METILAÇÃO DO DNA EM SOJA: CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS "LEITORAS" DA METILAÇÃO DO DNA E EFEITO DA METILAÇÃO NA GERMINAÇÃO E NO DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS

FERNANDA SILVA COELHO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO UENF

> CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ MAIO – 2022

METILAÇÃO DO DNA EM SOJA: CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS "LEITORAS" DA METILAÇÃO DO DNA E EFEITO DA METILAÇÃO NA GERMINAÇÃO E NO DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS

FERNANDA SILVA COELHO

"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^a. Dr^a. Clícia Grativol Gaspar de Matos

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ MAIO - 2022

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

C672 Coelho, Fernanda Silva.

Metilação do DNA em soja : caracterização de proteínas "leitoras" da metilação do DNA e efeito da metilação na germinação e no desenvolvimento de plântulas / Fernanda Silva Coelho. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2022.

145 f. Bibliografia: 87 - 116.

Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2022. Orientadora: Clícia Grativol Gaspar.

1. Metilação do DNA. 2. MBD. 3. Desenvolvimento da soja. 4. Expressão gênica. 5. 5azacitina. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 631.5233

METILAÇÃO DO DNA EM SOJA: CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS "LEITORAS" DA METILAÇÃO DO DNA E EFEITO DA METILAÇÃO NA GERMINAÇÃO E NO DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS

FERNANDA SILVA COELHO

"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 24 de maio de 2022.

Comissão Examinadora:

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

Prof.ª Claudete Santa Catarina (D.Sc., Biotecnologia) - UENF

Prof. Michel Georges Albert Vincentz (0, Sc., Biologia Molecular e Celular) - UNICAMP

Unia atiul Gosponde motos

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

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a mim e aos meus pais. Só eu sei o quanto cresci pessoalmente e profissionalmente nestes 4 anos de doutorado. Aos meus pais, José e Creide por sempre apoiarem meus estudos e pela compreensão nos momentos de ausência dedicados aos estudos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pela oportunidade e estrutura para realização de uma Pós-Graduação gratuita e de qualidade.

À FAPERJ pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa.

À minha orientadora Dr^a Clícia Grativol Gaspar de Matos por sua dedicação, paciência, conversas, conselhos e incentivos que contribuíram para o meu crescimento científico e profissional.

Agradeço a Deus por ter me dado saúde, coragem, disposição e aprendizado para conduzir este trabalho, podendo assim amadurecer profissional e pessoalmente.

Ao meu pai, minha mãe e minha família por me incentivarem, me apoiarem, serem minha base, por todo carinho e compreensão.

Ao meu noivo, Marcos Pedrosa Pereira, por sempre estar ao meu lado, por apoiar minhas escolhas, por sempre me ajudar. Enfim, obrigada por essa parceria de anos.

Agradeço aos meus amigos, Jacymara, Juliana e Walaci por tornar essa caminhada mais leve.

Agradeço aos colegas de laboratório Sara, Juliana, Paula, Geovanna, Giulia e Caroline pela convivência, pela amizade, confraternizações e por compartilhar que o conhecimento vai muito além dos livros. Aos meus conselheiros, professora Dr^a Antônia Elenir Amâncio e Dr. Messias Pereira.

Aos professores, alunos e técnicos do LQFPP, que prontamente me auxiliaram quando precisava utilizar algum equipamento ou tirar alguma dúvida.

À professora Dr^a Adriana Hemerly e ao Dr. Helkin pela disponibilidade e colaboração.

Ao professor Dr. Lyderson e ao Dr. Elyabe pela atenção, disponibilidade e colaboração.

Ao professor Dr. Jurandi e ao Dr. Edinaldo pela disponibilidade e colaboração com esse trabalho.

À professora Dr^a Eny e seu grupo pelas contribuições e colaboração com esse trabalho.

À professora Dr^a Claudete Santa-Catarina e ao Renan pela contribuição e colaboração.

Ao professor Dr. Vanildo e ao Dr. Felipe pela disponibilidade, colaboração e contribuição para realização deste trabalho.

