atender tal demanda. Além disso, as variações climáticas afetam diretamente o rendimento das culturas (Ray et al., 2015). É improvável que o desafio alimentar seja enfrentado apenas por tecnologias convencionais de melhoramento, devendo ser adotadas abordagens multidisciplinares visando ao aumento do rendimento e à tolerância das culturas vegetais (Varshney et al., 2018). Nesse sentido, um dos atuais desafios da agricultura é aumentar o rendimento das culturas, utilizando técnicas e estratégias que permitam a ampliação da qualidade e da produção, não agridam o meio ambiente e garantam a segurança alimentar.

A parede celular vegetal responde dinamicamente a diversos estresses bióticos e abióticos. A responsividade da parede celular a estresses bióticos está intrinsecamente relacionada à capacidade de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs). O reconhecimento de patógenos potenciais é possibilitado por receptores de reconhecimento de padrões (*Pattern-recognition receptors*, PRRs) localizados na membrana plasmática da planta. Após o reconhecimento, as células vegetais desencadeiam um conjunto de respostas imunes e vias de sinalização, como a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), compostos antimicrobianos e

espessamento da parede celular por deposição de calose (Dodds e Rathjen, 2010; Malinovsky et al., 2014; Huang et al., 2019).

A responsividade da parede celular a estresses abióticos envolve diferentes vias que atuam no remodelamento, afrouxamento e enrijecimento da parede. Essas vias detectam os danos sofridos na parede causados pelo estresse e ativam uma rede de reconhecimento e sinalização capazes de ativar diferentes mecanismos que vão desde a produção de EROs até a ativação de genes específicos, como os genes responsáveis pela biossíntese de calose (Stass e Horst, 2009; Tenhaken, 2015; Gigli-Bisceglia et al., 2020).

Calose é um polímero de  $\beta$ -1,3-glucano com ramificações  $\beta$ -1,6 depositado na parede celular vegetal. A deposição de calose é necessária para o crescimento e desenvolvimento da planta. Além disso, a deposição de calose pode ser induzida por vários estresses bióticos e abióticos. Em estresses bióticos, a calose pode impedir o desenvolvimento do patógeno e/ou da infecção. Em estresses abióticos, a calose interage diretamente com as microfibrilas de celulose, fortalecendo a parede celular e atuando nos mecanismos de manutenção do turgor celular (Ellinger et al., 2013; Cui e Lee, 2016; Wu et al., 2018; Wang et al., 2021b).

A calose é sintetizada na membrana plasmática a partir da UDP-glicose por genes pertencentes à família da calose sintase (CaIS ou GSL para *Glucan synthase-like*). Os genes GSL já foram investigados em várias espécies, como *Vitis vinifera* (Yu et al., 2016), *Citrus spp.* (Granato et al., 2019), *Zea mays* (Niu et al., 2021) e *Arabidopsis thaliana* (Richmond e Somerville, 2000; Verma e Hong, 2001b). No entanto, esses genes ainda não foram identificados em soja, e pouco se sabe sobre sua responsividade a estresses bióticos e abióticos.

Uma característica comum entre os genes GSL é sua estrita regulação tecido-temporal, sendo influenciados por mecanismos regulatórios que controlam a biossíntese e a deposição de calose. Hormônios como o ácido salicílico e padrões moleculares, associados a patógenos como flg22, sequência de 22 aminoácidos da região N-terminal da flagelina, são capazes de regular a deposição de calose em tecidos vegetais (Clay et al., 2009; García-Andrade et al., 2011; Matern et al., 2019).

Em soja, o silenciamento do receptor para flg22 aumenta significativamente a suscetibilidade das plantas de soja a *Pseudomonas syringae*. Além disso, a soja desenvolveu versões polimórficas de receptores flg22 que detectam os polimorfismos do epítipo flg22 (Wei et al., 2020). A calose está envolvida em vários

processos biológicos intrínsecos ao desenvolvimento da planta e em resposta a diferentes estresses. No entanto, o conhecimento detalhado sobre os mecanismos regulatórios de deposição de calose em resposta a flg22, manitol e a interação entre esses dois estresses ainda não foi reportado para os membros da família GSL em soja.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

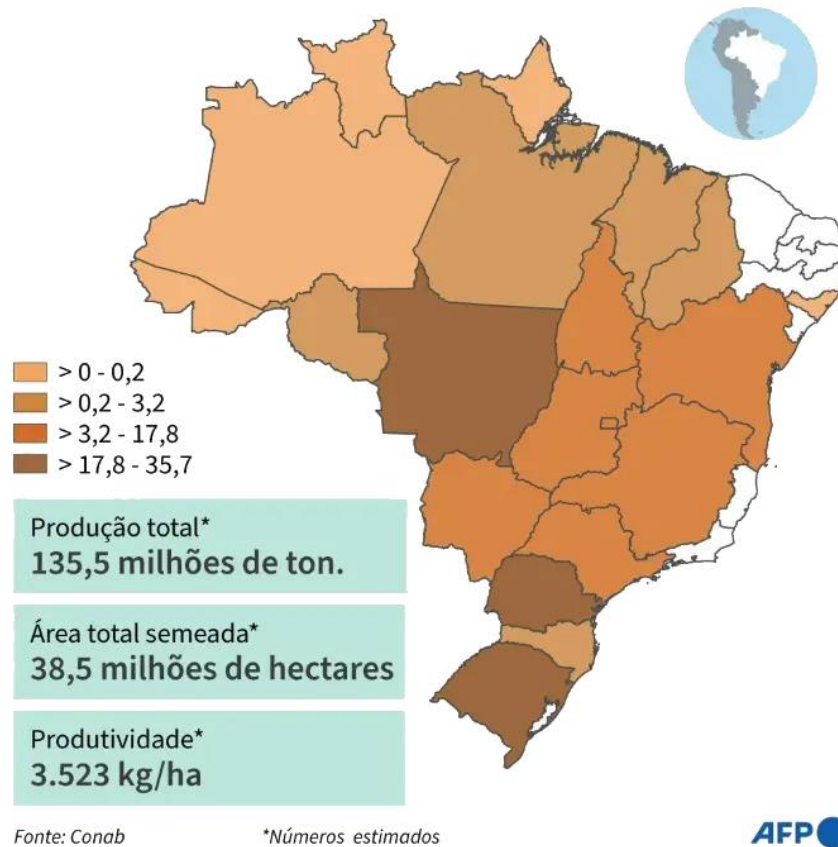
### 2.1. Aspectos gerais do cultivo de soja

A soja comumente cultivada pertence ao reino Plantae, filo Magnoliophyta, classe Rosidae, ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, gênero *Glycine*, espécie *Glycine max* (The Angiosperm Phylogeny Group III, 2009). Tendo sofrido duas duplicações do genoma ao longo da evolução, a espécie tem  $2n=40$  cromossomos (Schmutz et al., 2010).

A grande expansão da cultura da soja no Brasil teve início nas décadas de 80 e 90, apoiada pelos programas de melhoramento genético da soja, quando foram desenvolvidas cultivares adaptadas à região dos Cerrados, que hoje é a maior região produtora dos grãos no Brasil. A primeira característica que possibilitou a expansão da soja para as regiões do Centro-Oeste foi o período juvenil longo, pois a planta não floresce durante o período juvenil, mesmo que as condições climáticas existam, permitindo o crescimento e o desenvolvimento da cultivar (Destro, 2001).

No Brasil, a soja é a cultura com a maior área plantada (Hubbs et al., 2017). O estado do Mato Grosso é o maior produtor, correspondendo a cerca de 30% do total produzido no país (Figura 1). Em seguida, os estados do Paraná e Rio Grande do Sul com 19% e 13% do total, respectivamente. O Brasil há alguns anos vem sendo considerado a grande promessa no fortalecimento da produção mundial do

grão devido ao manejo, à eficiência dos produtores e à pesquisa e desenvolvimento de novas cultivares (OECD-FAO, 2015).



**Figura 1.** Produção de soja no Brasil na safra de 2020/21. O mapa exhibe a quantidade de grãos de soja (em milhões de toneladas) produzida em cada estado brasileiro. Adaptado de CONAB (2021).

Na safra de 2019/20, a produção mundial de soja caiu em razão da pandemia ocasionada pela COVID-19 e da conseqüente queda nos plantios nos Estados Unidos. Entretanto, a América do Sul atingiu uma produção recorde e o Brasil se tornou o maior produtor e exportador de soja do mundo (OECD-FAO, 2020).

Em 2021, foram produzidas 362,947 milhões de toneladas do grão em todos os continentes em uma área de 127,842 milhões de hectares, sendo então, um dos 10 alimentos mais produzidos no planeta. Os maiores produtores de soja, atualmente, são o Brasil, produzindo na safra de 2020/21 cerca de 135,5 milhões

de toneladas do grão, seguido dos Estados Unidos, com a produção de 112,549 milhões de toneladas (USDA, 2020; CONAB, 2021; Dukhnytskyi, 2022).

No Brasil, os recentes avanços na produção de soja se devem, principalmente, à pesquisa e à tecnologia, manejo e recursos genéticos disponíveis. No entanto, variações climáticas extremas como seca, inundações e aumento da temperatura afetam diretamente a produção das lavouras e demandam cada vez mais de recursos e tecnologias que visem à mitigação dos efeitos das mudanças climáticas no rendimento da cultura. Nesse sentido, o desenvolvimento de culturas tolerantes às variações climáticas é essencial para o valor nutricional e produtividade da cultura.

## **2.2. Estratégias de adaptação das plantas em resposta aos estresses ambientais**

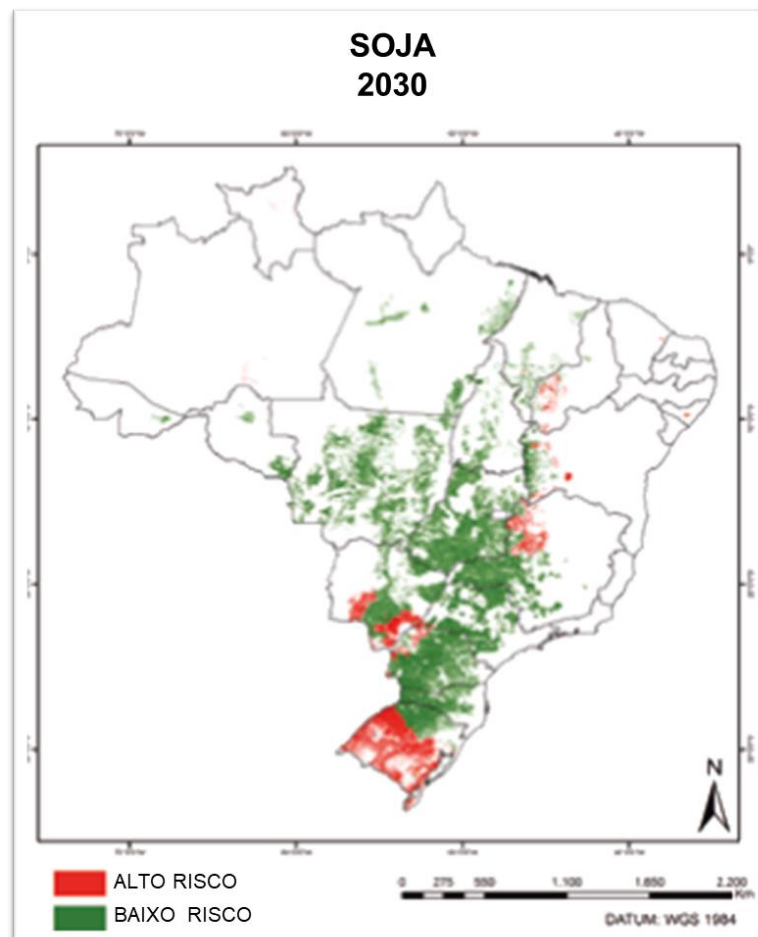
As variações climáticas e a ocorrência de eventos climáticos extremos, causados tanto por processos naturais quanto por fatores antropogênicos, afetam diretamente a produção das lavouras e são um dos principais desafios para o rendimento das culturas (Ray et al., 2015). A ocorrência de variações climáticas como ondas de calor e frio, inundações e estiagens prolongadas já podem ser observadas em todo o planeta (Nordhaus, 2019). Estimativas do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (*Intergovernmental Panel on Climate Change*, IPCC), em 2021, indicam um aumento da temperatura de 1,5-4°C no século XXI (Pörtner et al., 2021). E ainda, o aumento global da temperatura está diretamente associado às mudanças bruscas de temperatura e à intensificação da seca (IPCC, 2019).

Nos últimos 20 anos, o Brasil passou por secas extremas em 2005, 2010 e 2015, além de eventos de inundações, principalmente nas regiões Nordeste e Sul do país (Haddad e Teixeira, 2015; Ávila et al., 2016). Vários estudos investigaram os impactos das variações climáticas no potencial produtivo da agricultura brasileira e de suas commodities principais como o milho, cana-de-açúcar e soja (Battisti et al., 2018; Caetano et al., 2018; Zilli et al., 2020). O impacto na produtividade das lavouras de soja causado pelas mudanças climáticas já explica a variabilidade de 30% no rendimento da cultura e pode resultar em uma queda na produção de até 40% até 2030 (Figura 2), além de uma redução de até 65% na área destinada à



produção do grão, deslocando as principais regiões produtoras para o sudoeste da Amazônia (Zilli et al., 2020).

Cerca de 50% das perdas de safra são consequência direta de estresses abióticos, sendo 10% atribuídos à seca e até 20% ao estresse térmico (Ray et al., 2015). Além de estresses abióticos, as plantas enfrentam a ameaça de diversos patógenos e ataque de pragas. As variações climáticas, além de modificarem o habitat de possíveis organismos patogênicos, facilitam sua disseminação (Atkinson e Urwin, 2012). Além disso, estresses abióticos podem enfraquecer os mecanismos de defesa das plantas e, conseqüentemente, aumentar sua suscetibilidade a possíveis patógenos (Suzuki et al., 2014).



**Figura 2.** Impacto das mudanças climáticas na área plantada de soja no Brasil. Em verde são exibidos os locais previstos como de baixo risco para o impacto das variações. Em vermelho são os locais altamente vulneráveis às mudanças climáticas. Adaptado de The World Bank (2020).

### **2.2.1. Estratégias de adaptação das plantas em resposta aos estresses bióticos**

Os estresses bióticos são causados por diversos organismos como ervas daninhas, fungos, insetos, vírus e bactérias (Saddique et al., 2018). Esses organismos podem causar vários sintomas na planta, como a murcha, apodrecimento das raízes e restringir o crescimento e o desenvolvimento (Balachandran et al., 1997; Vats, 2018).

As doenças ocasionadas por fungos e bactérias são mais frequentes em países tropicais como o Brasil. Alguns fatores de patogenicidade, como proteínas efetoras, enzimas que degradam a parede celular, toxinas e fitohormônios, permitem que essas bactérias sejam bem-sucedidas em seus ataques (Vats, 2018). Para superar esses ataques, as plantas estabeleceram uma variedade de mecanismos de resistência já preestabelecidos, como a produção de ceras e outros gerados pelo ataque patogênico (Rejeb et al., 2014)

O ataque microbiano é reconhecido pelos receptores de reconhecimento de padrões (*Pattern Recognition Receptors*, PRRs), localizados na membrana plasmática da planta. Os PRRs reconhecem os padrões associados a patógenos/micróbios/danos (PAMP/MAMP/DAMPs) e podem ativar uma cascata de mecanismos de defesa. Mecanismos como a deposição de calose, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), a fortificação da parede celular, entre outros, podem inibir a propagação patogênica (Malinovsky et al., 2014; Bacete et al., 2018).

O reconhecimento do patógeno resulta no influxo rápido de íons de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) na célula e na produção de EROs. As EROs produzidas em concentrações locais elevadas têm propriedades antimicrobianas diretas, enquanto em concentrações mais baixas, podem atuar como moléculas de sinalização. Esses eventos iniciais ativam uma via de sinalização que envolve uma série de proteínas específicas. A expressão de alguns genes também é induzida rapidamente (Kawano, 2003). A fortificação da parede celular é outra resposta de defesa induzida. A fortificação da parede é feita pela formação de papilas diretamente no local de penetração do patógeno. Essas papilas são principalmente compostas de calose e lignina. A deposição de calose induzida dentro do plasmodesma também

pode bloquear o movimento de vírus de célula para célula (Bellincampi et al., 2014; Höfte e Voxeur, 2017; Wu et al., 2018).

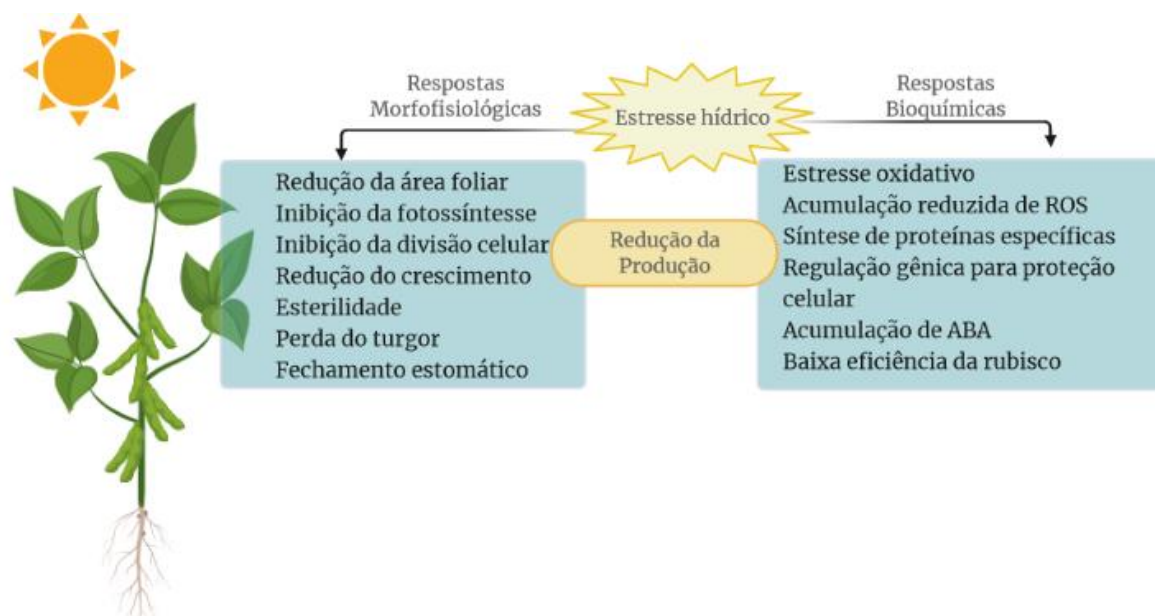
Nas plantas, o PRR mais bem estudado é o FLS2, receptor da flagelina bacteriana ou peptídeo flg22, que consiste em um peptídeo sinal N-terminal de 22 aminoácidos. O flg22 é percebido pelos receptores de membrana plasmáticos e, a partir de então, a planta desencadeia diferentes mecanismos de defesa. O flg22 tem sido amplamente utilizado como ferramenta de estudo para investigar os diferentes mecanismos moleculares envolvidos na resposta de defesa vegetal (Suarez-Rodriguez et al., 2007; Takai et al., 2008; Bethke et al., 2009; Tian et al., 2020). Em *Arabidopsis*, a flg22 foi utilizada na descoberta dos mecanismos moleculares envolvidos no reconhecimento do complexo FLS2-flg22 e na ativação do complexo imune receptor (Yadong et al., 2013). Em *Citrus sp.*, a flg22 foi utilizada na comparação de respostas de defesa em cultivares suscetíveis e resistentes ao cancro cítrico (Shi et al., 2015a).

### **2.2.2. Estratégias de adaptação das plantas em resposta aos estresses abióticos**

Inundações, salinidade, seca e o aumento da temperatura são fatores que afetam a planta, limitando seu crescimento e o desenvolvimento de suas principais características como altura, massa, área foliar, desenvolvimento floral, entre outros, levando a uma diminuição no potencial produtivo e enfraquecendo os mecanismos de defesa da planta. Além disso, as mudanças climática afetam as plantas a nível molecular, modificando suas características morfológicas e fisiológicas (Atkinson e Urwin, 2012; Gray e Brady, 2016; Vats, 2018) (Figura 3).

Em relação às variações climáticas, o estresse osmótico afeta drasticamente a produção das culturas (Lqbal et al., 2020). Plantas sob déficit hídrico apresentam baixo teor de água nas folhas, baixa taxa de transpiração e, conseqüentemente, diminuição do crescimento. Além disso, a seca prolongada prejudica muitas funções celulares, como síntese de proteínas e assimilação de nitrogênio, além de reduzir os teores de clorofila (Suzuki et al., 2014). Nos últimos anos, devido ao estresse hídrico, foi observada diminuição de 21% e 40% na produção de trigo e milho, respectivamente (Daryanto et al., 2016). Em plantas de soja, o estresse

hídrico leva a uma redução de 24-50% no rendimento dos grãos (Bauer, 2001; Dong et al., 2019)



**Figura 3.** Resumo das respostas morfológicas, fisiológicas e bioquímicas desencadeadas pelo estresse hídrico em plantas. As respostas morfofisiológicas resultam na redução do crescimento da planta. As respostas bioquímicas englobam uma série de respostas celulares e moleculares. Adaptado de Barnabas (2008) e Kumar (2018).

A salinidade, seca e congelamento provocam estresse osmótico na planta. Após a exposição ao estresse osmótico, as plantas desencadeiam uma gama de respostas morfológicas, fisiológicas e moleculares. O estresse osmótico é capaz de provocar a desidratação, que resulta em alterações nas propriedades lipídicas da membrana, levando à peroxidação lipídica. A ocorrência da peroxidação lipídica na membrana pode provocar o comprometimento dos receptores ligados à membrana e o aumento da permeabilidade inespecífica (Hoffmann e Dunham, 1995; Xiong e Zhu, 2002; Upadhyaya et al., 2013).

Quando submetidas ao estresse osmótico, a parede celular é um dos primeiros componentes da planta a ser afetado. Em plantas de trigo, o estresse osmótico reduziu os teores de celulose e hemicelulose, afetando as propriedades mecânicas da parede, promovendo o relaxamento da parede (Wakabayashi et al., 1997). Em plântulas de arroz, estresse osmótico aumentou a atividade de peroxidases, suprimiu o enrijecimento da parede e reduziu progressivamente o

tamanho das raízes (Lin e Kao, 2002). Como resposta de defesa ao estresse osmótico, foi evidenciada a deposição de calose na parede celular na região dos plasmodesmos, exercendo papel da regulação da permeabilidade (Volgger et al., 2010; Leijon et al., 2018; Hunter et al., 2019). Além disso, foi evidenciado que a calose desempenha um papel essencial na redução da plasmólise celular em soluções hipotônicas (Xie et al., 2012).

### **2.3. Parede Celular Vegetal**

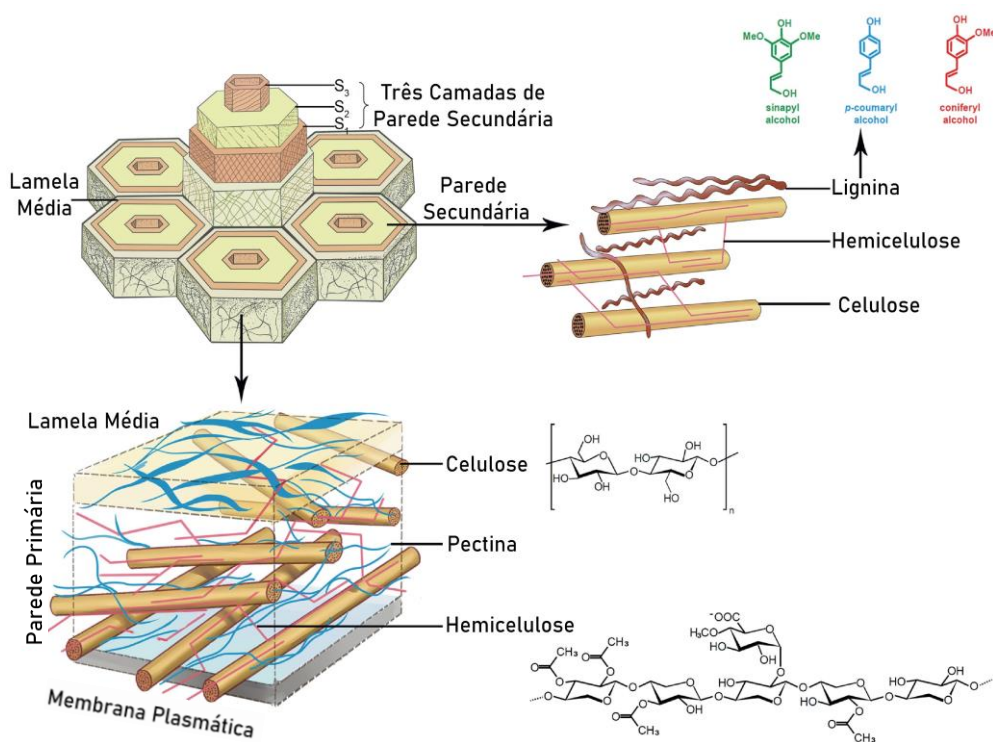
Entre os diversos aspectos das plantas, a parede celular define a rigidez e a morfologia da célula, controla a expansão celular, faz o transporte e a comunicação intercelular e confere proteção a diferentes estresses bióticos e abióticos (Varner e Lin, 1989; Cosgrove, 2016a; Houston et al., 2016).

A parede celular vegetal fica localizada na matriz extracelular, que é composta por água, um dos determinantes das propriedades físicas da parede, e compostos solúveis. Morfologicamente, a parede celular é composta por três diferentes estruturas: a lamela média, a parede primária e a parede secundária (Figura 4). A estrutura e a composição de cada componente da parede celular podem variar de acordo com o tecido, conforme o estágio de desenvolvimento e a medida do estresse sofrido pela planta (Varner e Lin, 1989; Sørensen et al., 2010; Cosgrove, 2016b).

A lamela média, constituída majoritariamente por polissacarídeos pécticos, é uma membrana flexível e permeável que conecta as células (Zamil e Geitmann, 2017). A parede primária é composta por microfibrilas de celulose, principal componente estrutural responsável pela resistência mecânica, que fornece força, resistência e flexibilidade à célula; hemiceluloses, polissacarídeos flexíveis capazes de se ligarem à superfície das microfibrilas de celulose formando uma rede resistente e maleável; pectinas, polissacarídeos que auxiliam na extensibilidade da parede e evitam seu colapso; e proteínas estruturais que auxiliam na manutenção das funções da parede (Albersheim et al., 2010; Haas et al., 2021; Hoffmann et al., 2021; Zhang et al., 2021).

A parede celular secundária, constituída majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina, é formada quando se inicia o processo de diferenciação celular. A parede secundária pode ser dividida em três camadas distintas (S1, S2 e

S3) que diferem entre si estruturalmente pela orientação das microfibrilas de celulose (Cosgrove, 2005). As células vegetais podem não apresentar parede celular secundária, dependendo do tipo de tecido.



**Figura 4.** Modelo esquemático da parede celular vegetal. O modelo apresenta os principais constituintes da parede celular primária e secundária. Adaptado de Zhao, 2019.

A parede celular vegetal é um compartimento metabólico ativo que tem a capacidade de alterar seus componentes, dependendo do tecido e do estágio de desenvolvimento da planta. Além disso, a parede celular vegetal responde ativamente a estresses bióticos e abióticos, fornecendo proteção para a planta (Lashbrook e Cai, 2008; Krzesłowska, 2011; Hamann, 2012; Houston et al., 2016; Hoffmann et al., 2021).

A capacidade da parede celular de alterar seus componentes e responder ativamente a diferentes fatores foi descrita como “plasticidade da parede celular”. A plasticidade envolve um mecanismo que monitora a integridade da parede celular. Quando a planta é exposta a algum estresse, pode ocorrer algum dano ou

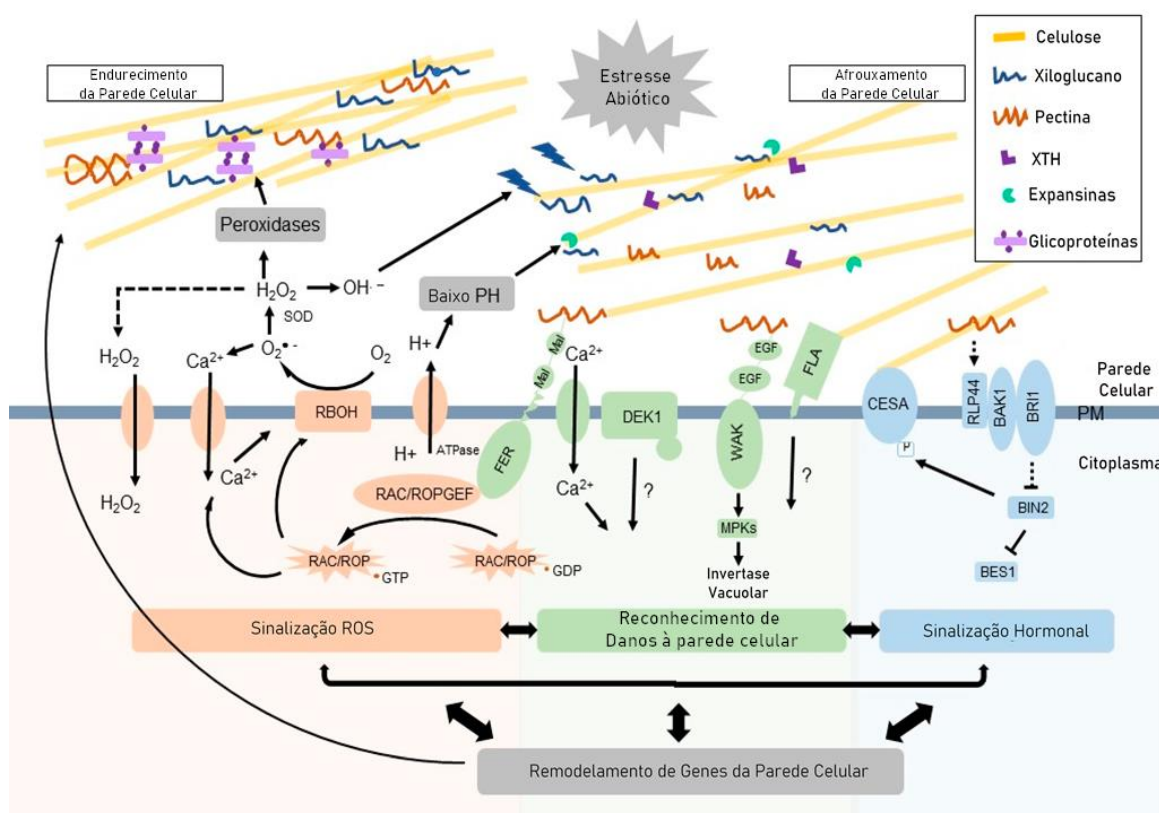
comprometimento da parede celular. A partir de então, a parede pode sofrer uma leve tensão ou até mesmo liberar fragmentos (Doblin et al., 2014; Vaahtera et al., 2019; Gigli-Bisceglia et al., 2020). Esses danos são rigorosamente monitorados durante os estresses bióticos e abióticos e são capazes de desencadear uma cascata de mecanismos de resposta de defesa da planta (Hamann, 2012; Houston et al., 2016; Rui e Dinneny, 2020).

Tanto o estresse biótico quanto o abiótico causam danos à parede celular, no entanto eles agem de modos diferentes. Os estresses abióticos são em grande parte sistêmicos e órgãos inteiros estão expostos a seus efeitos. Já em estresses bióticos, o dano na parede celular é geralmente localizado. Em estresses bióticos, a parede celular serve como uma barreira estrutural, impedindo e/ou retardando o ataque do patógeno, bem como desencadeando uma resposta de defesa ativa. Durante a infecção, como resultado da degradação, a parede celular pode liberar elicitores. A planta reconhece esses elicitores através da membrana plasmática e pode desencadear uma cascata de sinalização, que promove inúmeras respostas de defesa. Uma resposta de defesa comum é o reforço estrutural da parede celular tanto para resistência à pressão quanto para resistir à hidrólise enzimática gerada pelo patógeno (Houston et al., 2016). Entre os mecanismos de reforço da parede celular utilizados pela planta, está a deposição de calose nos locais de infecção (Luna et al., 2011; Underwood, 2012; Piršelová e Matušíková, 2013).

Estresses abióticos afetam o potencial hídrico da célula e, conseqüentemente, a pressão de turgescência. Como as paredes primárias são altamente hidratadas, o potencial hídrico influencia na organização da parede, interação dos polímeros e ligação física entre a parede e a membrana plasmática. Essas mudanças induzidas pelo estresse são percebidas pela célula e podem desencadear diferentes respostas no intuito de amenizar o dano sofrido (Figura 5) (Tenhaken, 2015; Sun et al., 2019).

O estresse abiótico pode ocasionar em danos à parede celular, causando seu afrouxamento, ativando diferentes vias de respostas. Na via de sinalização por EROs, o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  ativa a oxidase de explosão respiratória (RBOH), que leva à produção de EROs. A atividade das EROs, combinada com a atividade das peroxidases, promove a reticulação oxidativa das extensinas e a sinalização para induzir o enrijecimento da parede celular. Na via de sinalização de reconhecimento de danos à parede celular, sensores como a Feronia (FER) interagem para

promover a produção de EROs. A FER também responde aos danos à parede celular e influencia o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ . As quinases, associadas à parede (WAKs), podem se ligar às pectinas e iniciar a sinalização via proteínas para regular as invertases vacuolares e a manutenção do turgor. As proteínas arabinogalactanas do tipo fasciclina (FLAs) podem influenciar a biossíntese e/ou deposição de celulose em resposta ao estresse (Figura 5) (Bacete et al., 2018; Novaković et al., 2018; Zhao et al., 2019; Rui e Dinneny, 2020).



**Figura 5.** Modelo esquemático das interações e vias de sinalização durante um estresse abiótico. Durante a interação da planta com o estresse três diferentes vias de sinalização podem ser ativadas: via de sinalização por EROs, Reconhecimento de Danos à parede celular e a sinalização hormonal. Adaptado de Novaković (2018).

Na via de sinalização hormonal, o regulador da sinalização do brassinosteróide (BR), brassinosteróide insensível 2 (BIN2) pode fosforilar a celulose sintase A (CESA) e reduzir a atividade do CESA. BR regula negativamente BIN2 para ativar o fator de transcrição BES1 e regular genes relacionados ao



afrouxamento da parede celular. O ajuste e o equilíbrio de todas essas vias de sinalização são capazes de regular o enrijecimento e o afrouxamento da parede celular para modular a tolerância aos diferentes estresses. Outros mecanismos também podem estar envolvidos no processo (Novaković et al., 2018; Zhao et al., 2019; Rui e Dinneny, 2020).

#### 2.4. Calose

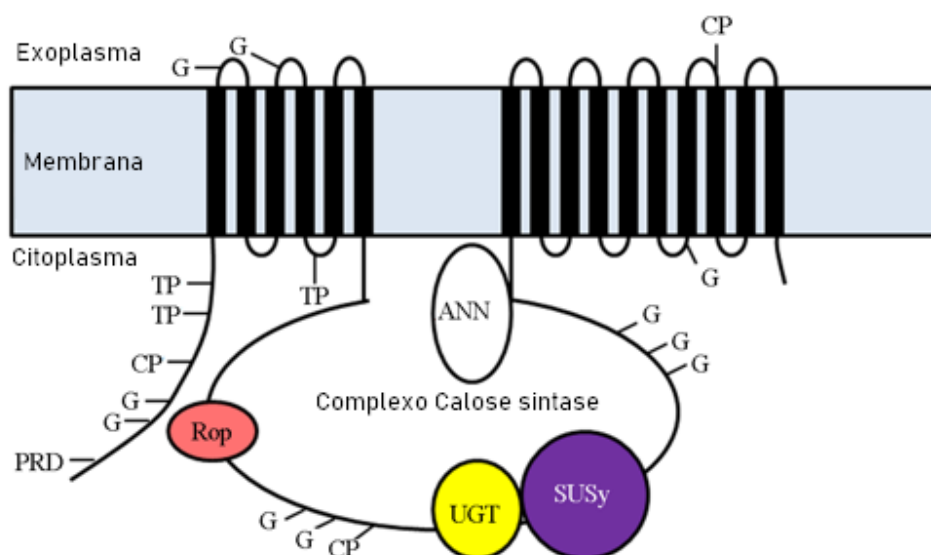
A calose é um polímero de  $\beta$ -1,3-glucano com ramificações  $\beta$ -1,6 associadas à parede celular vegetal. A deposição de calose é necessária para o crescimento e desenvolvimento das plantas e está envolvida em vários processos biológicos. A calose desempenha um papel essencial no transporte intercelular (Nedukha, 2015), citocinese (Davis et al., 2020), crescimento e desenvolvimento da inflorescência (Barratt et al., 2011; Paterlini et al., 2021), padronização celular (Chen et al., 2009), desenvolvimento do tubo polínico (Cai et al., 2011), organização da celulose (Abou-Saleh et al., 2018) e regulação dos plasmodesmos (Wu et al., 2018).

Além do seu papel no desenvolvimento normal da planta, a deposição de calose pode ser induzida por vários estresses bióticos e abióticos. Sob condições estressantes, a calose interage diretamente com as microfibrilas de celulose, fortalece a parede celular e pode impedir a penetração microbiana ou inibir o desenvolvimento de patógenos (Ellinger et al., 2013; Cui e Lee, 2016; Wu et al., 2018; Wang et al., 2021b; Guo et al., 2022). Em estresses abióticos, a calose atua como via de sinalização ao estresse (Cui e Lee, 2016), além de participar do seu mecanismo de tolerância (Stass e Horst, 2009; Feng et al., 2021).

A biossíntese da calose ocorre na membrana plasmática, usando UDP-glicose como substrato, por um complexo denominado calose sintase (CalS ou GSL para *Glucan Synthase-Like*) (Figura 6). A regulação da atividade da enzima calose sintase é realizada por proteínas Rho (ROP), sacarose sintase (SuSy), UDP-glicose transferase (UGT1), anexina (ANN) e outras subunidades que formam um complexo funcional ativo para desempenhar um papel catalítico (Verma e Hong, 2001a). As proteínas GSL têm alto peso molecular, contendo 14-16 domínios transmembranares agrupados nas regiões N-terminal e C-terminal que deixam uma alça hidrofílica central voltada para o citoplasma. As proteínas SuSy e UGT1 se

ligam a essa alça hidrofílica, na qual SUSY irá degradar a sacarose em UDP-glicose. Então, UDP-glicose, substrato para a reação, é transferida para o sítio catalítico através da UGT1 (Verma e Hong, 2001a; Schneider et al., 2016; Wang et al., 2020).

Em geral, os genes GSL têm de 40 a 50 éxons, com exceção dos genes que têm de dois a três éxons, e codificam proteínas com cerca de 2.000 aminoácidos. Os genes GSL já foram identificados em várias espécies como videira (Yu et al., 2016), milho (Niu et al., 2021), algodão (Feng et al., 2021), *Citrus sinensis* (Granato et al., 2019), *Brassica rapa* (Pu et al., 2019), *Brassica napus* (Liu et al., 2018), *Physcomitrella patens* (Schuette et al., 2009) e *Arabidopsis thaliana* (Richmond e Somerville, 2000; Verma e Hong, 2001a).



**Figura 6.** Representação esquemática das subunidades que atuam como reguladores da  $\beta$ -1,3-glucano sintase. Rop1 e UGT1 interagem com proteínas semelhantes à anexina (ANN) e podem modular a atividade do complexo calose sintase, enquanto a sacarose sintase (SuSy) pode fazer parte do complexo para fornecer substrato para a síntese de calose. G, potenciais sítios de glicosilação. CP, locais de fosforilação. TP, locais potenciais de fosforilação de tirosina; PRD, domínio rico em prolina.

Em *Arabidopsis*, 12 genes GSL foram divididos em dois grupos principais de acordo com seus papéis biológicos. O maior grupo, que inclui os genes AtGSL1, AtGSL2, AtGSL6, AtGSL8 e AtGSL10, está envolvido principalmente na biossíntese de calose durante a divisão celular e a fertilidade da planta. O grupo

menor inclui os genes AtGSL5, AtGSL7 e AtGSL12 e está envolvido no reforço estrutural da parede celular. O papel dos outros membros ainda não foi determinado. No entanto, os genes podem desempenhar papéis redundantes. Por exemplo, o gene AtGSL5 é responsável pela biossíntese de calose induzida por patógenos e desempenha um papel essencial no desenvolvimento do pólen (Verma e Hong, 2001a; Chen et al., 2009).

A deposição de calose, extremamente crucial para a tolerância das plantas, é uma resposta que visa a isolar localmente o impacto de estresses bióticos, servindo como uma barreira física (Brown, 2004; Underwood, 2012). No entanto, a calose também está envolvida na resposta a estresses abióticos. Durante a germinação, a calose foi relacionada com o aumento da tolerância ao estresse salino (Hunter et al., 2019). A calose também é depositada em resposta a metais danosos como o alumínio e atua como uma base da capacidade da planta de manter o crescimento das raízes em condições estressantes (O'Leary et al., 2018).

O estresse hídrico é um dos agentes que mais afetam o crescimento e o desenvolvimento das plantas ocasionando, entre outros, a esterilidade masculina e a deficiência do aparato fotossintético. Em plantas de algodão, a deposição de calose atua como uma das primeiras respostas da planta aos estresses hídrico, térmico e salino (Gao et al., 2020; Feng et al., 2021). Em plantas de cevada, a escassez de água aumentou os níveis de calose e atua como uma proteção induzida (Ahmed et al., 2014).

Uma característica comum entre os genes GSL é sua estrita regulação tecido-temporal, sendo influenciada por mecanismos regulatórios que controlam a biossíntese e a deposição de calose. Na defesa contra infecções bacterianas, as plantas têm um receptor de membrana, denominado FLS2, que pode se ligar a um fragmento da flagelina bacteriana e desencadear respostas imunes (Hunter et al., 2019; Tian et al., 2020). Padrões moleculares associados a patógenos como a flg22, sequência de 22 aminoácidos da região N-terminal da flagelina, se ligam aos receptores FLS2 da planta e são capazes de regular a deposição de calose nos tecidos vegetais (Clay et al., 2009; García-Andrade et al., 2011; Matern et al., 2019).

A deposição de calose, desencadeada por PAMPs como a flg22, é altamente estudada em *Arabidopsis* (Bethke et al., 2009, 2011; Yadong et al., 2013; Cui et al., 2018). Em soja, o silenciamento do receptor para flg22 aumenta significativamente a suscetibilidade a *Pseudomonas syringae* (Jin e Mackey, 2017;

Tian et al., 2020). Além disso, a soja desenvolveu versões polimórficas de receptores flg22 (Wei et al., 2020) e é capaz de regular genes específicos (Delgado-Cerrone et al., 2018a).

A calose está envolvida em vários processos biológicos intrínsecos ao desenvolvimento da planta, resposta a estresses abióticos e em resposta a ataques de organismos patogênicos, porém o conhecimento detalhado sobre os mecanismos moleculares reguladores da deposição de calose em resposta a flg22, ao estresse osmótico e a estresses simultâneos ainda não foi fornecido para todos os membros da família GSL em soja.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Caracterizar os genes relacionados à síntese de calose no genoma de soja através de ferramentas de bioinformática e analisar a sua expressão com a deposição de calose em plântulas de soja em resposta a estresses bióticos e abióticos.

#### **3.2. Objetivos específicos**

-Identificar, anotar e caracterizar os genes relacionados à calose no genoma de soja.

-Caracterizar fenotipicamente as plântulas de soja submetidas ao estresse por flg22, manitol e a combinação dos dois estresses.

-Caracterizar morfológico-tecidualmente a deposição de calose nas raízes de soja quando submetidas aos estresses por flg22, manitol e a combinação dos dois estresses.

-Avaliar a expressão de genes-chave da biossíntese de calose em plântulas de soja submetidas ao estresse por flg22, manitol e a combinação dos dois estresses.

-Analisar a atividade da enzima  $\beta$ -1,3-glucanase envolvida na resposta aos estresses por flg22 e manitol e a junção dos dois estresses.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Identificação dos genes da família GSL no genoma de soja

Para identificar e anotar os genes GSL, foi utilizado o genoma de soja (*Glycine max*) disponível no banco de dados *Phytozome v12.1* (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>). O perfil *Hidden Markov Model* (HMM) do domínio GSL, *Glucan\_synthase* (PF02364), disponível no banco de dados *Pfam* (<http://pfam.xfam.org/>), foi utilizado como *query* na pesquisa de Alinhamento Local Básico (BLASTp) (Altschul et al., 1997) para proteínas GSL. Todas as sequências contendo o domínio GSL foram previstas como candidatas.

Para verificar a integridade do domínio, as sequências foram analisadas no banco de dados *Simple Modular Architecture Research Tool 7.0* (SMART) (<https://smart.embl-heidelberg.de>) (Richmond, 2000), combinado com o *Pfam 33.1* (Mistry et al., 2021) e o banco de dados *NCBI Batch CD-Search* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>). As sequências sem o domínio foram desconsideradas das análises.

### 4.2. Análise da estrutura gênica e domínios proteicos conservados

A estrutura dos genes GSL foi construída com base na sequência de codificação, na fase de íntrons, no comprimento e no número de éxons, disponível no *Phytozome v12.1*, utilizando a ferramenta *Gene Structure Display Server*

(GSDS) 2.0 (Hu et al., 2015).

Para identificar os domínios proteicos conservados, foram utilizados os bancos de dados SMART e Pfam 33.1 (Mistry et al., 2021). O servidor TMHMM v.2.0 (cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/) foi utilizado para estimar o número de domínios helicoidais transmembrana (TMHs).

#### **4.3. Análise filogenética da família GSL**

As relações filogenéticas da família de genes GSL foram investigadas por meio do alinhamento de sequências múltiplas, construído utilizando o *ClustalW* (Li, 2003), de 75 proteínas GSL de *G. max*, *A. thaliana*, *Vitis vinifera*, *Citrus sinensis*, *Phaseolus vulgaris* e *Physcomitrella patens*, baixados do banco de dados Phytozome v12 .1.

A árvore filogenética de máxima verossimilhança para todas as sequências de proteínas GSL foi gerada de acordo com o modelo de melhor ajuste (modelo Jones-Taylor-Thornton +F+ I + G4), fornecido pelo ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017) do servidor IQ-TREE (Nguyen et al., 2015). O suporte estatístico para ramos internos foi estimado por análise de bootstrap (1000 réplicas). A árvore filogenética foi visualizada e editada no software FigTree v1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

#### **4.4. Duplicação gênica e estimativa das taxas de substituição sinônimas e não sinônimas dos genes GSL em soja**

As informações sintênicas de soja foram obtidas pelo banco de dados *Plant Genome Duplication Database* (PGDD) (Lee et al., 2017). O kit de ferramentas *Multiple Collinearity Scan* (MCScanX) (Wang et al., 2012) foi empregado para identificar os possíveis eventos de duplicação, analisar as relações de colinearidade e a taxa de substituição não sinônima ( $K_a$ ) e sinônima ( $K_s$ ) de pares de genes duplicados. Para cada par de genes duplicado, o tempo de duplicação (milhões de anos atrás, *Mya*) foi medido utilizando a taxa  $K_s$  de substituições  $\lambda$  por sítio sinônimo por ano, dada pela fórmula  $T = K_s / 2\lambda$  ( $\lambda = 6,5 \times 10^{-9}$ ).

#### 4.5. Análise de perfil de expressão de genes GSL em soja

Depois de identificados os genes envolvidos na biossíntese de calose, foram utilizadas 1.298 bibliotecas de transcriptoma de soja disponíveis no *Soybean Expression Atlas* (Brum Machado et al., 2020). As bibliotecas foram mapeadas aos genes GSL anotados anteriormente. A expressão dos genes foi medida em transcritos por milhão (TPM), transformados em log2 e exibidos em mapas de calor, usando a função `heatmap.2`, disponível no pacote `gplots` do R (Keen, 2018).

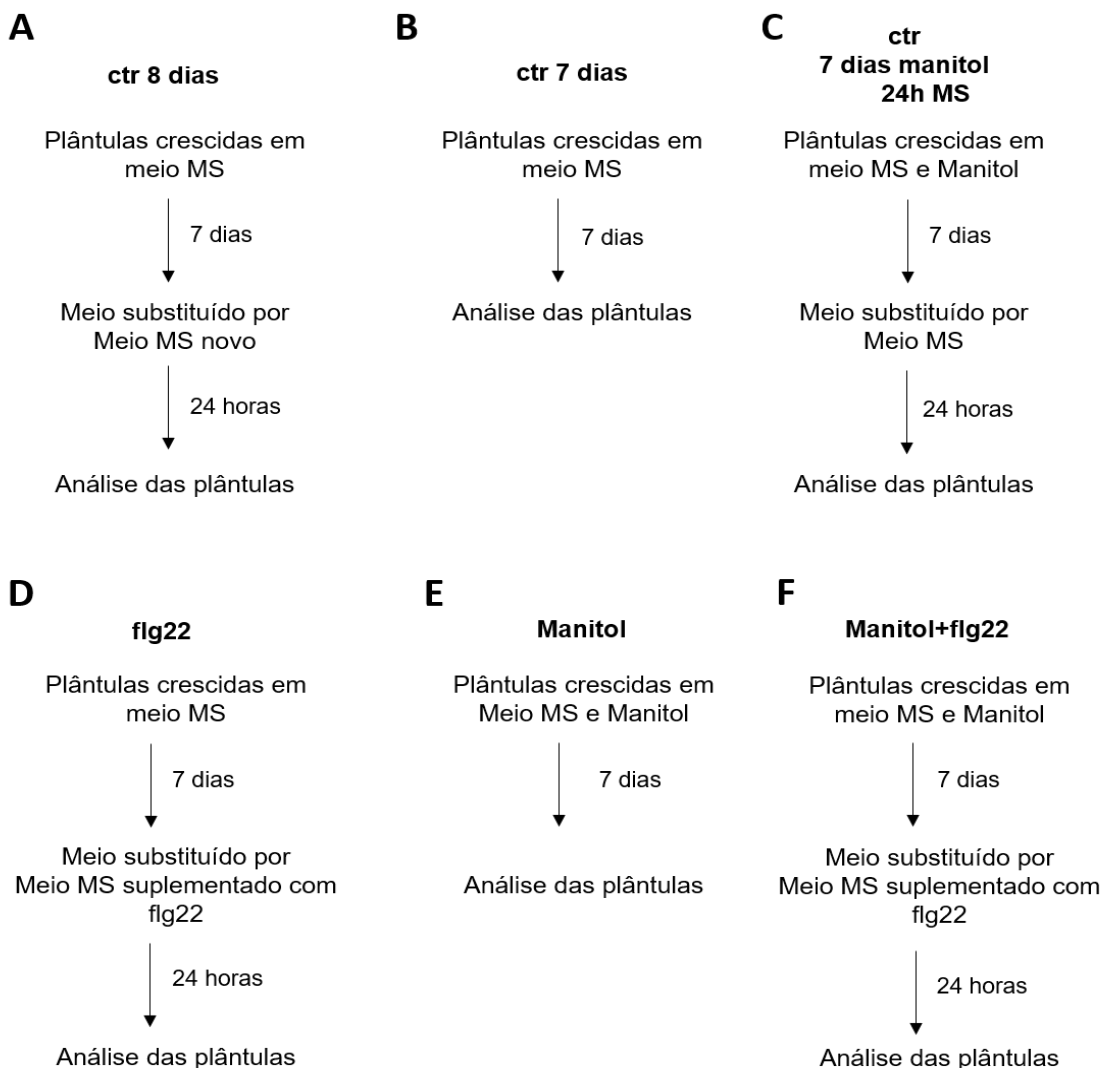
#### 4.6. Material vegetal e condições de crescimento

##### 4.6.1. Tratamento com flg22

Sementes de soja (cultivar BRS 284), cedidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, foram esterilizadas superficialmente em hipoclorito de sódio a 2% durante 1 minuto. Logo após, as sementes foram lavadas em água destilada estéril (três vezes). Em seguida, as sementes foram cultivadas em tubos estéreis contendo 20 ml de meio basal sólido Murashige e Skoog (MS) com vitaminas (PhytoTechnology Laboratories) (pH 5,8). Os tubos foram lacrados com fita microporosa e acomodados em incubadora bioquímica de demanda de oxigênio (BOD) a 28 ° C com fotoperíodo de 12/12 h e intensidade de luz de 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  por sete dias (Figura 7).