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

SUMÁRIO

RESUMO xii
ABSTRACT xiv
1. INTRODUÇÃO1
2. OBJETIVOS
2.1. Objetivo geral
2.2. Objetivos específicos
3. CAPÍTULOS
3.1 EVOLUÇÃO E CONSERVAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA FAMÍLIA COM
DOMÍNIO DE LIGAÇÃO AO METIL-CPG (MBD) EM PLANTAS4
3.1.1. NTRODUÇÃO
3.1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA
3.1.2.1. Metilação do DNA5
3.1.2.2.Proteínas com Domínio de Ligação ao Metil-CpG (MBD) em animais e
2122 Evolução concerveção o eventes de duplicação no concerve de
S.I.Z.S.Evolução, conservação e eventos de duplicação no genoma de
3.1.3. MATERIAL E METODOS
3.1.3.1. Identificação e anotação de genes MBD no genoma de soja e feijão-
comum9
3.1.3.2. Similaridade entre proteínas MBD de diferentes espécies10
3.1.3.3. Estrutura gênica e proteica de MBD10

3.1.3.4. Análise de duplicação de genes e estimativa de taxas de substituição
ka/ks10
3.1.3.5. Análise da região promotora11
3.1.3.6. Perfil de expressão dos genes GmMBD parálogos11
3.1.3.7. Análise filogenética dos genes MBD11
3.1.3.8. Modelagem molecular de AtMBD, GmMBD, PvMBD e MBD de humanos e
sua interação com metil-CpG12
3.1.3.9. Extração de RNA, construção de cDNA e expressão por RT-qPC 12
3.1.4. RESULTADOS 13
3.1.4.1. Identificação e caracterização das proteínas MBD no genoma de soja e
feijão-comum13
3.1.4.2. Eventos de duplicação dos genes MBD em soja e feijão19
3.1.4.3. Análise filogenética de proteínas MBD em plantas23
3.1.4.4. Conservação de MBD entre plantas e humanos e sua capacidade de
interação com sítios CpG metilados25
3.1.5. DISCUSSÃO
3.1.6. CONCLUSÃO
3.1.6. CONCLUSÃO
3.1.6. CONCLUSÃO353.2. EFEITO DA METILAÇÃO DO DNA NA GERMINAÇÃO EDESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE SOJA36
3.1.6. CONCLUSÃO
3.1.6. CONCLUSÃO
3.1.6. CONCLUSÃO 35 3.2. EFEITO DA METILAÇÃO DO DNA NA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE SOJA 3.2.1. INTRODUÇÃO 36 3.2.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 37 3.2.2.1. Soja: Classificação botânica, morfologia, origem e importância
3.1.6. CONCLUSÃO 35 3.2. EFEITO DA METILAÇÃO DO DNA NA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE SOJA 36 3.2.1. INTRODUÇÃO 36 3.2.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 37 3.2.2.1. Soja: Classificação botânica, morfologia, origem e importância 37
3.1.6. CONCLUSÃO 35 3.2. EFEITO DA METILAÇÃO DO DNA NA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE SOJA 36 3.2.1. INTRODUÇÃO 36 3.2.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 37 3.2.2.1. Soja: Classificação botânica, morfologia, origem e importância econômica 37 3.2.2.2. Semente de soja, aspectos gerais da germinação e desenvolvimento da
3.1.6. CONCLUSÃO 35 3.2. EFEITO DA METILAÇÃO DO DNA NA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE SOJA 36 3.2.1. INTRODUÇÃO 36 3.2.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 37 3.2.2.1. Soja: Classificação botânica, morfologia, origem e importância 37 3.2.2.2. Semente de soja, aspectos gerais da germinação e desenvolvimento da planta. 39
3.1.6. CONCLUSÃO 35 3.2. EFEITO DA METILAÇÃO DO DNA NA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE SOJA 36 3.2.1. INTRODUÇÃO 36 3.2.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 37 3.2.2.1. Soja: Classificação botânica, morfologia, origem e importância 37 3.2.2.2. Semente de soja, aspectos gerais da germinação e desenvolvimento da planta. 39 3.2.2.3. Regulação epigenética em plantas. 42
3.1.6. CONCLUSÃO 35 3.2. EFEITO DA METILAÇÃO DO DNA NA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE SOJA 36 3.2.1. INTRODUÇÃO 36 3.2.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 37 3.2.2.1. Soja: Classificação botânica, morfologia, origem e importância econômica 37 3.2.2.2. Semente de soja, aspectos gerais da germinação e desenvolvimento da planta 39 3.2.2.3. Regulação epigenética em plantas 42 3.2.2.4. Regulação epigenética na germinação de sementes e no desenvolvimento 42
3.1.6. CONCLUSÃO 35 3.2. EFEITO DA METILAÇÃO DO DNA NA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE SOJA 36 3.2.1. INTRODUÇÃO 36 3.2.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 37 3.2.2.1. Soja: Classificação botânica, morfologia, origem e importância econômica 37 3.2.2.2. Semente de soja, aspectos gerais da germinação e desenvolvimento da planta 39 3.2.2.3. Regulação epigenética em plantas 42 3.2.2.4. Regulação epigenética na germinação de sementes e no desenvolvimento da planta 43
3.1.6. CONCLUSÃO 35 3.2. EFEITO DA METILAÇÃO DO DNA NA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE SOJA 36 3.2.1. INTRODUÇÃO 36 3.2.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 37 3.2.2.1. Soja: Classificação botânica, morfologia, origem e importância 37 3.2.2.2. Semente de soja, aspectos gerais da germinação e desenvolvimento da planta. 39 3.2.2.3. Regulação epigenética em plantas 42 3.2.2.4. Regulação epigenética na germinação de sementes e no desenvolvimento da planta. 43 3.2.2.5. Metilação do DNA e a ação hormonal no desenvolvimento das 43
3.1.6. CONCLUSÃO 35 3.2. EFEITO DA METILAÇÃO DO DNA NA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE SOJA 3.2.1. INTRODUÇÃO 36 3.2.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 37 3.2.2.1. Soja: Classificação botânica, morfologia, origem e importância 6 a conômica 37 3.2.2.2. Semente de soja, aspectos gerais da germinação e desenvolvimento da 39 3.2.2.3. Regulação epigenética em plantas 42 3.2.2.4. Regulação epigenética na germinação de sementes e no desenvolvimento 43 3.2.2.5. Metilação do DNA e a ação hormonal no desenvolvimento das 43
3.1.6. CONCLUSÃO 35 3.2. EFEITO DA METILAÇÃO DO DNA NA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE SOJA 36 3.2.1. INTRODUÇÃO 36 3.2.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 37 3.2.2.1. Soja: Classificação botânica, morfologia, origem e importância 9 3.2.2.2. Semente de soja, aspectos gerais da germinação e desenvolvimento da planta. 39 3.2.2.3. Regulação epigenética em plantas. 42 3.2.2.4. Regulação epigenética na germinação de sementes e no desenvolvimento da planta. 43 3.2.2.5. Metilação do DNA e a ação hormonal no desenvolvimento das plantas. 43 3.2.2.5. MATERIAL E MÉTODOS 48
3.1.6. CONCLUSÃO 35 3.2. EFEITO DA METILAÇÃO DO DNA NA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE SOJA 36 3.2.1. INTRODUÇÃO 36 3.2.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 37 3.2.2.1. Soja: Classificação botânica, morfologia, origem e importância 37 3.2.2.2. Semente de soja, aspectos gerais da germinação e desenvolvimento da planta. 39 3.2.2.3. Regulação epigenética em plantas 42 3.2.2.4. Regulação epigenética na germinação de sementes e no desenvolvimento da planta. 43 3.2.2.5. Metilação do DNA e a ação hormonal no desenvolvimento das plantas 45 3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS 48
3.1.6. CONCLUSÃO 35 3.2. EFEITO DA METILAÇÃO DO DNA NA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE SOJA 36 3.2.1. INTRODUÇÃO 36 3.2.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 37 3.2.2.1. Soja: Classificação botânica, morfologia, origem e importância 37 3.2.2.2. Semente de soja, aspectos gerais da germinação e desenvolvimento da planta 39 3.2.2.3. Regulação epigenética em plantas 42 3.2.2.4. Regulação epigenética na germinação de sementes e no desenvolvimento da planta 43 3.2.2.5. Metilação do DNA e a ação hormonal no desenvolvimento das plantas 45 3.2.3.1. Material vegetal e condições de crescimento. 48 3.2.3.2. Tratamento com 5-azacytidine (5-azaC) 48