Após sete dias de crescimento, o meio MS foi substituído por 20 mL de meio líquido MS fresco suplementado com o peptídeo flg22 (GenScript, Piscataway, NJ, U.S.A.) (Felix et al., 1999) na concentração final de 1  $\mu\text{M}$  (Figura 7D). Para o tratamento controle, o meio MS foi suplementado com água ultrapura (Figura 7A). O tratamento com Flg22 foi continuado por 24 horas. Plântulas controle foram mantidas em meio MS pelo mesmo tempo. Ao final das 24 h, as plântulas tiveram suas raízes seccionadas para análises posteriores. Para a análise foliar, as plântulas com 7 dias de idade, cultivadas conforme descrito anteriormente, tiveram suas folhas seccionadas e imersas em 5 mL de água contendo Tween20 a 0,05% e flg22 na concentração final de 1  $\mu\text{M}$ . Para o tratamento controle, foi utilizada água ultrapura. Após 24 horas de tratamento, as folhas foram seccionadas para análises posteriores.





**Figura 7.** Modelo esquemático detalhando as condições de crescimento das plântulas de soja utilizadas para análise. (A) Detalhes do tratamento das plântulas controle, sem nenhuma condição estressante. (B) Detalhes do tratamento das plântulas controle, crescidas durante 7 dias no meio com manitol, porém sem flg22. (C) Detalhes do tratamento das plântulas com flg22. (D) Detalhes do tratamento das plântulas tratadas durante 7 dias no meio com manitol e posteriormente 24h com flg22.

#### 4.6.2. Tratamento com manitol

Para o tratamento com manitol, as sementes de soja (cultivar BRS 284), cedidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, foram esterilizadas como descrito anteriormente. Em seguida, as sementes foram cultivadas em tubos estéreis contendo 20 ml de meio basal sólido Murashige e Skoog (MS) com vitaminas (PhytoTechnology Laboratories) (pH 5,8) e 200mM de manitol (≥97%,

Sigma-Aldrich) (Figura 7E). Para o tratamento controle, as plantas foram cultivadas em meio MS sem a presença de manitol (Figura 7B). Os tubos foram lacrados com fita microporosa e acomodados em incubadora bioquímica de demanda de oxigênio (BOD) a 28 ° C com fotoperíodo de 12/12 h e intensidade de luz de 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  por sete dias. Após sete dias, as plântulas tiveram suas raízes e folhas seccionadas para as análises posteriores.

#### **4.6.3. Tratamento com manitol e flg22**

Para o tratamento com manitol e flg22, as sementes de soja (cultivar BRS 284), cedidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, foram esterilizadas como descrito anteriormente. Posteriormente, as sementes foram cultivadas em tubos estéreis contendo 20 ml de meio MS e 200mM de manitol ( $\geq 97\%$ , Sigma-Aldrich). Os tubos foram lacrados com fita microporosa e acomodados em incubadora bioquímica de demanda de oxigênio (BOD) a 28 ° C com fotoperíodo de 12/12 h e intensidade de luz de 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  por sete dias. Após sete dias de tratamento com manitol, o meio MS com manitol foi substituído por 20 mL de meio líquido MS fresco suplementado com o peptídeo flg22 na concentração final de 1  $\mu\text{M}$  (Figura 7F). Para o tratamento controle, o meio MS foi suplementado com água ultrapura (Figura 7C). O tratamento com a presença de flg22 foi continuado por 24 horas. Transcorridas as 24 horas, as plântulas tiveram suas raízes e folhas seccionadas para futuras análises.

#### **4.7. Processamento das sementes de soja e observação microscópica**

Segmentos radiculares ( $\pm 5 \text{ mm}$ ) das plântulas de todos os tratamentos descritos anteriormente foram fixados em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1964) por 24 h. Após a fixação, os segmentos foram lavados em tampão cacodilato de sódio 0,05 M (pH 7,2) e desidratados em série alcoólica de 10 a 100% durante 1h em cada série. Posteriormente, os segmentos foram infiltrados com historesina (Historesina Leica) e incluídos em resina pura. Os blocos foram cortados em seções de 5  $\mu\text{m}$ , usando um micrótomo rotativo (RM 2135, Leica).

As seções transversais foram aderidas a lâminas histológicas e coradas com azul de anilina 0,1% em tampão de fosfato de potássio 150 mM (pH 9,5) por

10 min, lavadas com água destilada e examinadas em um microscópio DIC (Axioplan Imager.A2, Zeiss), equipado com um filtro fluorescente DAPI\_BFP (comprimento de onda de excitação 390 nm, emissão 461 nm). As imagens foram fotografadas com objetiva de 20X e os dados, analisados com o software interativo Axiovision versão 4.0 (Zeiss).

#### **4.8. Ensaio de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e concentração relativa de ROS**

O ensaio de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a concentração relativa de espécies reativas de oxigênio (ROS) foram feitos apenas para as plântulas tratadas com flg22. Após o crescimento das plântulas por sete dias, conforme descrito anteriormente, o meio MS foi substituído por um novo suplementado com flg22. Após 30 minutos de tratamento, as plântulas tiveram suas raízes seccionadas. Para as folhas, após o crescimento das mudas por sete dias, as mudas tiveram suas folhas seccionadas e colocadas em uma placa de Petri contendo água estéril, 0,05% tween20 e 1µM flg22 por 30 min. Folhas e raízes foram lavadas com água destilada estéril e imersas em solução de 0,5% de 3' diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB) em tampão MES 10 mM (pH 6,5) e infiltradas sob vácuo por 10 minutos. Em seguida, as folhas e as raízes foram incubadas por 8 horas na ausência de luz. Posteriormente, as folhas foram colocadas sob a luz até o aparecimento de manchas marrons características. Para o clareamento, as folhas foram fervidas em solução de etanol 80% (3:1) de ácido acético.

A concentração dos níveis de ROS foi determinada medindo a fluorescência do diacetato de 2', 7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich, Alemanha) conforme descrito por Kong et al. (2013) com pequenas modificações. Para isso, segmentos de raízes e folhas (3 mg) tratados por 30 min com flg22 foram seccionados e lavados em tampão salino tamponado com fosfato (PBS) pH 7 e, em seguida, transferidos para uma placa de ELISA contendo 200 µl de tampão fresco e 10 µM de DCFH-DA. A placa foi incubada por 20 min a 25 ° C e, em seguida, a fluorescência foi lida em espectrofotômetro com comprimento de onda de excitação de 485 nm e emissão de 528 nm. A concentração relativa de ROS foi expressa como fluorescência relativa de DCF por g de tecido fresco (g<sup>-1</sup> FT).

#### 4.9. Extração e determinação de calose

O conteúdo de calose foi extraído e determinado conforme descrito por Voigt et al., (2006) com pequenas modificações. A parte aérea e as raízes de todos os tratamentos descritos anteriormente foram lavadas em água desionizada. Em seguida, os tecidos foram macerados em pilão contendo nitrogênio líquido. Os tecidos macerados, 50 mg, foram embebidos em etanol 96% e centrifugados a 28 ° C a 12.000 g por 20 min. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet, dissolvido em 200 µl de NaOH 1 M e incubado a 80 ° C por 30 min. Após a incubação, o material foi centrifugado em temperatura ambiente a 12.000 g por 20 min. O sobrenadante foi usado para a determinação do conteúdo de calose.

A concentração de calose foi determinada pela adição de 50 µl do produto de extração em 200 µl de *mix* de azul de anilina (Shedletzky et al., 1997) pipetados em uma placa de microtitulação. A placa foi incubada a 50 °C por 30 min e, subsequentemente, a temperatura ambiente por 30 min sob condições de agitação. Posteriormente, a fluorescência foi quantificada em um leitor de placas, Synergy™ HT, usando o comprimento de onda de excitação de 360 nm e emissão de 460 nm. Para cada amostra, as intensidades de fluorescência na ausência do produto de extração (autofluorescência) foram subtraídas. Todas as medidas foram feitas três vezes com pelo menos três repetições cada. A concentração de calose foi expressa em fluorescência relativa de azul de anilina por mg de tecido.

#### 4.10. Ensaio de atividade da enzima $\beta$ -1,3-glucanase

A atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase foi determinada, para todos os tratamentos, parte aérea e raízes, utilizando laminarina oriunda da *Laminaria digitata* (Sigma-Aldrich) (Ramada et al., 2010) de acordo com o método descrito por Fink et al. (1988). Para isso, as amostras de parte aérea e raiz foram maceradas em nitrogênio líquido. Após a maceração, foram adicionados 10 mg de cada amostra em 500 µL de tampão fosfato de sódio monobásico (100mM) pH 7,6. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas durante 1 h em vórtex a 4 °C. Depois de homogeneizadas, as amostras foram centrifugadas (10.000 rpm) durante 10 minutos a -4 °C. Em seguida, o sobrenadante de cada amostra foi coletado e

armazenado em microtubos e o extrato proteico, quantificado em espectrofotômetro *NanoDrop*<sup>™</sup> 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific).

Para o ensaio da atividade enzimática, foram adicionados a tubos de ensaio 30 µg de extrato proteico e 125 µl de laminarina (2 mg l<sup>-1</sup> em tampão de acetato de sódio 50 mM, pH 5,0) ajustada para um volume final de 500 µl com tampão de acetato de sódio 50 mM pH 5,0. Em seguida, os tubos de ensaio foram incubados a 37 °C por 12 horas. Após a incubação, 500 µl de reagente de cobre foram adicionados e fervidos por 10 minutos. Após o resfriamento à temperatura ambiente, 1000 µl de reagente arsenomolibdato foram adicionados (Nelson, 1944). As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 500 nm. Para determinar o controle (branco) da reação, os extratos foram substituídos por tampão de ensaio. A atividade da β-1,3-glucanase foi definida como unidade de atividade por miligrama de extrato proteico (UA/mg<sup>-1</sup> PE).

#### **4.11. Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR quantitativa em tempo real**

O RNA total foi extraído das amostras de raízes de todos os tratamentos descritos anteriormente (com flg22, manitol, mannitol e flg22) e seus respectivos tratamentos controle, utilizando o reagente *TRIzol*<sup>®</sup> (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A concentração e a integridade do RNA extraído foram estimadas utilizando um espectrofotômetro *NanoDrop*<sup>™</sup> 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific). Amostras de RNA com razões 260/280 e 260/230 de 1,8–2,0 foram usadas para os experimentos posteriores.

A síntese de cDNA foi feita utilizando o kit de síntese *GoScript*<sup>™</sup> *Reverse Transcription System* (Promega, Madison, WI, EUA), utilizando 5 µg de RNA total e de acordo com o protocolo do fabricante. Os iniciadores (*primers*) utilizados (Tabela S1) foram construídos usando a ferramenta *Oligo Analyzer* da *Integrated DNA Technologies* (IDT). O PCR quantitativo (qPCR) foi executado usando o *StepOne Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). As amplificações foram feitas em uma placa de 48 poços, usando um volume final de 15 µl, contendo 0,75 µl (0,5 µM) de cada *primer* direto e reverso, 7,5 de *SYBR Green*, 3 µl de cDNA e 3 µl de água ultrapura.

O gene modificador semelhante à ubiquitina (SUMO) e o S-adenosylmethionine synthase 4 (METK4) foram utilizados como controle interno. Cada par de *primer* foi avaliado por meio da análise da curva de *melting*. A expressão relativa foi definida usando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak e Schmittgen 2001).

#### **4.12. Análises estatísticas**

Todos os dados foram obtidos de experimentos feitos em triplicata. Um teste t não pareado foi feito para determinar as diferenças estatisticamente significativas na concentração de calose, atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase e análise quantitativa da expressão gênica. Valores de  $p < 0,05$  (\*  $p < 0,05$ ) e  $< 0,01$  (\*  $p < 0,01$ ) foram considerados estatisticamente significativos. Também foram feitas análise de variância (ANOVA) e teste Tukey HSD, com nível de significância de 95%. As análises estatísticas foram feitas usando R versão 3.6 e GraphPad Prism suite v8.0.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Identificação dos genes GSL no genoma de soja

Para determinar quais genes estão relacionados à deposição de calose no genoma de soja, fizemos a identificação de todos os genes responsáveis pela biossíntese de calose. Como resultado, encontramos um total de 23 genes contendo o domínio GSL (Tabela 1). Com base na localização cromossômica, os genes foram nomeados como GmGSL1 a GmGSL23.

Os genes identificados têm tamanho total de 5.203 a 84.472 pares de bases. O número de éxons varia de 1 a 53. O comprimento total da proteína variou de 813 a 1.965 aminoácidos. Em relação às propriedades bioquímicas, as proteínas GmGSL têm de 5 a 17 TMHs. Os valores de pI variaram de 7,99 a 9,23.

**Tabela 1.** Resumo dos membros da família de genes GSL identificados no genoma de soja.

Gene ID	Anotação	Tamanho do gene (bp)	Número de éxons	Número de transcritos	Posição genômica	Tamanho da proteína (aa)	pI	Número de TMH
Glyma.04G192300	<i>GmGSL1</i>	58770	50	1	-	1899	9.14	16
Glyma.04G213100	<i>GmGSL2</i>	14410	42	1	+	1951	9.19	14
Glyma.05G191600	<i>GmGSL3</i>	14934	42	1	-	1958	8.95	17
Glyma.06G173500	<i>GmGSL4</i>	50841	45	2	+	1607	8.75	16
Glyma.06G292500	<i>GmGSL5</i>	4936	2	3	-	815	8.86	7
Glyma.08G156800	<i>GmGSL6</i>	14773	42	1	-	1904	9.14	15
Glyma.08G157400	<i>GmGSL7</i>	30597	47	1	-	1947	9.2	16
Glyma.08G308200	<i>GmGSL8</i>	36555	43	3	-	1867	8.06	14
Glyma.08G308700	<i>GmGSL9</i>	24754	42	3	+	1921	8.1	15
Glyma.08G361500	<i>GmGSL10</i>	23954	43	2	-	1958	9.15	17
Glyma.10G295100	<i>GmGSL11</i>	43560	53	3	+	1906	8.37	16
Glyma.12G113300	<i>GmGSL12</i>	5203	4	1	+	826	9.6	11
Glyma.13G239300	<i>GmGSL13</i>	5830	2	1	-	1446	9.23	16
Glyma.13G261000	<i>GmGSL14</i>	15905	41	1	+	1965	8.88	14
Glyma.13G297100	<i>GmGSL15</i>	5705	2	1	-	1743	8.95	14
Glyma.15G074000	<i>GmGSL16</i>	6783	3	6	+	1799	9.23	16
Glyma.15G245800	<i>GmGSL17</i>	22453	41	2	-	1965	8.88	14
Glyma.15G268800	<i>GmGSL18</i>	19398	44	6	+	1948	9.15	16
Glyma.18G107900	<i>GmGSL19</i>	40293	45	3	+	1918	8.57	15
Glyma.18G109100	<i>GmGSL20</i>	84472	44	4	+	1958	7.99	14
Glyma.18G300200	<i>GmGSL21</i>	31666	42	2	+	1958	9.18	17
Glyma.20G244800	<i>GmGSL22</i>	11718	18	1	+	813	9.21	5
Glyma.20G244900	<i>GmGSL23</i>	58639	53	1	+	1905	8.57	16

## 5.2. Análise estrutural e relações filogenéticas da família GSL em soja

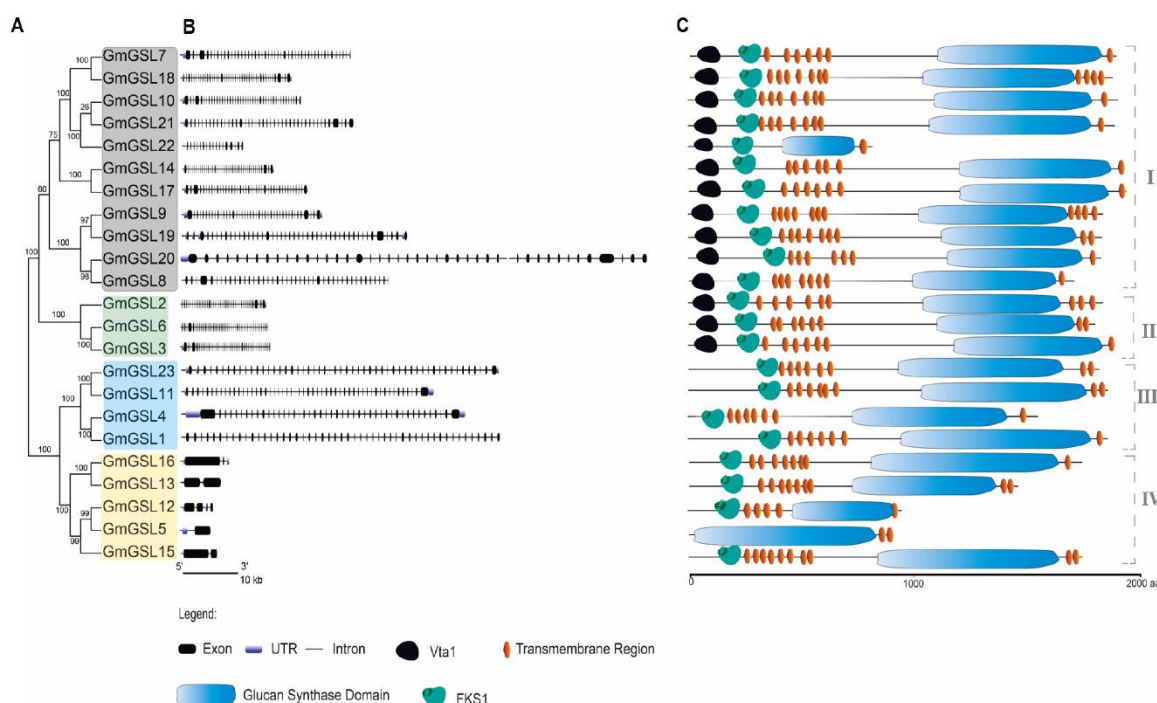
Para compreender o processo evolutivo e a diversidade estrutural dos genes e proteínas GmGSLs, analisamos os padrões éxon-íntron e os domínios proteicos (Figura 8). Com base nas relações filogenéticas e nos padrões estruturais dos genes e proteínas, os GmGSL podem ser divididos em quatro grupos (I-IV) (Figura 8A). Esses grupos de genes podem ser diferenciados pelo número de éxons em sua estrutura (Figura 8B) e por seu padrão de domínios proteicos (Figura 8C).

Os genes GmGSL do grupo II são menores que os genes GmGSL dos grupos I e III, mas têm, em média, o mesmo número de éxons, demonstrando que o número de éxons não está relacionado ao tamanho do gene. O grupo IV dos genes GmGSL se distingue claramente dos demais pelo número de éxons em sua



estrutura, tendo no máximo quatro éxons, enquanto os demais genes GmGSL têm, em média, 42 éxons.

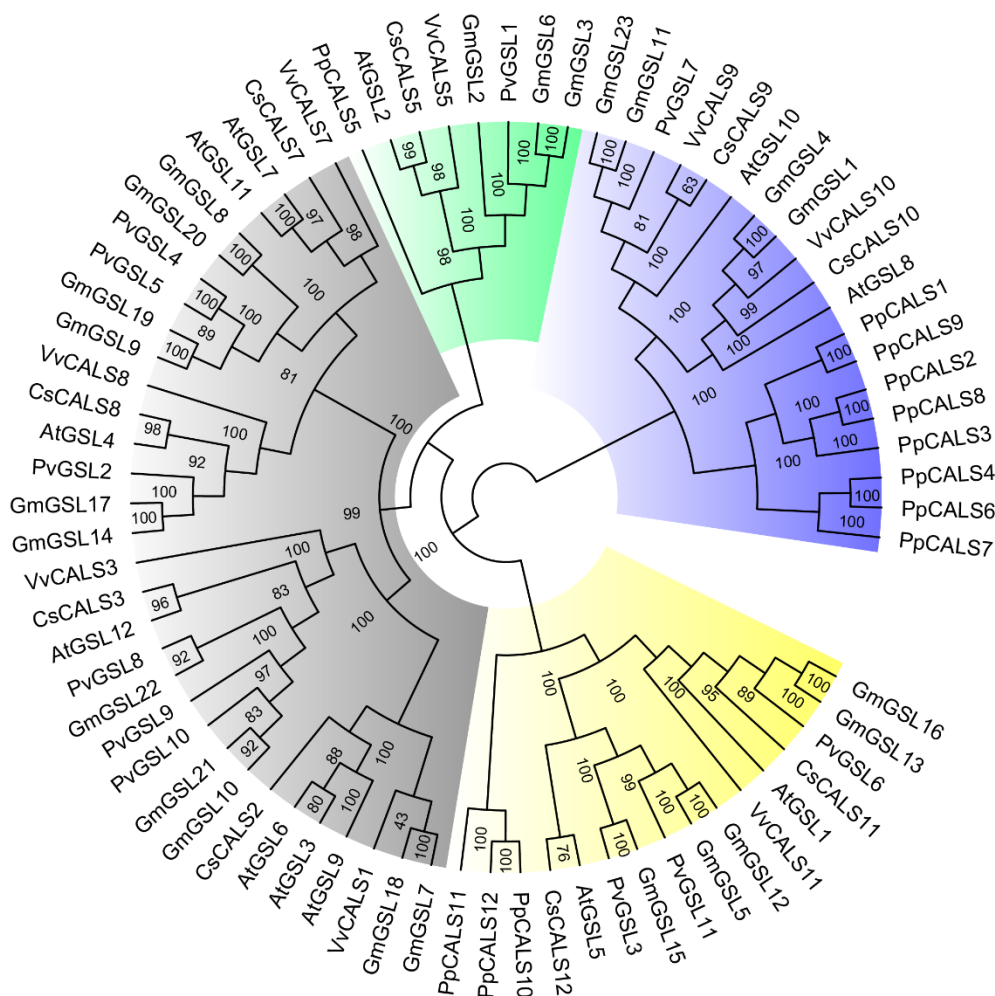
Todas as proteínas codificadas pelos genes GmGSL têm o domínio completo do tipo Glucan-sintase e o domínio FKS1 em sua estrutura (Figura 8C). No entanto, apenas as proteínas GmGSL dos grupos I e II têm o domínio Vta1. Além disso, todas as proteínas GmGSL têm uma transmembrana helicoidal (TMH) na região N-terminal, exceto o GmGSL22, que tem TMH apenas na região C-terminal.



**Figura 8.** Relação filogenética, estrutura gênica e arquitetura de domínio dos GmGSL em soja. (A) Relação filogenética dos GSL identificados em soja. (B) Estrutura gênica das 23 sequências de GSL em soja. Os CDSs são representados em retângulos pretos e os introns, em linhas pretas. O comprimento de CDSs e íntrons pode ser estimado usando a escala mostrada abaixo. (C) Representação esquemática da arquitetura do domínio das proteínas GSL. O tamanho das proteínas pode ser estimado usando a escala mostrada abaixo.

Para obter informações sobre a evolução dos GmGSL, foi construída uma árvore filogenética utilizando o alinhamento de 75 proteínas GSL identificadas em soja, *A. thaliana* (Richmond e Somerville, 2000; Verma e Hong, 2001a), *C. sinensis* (Granato et al., 2019), *P. patens* (Schuette et al., 2009), *V. vinifera* (Yu et al., 2016)

e *Phaseolus vulgaris* (Tabela S2) (Figura 9). A topologia em árvore confirmou a classificação dos genes GmGSL em quatro grupos propostos anteriormente. O Grupo I (cinza) foi o maior, agrupando 26 proteínas GSL. O grupo II (verde) foi o menor, tendo três proteínas de soja e apenas uma de cada espécie analisada na árvore. Grupo III (azul) agrupou o maior número de proteínas GSL de *P. patens* e formaram um *cluster*. As proteínas agrupadas no grupo IV foram as que têm poucos éxons em seus genes.



**Figura 9.** Relação filogenética dos genes GSL em soja, *Arabidopsis*, *Citrus sinensis*, *Vitis vinifera*, *Physcomitrella patens* e *Phaseolus vulgaris*. A árvore filogenética foi conduzida usando o servidor web IQ-Tree pelo método de Máxima Verossimilhança. O valor nas ramificações representa valores de bootstrap de 1000 réplicas. Diferentes grupos da família GSL são divididos em cores diferentes. Cinza, verde, azul e amarelo são os grupos I, II, III e IV, respectivamente.

A maioria dos genes GSL com organização gênica semelhante compartilha uma relação filogenética, sugerindo possíveis eventos de duplicação gênica nesta família de genes. Pelos altos valores de *bootstrap* nos ramos da árvore, é possível inferir que existem proteínas GSL, possivelmente homólogas, que podem apresentar padrões funcionais semelhantes. Além disso, os pares de proteínas localizados em nós terminais podem ser possíveis pares parálogos ou ortólogos.