3.2.3.4. Extração de pigmentos fotossintéticos49
3.2.3.5. Microscopia de fluorescência49
3.2.3.6. Avaliação do conteúdo relativo de DNA das plântulas em citômetro de
fluxo50
3.2.3.8. Determinação de poliaminas (PAs) livres
3.2.3.9. Quantificação dos níveis de etileno52
3.2.3.10. Quantificação ABA e AIA53
3.2.3.11. Extração de RNA, Construção de cDNA e análise por RT-qPCR53
3.2.3.12. Análises estatísticas54
3.2.4. RESULTADOS
3.2.5. DISCUSSÃO
3.2.5.1. Papel da metilação na germinação e no desenvolvimento de plântulas de
soja 73
3.2.5.2. Análise do efeito da metilação na expressão de genes envolvidos na
metilação e desmetilação do DNA em plântulas de soja75
3.2.5.3. 5-azaC afeta o desenvolvimento das raízes de plântulas de soja77
3.2.5.4.5-azaC afeta a regulação de vias metabólicas importantes para
desenvolvimento e resposta a estresses77
3.2.5.5.5-azaC afeta o conteúdo endógeno de PAs, ABA, AIA e a emissão de
etileno82
3.2.6. CONCLUSÕES
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS
APÊNDICE

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura gênica e proteica de MBDs em soja e feijão......18 Figura 2: Perfil de expressão e sítios conservados em regiões promotoras de parálogos GmMBDs e validação de genes GmMBD diferencialmente expressos no eixo embrionário e folhas de soja.....22 Figura 3: Relações filogenéticas da família de proteínas MBD em diferentes espécies......24 Figura 4: Semelhança dos ortólogos entre proteínas MBD de Arabidopsis (At), humana (MBD), soja (GmMBD), feijão-comum (PvMBD), Aquilegia coerulea (Aqcoe), Amborella trichopoda (AmTr)......26 Figura 5: Alinhamento de múltiplas sequências dos domínios de ligação de metil-CpG (MBD) das proteínas......28 Figura 7: Esquema geral de processos moleculares, bioquímicos e fisiológicos na germinação e pós-germinação em sementes de eudicotiledônea41 Figura 8: Efeito provocado pelo inibidor da metilação (5-azaC) no desenvolvimento Figura 9: Análise fenotípica das plântulas com 7 dias de desenvolvimento.......56 Figura 10: Análise fenotípica de plântulas da cultivar BR-16 e Embrapa 48......57

Figura 11: Efeitos do 5-azaC na germinação e no desenvolvimento da radícula de soja
Figura 12: Expressão de genes relacionados à metilação (MET 1 e DRM2) e desmetilação do DNA (ROS1) em raiz de plântulas de soja com 7 DAE60
Figura 13: Efeito do 5-azac nas raízes de plântulas de soja controle e tratadas com5-azac.62
Figura 14: Conteúdo de DNA das raízes de plântulas com 7 dias de desenvolvimento
Figura 15: Análise quantitativa dos dados de proteômica comparativa entre raízes controle e tratadas com 5-azaC
Figura 16: Vias metabólicas mapeadas a partir dos dados de proteômicacomparativa entre raízes controle e tratadas com 5-azaC
Figura 17: Conteúdo endógeno de PA em parte aérea e raiz de plântulas controle e tratadas com 5-azaC por 7 dias70
Figura 18: Taxa de emissão de etileno em raízes controle e tratadas com 5-azaC.
Figura 19: Quantificação de ABA e pigmentos fotossintéticos em parte aérea e raiz de plântulas de soja tratadas ou não com 5-azac72
Figura 20: Conteúdo endógeno de AIA em parte aérea e raiz controle e tratada com 5-azaC. MF: Massa Fresca
Figura 21: Representação esquemática dos principais eventos biológicos

observados em resposta ao 5-azaC em plântulas de soja......84

ABREVIATURAS

- MBD Domínio de Ligação ao Metil-CpG
- 5mC 5-metilcitosina
- mDNA DNA metilado
- mCpG CpG metilado

AtMBDs – Proteína com Domínio de Ligação ao Metil-CpG de Arabidopsis thaliana GmMBD - Proteína com Domínio de Ligação ao Metil-CpG de *Glycine max* PvMBD - Proteína com Domínio de Ligação ao Metil-CpG de *Phaseolus vulgaris* AcoMBD - Proteína com Domínio de Ligação ao Metil-CpG de *Aquilegia coerulea* AtrMBD - Proteína com Domínio de Ligação ao Metil-CpG de *Amborella trichopoda* SIMBD – Proteína com Domínio de Ligação ao Metil-CpG de *Solanum lycopersicum* PgMBD - Proteína com Domínio de Ligação ao Metil-CpG de *Solanum tuberosum* ZmMBDs - Proteína com Domínio de Ligação ao Metil-CpG de *Solanum tuberosum*