### 5.3. Duplicação dos genes GmGSL

Para entender a duplicação e a expansão dos genes GmGSL, identificamos os eventos de duplicação dos GSLs no genoma da soja. Dos 23 GmGSL identificados, 20 (87%) foram duplicados via WGD/eventos segmentares, exceto para os genes GmGSL4 e GmGSL19, que sofreram duplicação dispersa, e o gene GmGSL9, que passou por duplicação proximal (Tabela S3). Além disso, por análise filogenética, para cada gene de *A. thaliana* e *P. vulgaris* existem pelo menos dois genes GSL de soja distribuídos em grupos (Figura 9). Esses dados indicam que a duplicação segmentar / WGD foi um mecanismo importante para a expansão dos genes GSL no genoma da soja.

Para mensurar a divergência entre os GmGSL, analisamos as relações colineares e o tempo de duplicação dos genes. Descobrimos que dezesseis pares parálogos (Tabela 2) têm uma relação filogenética próxima (Figura 9). Entre os pares parálogos, GmGSL5 e GmGSL13 foram os que apresentaram as relações mais colineares entre todos os pares. Os valores de razão de substituições não sinônimos para sinônimos ( $Ka/Ks$ ) podem ser usados como parâmetros para estimar a pressão de seleção. Todos os valores da razão  $Ka/Ks$  foram  $<1$ , sugerindo que os parálogos GSL estão sob purificação ou seleção estabilizadora.

Para estimar o tempo de separação dos pares de genes parálogos, usamos o valor de  $Ks$ . O tempo de divergência dos genes GmGSL variou de 7,26 a 190,33 Mya, com cinco genes com tempo de divergência menor que 10 Mya e dois com tempo de divergência maior que 100 Mya.

**Tabela 2.** Análise de colinearidade da duplicação dos genes *GmGSL*.

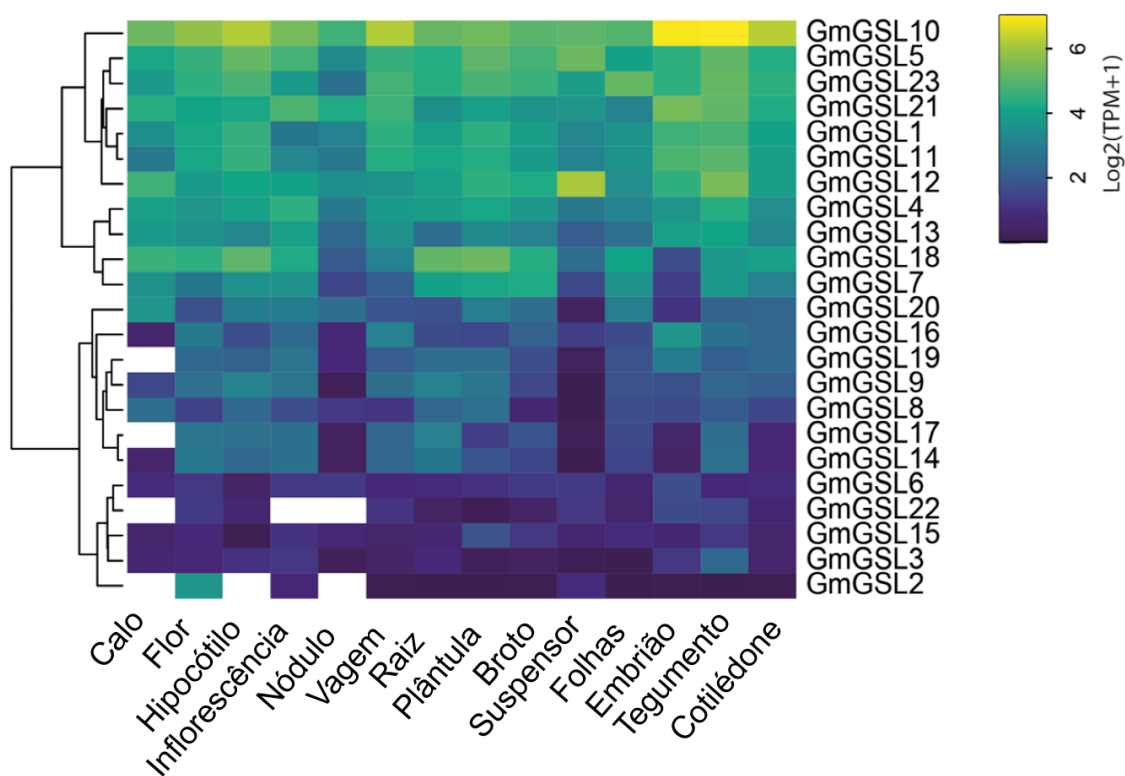
<b>Gene 1</b>	<b>Gene 2</b>	<b>Ka</b>	<b>Ks</b>	<b>Ka/Ks</b>	<b>Tempo de Duplicação (Mya)</b>
GmGSL2	GmGSL3	0.08	0.46	0.17	38
GmGSL2	GmGSL6	0.09	0.47	0.18	38.39
GmGSL5	GmGSL12	0.54	0.77	0.71	62.87
GmGSL5	GmGSL15	0.09	0.35	0.26	29.07
GmGSL5	GmGSL13	0.24	0.92	0.27	75.08
GmGSL5	GmGSL16	0.19	0.72	0.26	59.28
GmGSL7	GmGSL18	0.02	0.09	0.19	7.26
GmGSL8	GmGSL20	0.11	0.18	0.62	14.49
GmGSL10	GmGSL21	0.01	0.09	0.09	7.57
GmGSL11	GmGSL23	0.02	0.1	0.19	8.14
GmGSL12	GmGSL15	0.21	0.45	0.45	37.19
GmGSL12	GmGSL13	0.27	0.75	0.36	61.87
GmGSL13	GmGSL15	0.22	1.48	0.15	121.31
GmGSL13	GmGSL16	0.02	0.11	0.2	8.94
GmGSL14	GmGSL17	0.01	0.11	0.11	8.62
GmGSL15	GmGSL16	0.23	2.32	0.1	190.33

#### 5.4. Perfil geral de expressão dos genes *GmGSL*

Para investigar perfis de expressão de tecidos específicos de genes *GmGSL*, usamos 1.298 bibliotecas de RNA-Seq de 14 tecidos de soja diferentes (Figura 10). Ao agrupar o padrão de expressão dos genes *GmGSL*, verificamos dois grupos distintos. Um grupo que consiste em *GmGSL10*, *GmGSL5*, *GmGSL23*, *GmGSL21*, *GmGSL1*, *GmGSL11*, *GmGSL12*, *GmGSL4*, *GmGSL13*, *GmGSL18* e *GmGSL7* mostrou alta expressão na maioria dos tecidos em comparação com os outros genes. A maioria dos genes dos grupos I-IV tinha padrões de expressão semelhantes. Por exemplo, os genes do grupo II tiveram baixa expressão na maioria dos tecidos, enquanto os genes do grupo III tiveram alta expressão. O gene *GmGSL12* apresentou alta expressão, principalmente no suspensor, podendo desempenhar importante papel neste tipo de tecido (Figura 10). Da mesma forma, o gene *GmGSL10* apresentou alta expressão na maioria dos tecidos analisados, principalmente nos tecidos das sementes. Por outro lado, *GmGSL2*, *GmGSL3*,

GmGSL15, GmGSL22 e GmGSL6 mostraram baixa expressão na maioria dos tecidos analisados (Figura 10).

A maioria dos pares parálogos mostrou padrões de expressão semelhantes. Por exemplo, os pares parálogos GmGSL2-GmGSL3, GmGSL5-GmGSL12, GmGSL14-GmGSL17, GmGSL11-GmGSL23 e GmGSL8-GmGSL20 mostraram padrões de expressão semelhantes, o que reforça a ideia de que esses genes estão sob pressão negativa e mantiveram suas funções ao longo da evolução. Por outro lado, os pares de parálogos GmGSL5-GmGSL15, GmGSL5-GmGSL16, GmGSL12-GmGSL15 e GmGSL13-GmGSL15 apresentaram padrões de expressão distintos. vários pares duplicados.



**Figura 10.** Perfis de expressão dos genes GmGSL em diferentes tecidos e órgãos de soja. As cores amarela e azul indicam alta e baixa expressão, respectivamente.

Para verificar a regulação dos genes GmGSL em estresses bióticos, analisamos o perfil de expressão dos genes GmGSL em folhas de soja em resposta à solução de MAMPs (Figura S1) e plântulas de soja após infecção precoce e tardia por *Fusarium sp.* (Figura S2), usando bibliotecas de RNA-seq publicamente

disponíveis. O grupo de genes mais expresso nos tecidos analisados anteriormente também obteve maior expressão sob estresses bióticos. Os genes GmGSL5, GmGSL18 e GmGSL23 foram induzidos pela solução de MAMPs, sugerindo um papel importante nas folhas após o ataque do patogênico. O gene GmGSL10, apesar de sua alta expressão, não foi diferentemente regulado pelo tratamento. Em plântulas de soja infectadas por *Fusarium sp.*, os genes GmGSL10, GmGSL18 e GmGSL23 tiveram sua expressão modulada, sugerindo que podem desempenhar uma função relevante na resposta de defesa da plântula ao ataque por *Fusarium sp.*

Para analisar a regulação dos genes GmGSL em estresses abióticos, analisamos o perfil de expressão dos genes GmGSL em folhas de soja em resposta ao déficit hídrico (Figura S3), utilizando bibliotecas de RNA-seq disponíveis publicamente. Os genes GmGSL23, GmGSL18, GmGSL7, GmGSL12 e GmGSL5 foram regulados com o tratamento e possivelmente desempenham papéis importantes na resposta de folhas de soja ao déficit hídrico.

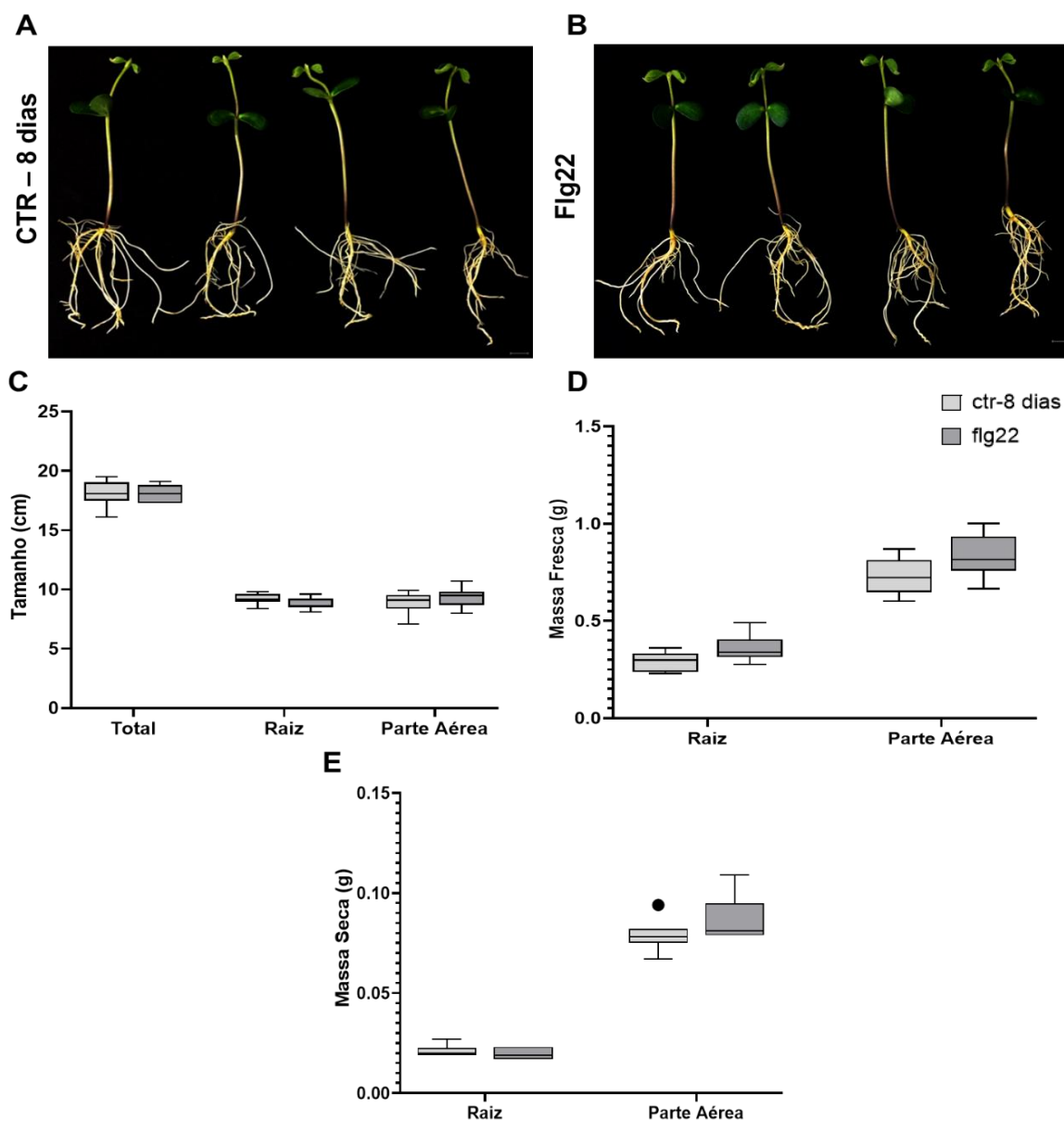
### **5.5. Flg22 induz a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e calose em plântulas de soja**

Para analisar as possíveis mudanças fenotípicas que a flg22 é capaz de desencadear em plântulas de soja, fizemos a análise do tamanho, e da massa fresca e seca das plântulas (Figura 11). Os parâmetros fenotípicos analisados não diferiram do tratamento controle. Esses resultados indicam que o tratamento em plântulas de soja com flg22 durante 24h não afeta fenotipicamente seu crescimento.

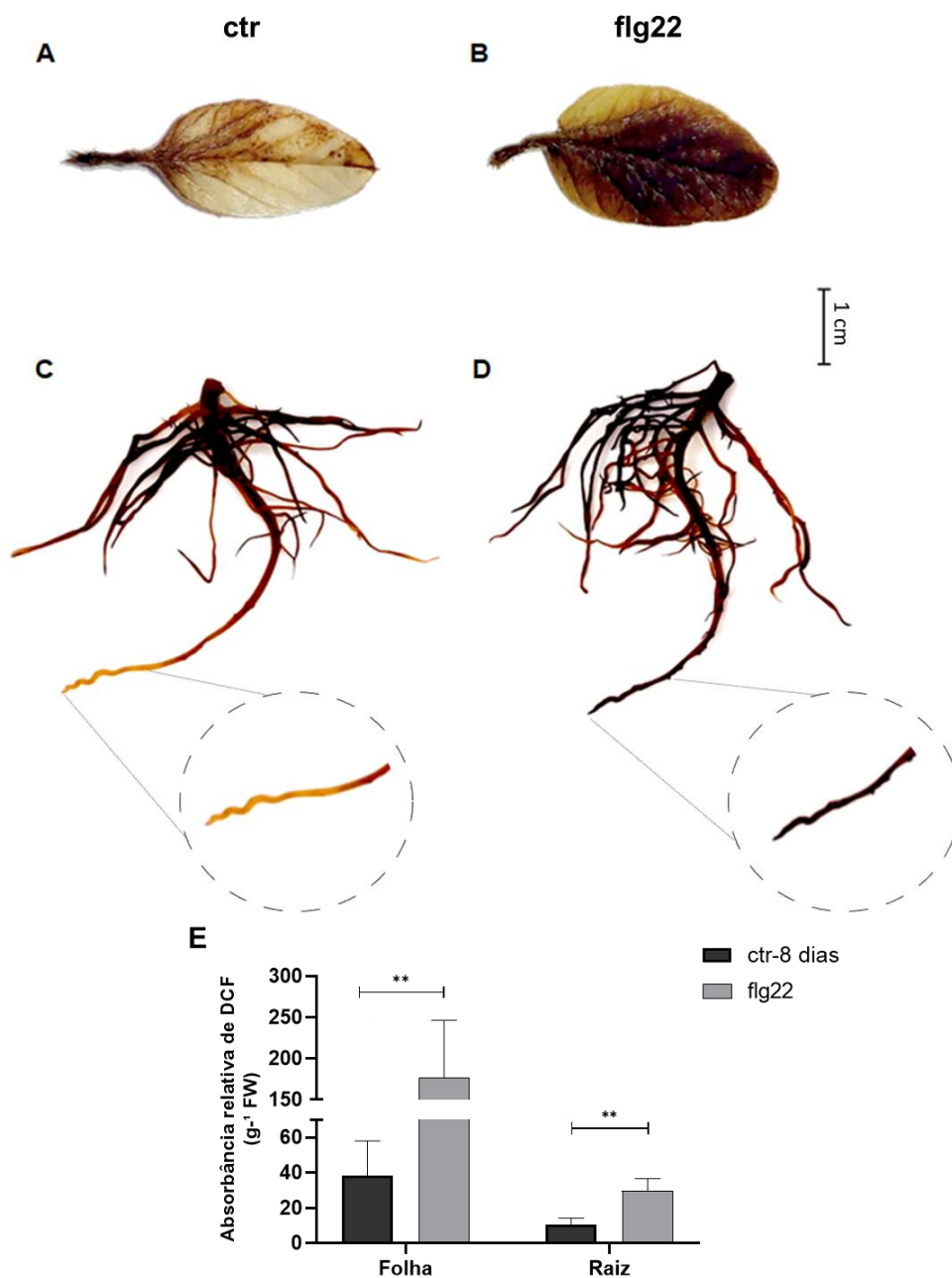
Para investigar se o tratamento com flg22 induziu acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) em folhas e raízes de soja, utilizamos o método histoquímico com DAB e a medida da fluorescência do diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA). A coloração DAB mostrou que o tratamento com flg22 causou uma rápida disseminação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas folhas e raízes das plântulas de soja (Figura 12). Nas folhas tratadas com flg22 por 30 min (Figura 12B), observou-se aumento das manchas marrons em relação às folhas não tratadas com flg22 (Figura 12A). O mesmo foi observado para as raízes tratadas com flg22 (Figura 12D) em comparação com as não tratadas (Figura 12C).

Além disso, verificou-se que a concentração de EROs é maior tanto nas folhas quanto nas raízes tratadas com flg22 (Figura 12E). Esses dados mostram

que o tratamento com flg22 pode desencadear o acúmulo de EROs tanto nas folhas quanto nas raízes da soja.



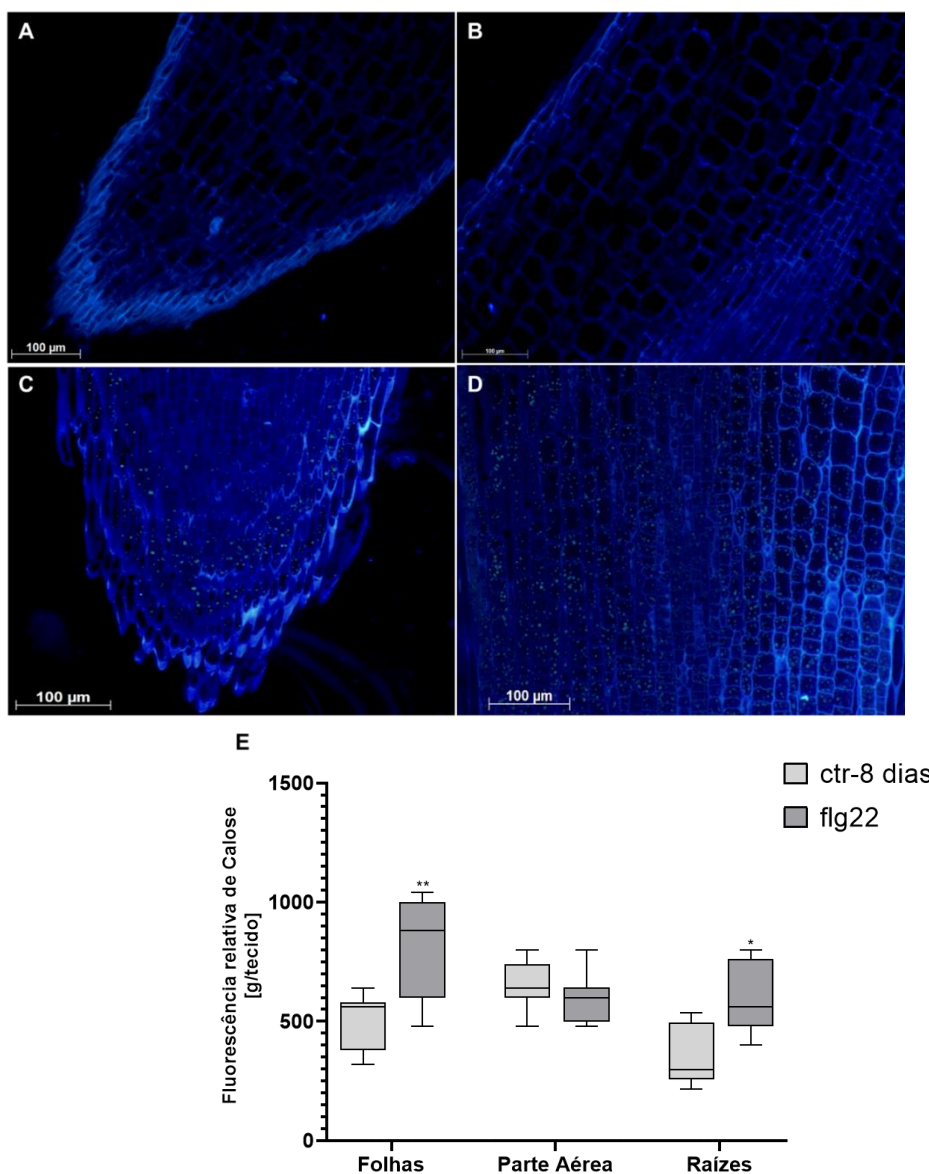
**Figura 11.** Análises fenotípicas das plântulas tratadas com flg22. (A) Plântulas controle. (B) Plântulas tratadas com flg22. (C) Tamanho das plântulas. (D) Massa fresca das plântulas. (E) Massa seca das plântulas. Barra de escala em 1cm.



**Figura 12.** Avaliação dos níveis de EROs e detecção histoquímica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em folhas e raízes de plântulas de soja. (A) Folhas de controle tratadas com água destilada. (B) Folhas tratadas com flg22 por 30 min. (C) Raízes das plântulas controle. (D) Raízes das plântulas tratadas com flg22 por 30 min. (E) Intensidade relativa de fluorescência DCFH-DA em folhas e raízes de soja tratadas com flg22 por 30 min. \*\*Indica a diferença significativa em relação ao controle conforme determinado pelo teste t de Student ( $p < 0,01$ ). Os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes com resultados semelhantes. Barra de escala em 1cm.



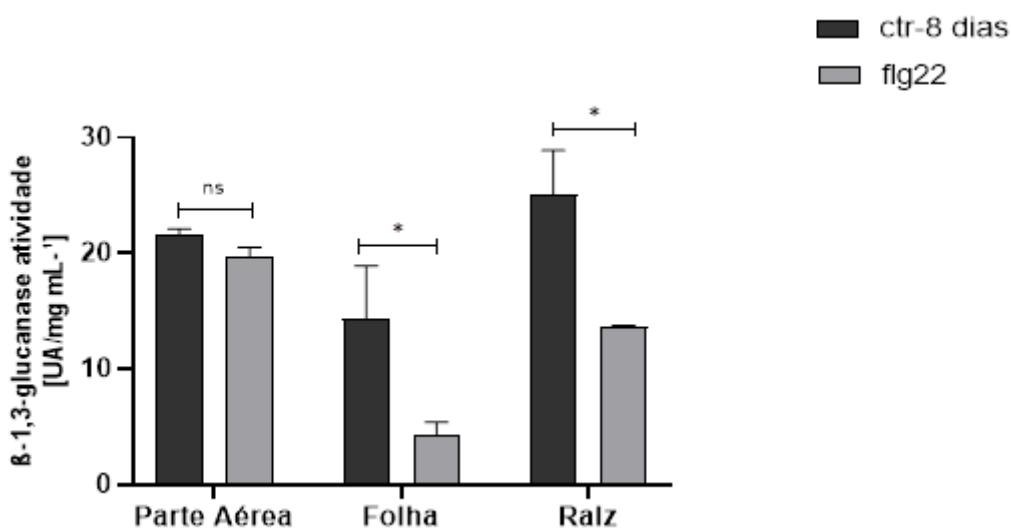
Para revelar a relação entre a indução de EROs por flg22 e a deposição de calose, as raízes, folhas e parte aérea tratadas com flg22 tiveram o teor total de calose quantificado (Figura 13).



**Figura 13.** Deposição de calose em raízes de soja tratadas com flg22. (A) Corte longitudinal da ponta da raiz controle. (B) Região central das raízes controle. (C) Corte longitudinal da ponta da raiz tratada com flg22. (D) Região média das raízes tratadas com flg22. (E) Conteúdo de calose das folhas, raízes e parte aérea tratadas e não tratadas com flg22. Experimentos repetidos tiveram resultados semelhantes. As imagens selecionadas são representativas para a deposição de calose em raízes de plântulas de soja tratadas com flg22 por 24 h após examinar pelo menos 10 seções para cada região de tecido. \*Indica a diferença significativa em relação ao controle conforme determinado pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ). \*\*Indica a diferença significativa em relação ao controle conforme determinado pelo teste t de Student ( $p < 0,01$ ). Barra de escala em 100 μm. Objetiva de 20X.

A análise da deposição de calose nas raízes das plântulas tratadas e não tratadas com flg22 foi observada na ponta e na região medial (Figura 13A-D). Em ambos os locais, o acúmulo de calose foi mais significativo nas raízes tratadas com flg22 (Figura 13C e D) do que nas raízes controle (Figuras 13A e 13B).

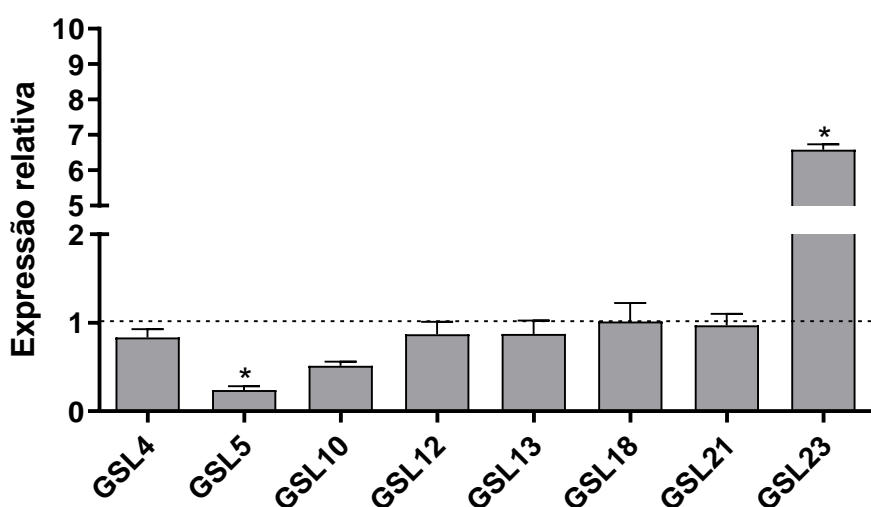
A deposição de calose não variou na parte aérea da plântula tratada com flg22 nas raízes. No entanto, quando as folhas são expostas diretamente ao flg22 ocorre a deposição de calose nelas (Figura 13E). Para avaliar se as  $\beta$ -(1,3)-glucanases desempenham algum papel na regulação da deposição de calose, a atividade das  $\beta$ -(1,3)-glucanases foi medida em extratos proteicos de raízes, folhas (expostas diretamente ao flg22) e parte aérea. Em comparação com o tratamento controle, a atividade das  $\beta$ -(1,3)-glucanases foi reprimida nos tecidos foliares e radiculares pelo tratamento com flg22, no entanto, na parte aérea que não apresentou indução na deposição de calose não foi detectada regulação da atividade das  $\beta$ -(1,3)-glucanases (Figura 14).



**Figura 14.** Atividade das enzimas  $\beta$ -1,3-glucanase na parte aérea, folhas e raízes de plântulas de soja tratadas por 24 h com flg22. \*Indica diferença significativa em relação ao controle conforme determinado pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ). Os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes com resultados semelhantes

Investigamos o perfil de expressão do grupo de genes GmGSL mais expressos em raízes tratadas com flg22 (Figura 10) através de PCR quantitativo

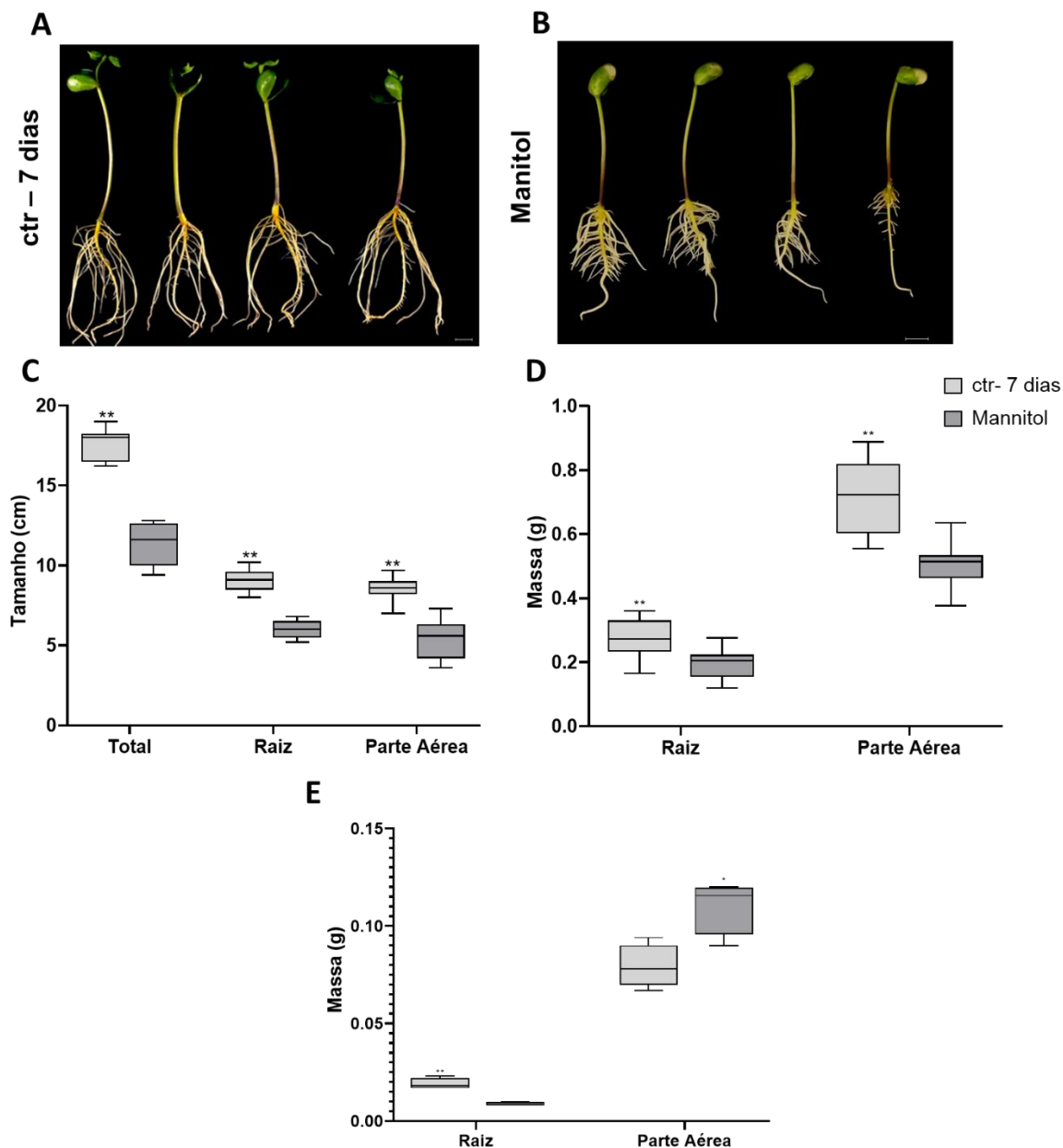
em tempo real (RT-qPCR) (Figura 15). Dos genes analisados, apenas um, GmGSL23, foi regulado positivamente no tratamento com flg22, indicando que este gene é essencial para a resposta de raízes de soja ao flg22. Por outro lado, GmGSL5 foi regulado negativamente. Com exceção dos pares de parálogos do gene GmGSL5, a maioria dos pares de parálogos apresentaram expressão semelhante. Por exemplo, os pares parálogos GmGSL10-GmGSL21 e GmGSL12-GmGSL13 apresentaram o mesmo perfil de expressão, não sendo regulados pelo tratamento.



**Figura 15.** Expressão relativa dos genes GmGSL em tecido radicular de soja tratada com flg22. SUMO foi usado como um gene de referência. A linha tracejada representa a expressão normalizada das plantas controle. \*Indica diferença significativa em relação ao controle conforme determinado pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

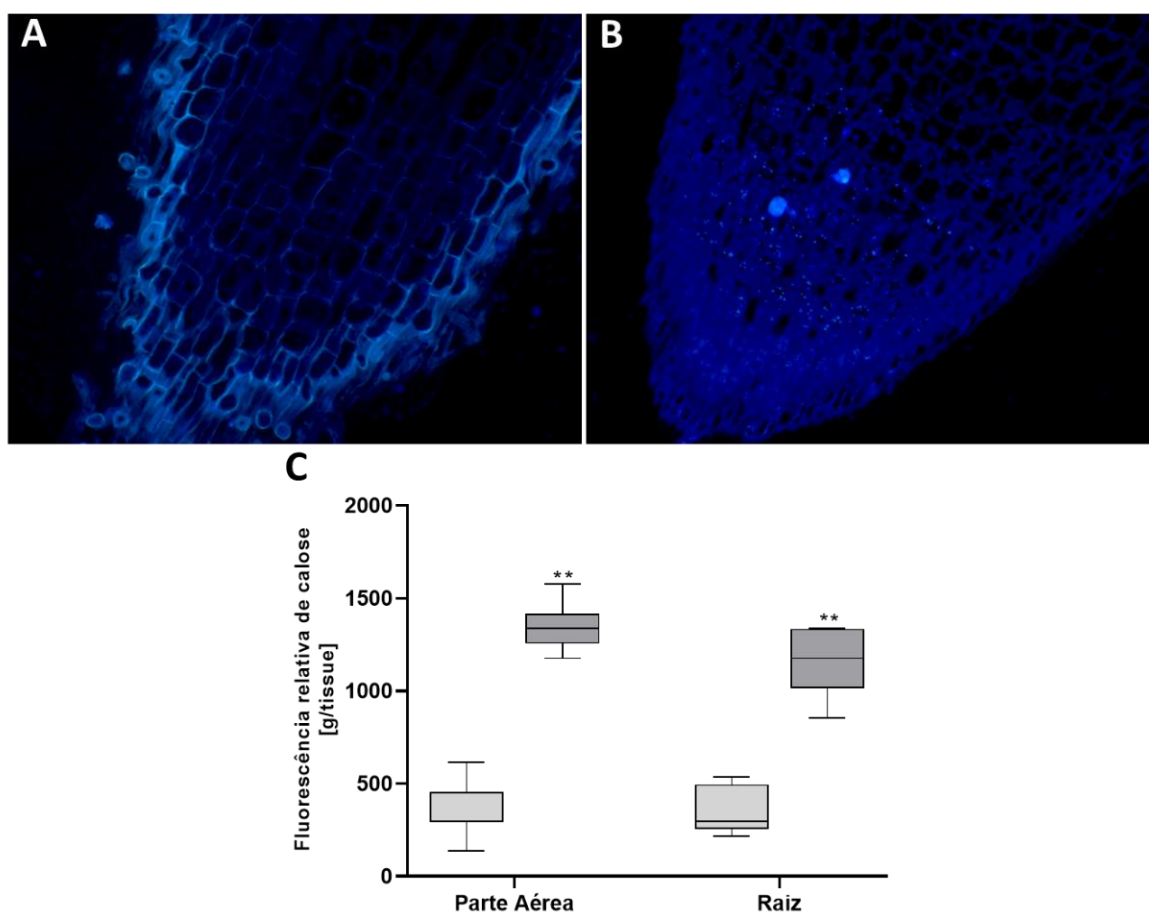
## 5.6. Manitol induz a produção de calose em plântulas de soja

Para investigar o efeito do estresse osmótico causado pelo manitol em plântulas de soja, analisamos as mudanças fenotípicas provocadas nas plântulas (Figura 16). Todos os parâmetros analisados diferiram em relação às plântulas controle. As plântulas tratadas com manitol apresentaram tamanho reduzido, volume radicular menor e menores teores de massa fresca. No entanto, a massa seca da parte aérea das plântulas tratadas com manitol foi maior em relação às plântulas controle.



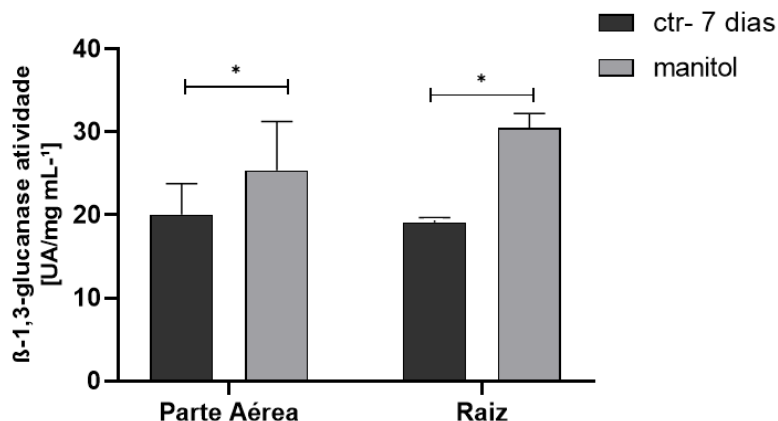
**Figura 16.** Análises fenotípicas das plântulas tratadas com manitol. (A) Plântulas controle. (B) Plântulas tratadas com manitol. (C) Tamanho das plântulas. (D) Massa fresca das plântulas. (E) Massa seca das plântulas. Barra de escala em 1cm. \*Indica diferença significativa em relação ao controle conforme determinado pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ). \*\*Indica diferença significativa em relação ao controle conforme determinado pelo teste t de Student ( $p < 0,01$ ).

O tratamento com manitol induziu produção de calose tanto na parte aérea quanto nas raízes de soja (Figura 17). As análises microscópicas evidenciaram a maior deposição de calose nas raízes de soja (Figura 17A e B).



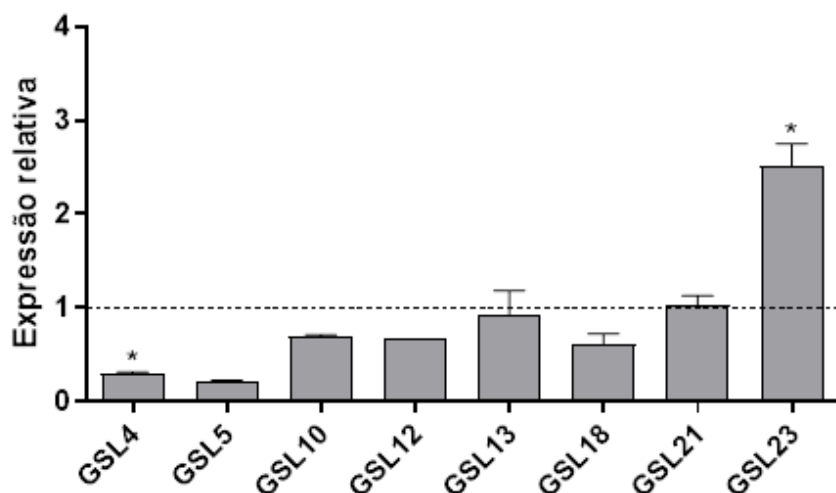
**Figura 17.** Deposição de calose em raízes de soja tratadas com manitol. (A) Corte longitudinal da ponta da raiz controle. (B) Corte longitudinal da ponta da raiz tratada com flg22. (C) Conteúdo de calose das raízes e parte aérea tratadas e não tratadas com flg22. Experimentos repetidos tiveram resultados semelhantes. \*\*Indica a diferença significativa em relação ao controle conforme determinado pelo teste t de Student ( $p < 0,01$ ). Barra de escala em 100  $\mu$ m. Objetiva de 20X.

Diferentemente do ocorrido nas plântulas tratadas com flg22, as plântulas tratadas com manitol apresentaram maior atividade de  $\beta$ -(1,3)-glucanases tanto nas raízes quanto na parte aérea (Figura 18).



**Figura 188.** Atividade das enzimas  $\beta$ -1,3-glucanase na parte aérea e raízes de plântulas tratadas com manitol durante 7 dias. \*Indica diferença significativa em relação ao controle conforme determinado pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ). Os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes com resultados semelhantes

Para investigar quais genes GSL estariam sendo regulados nas raízes das plântulas tratadas com manitol, avaliamos a expressão por RT-qPCR (Figura 19). Dos genes analisados, o GmGSL23 foi regulado positivamente, assim como no tratamento com flg22, indicando que este gene pode ser essencial para a resposta de raízes de soja exposta tanto a estresse biótico quanto abiótico. Por outro lado, o gene GmGSL4 foi regulado negativamente.



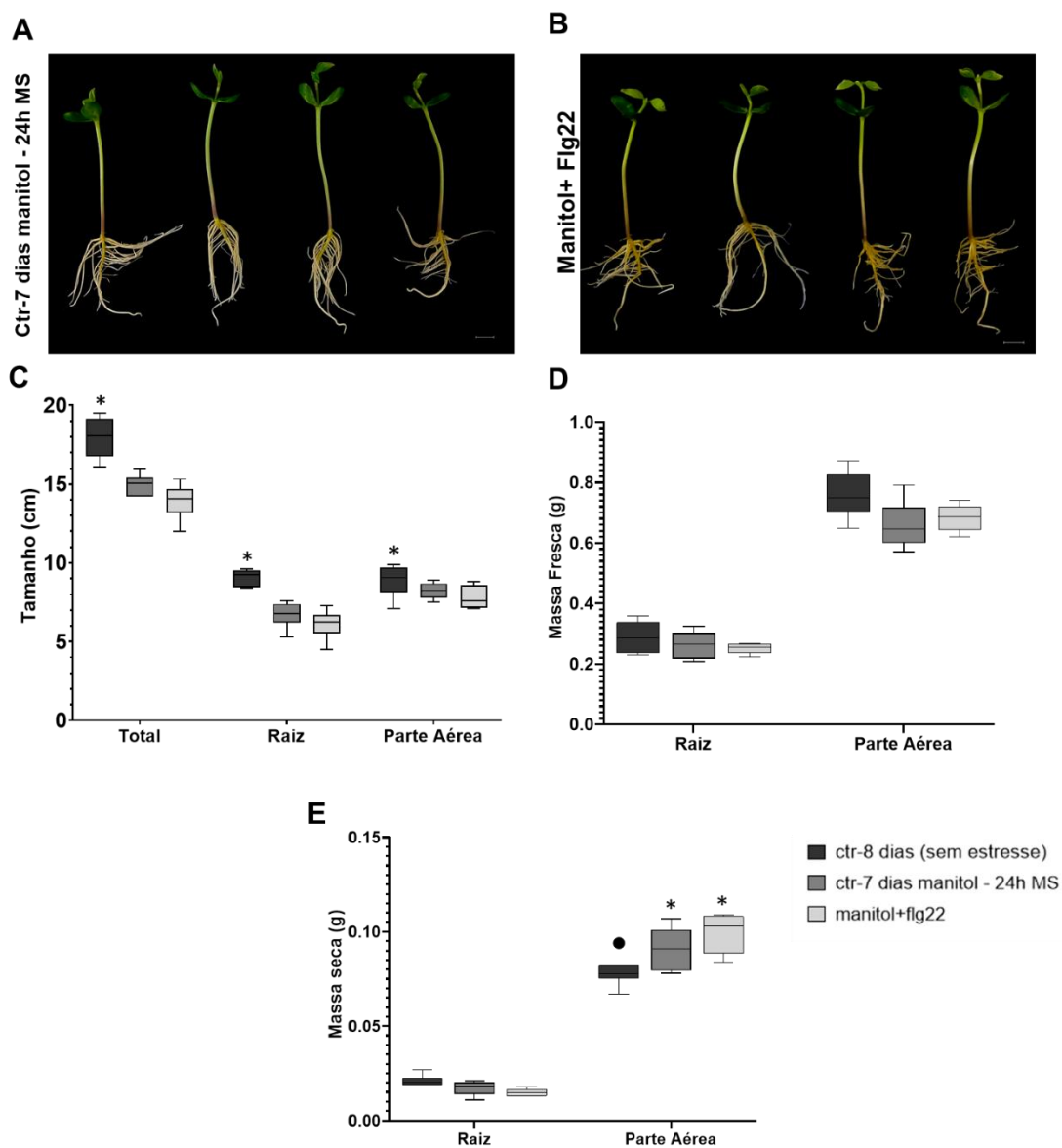
**Figura 19.** Expressão relativa dos genes GmGSL em tecido radicular de soja tratada com manitol durante 7 dias. METK4 foi usado como um gene de referência. A linha tracejada representa a expressão normalizada das plantas controle. \*Indica diferença significativa em relação ao controle conforme determinado pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

### **5.7. Manitol e flg22 induzem a produção de calose em plântulas de soja**

Em condições naturais, a ocorrência de dois ou mais estresses simultaneamente é comum. Além disso, diversos estudos sugerem que as plantas respondem a uma combinação específica de estresses de maneira não aditiva, produzindo efeitos que não podem ser avaliados analisando cada estresse separadamente (Rizhsky et al., 2004; Mittler, 2006; Suzuki et al., 2014).

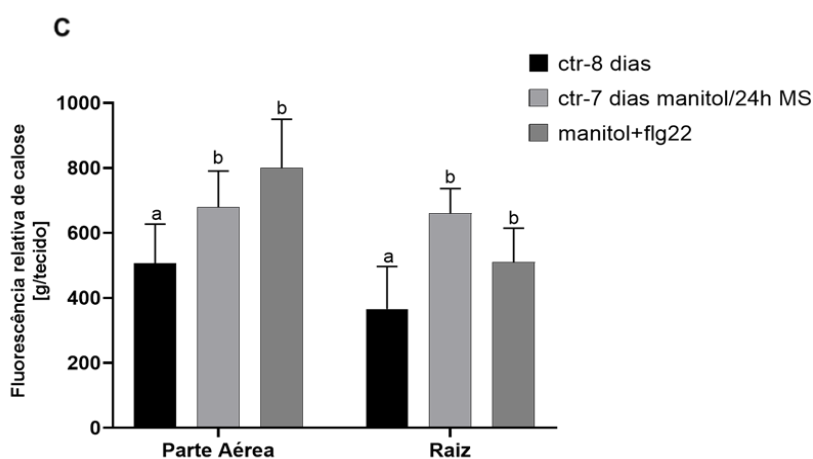
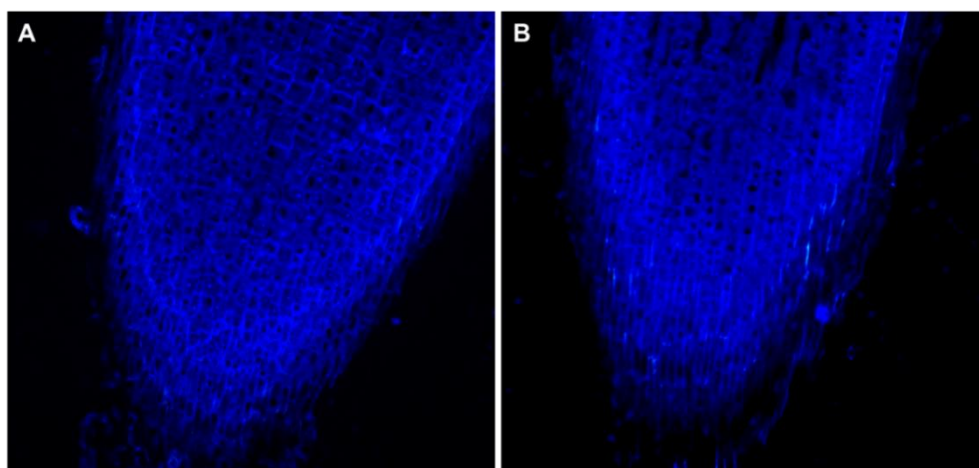
Para entender se o estresse osmótico ocasionado pelo manitol aumenta a susceptibilidade das plântulas de soja à flg22 através da regulação dos polímeros de calose, crescemos as plântulas de soja durante 7 dias em manitol e posteriormente aplicamos flg22 durante 24h (Figura 7). Dos dados fenotípicos avaliados, as plântulas diferiram apenas em relação ao tratamento sem estresse. As plântulas não estressadas são maiores, mas não apresentam diferença em relação à massa fresca. Já em relação à massa seca, as plântulas estressadas têm mais massa seca na parte aérea em relação às plântulas não estressadas (Figura 20).

A análise da quantificação do conteúdo de calose e as imagens de microscopia mostraram que o conteúdo de calose não se altera quando comparado às plântulas crescidas durante 7 dias no manitol e sem infecção flg22, tanto nas raízes quanto na parte aérea entre os tratamentos (Figura 21). No entanto, quando comparado com as plântulas de 8 dias de idade que não foram submetidas a agentes estressantes, as plântulas tratadas com manitol+flg22 apresentaram um conteúdo maior de calose.



**Figura 20.** Análises fenotípicas das plântulas tratadas durante 7 dias com manitol e, posteriormente, 24h em flg22. (A) Plântulas controle. (B) Plântulas tratadas com manitol e flg22. (C) Tamanho das plântulas. (D) Massa fresca das plântulas. (E) Massa seca das plântulas. Barra de escala em 1cm. \*Indica diferença significativa em relação ao controle conforme determinado pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ). \*\*Indica diferença significativa em relação ao controle conforme determinado pelo teste t de Student ( $p < 0,01$ ).