- Cre Chlamidomonas reinhardtii
- Atr Amborella trichopoda
- Aco Aquilegia coerulea
- Tyrosine Tyr (Y)
- Aspartate Asp (D)
- Arginine Arg (R)
- 5-azaC 5-azacitidina
- PAs Poliaminas
- ABA Ácido Abscísico

AIA – Ácido indol-3-acético

- JA Ácido Jasmônico
- IP lodeto de propídeo
- DAPI Dicloridrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
- HAE Horas Após a Embebição
- DAE Dias Após a Embebição

RESUMO

COELHO, Fernanda Silva; D.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Maio de 2022; METILAÇÃO DO DNA EM SOJA: CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS "LEITORAS" DA METILAÇÃO DO DNA E EFEITO DA METILAÇÃO NA GERMINAÇÃO E NO DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS; Orientadora: Dr^a Clícia Grativol Gaspar de Matos; Conselheiros: Dr^a Antônia Elenir Oliveira Amâncio e Dr. Messias Gonzaga Pereira.

A metilação do DNA é uma marca epigenética conservada que é crucial para regular a expressão gênica e manter a estabilidade do genoma em plantas e mamíferos. Neste estudo, foram analisadas a evolução e a conservação de proteínas leitoras da metilação do DNA no genoma de soja a fim de compreender a influência da metilação do DNA na germinação e desenvolvimento de plântulas de soja. No primeiro capítulo, foram realizadas análises de bioinformática para identificar e anotar genes com Domínio de Ligação ao Metil-CpG (MBD) nos genomas de soja e de feijão-comum. Foram identificados 21 e 13 genes MBD nos genomas de eurosids I - soja e feijão, respectivamente. Os dois eventos de duplicação do genoma inteiro (Whole Genome Duplication - WGD) vivenciados pela soja contribuíram para gerar o dobro de genes MBD em comparação com o feijãocomum. De oito pares de parálogos de MBD encontrados no genoma da soja, um par (GmMBD2a-GmMBD2) possivelmente se subfuncionalizou após sua recente divergência corroborada com os diferentes perfis de expressão desse par gênico em dados de RNA-seq. MBD9 pode ter surgido após a hexaploidização de eudicotiledôneas, uma vez que a Aquilegia coerulea (eudicotiledônea basal) não

apresentou proteínas MBD como outras MBD9. Os resíduos de aminoácidos Arg (R), Asp (D), Tyr (Y) e Arg (R) são altamente conservados no domínio MBD de MBD2 e MBD4 de humanos, soja, Arabidopsis, feijão-comum, tomate, batata, Amborela trichopoda, e Aquilegia coerulea, sendo possivelmente responsável pela ligação a mCpG e mCpA em plantas. No entanto, MBD9 de soja, feijão-comum e Arabidopsis sofreram substituições nesses quatro resíduos, sugerindo a não interação dessa proteína no contexto mCpG ou mCpA, mas uma possível associação com heterocromatina como MBD5 e MBD6 de humanos. No segundo capítulo, sementes de soja foram germinadas e crescidas in vitro durante sete dias com e sem o inibidor da metilação do DNA, 5-azacitidina (5-azaC). Os dados biométricos mostraram que o 5-azaC não afetou a germinação de sementes de soja. Entretanto, afetou o desenvolvimento da radícula a partir do segundo dia de desenvolvimento. Em sete dias de tratamento, raízes com 5-azaC apresentaram interrupção no crescimento radicular e morfologia anormal. Em raízes, o tratamento com 5-azaC modulou a expressão de genes envolvidos com a via RNA direct DNA Methylation (RdDM), mas não o gene MET1 relacionado à manutenção da metilação do DNA. A análise proteômica identificou um total de 1.205 proteínas, sendo 66 destas up-acumuladas e 45 proteínas down-acumuladas em raízes tratadas com 5-azaC comparativamente ao controle, 13 proteínas únicas em raízes tratadas com 5-azaC e 3 proteínas únicas em raízes controle. O 5-azaC reduziu o conteúdo das poliaminas, putrescina e cadeverina, em raízes. Além disso, reduziu também o nível de ABA endógeno e a emissão de etileno, mas aumentou o nível de AIA. Os resultados obtidos neste trabalho fornecem uma compreensão importante do papel da metilação do DNA e conservação da família de proteínas MBD no genoma de soja na germinação e desenvolvimento de plântulas de soja.