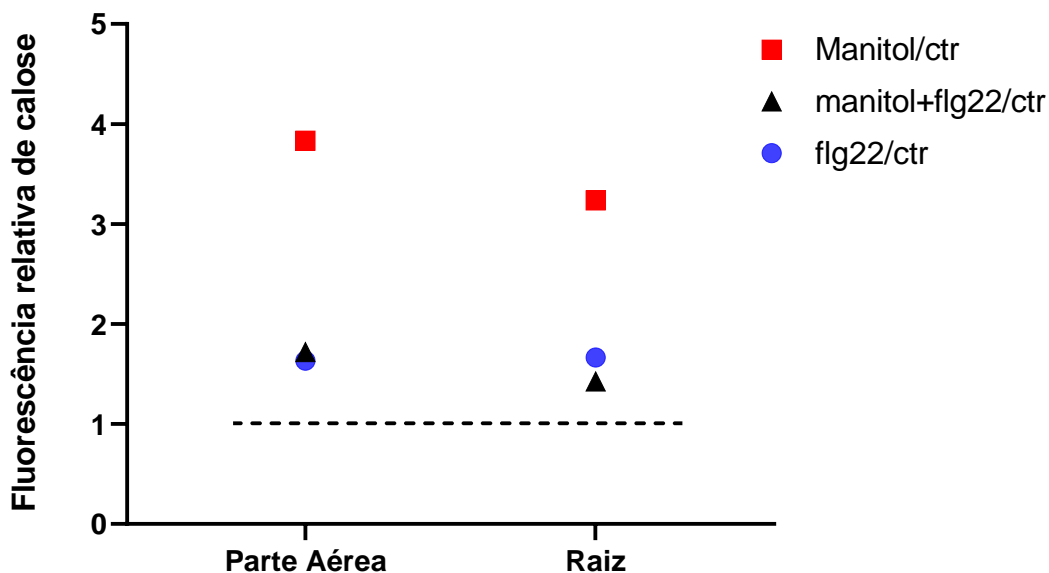


**Figura 21.** Deposição de calose em raízes de soja tratadas durante 7 dias com manitol e, posteriormente, 24h em flg22. (A) Corte longitudinal da ponta da raiz controle. (B) Corte longitudinal da ponta da raiz tratadas com manitol e flg22. (C) Conteúdo de calose das raízes e parte aérea tratadas e não tratadas com manitol e flg22. Experimentos repetidos tiveram resultados semelhantes. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos da parte aérea e raiz usando ANOVA e teste Tukey HSD, com nível de significância de 95%.

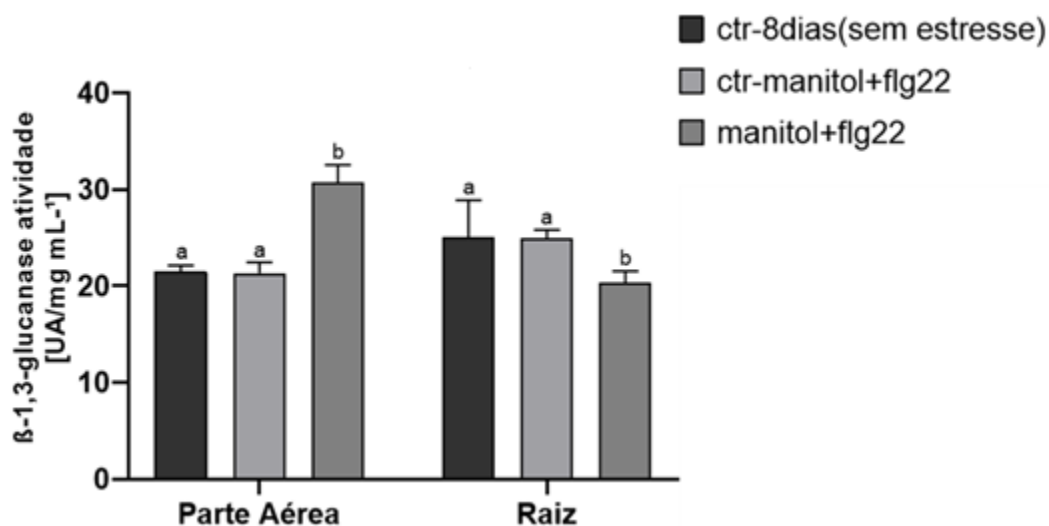
O conteúdo relativo de calose foi maior no tratamento com manitol. As plantas submetidas ao estresse osmótico biossintetizam pelo menos duas vezes mais calose que as plantas infectadas com flg22 (Figura 22). As plântulas tratadas com manitol+flg22 apresentam a mesma quantidade de calose que as plantas tratadas somente com flg22, indicando um balanço no conteúdo de calose ao longo da interação das plântulas com os diferentes estresses.

A atividade das  $\beta$ -1,3-glucanase foi regulada nos tratamentos. Ao contrário do que acontece nos tratamentos anteriores, na parte aérea, as plântulas tratadas com manitol e, posteriormente, com flg22 apresentaram uma atividade maior da

enzima. Já nas raízes, as plântulas crescidas com manitol e, depois, com flg22 tiveram uma atividade menor da enzima (Figura 23).

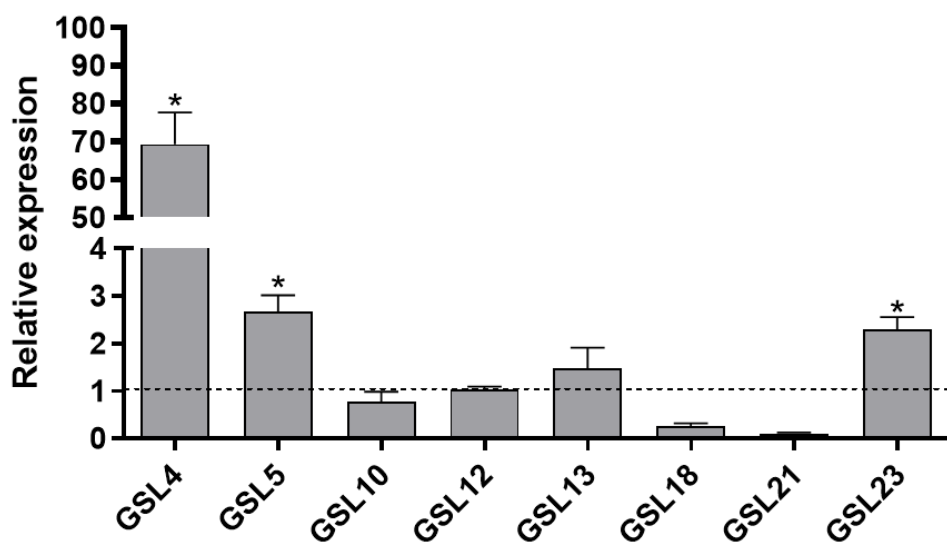


**Figura 22.** Comparação do conteúdo relativo de calose entre os três tratamentos realizados



**Figura 23.** Atividade das enzimas β-1,3-glucanase na parte aérea, folhas e raízes de plântulas tratadas com manitol durante 7 dias e flg22 durante 24h. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos da parte aérea e raiz usando ANOVA e teste Tukey HSD, com nível de significância de 95%.

Dos genes analisados, o GmGSL23, GmGSL4 e GmGSL5 foram regulados positivamente, indicando que eles podem ser essenciais para a resposta de raízes de soja exposta tanto a estresse biótico quanto abiótico (Figura 24).



**Figura 24.** Expressão relativa de genes GmGSL em tecido radicular de soja tratada durante 7 dias com manitol e 24h com flg22. METK4 foi usado como um gene de referência. A linha tracejada representa a expressão normalizada das plantas controle. \*Indica diferença significativa em relação ao controle conforme determinado pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Soja tem 23 genes GSL

A calose exerce funções fundamentais no transporte intercelular (Nedukha, 2015), no crescimento e desenvolvimento da inflorescência (Barratt et al., 2011; Paterlini et al., 2021), na formação do pólen (Wang et al., 2021a), na padronização celular (Chen et al., 2009), no desenvolvimento do tubo polínico (Cai et al., 2011) e na organização da celulose (Abou-Saleh et al., 2018). Além disso, a deposição de calose pode ser induzida por vários estresses bióticos e abióticos. Sob condições estressantes, a calose interage diretamente com as microfibrilas de celulose, fortalece a parede celular e pode impedir e/ou inibir o desenvolvimento de patógenos (Ellinger et al., 2013; Cui e Lee, 2016; Wu et al., 2018; Wang et al., 2021b; Yi et al., 2021).

Os genes GSL já foram identificados em diversas espécies (Verma e Hong, 2001b; Yu et al., 2016; Granato et al., 2019; Pu et al., 2019; Feng et al., 2021; Niu et al., 2021). Em milho, os genes GSL são necessários para o crescimento e desenvolvimento da planta (Niu et al., 2021). Em videira, foram identificados 8 genes GSL, alguns deles envolvidos com a resposta de defesa da planta (Yu et al., 2016). Em algodão, os genes GSL estão envolvidos no potencial da qualidade da fibra, além de desempenharem papéis importantes durante diversos estresses abióticos (Feng et al., 2021).

Em nossas análises, identificamos 23 genes GSL no genoma de soja (Tabela 1). Os genes GmGSL foram agrupados em dois clados principais que podem ser divididos em quatro grupos (Figura 8). Em geral, o número de éxons dos genes foi em média de 52 éxons, exceto pelos genes do grupo IV que têm de um a quatro éxons. Essa variação no número de éxons também ocorre em outras espécies como *Arabidopsis* que tem genes GSL de 40-50 éxons e um grupo com 2-3 (Verma e Hong, 2001a; Chen e Kim, 2009). Possivelmente, os genes GmGSL que compõem o grupo IV sejam ortólogos dos genes AtGSL1 e AtGSL5 e têm 2 e 3 éxons, respectivamente. Esses dados são reforçados pela estreita relação filogenética entre os genes GmGSL5, GmGSL12, GmGSL13, GmGSL15 e GmGSL16, pertencentes ao grupo IV, e os genes AtGSL1 e AtGSL5 de *Arabidopsis* (Figura 9).

As proteínas GSL de soja têm em média 1.906 aminoácidos, apresentando três domínios conservados: Vta1, FKS1 e glucano sintase, exceto as proteínas codificadas pelos genes GmGSL dos grupos III e IV que não têm o domínio Vta1. No total, 9 dos 23 genes identificados não codificam proteínas contendo o domínio Vta1. O domínio Vta1 está envolvido no transporte de corpos multivesiculares endossomais envolvidos na seleção de proteínas de membrana para degradação pelos lisossomos. Como as proteínas codificadas pelos genes GmGSL dos grupos III e IV não têm o domínio Vta1 em sua estrutura, provavelmente não compartilham tais funções. O domínio FKS1, presente em todas as proteínas GSL, é homólogo dos genes FKS fúngicos que codificam uma proteína integral de membrana, que é uma subunidade da 1,3-beta-D-glucano sintase. O domínio glucano sintase atua como um catalisador típico (Douglas et al., 1994; Cui et al., 2001; Xiao et al., 2008).

Em comparação com espécies como *Arabidopsis*, *C. sinensis* e *B. rapa*, que contêm 12, 9 e 15 genes GSL, respectivamente, a soja tem 23. Essa expansão dos genes GSL em soja possivelmente é devida às duas rodadas de duplicação sofridas no genoma (*Whole Genome Duplication, WGD*), que resultaram em um genoma altamente duplicado (Schmutz et al., 2010). Nossas análises mostram que dos 23 genes GmGSL identificados, 20 sofreram WGD/duplicação segmentar (Tabela S3). Este resultado é apoiado por estudos anteriores que mostraram que a duplicação predominante no genoma da soja é a segmentar (Pagel et al., 2004; Bolon et al., 2014). Além disso, muitas famílias gênicas em soja têm a duplicação segmentar

como um dos principais mecanismos de duplicação (Han et al., 2016; Delgado-Cerrone et al., 2018b; Sangi et al., 2021).

As duplicações do genoma total em soja que ocorreram aproximadamente há 59 milhões de anos (durante a duplicação do genoma das leguminosas) e 13 milhões de anos (duplicação na linhagem *Glycine*) foram responsáveis pela derivação de numerosos parálogos (Shoemaker et al., 1996; Schmutz et al., 2010). Neste estudo, mostramos que os genes GmGSL têm 16 pares de parálogos que foram derivados de eventos de duplicação, o que reforça que a duplicação de WGD pode ser um dos principais mecanismos de expansão da família de genes GSL em soja.

## 6.2. Perfis de expressão e regulação da família de genes GSL em soja

A partir dos eventos de duplicação de genes, novos padrões de expressão podem ser gerados. O perfil de expressão dos 23 genes GmGSL é heterogêneo, alguns genes apresentam baixa expressão em todos os tecidos, alguns apresentam média expressão, enquanto outros apresentam expressão em tecidos específicos (Figura 10). O par de genes parálogos GmGSL10-GmGSL21 tem um padrão de expressão semelhante, e esses genes apresentam um tempo de divergência curto (Tabela 2), o que pode ter contribuído para a manutenção de suas funções. Além disso, em razão da sua estreita relação filogenética, esses genes são possivelmente ortólogos do gene AtGSL12. Em *Arabidopsis*, AtGSL12 regula o tráfego de célula para célula, depositando calose nos plasmodesmos (Guseman et al., 2010; Vatén et al., 2011). Plantas mutantes para os genes AtGSL12 e AtGSL11 apresentam quantidades muito baixas de calose levando à degeneração de micrósporos (Dong et al., 2005, 2008; Enns et al., 2005). Isso pode indicar que os genes GSL10 e 21 de soja possam estar envolvidos com a deposição de calose nos plasmodesmos e nos micrósporos.

Em nossa análise de expressão relativa dos genes GSL no tecido radicular de soja em resposta ao manitol, flg22 e manitol+flg2, esses genes não diferiram do tratamento controle, possivelmente não estão relacionados à resposta de defesa contra patógenos microbianos, nem à resposta ao estresse osmótico. Esses dados sugerem que os genes GmGSL10-GmGSL21 podem estar envolvidos na biossíntese e deposição de calose em outros tecidos e órgãos de soja. Além disso,

cabe ressaltar que o gene GmGSL10 tem alta expressão em tecidos de sementes (Figura 10) e pode desempenhar seu papel especificamente nestes tecidos.

O gene GmGSL23 foi mais expresso em tecidos específicos como folhas e tegumento (Figura 10). Em bibliotecas de RNA-seq de plântulas de soja infectadas por *Fusarium sp.*, o GmGSL23 é altamente expresso, mas não é regulado em relação ao controle. Em bibliotecas de folhas de soja tratadas com solução de MAMPs, este gene também não foi regulado (Figura S1). Por terem uma estreita relação filogenética, este gene é provavelmente um parálogo dos genes AtGSL10/AtGSL8 e dos genes VvCalS9 e VvCalS10 de *V. Vinifera* (Figura 9). O AtGSL8 é necessário para a citocinese, padronização celular e tráfego simplástico. Mutantes para o gene AtGSL8 são gametofíticos letais (Chen et al., 2009; Saatian et al., 2018), além de serem necessários para o desenvolvimento normal da planta (Töller et al., 2008). Em *V. vinifera*, VvCalS9 e VvCalS10 estão envolvidos na defesa do ataque patogênico de *Plasmopara viticola*, agente causador da doença do míldio (Yu et al., 2016). Em nossa análise de RT-qPCR, o GmGSL23 foi regulado positivamente em todos os tratamentos analisados em raízes de plântulas de soja, sugerindo que este gene esteja envolvido tanto na deposição de calose nas raízes de plântulas de soja contra o ataque de agentes bacterianos quanto na resposta ao estresse osmótico.

O par de genes parálogos GmGSL5-GmGSL12 teve expressão mediana na maioria dos tecidos, exceto no suspensor e tegumento, onde o gene GmGSL12 teve alta expressão. Em folhas de soja infectadas com solução de MAMPs, esses genes foram diferencialmente expressos (Figura S1). Em arroz, o GSL5 regula o metabolismo de calose durante a microsporogênese e desempenha um papel essencial na fertilidade masculina (Shi et al., 2015b). Em *Arabidopsis*, AtGSL5 é essencial para a viabilidade do pólen (Dong et al., 2005), além de ser responsável pela biossíntese de calose que separa os micrósporos da tétrade (Enns et al., 2005). Adicionalmente, AtGSL5 é necessário na formação de calose papilar e é induzido em folhas de *Arabidopsis* após infecção patogênica (Jacobs et al., 2003; Dong et al., 2008).

Plantas mutantes de *Arabidopsis* para o gene GSL5, denominadas POWDERY MILDEW RESISTANT 4 (PMR4), apresentaram maior resistência ao oídio, o que demonstrou que outras vias estão superativadas e podem compensar a falta de deposição de calose (Nishimura et al., 2003). Ellinger et al. (2013)

demonstraram que a calose pode suportar fortemente a resistência à penetração quando depositada em grandes quantidades nos primeiros momentos da infecção. Curiosamente, em nossa análise de RT-qPCR em raízes de plântulas de soja infectadas com flg22 por 24 h, o gene GmGSL5 foi regulado negativamente. No entanto, no tratamento das plântulas com manitol+flg22, esse gene foi regulado positivamente. Possivelmente, esse gene exerce uma atividade essencial na biossíntese de calose em resposta ao estresse. Nas plantas infectadas com flg22 durante 24 h, esse gene pode ter exercido algum papel na deposição de calose ao longo das 24 h e como a calose já foi depositada das raízes, ao final das 24 h esse gene pode ter sido regulado negativamente. Adicionalmente, outros mecanismos para regular a deposição de calose podem estar em ação.

### **6.3. Enzimas $\beta$ -1,3-glucanase regulam a deposição de calose em plântulas de soja**

A calose é sintetizada pelos genes GSL e pode ser degradada pelas enzimas  $\beta$ -1,3-glucanases (Zabotin et al., 2002). Vários estudos sugerem que níveis elevados de  $\beta$ -1,3-glucanase podem regular o acúmulo de calose (Zabotin et al., 2002; Saheed et al., 2009; Wan et al., 2011). As  $\beta$ -1,3-glucanases também foram associadas à degradação da calose na região dos plasmodesmas, afetando diretamente a regulação da deposição de calose no transporte célula a célula (Zavaliev et al., 2013). Em *Arabidopsis*, plantas mutantes para genes de  $\beta$ -1,3-glucanase são mais tolerantes à infecção por patógenos por apresentarem maior acúmulo de calose (Iglesias e Meins Jr, 2000).

Em nossas análises, existe uma conversa cruzada entre as enzimas  $\beta$ -1,3-glucanases e a deposição de calose nos tecidos analisados. No tratamento com flg22 nas raízes das plântulas de soja, não ocorre maior deposição de calose na parte aérea das plântulas e, conseqüentemente, as enzimas  $\beta$ -1,3-glucanases não são reguladas (Figuras 13 e 14). No entanto, quando a flg22 é aplicada nas folhas das plântulas, ocorre deposição de calose e também as enzimas  $\beta$ -1,3-glucanases são reguladas. O mesmo acontece nas raízes das plântulas tratadas com flg22, em que ocorre uma maior deposição de calose em relação às plântulas não tratadas e, conseqüentemente, à regulação das enzimas  $\beta$ -1,3-glucanases (Figuras 13 e 14).



No tratamento com flg22, a atividade das enzimas  $\beta$ -1,3-glucanase é maior nos tratamentos controle, o que indica que a baixa atividade dessas enzimas influencia na deposição de calose nos tecidos. Já em nosso tratamento com manitol, as enzimas  $\beta$ -1,3-glucanase apresentaram alta atividade nas plântulas tratadas. Essa alta atividade das enzimas e a alta deposição de calose podem estar relacionadas à grande quantidade de calose no tecido. As plântulas tratadas com manitol apresentam pelo menos o dobro de calose em comparação com as plântulas tratadas com flg22, em razão de essa alta deposição de calose nos tecidos as enzimas  $\beta$ -1,3-glucanase poder estar controlando a deposição do polímero nos tecidos.

No tratamento manitol+flg22, a atividade das  $\beta$ -1,3-glucanases é maior na parte aérea e menor nas raízes em relação aos tratamentos controle. O aumento da atividade na parte aérea das plântulas pode estar relacionado ao aumento da deposição de calose ocasionado pelo tratamento com manitol. Já a baixa atividade das enzimas  $\beta$ -1,3-glucanase nas raízes pode estar relacionada ao tratamento com a flg22, quando a planta detecta um possível ataque patogênico e a atividade das enzimas é reduzida para uma possível maior deposição de calose.

#### **6.4. Acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e deposição de calose em raízes e folhas de plântulas de soja induzido por flg22 e manitol**

A capacidade da planta em responder a inúmeros potenciais patógenos está diretamente relacionada à sua competência em reconhecer moléculas patogênicas conservadas, comumente chamadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), por meio de receptores de reconhecimento de padrões localizados na membrana plasmática da planta (PRRs). Um dos PRRs bem caracterizados em plantas é o receptor FLAGELLIN-SENSITIVE 2 (FLS2), capaz de reconhecer o peptídeo flagelina (flg22), que é altamente conservado em bactérias (Wei et al., 2020).

Após o reconhecimento, as células vegetais iniciam a sinalização e estabelecem várias respostas imunes que podem convergir para o núcleo da célula para induzir a reprogramação transcricional para equilibrar a defesa com o crescimento da planta. Entre as respostas imunes desencadeadas pela flg22, estão a produção de EROs e o fortalecimento da parede celular vegetal por meio da

deposição de calose (Camejo et al., 2016). Em nosso estudo, o tratamento de folhas e raízes de soja com flg22 induziu a produção de EROs (Figura 12). Além disso, o tratamento com flg22 aumentou a deposição de calose nas folhas e raízes das plântulas de soja (Figura 13). Esses dados indicam que a produção de EROs e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode contribuir para a ativação de vias de sinalização da biossíntese de calose em folhas e raízes de soja. No entanto, a parte aérea das plântulas não apresentou modulação da biossíntese de calose, indicando que o tratamento das raízes com flg22 induz apenas localmente a deposição de calose.

A explosão de EROs e a deposição de calose estão entre as principais vias de resposta de defesa para prevenir a penetração de patógenos (O'Brien et al., 2012; Huang et al., 2019). Em *Arabidopsis*, os PAMPs induzem a formação de EROs e provocam a deposição de calose, ativando a expressão de sintases de calose (Hong et al., 2001; Wang et al., 2019). Além disso, plantas de *Arabidopsis* com níveis reduzidos de deposição de calose apresentam resistência reduzida ao fungo *Leptosphaeria maculans* (Kaliff et al., 2007). Quando o acúmulo de EROs é suprimido no trigo, os níveis de deposição de calose diminuem e a capacidade de resposta de defesa da planta (Qi et al., 2019). Plantas de tomate atacadas com *Botrytis cinerea* acumulam EROs e induzem a deposição de calose na parede celular, além de induzir a expressão de genes relacionados à defesa (López-Cruz et al., 2017). Além disso, o aumento da deposição de calose aumenta a resistência das plantas de tomate à bactéria *P. syringae* (de Torres-Zabala et al., 2007).

Nossos resultados demonstram o envolvimento da via EROs na regulação dos níveis de calose e indicam que a produção de EROs e o acúmulo de calose podem desempenhar papel importante na resposta de defesa da planta a microrganismos bacterianos em plântulas de soja.

A deposição de calose desencadeada por organismos patogênicos é muito bem documentada (Underwood, 2012; Malinovsky et al., 2014). No entanto, existem poucos estudos demonstrando a deposição de calose durante estresses abióticos. Em nosso estudo, mostramos que o estresse osmótico induzido por manitol acarreta deposição de calose tanto na parte aérea como nas raízes de plântulas de soja. Já foi demonstrado que a acumulação de calose em raízes de soja sob déficit hídrico pode ser um indicativo de suscetibilidade ao estresse hídrico (Ehrhardt-Brocardo et al., 2019). Em *Arabidopsis*, já foi relatada a importância da deposição de calose para a tolerância das sementes e raízes ao estresse osmótico (Pillai et

al., 2018; Hunter et al., 2019). Nesse sentido, nossos resultados sugerem que a deposição de calose em plântulas de soja em resposta ao estresse osmótico é um mecanismo de defesa da planta para amenizar o estresse, podendo ser utilizada em estudos futuros de tolerância e suscetibilidade em diferentes cultivares.

Quando as plantas enfrentam estresses simultâneos, elas respondem de maneira específica (Rejeb et al., 2014). Além disso, quando a planta passa por alguma condição estressante, seus mecanismos de defesa são enfraquecidos e aumentam sua suscetibilidade à infecção patogênica (Suzuki et al., 2014). Nossos dados mostraram que o conteúdo relativo de calose das plântulas tratadas com manitol+flg22 é igual ao das plântulas tratadas somente com flg22 (Figura 22). O estresse osmótico ocasiona uma alta deposição de calose nos tecidos, que é controlada pelas enzimas  $\beta$ -1,3-glucanase, e quando o estresse osmótico cessa e a flg22 é adicionada ao meio, os níveis de calose diminuem para os mesmos de quando a plântula é exposta somente a flg22.

## 7. CONCLUSÕES

Nossos resultados fornecem uma visão abrangente sobre a regulação da deposição de calose em plântulas de soja tratadas com flg22, manitol e manitol+flg22. Demonstramos a existência de uma interação entre a produção de EROs, a deposição de calose e a atividade das enzimas  $\beta$ -1,3-glucanases. Também relatamos a identificação de 23 genes GSL no genoma da soja que se expandiram através de duplicações WGD/segmentares. Desses 23 genes, apenas um é suprarregulado em resposta ao tratamento com flg22 e ao estresse osmótico no tecido radicular (GSL23), o que sugere um papel essencial desse gene na defesa de plântulas de soja. Quando a plântula é submetida ao estresse osmótico e posteriormente ao estresse por flg22, 3 genes específicos são suprarregulados. No geral, nosso estudo demonstra que a deposição de calose em plântulas de soja é regulada por genes GSL e enzimas  $\beta$ -1,3-glucanase. Nosso conjunto de resultados contribui para a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na resposta de plântulas de soja a diferentes estresses.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abou-Saleh, R.H., Hernandez-Gomez, M.C., Amsbury, S., Paniagua, C., Bourdon, M., Miyashima, S., Helariutta, Y., Fuller, M., Budtova, T., Connell, S.D., Ries, M.E., Benitez-Alfonso, Y. (2018) Interactions between callose and cellulose revealed through the analysis of biopolymer mixtures. *Nat Commun* 9: 4538.
- Ahmed, M., Fayyaz-ul-Hassan., Asif, M. (2014) Amelioration of Drought in Sorghum (*Sorghum bicolor* L.) by Silicon. *Commun Soil Sci Plant Anal* 45: 470–486.
- Albersheim, P., Darvill, A., Roberts, K., Sederoff, R., Staehelin, A. (2010) *Plant cell walls: from chemistry to biology*. New York: Garland Science,
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389–3402.
- Atkinson, N.J., Urwin, P.E. (2012) The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *J Exp Bot* 63: 3523–3543.
- Ávila, A., Justino, F., Wilson, A., Bromwich, D., Amorim, M. (2016) Recent precipitation trends, flash floods and landslides in southern Brazil. *Environ Res Lett* 11: 114029.
- Bacete, L., Mérida, H., Miedes, E., Molina, A. (2018) Plant cell wall-mediated immunity: cell wall changes trigger disease resistance responses. *Plant J* 93:

614–636.