Palavras-chave: Metilação do DNA; MBD; desenvolvimento da soja; Expressão gênica; conservação; 5-azacitina.

ABSTRACT

COELHO, Fernanda Silva; D.Sc. North Fluminense State University Darcy Ribeiro; May 2022; DNA METHYLATION IN SOYBEAN: CHARACTERIZATION OF DNA METHYLATION "READER" PROTEINS AND EFFECT OF METHYLATION ON GERMINATION AND SEEDLING DEVELOPMENT; Advisor: D.Sc. Clícia Grativol Gaspar de Matos; Committee members: D.Sc. Antônia Elenir Amâncio Oliveira and D.Sc. Messias Gonzaga Pereira.

DNA methylation is a conserved epigenetic marker which is crucial for regulating gene expression and maintaining genome stability in plants and mammals. In this study, we analyzed the evolution and conservation of DNA methylation reading proteins in the soybean genome and understand the influence of DNA methylation on the germination and development of soybean seedlings. In the first chapter, bioinformatics analyzes were performed to identify and annotate with Methyl-CpG Binding Domain (MBD) genes in the genomes of soybean and common bean. The two Whole Genome Duplication (WGD) events experienced by soybean contributed to generating twice as many MBD genes as common beans. We identified 21 and 13 MBD genes from the eurosids I genome - soybeans and beans, respectively. Of eight pairs of MBD paralogs found in the soybean genome, one pair (GmMBD2a-GmMBD2) was possibly underfunctionalized after its recent divergence corroborated with the different expression profiles of this gene pair in RNA-seg data. MBD9 may have arisen after the hexaploidization of eudicots, since Aquilegia coerulea (basal eudicots) did not present MBD proteins like other MBD9s. The amino acid residues Arg (R), Asp (D), Tyr (Y), and Arg (R) are highly conserved in

the MBD domain of MBD2 and MBD4 from humans, soybean, Arabidopsis, common bean, tomato, potato, Amborela trichopoda, e Aquilegia coerulea, possibly being responsible for binding to mCpG and mCpA in plants. However, MBD9 from soybean, common bean, and Arabidopsis underwent substitutions in these four residues, suggesting the non-interaction of this protein in the mCpG or mCpA context, but a possible association with heterochromatin as MBD5 and MBD6 from humans. In the second chapter, soybean seeds were germinated and grown in vitro for seven days with and without the DNA methylation inhibitor, 5-azacytidine (5azaC). The biometric data showed that 5-azaC did not affect soybean seed germination. However, it affected radicle development from the second day of development. In seven days of treatment, roots with 5-azaC showed interruption in root growth and abnormal morphology. In roots, 5-azac treatment modulates the expression of genes involved in the RNA direct DNA Methylation (RdDM) pathway, but not the MET1 gene related to the maintenance of DNA methylation. Proteomic analysis identified a total of 1205 proteins, 66 up-accumulated and 45 downaccumulated in roots treated with 5-azaC compared to control, 13 proteins unique in roots treated with 5-azaC and 3 proteins unique in roots treated with 5-azaC. 5azaC reduced the content of polyamines - putrescine and cadaverine - in roots. 5azaC reduced the content of polyamines, putrescine, and cadaverine in roots. The results obtained in this work provide an important understanding of the role of DNA methylation and conservation of the MBD protein family in the soybean genome in the germination and development of soybean seedlings.

Keywords: DNA; methylation; MBD; soybean development; Gene expression; conservation; 5-azacytidine.

1. INTRODUÇÃO

A epigenética refere-se principalmente a mudanças na molécula de DNA que não alteram a sequência de nucleotídeos. As marcas epigenéticas, como a metilação do DNA, modificações de histonas e pequenos RNAs (sRNAs) têm sido cada vez mais explorados com a intenção de compreender como essas modificações epigenéticas podem atuar na regulação de genes e regiões repetitivas (Law e Jacobsen, 2010). A marca epigenética mais amplamente estudada que é envolvida no processo de controle epigenético da expressão gênica em plantas é a metilação do DNA (Bond e Finnegan, 2007). A metilação do DNA é conservada em plantas e animais, a qual desempenha papel fundamental na estabilidade do genoma, no desenvolvimento e em vários fenômenos, tais como o *imprinting* genômico, para mutação e inativação do cromossomo X (He; Chen; Zhu, 2011; Law e Jacobsen, 2010).