- Balachandran, S., Hurry, V.M., Kelley, S.E., Osmond, C.B., Robinson, S.A., Rohozinski, J., Seaton, G.G.R., Sims, D.A. (1997) Concepts of plant biotic stress. Some insights into the stress physiology of virus-infected plants, from the perspective of photosynthesis. *Physiol Plant* 100: 203–213.
- Barratt, D.H.P., Kölling, K., Graf, A., Pike, M., Calder, G., Findlay, K., Zeeman, S.C., Smith, A.M. (2011) Callose synthase GSL7 is necessary for normal phloem transport and inflorescence growth in Arabidopsis. *Plant Physiol* 155: 328–341.
- Battisti, R., Sentelhas, P.C., Boote, K.J. (2018) Sensitivity and requirement of improvements of four soybean crop simulation models for climate change studies in Southern Brazil. *Int J Biometeorol* 62: 823–832.
- Bauer, J.R.F.A.-J.R.F.A.-C.R.C.A.-P.J. (2001) Drought-Stress Effects on Branch and Mainstem Seed Yield and Yield Components of Determinate Soybean. *Crop Sci* v. 41: 759-763–2001 v.41 no.3.
- Bellincampi, D., Cervone, F., Lionetti, V. (2014) Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant – pathogen interactions. 5: 1–8.
- Bethke, G., Pecher, P., Eschen-Lippold, L., Tsuda, K., Katagiri, F., Glazebrook, J., Scheel, D., Lee, J. (2011) Activation of the Arabidopsis thaliana Mitogen-Activated Protein Kinase MPK11 by the Flagellin-Derived Elicitor Peptide, flg22. *Mol Plant-Microbe Interact* 25: 471–480.
- Bethke, G., Unthan, T., Uhrig, J.F., Pöschl, Y., Gust, A.A., Scheel, D., Lee, J. (2009) Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in Arabidopsis thaliana via ethylene signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 8067–8072.
- Bolon, Y.-T., Stec, A.O., Michno, J.-M., Roessler, J., Bhaskar, P.B., Ries, L., Dobbels, A.A., Campbell, B.W., Young, N.P., Anderson, J.E., Grant, D.M., Orf, J.H., Naeve, S.L., Muehlbauer, G.J., Vance, C.P., Stupar, R.M. (2014) Genome Resilience and Prevalence of Segmental Duplications Following Fast Neutron Irradiation of Soybean. *Genetics* 198: 967–981.

- Brown, R.M. (2004) Cellulose Structure and Biosynthesis: What is in Store for the 21st Century?. *J Polym Sci Part A Polym Chem* 42: 487–495.
- Brum Machado, F., Moharana, K.C., Almeida-Silva, F., Gazara, R.K., Pedrosa-Silva, F., Coelho, F.S., Grativol, C., Venancio, T.M. (2020) Systematic analysis of 1,298 RNA-Seq samples and construction of a comprehensive soybean (*Glycine max*) expression atlas. *Plant J.* doi: 10.1111/tpj.14850
- Caetano, J.M., Tessarolo, G., de Oliveira, G., Souza, K. da S. e., Diniz-Filho, J.A.F., Nabout, J.C. (2018) Geographical patterns in climate and agricultural technology drive soybean productivity in Brazil. *PLoS One* 13: e0191273.
- Cai, G., Faleri, C., Del Casino, C., Emons, A.M.C., Cresti, M. (2011) Distribution of callose synthase, cellulose synthase, and sucrose synthase in tobacco pollen tube is controlled in dissimilar ways by actin filaments and microtubules. *Plant Physiol* 155: 1169–1190.
- Camejo, D., Guzmán-Cedeño, Á., Moreno, A. (2016) Reactive oxygen species, essential molecules, during plant–pathogen interactions. *Plant Physiol Biochem* 103: 10–23.
- Chen, X.-Y., Liu, L., Lee, E., Han, X., Rim, Y., Chu, H., Kim, S.-W., Sack, F., Kim, J.-Y. (2009) The Arabidopsis Callose Synthase Gene *GSL8* Is Required for Cytokinesis and Cell Patterning . *Plant Physiol* 150: 105–113.
- Chen, X.-Y.Y., Kim, J.-Y.Y. (2009) Callose synthesis in higher plants. *Plant Signal Behav* 4: 489–492.
- Clay, N.K., Adio, A.M., Denoux, C., Jander, G., Ausubel, F.M. (2009) Glucosinolate metabolites required for an Arabidopsis innate immune response. *Science (80- )* 323: 95–101.
- CONAB. (2021) Cultivos de verão safra 2021/22.
- Cosgrove, D.J. (2005) Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 850–861.
- Cosgrove, D.J. (2016a) Plant cell wall extensibility: Connecting plant cell growth with cell wall structure, mechanics, and the action of wall-modifying enzymes. *J Exp*

*Bot* 67: 463–476.

- Cosgrove, D.J. (2016b) Catalysts of plant cell wall loosening. *F1000Research* 5: 1–13.
- Cui, W., Lee, J.-Y.Y. (2016) Arabidopsis callose synthases CalS1/8 regulate plasmodesmal permeability during stress. *Nat Plants* 2: 16034.
- Cui, X., Shin, H., Song, C., Laosinchai, W., Amano, Y., Brown, M.R. (2001) A putative plant homolog of the yeast  $\beta$ -1,3-glucan synthase subunit FKS1 from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) fibers. *Planta* 213: 223–230.
- Cui, Y., Li, X., Yu, M., Li, R., Fan, L., Zhu, Y., Lin, J. (2018) Sterols regulate endocytic pathways during flg22-induced defense responses in Arabidopsis. *Development* 145: dev165688.
- Daryanto, S., Wang, L., Jacinthe, P.-A. (2016) Global Synthesis of Drought Effects on Maize and Wheat Production. *PLoS One* 11: e0156362.
- Davis, D.J., Wang, M., Sørensen, I., Rose, J.K.C., Domozych, D.S., Drakakaki, G. (2020) Callose deposition is essential for the completion of cytokinesis in the unicellular alga *Penium margaritaceum*. *J Cell Sci*. doi: 10.1242/jcs.249599
- de Torres-Zabala, M., Truman, W., Bennett, M.H., Lafforgue, G., Mansfield, J.W., Rodriguez Egea, P., Bögre, L., Grant, M. (2007) *Pseudomonas syringae* pv. tomato hijacks the Arabidopsis abscisic acid signalling pathway to cause disease. *EMBO J* 26: 1434–1443.
- Delgado-Cerrone, L., Alvarez, A., Mena, E., Ponce de León, I., Montesano, M. (2018a) Genome-wide analysis of the soybean CRK-family and transcriptional regulation by biotic stress signals triggering plant immunity. *PLoS One* 13: 1–27.
- Delgado-Cerrone, L., Alvarez, A., Mena, E., Ponce de León, I., Montesano, M. (2018b) Genome-wide analysis of the soybean CRK-family and transcriptional regulation by biotic stress signals triggering plant immunity. *PLoS One* 13: e0207438.
- Destro, D. (2001) Photoperiodism and genetic control of the long juvenile period in



soybean: A review. *Crop Breed Appl* 72–92.

Doblin, M.S., Johnson, K.L., Humphries, J., Newbigin, E.J., Bacic, A. (Tony). (2014) Are designer plant cell walls a realistic aspiration or will the plasticity of the plant's metabolism win out? *Curr Opin Biotechnol* 26: 108–114.

Dodds, P.N., Rathjen, J.P. (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions.

Dong, S., Jiang, Y., Dong, Y., Wang, L., Wang, W., Ma, Z., Yan, C., Ma, C., Liu, L. (2019) A study on soybean responses to drought stress and rehydration. *Saudi J Biol Sci* 26: 2006–2017.

Dong, X., Hong, Z., Chatterjee, J., Kim, S., Verma, D.P.S. (2008) Expression of callose synthase genes and its connection with Npr1 signaling pathway during pathogen infection. *Planta* 229: 87–98.

Dong, X., Hong, Z., Sivaramakrishnan, M., Mahfouz, M., Verma, D.P.S. (2005) Callose synthase (CalS5) is required for exine formation during microgametogenesis and for pollen viability in Arabidopsis. *Plant J* 42: 315–328.

Douglas, C.M., Foor, F., Marrinan, J.A., Morin, N., Nielsen, J.B., Dahl, A.M., Mazur, P., Baginsky, W., Li, W., el-Sherbeini, M. (1994) The *Saccharomyces cerevisiae* FKS1 (ETG1) gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of 1,3-beta-D-glucan synthase. *Proc Natl Acad Sci* 91: 12907 LP – 12911.

Dukhnytskyi, B. (2022) World agricultural production. *Ekon APK* 59–65.

Ehrhardt-Brocardo, N.C.M., Coelho, C.M.M., Souza, C.A., Mathias, V. (2019) Callose accumulation in roots of soybean seedlings under water deficit. *Theor Exp Plant Physiol* 31: 475–481.

Ellinger, D., Naumann, M., Falter, C., Zwikowics, C., Jamrow, T., Manisseri, C., Somerville, S.C., Voigt, C.A. (2013) Elevated early callose deposition results in complete penetration resistance to powdery mildew in Arabidopsis. *Plant Physiol* 161: 1433–1444.

- Enns, L.C., Kanaoka, M.M., Torii, K.U., Comai, L., Okada, K., Cleland, R.E. (2005) Two callose synthases, GSL1 and GSL5, play an essential and redundant role in plant and pollen development and in fertility. *Plant Mol Biol* 58: 333–349.
- FAO. (2009) Global agriculture towards 2050. In: Glob. Agric. Towar. 2050.
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., Boller, T. (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J* 18: 265–276.
- Feng, J., Chen, Y., Xiao, X., Qu, Y., Li, P., Lu, Q., Huang, J. (2021) Genome-wide analysis of the CalS gene family in cotton reveals their potential roles in fiber development and responses to stress. *PeerJ* 9: e12557.
- Fink, W., Liefland, M., Mendgen, K. (1988) Chitinases and beta-1,3-Glucanases in the Apoplastic Compartment of Oat Leaves (*Avena sativa* L.). *Plant Physiol* 88: 270–275.
- Gao, M., Snider, J.L., Bai, H., Hu, W., Wang, R., Meng, Y., Wang, Y., Chen, B., Zhou, Z. (2020) Drought effects on cotton (*Gossypium hirsutum* L.) fibre quality and fibre sucrose metabolism during the flowering and boll-formation period. *J Agron Crop Sci* 206: 309–321.
- García-Andrade, J., Ramírez, V., Flors, V., Vera, P. (2011) Arabidopsis ocp3 mutant reveals a mechanism linking ABA and JA to pathogen-induced callose deposition. *Plant J* 67: 783–794.
- Gigli-Bisceglia, N., Engelsdorf, T., Hamann, T. (2020) Plant cell wall integrity maintenance in model plants and crop species-relevant cell wall components and underlying guiding principles. *Cell Mol Life Sci* 77: 2049–2077.
- Granato, L.M., Galdeano, D.M., Da Roz D’Alessandre, N., Breton, M.C., Machado, M.A., D’Alessandre, N.D.R., Breton, M.C., Machado, M.A. (2019) Callose synthase family genes plays an important role in the Citrus defense response to Candidatus Liberibacter asiaticus. *Eur J Plant Pathol* 155: 25–38.
- Gray, S.B., Brady, S.M. (2016) Plant developmental responses to climate change. *Dev Biol* 419: 64–77.

- Guo, T., Kong, F., Burton, C., Scaglione, S., Beagles, B., Ray, J., Ramonell, K.M. (2022) The E3 Ubiquitin Ligase ATL9 Affects Expression of Defense Related Genes, Cell Death and Callose Deposition in Response to Fungal Infection.
- Guseman, J.M., Lee, J.S., Bogenschutz, N.L., Peterson, K.M., Virata, R.E., Xie, B., Kanaoka, M.M., Hong, Z., Torii, K.U. (2010) Dysregulation of cell-to-cell connectivity and stomatal patterning by loss-of-function mutation in Arabidopsis CHORUS (GLUCAN SYNTHASE-LIKE 8). *Development* 137: 1731–1741.
- Haas, K.T., Wightman, R., Peaucelle, A., Höfte, H. (2021) The role of pectin phase separation in plant cell wall assembly and growth. *Cell Surf* 7: 100054.
- Haddad, E.A., Teixeira, E. (2015) Economic impacts of natural disasters in megacities: The case of floods in São Paulo, Brazil. *Habitat Int* 45: 106–113.
- Hamann, T. (2012) Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms .
- Han, Y., Li, X., Cheng, L., Liu, Y., Wang, H., Ke, D. (2016) Genome-Wide Analysis of Soybean JmjC Domain-Containing Proteins Suggests Evolutionary Conservation Following Whole-Genome Duplication. doi: 10.3389/fpls.2016.01800
- Hoffmann, E.K., Dunham, P.B. (1995) Membrane Mechanisms and Intracellular Signalling in Cell Volume Regulation. *Int Rev Cytol* 161: 173–262.
- Hoffmann, N., King, S., Samuels, A.L., McFarlane, H.E. (2021) Subcellular coordination of plant cell wall synthesis. *Dev Cell* 56: 933–948.
- Höfte, H., Voxeur, A. (2017) Plant cell walls. *Curr Biol* 27: R865–R870.
- Hong, Z., Delauney, A.J., Verma, D.P.S. (2001) A cell plate-specific callose synthase and its interaction with phragmoplastin. *Plant Cell* 13: 755–768.
- Houston, K., Tucker, M.R., Chowdhury, J., Shirley, N., Little, A. (2016) The Plant Cell Wall: A Complex and Dynamic Structure As Revealed by the Responses of Genes under Stress Conditions. *Front Plant Sci* 7: 984.
- Hu, B., Jin, J., Guo, A.Y., Zhang, H., Luo, J., Gao, G. (2015) GSDS 2.0: An upgraded

- gene feature visualization server. *Bioinformatics* 31: 1296–1297.
- Huang, H., Ullah, F., Zhou, D.-X., Yi, M., Zhao, Y. (2019) Mechanisms of ROS Regulation of Plant Development and Stress Responses .
- Hubbs, T., Irwin, S., Good, D. (2017) Assessing Brazilian Soybean Yield Risks: Historical Deviations from Trend. *Dep Agric Consum Econ Univ Illinois* 1–8.
- Hunter, K., Kimura, S., Rokka, A., Tran, H.C., Toyota, M., Kukkonen, J.P., Wrzaczek, M. (2019) CRK2 Enhances Salt Tolerance by Regulating Callose Deposition in Connection with PLD $\alpha$ 1. *Plant Physiol* 180: 2004–2021.
- Iglesias, V.A., Meins Jr, F. (2000) Movement of plant viruses is delayed in a  $\beta$ -1,3-glucanase-deficient mutant showing a reduced plasmodesmatal size exclusion limit and enhanced callose deposition. *Plant J* 21: 157–166.
- IPCC. (2019) Climate Change and Land: an IPCC special report. *Clim Chang L an IPCC Spec Rep Clim Chang Desertif L Degrad Sustain L Manag food Secur Greenh gas fluxes Terr Ecosyst* 1–864.
- Iqbal, M.S., Singh, A.K., Ansari, M.I. (2020) Effect of Drought Stress on Crop Production BT - New Frontiers in Stress Management for Durable Agriculture. *In: Rakshit, A., Singh, H.B., Singh, A.K., et al. (ed). Singapore: Springer Singapore, p. 35–47* 35–47
- Jacobs, A.K., Lipka, V., Burton, R.A., Panstruga, R., Strizhov, N., Schulze-Lefert, P., Fincher, G.B. (2003) An Arabidopsis Callose Synthase, GSL5, Is Required for Wound and Papillary Callose Formation . *Plant Cell* 15: 2503–2513.
- Jin, L., Mackey, D.M. (2017) Measuring callose deposition, an indicator of cell wall reinforcement, during bacterial infection in Arabidopsis. *Methods Mol Biol* 1578: 195–205.
- Kaliff, M., Staal, J., Myrenås, M., Dixelius, C. (2007) ABA Is Required for Leptosphaeria maculans Resistance via ABI1- and ABI4-Dependent Signaling. *Mol Plant-Microbe Interact* 20: 335–345.
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B.Q., Wong, T.K.F., von Haeseler, A., Jermin, L.S. (2017) ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates.

*Nat Methods* 14: 587–589.

Karnovsky, M. (1964) *A Formaldehyde-Glutaraldehyde Fixative of High Osmolality for Use in Electron Microscopy*. 1964–1965p.

Kawano, T. (2003) Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. *Plant Cell Rep* 21: 829–837.

Keen, K.J. (2018) *Graphics for Statistics and Data Analysis with R*. CRC Press, 590p.

Kong, L., Wang, F., Si, J., Feng, B., Zhang, B., Li, S., Wang, Z. (2013) Increasing in ROS levels and callose deposition in peduncle vascular bundles of wheat (*Triticum aestivum* L.) grown under nitrogen deficiency. *J Plant Interact* 8: 109–116.

Krzyszowska, M. (2011) The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy. *Acta Physiol Plant* 33: 35–51.

Lashbrook, C.C., Cai, S. (2008) Cell wall remodeling in Arabidopsis stamen abscission zones. *Plant Signal Behav* 3: 733–736.

Lee, T.-H., Kim, J., Robertson, J.S., Paterson, A.H. (2017) Plant Genome Duplication Database BT - Plant Genomics Databases: Methods and Protocols. In: van Dijk, A.D.J. (ed). New York, NY: Springer New York, p. 267–277

Leijon, F., Melzer, M., Zhou, Q., Srivastava, V., Bulone, V. (2018) Proteomic Analysis of Plasmodesmata From Populus Cell Suspension Cultures in Relation With Callose Biosynthesis .

Li, K.-B. (2003) ClustalW-MPI: ClustalW analysis using distributed and parallel computing.

Lin, C.C., Kao, C.H. (2002) Osmotic stress-induced changes in cell wall peroxidase activity and hydrogen peroxide level in roots of rice seedlings. *Plant Growth Regul* 37: 177–184.

- Liu, F., Zou, Z., Dilantha Fernando, W.G., Fernando, W.G.D. (2018) Characterization of Callose Deposition and Analysis of the Callose Synthase Gene Family of *Brassica napus* in Response to *Leptosphaeria maculans*. *Int J Mol Sci* 19: 3769.
- López-Cruz, J., Óscar, C.-S., Emma, F.-C., Pilar, G.-A., Carmen, G.-B. (2017) Absence of Cu–Zn superoxide dismutase BCSOD1 reduces *Botrytis cinerea* virulence in *Arabidopsis* and tomato plants, revealing interplay among reactive oxygen species, callose and signalling pathways. *Mol Plant Pathol* 18: 16–31.
- Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., Ton, J. (2011) Callose deposition: A multifaceted plant defense response. *Mol Plant-Microbe Interact* 24: 183–193.
- Malinovsky, F.G., Fangel, J.U., Willats, W.G.T. (2014) The role of the cell wall in plant immunity. *Front Plant Sci* 5: 1–12.
- Matern, A., Böttcher, C., Eschen-Lippold, L., Westermann, B., Smolka, U., Döll, S., Trempel, F., Aryal, B., Scheel, D., Geisler, M., Rosahl, S. (2019) A substrate of the ABC transporter PEN3 stimulates bacterial flagellin (flg22)-induced callose deposition in *Arabidopsis thaliana*.
- Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., Qureshi, M., Salazar, G.A., Sonnhammer, E.L.L., Tosatto, S.C.E., Paladin, L., Raj, S., Richardson, L.J., Finn, R.D., Bateman, A. (2021) Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Res* 49: D412–D419.
- Mittler, R. (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci* 11: 15–19.
- Nedukha, O.M. (2015) Callose: Localization, functions, and synthesis in plant cells.
- Nelson, N. (1944) A PHOTOMETRIC ADAPTATION OF THE SOMOGYI METHOD FOR THE DETERMINATION OF GLUCOSE.
- Nguyen, L.-T., Schmidt, H.A., von Haeseler, A., Minh, B.Q. (2015) IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol* 32: 268–274.

- Nishimura, M.T., Stein, M., Hou, B.-H., Vogel, J.P., Edwards, H., Somerville, S.C. (2003) Loss of a Callose Synthase Results in Salicylic Acid-Dependent Disease Resistance. *Science* (80- ) 301: 969 LP – 972.
- Niu, Q., Zhang, P., Su, S., Jiang, B., Liu, X., Li, C., Yu, T., Yi, H., Tang, J., Cao, M. (2021) Characterization and Expression Analyses of Callose Synthase Enzyme (Cals) Family Genes in Maize (*Zea mays* L.). *Biochem Genet.* doi: 10.1007/s10528-021-10103-5
- Nordhaus, W. (2019) Climate Change: The Ultimate Challenge for Economics. *Am Econ Rev* 109: 1991–2014.
- Novaković, L., Guo, T., Bacic, A., Sampathkumar, A., Johnson, K.L. (2018) Hitting the Wall—Sensing and Signaling Pathways Involved in Plant Cell Wall Remodeling in Response to Abiotic Stress.
- O'Brien, J.A., Daudi, A., Butt, V.S., Paul Bolwell, G. (2012) Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta* 236: 765–779.
- O'Leary, R., Kasai, K., Clark, N., Fujiwara, T., Sozzani, R., Gallagher, K.L. (2018) Exposure to heavy metal stress triggers changes in plasmodesmatal permeability via deposition and breakdown of callose. *J Exp Bot* 69: 3715–3728.
- OECD-FAO. (2020) *OECD-FAO Agricultural Outlook 2020-2029*. OECD,
- OECD-FAO. (2015) *Agricultural Outlook 2015-2024: Special Feature – Brazil:Prospects and Challenges*.
- Pagel, J., Walling, J.G., Young, N.D., Shoemaker, R.C., Jackson, S.A. (2004) Segmental duplications within the Glycine max genome revealed by fluorescence in situ hybridization of bacterial artificial chromosomes. *Genome* 47: 764–768.
- Paterlini, A., Dorussen, D., Fichtner, F., van Rongen, M., Delacruz, R., Vojnović, A., Helariutta, Y., Leyser, O. (2021) Callose accumulation in specific phloem cell types reduces axillary bud growth in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 231: 516–523.