Os níveis de metilação do DNA durante o desenvolvimento e reprodução de plantas e animais são determinados por reações de metilação e desmetilação que ocorrem em um processo coordenado. A metilação do DNA é um tipo de modificação epigenética relacionada à adição de um grupamento metil no quinto carbono do anel de citosinas. Em plantas e animais, a citosina é primariamente metilada no contexto do dinucleotídeo CG. Nas plantas, a metilação de citosina pode ser encontrada em três contextos diferentes: CpG, CpHpG e CpHpH (H pode ser A, C ou T) (He; Chen; Zhu, 2011; Law e Jacobsen, 2010). Na planta modelo, *Arabidopsis thaliana*, os níveis de metilação simétrica de CpG são mantidos por

ortólogos de DNA Metiltransferases (DNMT1), a DNA METHYLTRANSFERASE 1 (MET1) durante a replicação do DNA (Law e Jacobsen, 2010).

O padrão de metilação do DNA pode ser lido por uma família de proteínas evolutivamente conservadas com um domínio de ligação ao metil-CpG (MBD), sendo considerada um componente importante no silenciamento transcricional mediado pela metilação (Zemach e Grafi, 2006). Essa proteína é altamente conservada em plantas e animais, e são capazes de reconhecer os locais metil-CpG e recrutar remodeladores de cromatina, histona desacetilases, histona metiltransferases ou IDM1-IDM2-IDL1 reprimindo ou ativando a transcrição (Lang et al., 2015; Mehrnaz e Wade, 2006).

A soja é uma das principais "commodities" produzidas e comercializadas no mundo. Seus grãos possuem alto teor proteico e considerável teor de óleo que a torna essencial para utilização na indústria alimentícia e na fábrica de biocombustíveis. O Brasil ocupa a posição de maior produtor mundial de grão (CONAB, 2022). Alguns estudos sobre o perfil de metilação do DNA em soja foram publicados. An et al. (2017) e Song et al. (2013) mostraram o perfil de metilação do DNA durante o desenvolvimento de sementes e em diferentes órgãos (raiz, caule, folhas de soja e cotilédones) de soja, respectivamente. Kim et al. (2015) realizaram uma análise comparativa de metilação do DNA em tecidos de folha e raízes de soja e feijão. No entanto, nenhum dos trabalhos citados abordou o papel da metilação do DNA na germinação e no desenvolvimento de plântulas de soja. Sendo a semente o ponto de partida para a multiplicação das espécies e a base de toda a produtividade agrícola, faz-se necessário garantir a homogeneidade e a uniformidade no processo germinativo e desenvolvimento da plântula, justificandose a prioridade dirigida para compreender a regulação envolvida no processo de desenvolvimento da planta.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Analisar a conservação e evolução de proteínas MBD no genoma de plantas e o efeito da metilação do DNA na germinação e desenvolvimento de plântulas de soja.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar e caracterizar genes MBD (leitores da metilação do DNA) no genoma de leguminosas, principalmente soja.

- Analisar a conservação e evolução das proteínas MBD em plantas.

- Analisar a expressão dos genes MBD em diferentes tecidos de soja usando dados de RNA-Seq e por RT-qPCR.

 Avaliar o efeito da metilação do DNA na germinação e em plântulas de soja tratadas e não tratadas com inibidor da metilação do DNA (5-azaC).

- Quantificar os níveis de expressão de genes envolvidos na regulação epigenética em plântulas tratadas e não tratadas com 5-azaC.

 Identificar e comparar proteínas diferencialmente acumuladas em raízes de plântulas tratadas e não tratadas com 5-azaC.

- Quantificar os níveis endógenos de Poliaminas (PAs), Ácido Abscísico (ABA),
 ácido indol acético (AIA) e etileno em plântulas de soja tratadas e não tratadas com
 5-azac.