- Pillai, S.E., Kumar, C., Patel, H.K., Sonti, R. V. (2018) Overexpression of a cell wall damage induced transcription factor, OsWRKY42, leads to enhanced callose deposition and tolerance to salt stress but does not enhance tolerance to bacterial infection. *BMC Plant Biol* 18: 177.
- Piršelová, B., Matušíková, I. (2013) Callose: the plant cell wall polysaccharide with multiple biological functions. *Acta Physiol Plant* 35: 635–644.
- Pörtner, H.O., Scholes, R.J., Agard, J., Archer, E., Arneth, A., Bai, X., Barnes, D., Burrows, M., Chan, L., Cheung, W.L. (2021) IPBES-IPCC co-sponsored workshop report on biodiversity and climate change.
- Pu, Y., Hou, L., Guo, Y., Ullah, I., Yang, Y., Yue, Y. (2019) Genome-wide analysis of the callose enzyme families of fertile and sterile flower buds of the Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *FEBS Open Bio* 9: 1432–1449.
- Qi, T., Guo, J., Liu, P., He, F., Wan, C., Islam, M.A., Tyler, B.M., Kang, Z., Guo, J. (2019) Stripe Rust Effector PstGSRE1 Disrupts Nuclear Localization of ROS-Promoting Transcription Factor TaLOL2 to Defeat ROS-Induced Defense in Wheat. *Mol Plant* 12: 1624–1638.
- Ramada, M.H.S., Lopes, F.Á.C., Ulhoa, C.J., do Nascimento Silva, R. (2010) Optimized microplate  $\beta$ -1,3-glucanase assay system for *Trichoderma* spp. screening.
- Ray, D.K., Gerber, J.S., Macdonald, G.K., West, P.C. (2015) Climate variation explains a third of global crop yield variability. *Nat Commun* 6: 1–9.
- Rejeb, I.B., Pastor, V., Mauch-Mani, B. (2014) Plant Responses to Simultaneous Biotic and Abiotic Stress: Molecular Mechanisms.
- Richmond, T. (2000) A simple modular architecture research tool for the identification of signaling domains.
- Richmond, T.A., Somerville, C.R. (2000) The cellulose synthase superfamily. *Plant Physiol* 124: 495–498.
- Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S., Mittler, R. (2004) When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination



- of drought and heat stress. *Plant Physiol* 134: 1683–1696.
- Rui, Y., Dinneny, J.R. (2020) A wall with integrity: surveillance and maintenance of the plant cell wall under stress. *New Phytol* 225: 1428–1439.
- Saatian, B., Austin, R.S., Tian, G., Chen, C., Nguyen, V., Kohalmi, S.E., Geelen, D., Cui, Y. (2018) Analysis of a novel mutant allele of *GSL8* reveals its key roles in cytokinesis and symplastic trafficking in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol* 18: 295.
- Saddique, M., Kamran, M., Shahbaz, M. (2018) *Differential Responses of Plants to Biotic Stress and the Role of Metabolites*. Elsevier Inc., 69–87p.
- Saheed, S.A., Cierlik, I., Larsson, K.A.E., Delp, G., Bradley, G., Jonsson, L.M. V., Botha, C.E.J. (2009) Stronger induction of callose deposition in barley by Russian wheat aphid than bird cherry-oat aphid is not associated with differences in callose synthase or  $\beta$ -1,3-glucanase transcript abundance. *Physiol Plant* 135: 150–161.
- Sangi, S., Araújo, P.M., Coelho, F.S., Gazara, R.K., Almeida-Silva, F., Venancio, T.M., Grativol, C. (2021) Genome-wide analysis of the cobra-like gene family supports gene expansion through whole-genome duplication in soybean (*Glycine max*). *Plants* 10: 1–13.
- Schmutz, J., Cannon, S.B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., Hyten, D.L., Song, Q., Thelen, J.J., Cheng, J., Xu, D., Hellsten, U., May, G.D., Valliyodan, B., Lindquist, E., Peto, M., Grant, D., Shu, S., Goodstein, D., Barry, K., Futrell-griggs, M., Abernathy, B., Du, J., Tian, Z., Zhu, L., Gill, N., Joshi, T., Libault, M., Sethuraman, A., Zhang, X., Shinozaki, K., Nguyen, H.T., Wing, R.A., Cregan, P., Specht, J., Grimwood, J., Rokhsar, D., Stacey, G., Shoemaker, R.C., Jackson, S.A. (2010) Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463: 178–183.
- Schneider, R., Hanak, T., Persson, S., Voigt, C.A. (2016) Cellulose and callose synthesis and organization in focus, what's new? *Curr Opin Plant Biol* 34: 9–16.
- Schuette, S., Wood, A.J., Geisler, M., Geisler-Lee, J., Ligrone, R., Renzaglia, K.S. (2009) Novel localization of callose in the spores of *Physcomitrella patens* and

- phylogenomics of the callose synthase gene family. *Ann Bot* 103: 749–756.
- Shedletzky, E., Unger, C., Delmer, D.P. (1997) A Microtiter-Based Fluorescence Assay for (1,3)- $\beta$ -Glucan Synthases.
- Shi, Q., Febres, V.J., Jones, J.B., Moore, G.A. (2015a) Responsiveness of different citrus genotypes to the *Xanthomonas citri* ssp. *citri*-derived pathogen-associated molecular pattern (PAMP) flg22 correlates with resistance to citrus canker. *Mol Plant Pathol* 16: 507–520.
- Shi, X., Sun, X., Zhang, Z., Feng, D., Zhang, Q., Han, L., Wu, J., Lu, T. (2015b) GLUCAN SYNTHASE-LIKE 5 (GSL5) Plays an Essential Role in Male Fertility by Regulating Callose Metabolism During Microsporogenesis in Rice. *Plant Cell Physiol* 56: 497–509.
- Shoemaker, R.C., Polzin, K., Labate, J., Specht, J., Brummer, E.C., Olson, T., Young, N., Concibido, V., Wilcox, J., Tamulonis, J.P., Kochert, G., Boerma, H.R. (1996) Genome Duplication in Soybean (*Glycine* subgenus *soja*). *Genetics* 144: 329–338.
- Sørensen, I., Domozych, D., Willats, W.G.T. (2010) How have plant cell walls evolved?. *Plant Physiol.* doi: 10.1104/pp.110.154427
- Stass, A., Horst, W.J. (2009) Callose in Abiotic Stress. *In*: Bacic, A., Fincher, G.B., Stone Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides, B.A.B.T.-C. (ed) *Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides*. San Diego: Academic Press, p. 499–524
- Suarez-Rodriguez, M.C., Adams-Phillips, L., Liu, Y., Wang, H., Su, S.-H., Jester, P.J., Zhang, S., Bent, A.F., Krysan, P.J. (2007) MEKK1 Is Required for flg22-Induced MPK4 Activation in Arabidopsis Plants. *Plant Physiol* 143: 661–669.
- Sun, H., Wei, H., Wang, H., Hao, P., Gu, L., Liu, G., Ma, L., Su, Z., Yu, S. (2019) Genome-wide identification and expression analysis of the BURP domain-containing genes in *Gossypium hirsutum*. *BMC Genomics* 20: 1–19.
- Suzuki, N., Rivero, R.M., Shulaev, V., Blumwald, E., Mittler, R. (2014) Abiotic and

- biotic stress combinations. *New Phytol* 203: 32–43.
- Takai, R., Isogai, A., Takayama, S., Che, F.S. (2008) Analysis of flagellin perception mediated by flg22 receptor OsFLS2 in rice. *Mol Plant-Microbe Interact* 21: 1635–1642.
- Tenhaken, R. (2015) Cell wall remodeling under abiotic stress .
- The Angiosperm Phylogeny Group III. (2009) An update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot J Linn Soc* 161: 105–121.
- Tian, S.-N., Liu, D.-D., Zhong, C.-L., Xu, H.-Y., Yang, S., Fang, Y., Ran, J., Liu, J.-Z. (2020) Silencing GmFLS2 enhances the susceptibility of soybean to bacterial pathogen through attenuating the activation of GmMAPK signaling pathway. *Plant Sci* 292: 110386.
- Töller, A., Brownfield, L., Neu, C., Twell, D., Schulze-Lefert, P. (2008) Dual function of *Arabidopsis* glucan synthase-like genes GSL8 and GSL10 in male gametophyte development and plant growth. *Plant J* 54: 911–923.
- Underwood, W. (2012) The plant cell wall : a dynamic barrier against pathogen invasion. 3: 1–6.
- Upadhyaya, H., Sahoo, L., Panda, S.K. (2013) Molecular Physiology of Osmotic Stress in Plants BT - Molecular Stress Physiology of Plants. *In*: Rout, G.R., Das, A.B. (ed). India: Springer India, p. 179–192 179–192
- USDA. (2020) Department of agriculture national agricultural statistics service agricultural agricultural statistics 2020. 1–9.
- Vaahtera, L., Schulz, J., Hamann, T. (2019) Cell wall integrity maintenance during plant development and interaction with the environment. *Nat Plants* 5: 924–932.
- Varner, J.E., Lin, L.-S. (1989) Plant cell wall architecture. *Cell* 56: 231–239.
- Varshney, R.K., Thudi, M., Pandey, M.K., Tardieu, F., Ojiewo, C., Vadez, V., Whitbread, A.M., Siddique, K.H.M., Nguyen, H.T., Carberry, P.S., Bergvinson, D. (2018) Accelerating genetic gains in legumes for the development of

- prosperous smallholder agriculture: Integrating genomics, phenotyping, systems modelling and agronomy. *J Exp Bot* 69: 3293–3312.
- Vatén, A., Dettmer, J., Wu, S., Stierhof, Y.-D., Miyashima, S., Yadav, S.R., Roberts, C.J., Campilho, A., Bulone, V., Lichtenberger, R., Lehesranta, S., Mähönen, A.P., Kim, J.-Y., Jokitalo, E., Sauer, N., Scheres, B., Nakajima, K., Carlsbecker, A., Gallagher, K.L., Helariutta, Y. (2011) Callose Biosynthesis Regulates Symplastic Trafficking during Root Development. *Dev Cell* 21: 1144–1155.
- Vats, S. (2018) Biotic and abiotic stress tolerance in plants. *Biot Abiotic Stress Toler Plants* 1–367.
- Verma, D.P., Hong, Z. (2001a) Plant callose synthase complexes. *Plant Mol Biol* 47: 693–701.
- Verma, D.P.S., Hong, Z. (2001b) Plant callose synthase complexes. *Plant Mol Biol* 47: 693–701.
- Voigt, C.A., Schäfer, W., Salomon, S. (2006) A comprehensive view on organ-specific callose synthesis in wheat (*Triticum aestivum* L.): glucan synthase-like gene expression, callose synthase activity, callose quantification and deposition. *Plant Physiol Biochem* 44: 242–247.
- Volgger, M., Lang, I., Ovečka, M., Lichtscheidl, I. (2010) Plasmolysis and cell wall deposition in wheat root hairs under osmotic stress. *Protoplasma* 243: 51–62.
- Wakabayashi, K., Hoson, T., Kamisaka, S. (1997) Suppression of cell wall stiffening along coleoptiles of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings grown under osmotic stress conditions. *J Plant Res* 110: 311–316.
- Wan, L., Zha, W., Cheng, X., Liu, C., Lv, L., Liu, C., Wang, Z., Du, B., Chen, R., Zhu, L., He, G. (2011) A rice  $\beta$ -1,3-glucanase gene *Osg1* is required for callose degradation in pollen development. *Planta* 233: 309–323.
- Wang, B., Fang, R., Zhang, J., Han, J., Chen, F., He, F., Liu, Y.-G., Chen, L. (2020) Rice LecRK5 phosphorylates a UGPase to regulate callose biosynthesis during pollen development. *J Exp Bot* 71: 4033–4041.
- Wang, C., Chen, L., Yang, H., Yang, S., Wang, J. (2019) Genome-wide

- identification, expression and functional analysis of *Populus* xylogen-like genes. *Plant Sci* 287: 110191.
- Wang, K.-Q., Yu, Y.-H., Jia, X.-L., Zhou, S.-D., Zhang, F., Zhao, X., Zhai, M.-Y., Gong, Y., Lu, J.-Y., Guo, Y., Yang, N.-Y., Wang, S., Xu, X.-F., Yang, Z.-N. (2021a) Delayed callose degradation restores the fertility of multiple P/TGMS lines in *Arabidopsis*. *J Integr Plant Biol*. doi: <https://doi.org/10.1111/jipb.13205>
- Wang, Y., Li, X., Fan, B., Zhu, C., Chen, Z. (2021b) Regulation and Function of Defense-Related Callose Deposition in Plants. *Int J Mol Sci* 22: 1–15.
- Wang, Y., Tang, H., DeBarry, J.D., Tan, X., Li, J., Wang, X., Lee, T., Jin, H., Marler, B., Guo, H., Kissinger, J.C., Paterson, A.H. (2012) MCScanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity. *Nucleic Acids Res* 40: e49–e49.
- Wei, Y., Balaceanu, A., Rufian, J.S., Segonzac, C., Zhao, A., Morcillo, R.J.L., Macho, A.P. (2020) An immune receptor complex evolved in soybean to perceive a polymorphic bacterial flagellin. *Nat Commun* 11: 3763.
- Wu, S.-W., Kumar, R., Iswanto, A.B.B., Kim, J.-Y. (2018) Callose balancing at plasmodesmata. *J Exp Bot* 69: 5325–5339.
- Xiao, J., Xia, H., Zhou, J., Azmi, I.F., Davies, B.A., Katzmann, D.J., Xu, Z. (2008) Structural Basis of Vta1 Function in the Multivesicular Body Sorting Pathway. *Dev Cell* 14: 37–49.
- Xie, B., Deng, Y., Kanaoka, M.M., Okada, K., Hong, Z. (2012) Expression of *Arabidopsis* callose synthase 5 results in callose accumulation and cell wall permeability alteration. *Plant Sci* 183: 1–8.
- Xiong, L., Zhu, J.-K. (2002) Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell Environ* 25: 131–139.
- Yadong, S., Lei, L., P., M.A., Zhifu, H., Zehan, H., Cyril, Z., Jian-Min, Z., Jijie, C. (2013) Structural Basis for flg22-Induced Activation of the *Arabidopsis* FLS2-BAK1 Immune Complex. *Science (80- )* 342: 624–628.
- Yi, G., Wu, W., Wei, T. (2021) Delivery of Rice Gall Dwarf Virus Into Plant Phloem

by Its Leafhopper Vectors Activates Callose Deposition to Enhance Viral Transmission .

- Yu, Y., Jiao, L., Fu, S., Yin, L., Zhang, Y., Lu, J. (2016) Callose synthase family genes involved in the grapevine defense response to downy mildew disease. *Phytopathology* 106: 56–64.
- Zabotin, A.I., Barysheva, T.S., Trofimova, O.I., Lozovaya, V. V., Widholm, J. (2002) Regulation of Callose Metabolism in Higher Plant Cells in vitro. *Russ J Plant Physiol* 49: 792–798.
- Zamil, M.S., Geitmann, A. (2017) The middle lamella—more than a glue. *Phys Biol* 14: 15004.
- Zavaliev, R., Levy, A., Gera, A., Epel, B.L. (2013) Subcellular Dynamics and Role of Arabidopsis  $\beta$ -1,3-Glucanases in Cell-to-Cell Movement of Tobamoviruses. *Mol Plant-Microbe Interact* 26: 1016–1030.
- Zhang, B., Gao, Y., Zhang, L., Zhou, Y. (2021) The plant cell wall: Biosynthesis, construction, and functions. *J Integr Plant Biol* 63: 251–272.
- Zhao, Y., Man, Y., Wen, J., Guo, Y., Lin, J. (2019) Advances in Imaging Plant Cell Walls. *Trends Plant Sci* 24: 867–878.
- Zilli, M., Scarabello, M., Soterroni, A.C., Valin, H., Mosnier, A., Leclère, D., Havlík, P., Kraxner, F., Lopes, M.A., Ramos, F.M. (2020) The impact of climate change on Brazil's agriculture. *Sci Total Environ* 740: 139384.

## APÉNDICE

**Tabela S1.** Desenho dos iniciadores dos genes GSL.

<b>Target</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
GmGSL23	GGCTTTCATTCTACTGGTTG	GGCAATGGGTACAAAGATGAG
GmGSL21	GCCTCCAAAGTTATCAATCTAAG	ACCCACATCTCTTCCCTTC
GmGSL10	AAGAGCATCTCCAATATTCTGG	CCATGAAATGCCATAGACCAG
GmGSL12	CAGAGCAGGAGTTTTGTGG	GTAGCTCGATATTTTGACCCC
GmGSL13	GTTTCCCAAGGTTCTTAAAGC	CATCAACATACGCCACTCG
GmGSL4	CCTTGCATTTATCCCTACTGG	CCATTCCAGCGTCATACATTC
GmGSL5	GCTCTTCCATGACTGCTATAG	GTTGGCTTGATTGTAGAGGG

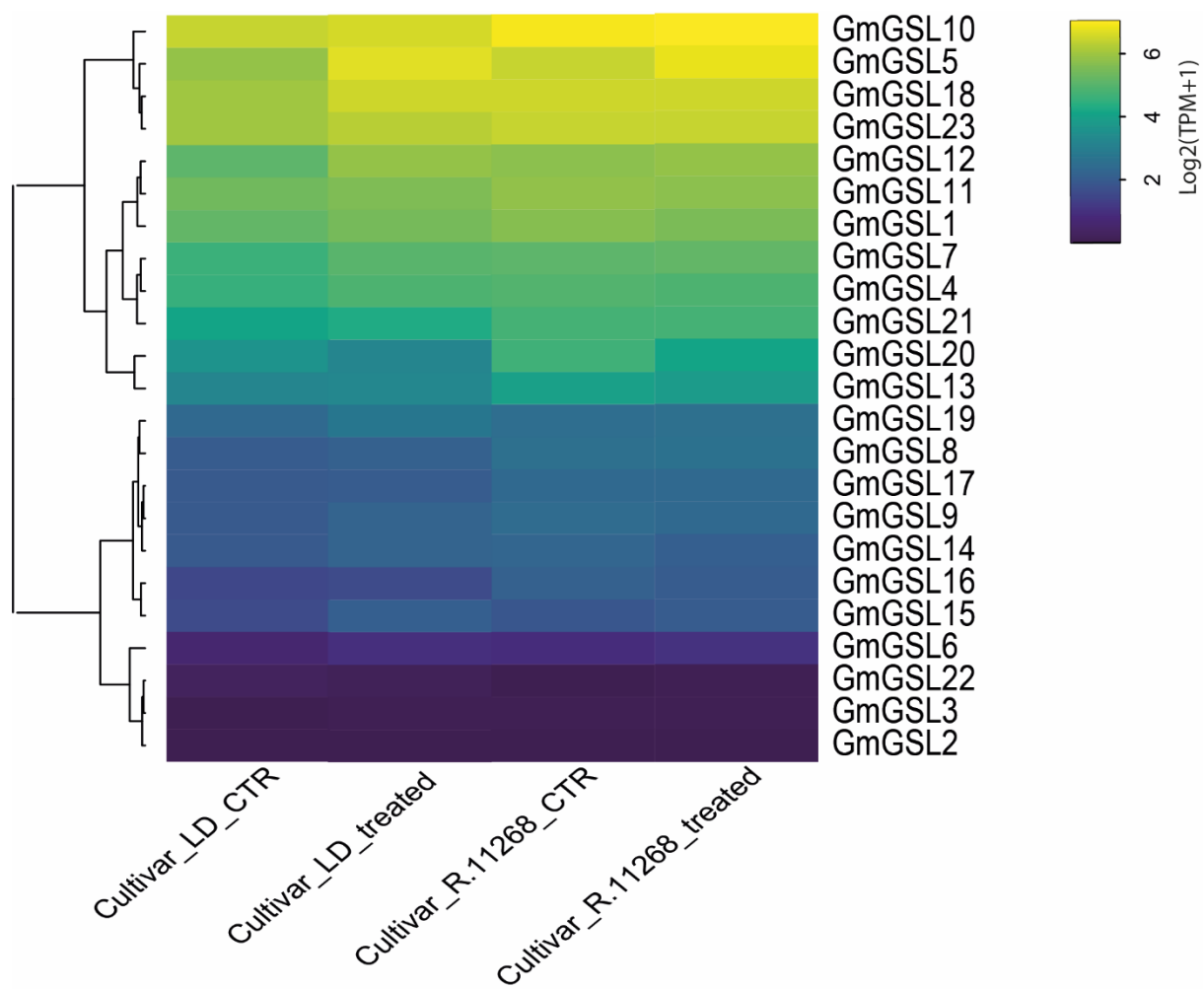
**Tabela S2.** Genes GSL identificados em *Phaseolus vulgaris*.

<b>Gene name</b>	<b>Gene ID</b>
<i>PvGSL1</i>	Phvul.002G271904
<i>PvGSL2</i>	Phvul.005G062500
<i>PvGSL3</i>	Phvul.005G103600
<i>PvGSL4</i>	Phvul.006G185600
<i>PvGSL5</i>	Phvul.006G031850
<i>PvGSL6</i>	Phvul.006G032100
<i>PvGSL7</i>	Phvul.007G004900
<i>PvGSL8</i>	Phvul.007G005100
<i>PvGSL9</i>	Phvul.008G002300
<i>PvGSL10</i>	Phvul.008G002250
<i>PvGSL11</i>	Phvul.011G113800

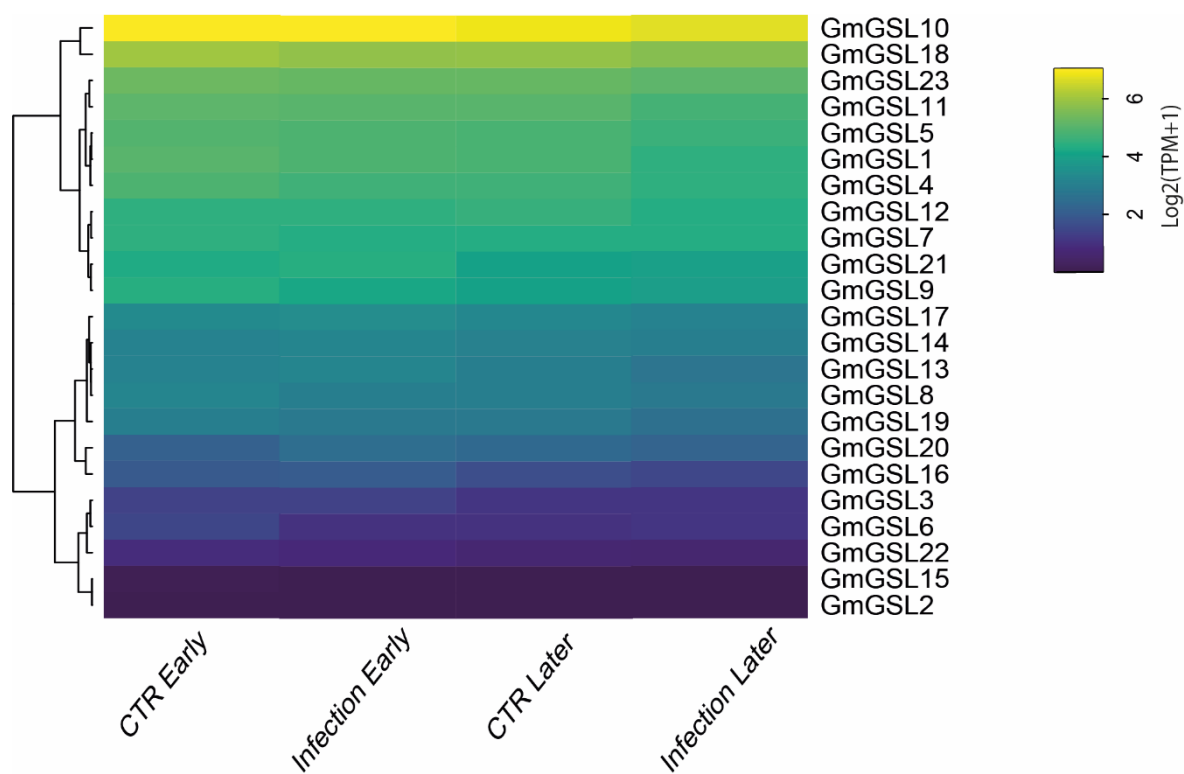


**Tabela S3.** Tipos de duplicação que ocorrem nos genes GSL no genoma da soja.

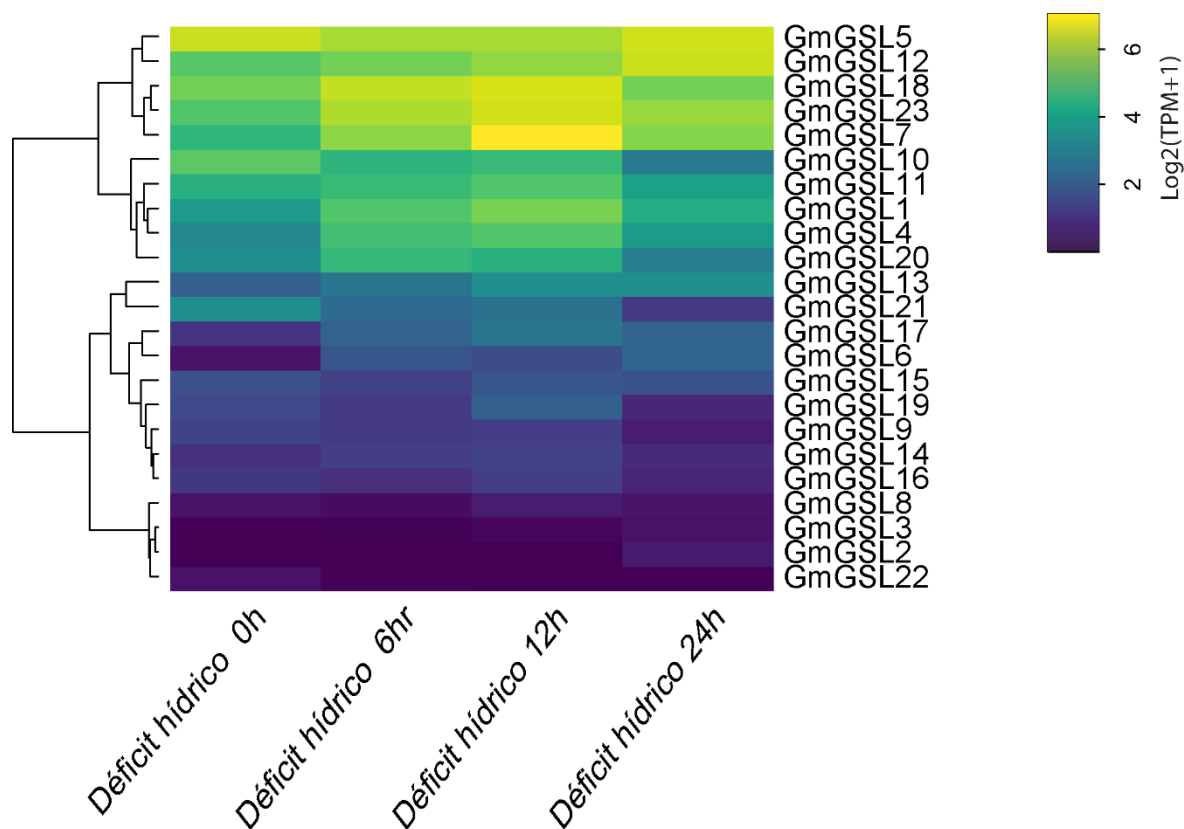
<b>ID do gene</b>	<b>Tipo de Duplicação</b>
GmGSL1	WGD ou Segmental
GmGSL2	WGD ou Segmental
GmGSL3	WGD ou Segmental
GmGSL4	Dispersa
GmGSL5	WGD ou Segmental
GmGSL6	WGD ou Segmental
GmGSL7	WGD ou Segmental
GmGSL8	WGD ou Segmental
GmGSL9	Proximal
GmGSL10	WGD ou Segmental
GmGSL11	WGD ou Segmental
GmGSL12	WGD ou Segmental
GmGSL13	WGD ou Segmental
GmGSL14	WGD ou Segmental
GmGSL15	WGD ou Segmental
GmGSL16	WGD ou Segmental
GmGSL17	WGD ou Segmental
GmGSL18	WGD ou Segmental
GmGSL19	Dispersa
GmGSL20	WGD ou Segmental
GmGSL21	WGD ou Segmental
GmGSL22	WGD ou Segmental
GmGSL23	WGD ou Segmental



**Figura S1.** Expressão (TPM) de GmGSL em folhas de soja tratadas com solução de MAMP.



**Figura S2.** Expressão (TPM) de GmGSL em plântulas de soja infectadas por *Fusarium* spp.



**Figura S3.** Expressão (TPM) de GmGSL em folhas de soja sob déficit hídrico.