3. CAPÍTULOS

3.1. EVOLUÇÃO E CONSERVAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA FAMÍLIA COM DOMÍNIO DE LIGAÇÃO AO METIL-CPG (MBD) EM PLANTAS

3.1.1. INTRODUÇÃO

Marcas epigenéticas coordenam a expressão de milhares de genes de maneira hereditária, sem alterar a sequência de DNA subjacente (Henderson e Jacobsen, 2007). A metilação do DNA e modificações de histonas e pequenos RNAs são as principais marcas epigenéticas estudadas em plantas (Law e Jacobsen, 2010; Bouyer et al., 2017; Zhang et al., 2018).

A metilação do DNA é uma marca epigenética que atua nos resíduos de citosina. É uma modificação covalente do DNA que é herdada na fita de DNA parental através de cada ciclo de replicação do DNA. Em mamíferos, a metilação da citosina ocorre exclusivamente no contexto CpG. A metilação do DNA no genoma de plantas ocorre em três contextos de sequência: CpG, CpHpG e CpHpH (onde H = A, C ou T) (Law e Jacobsen, 2010; Bouyer et al., 2017; Zhang et al., 2018) e contribui para a regulação da expressão gênica durante o desenvolvimento da planta e resposta a estresses (Fransz e De Jong, 2002; Zilberman et al., 2007;

Zhang et al., 2010b; An et al., 2017; Kawakatsu et al., 2017; Kumar e Mohapatra, 2021).

A metilação do DNA está envolvida na regulação de elementos transponíveis (TEs), reprodução, *imprinting* gênico, comunicação intercelular e interações genômicas (Matzke e Mosher, 2014). A metilação do DNA no promotor de genes codificadores de proteínas e microRNAs geralmente causa repressão transcricional, embora relatos recentes apontem para um possível papel da metilação do DNA na ativação transcricional de genes (Zilberman et al., 2007; Hewezi et al., 2017; Huang et al., 2019; Rambani et al., 2020).

Existem três classes de proteínas que reconhecem a metilação do DNA: proteínas leitoras, escritoras e apagadoras da metilação (Grimanelli e Ingouff, 2020). Na classe das leitoras estão as proteínas que contêm um domínio de ligação ao Metil-CpG (MBD). Essas proteínas estão envolvidas no reconhecimento de metil-citosinas e ativam uma cascata de sinalização que induz a formação de heterocromatina ou eucromatina, regulando assim a expressão gênica (Qu et al.,; lto et al., 2003; Clouaire e Stancheva, 2008; Scarsdale et al., 2011). Em animais e plantas, a família de proteínas MBD é capaz de reconhecer sítios CpG metilados e recrutar remodeladores de cromatina, tais como histonas desacetilases e histonas metiltransferases para reprimir a transcrição (Zemach e Grafi, 2006; Grafi et al., 2007; Prasad et al., 2018; Grimanelli e Ingouff, 2020).

As proteínas MBD já foram descritas em animais (Hendrich e Tweedie, 2003; Dhasarathy e Wade, 2008; Menafra e Stunnenberg, 2014) e em plantas (Zemach e Grafi, 2003; Peng et al., 2006; Yaish et al., 2009; Ramiro-Merina et al., 2013; Prasad et al., 2018; Qian et al., 2020). Apesar de um número crescente de trabalhos de proteínas MBD em plantas, a análise de conservação das proteínas MBD no genoma de soja e feijão permanece inexplorado.

3.1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1.2.1. Metilação do DNA

A metilação da citosina é uma marca epigenética conservada que regula a expressão gênica, estabilidade do genoma e *imprinting* genômico em plantas, fungos e animais (Law e Jacobsen, 2010; Liu et al., 2014). Em animais, a metilação em 5mC ocorre predominantemente em um contexto de CpG simétrico pela ação DNA metiltransferase1 (Dnmt1) ou DNA metiltransferase3 (Dnmt3) (Li, 2002). Os CpG metilados são encontrados principalmente perto de promotores de genes em ilhas CpG (Law e Jacobsen, 2010).

Nas plantas, a metilação da citosina pode ser encontrada em três contextos diferentes: CpG, CpHpG e CpHpH (H sendo A, C ou T) (Law e Jacobsen, 2010; He et al., 2011). A manutenção da metilação do CpG em plantas é catalisada pela DNA MET1, um ortólogo de Dnmt1 em mamíferos. Uma enzima específica da planta, CHROMOMETHYLASE 2 e 3 (CMT2 e CMT3), é necessária para a metilação no contexto CHG (Vongs et al., 1993; Law e Jacobsen, 2010). O estabelecimento da metilação *de novo* no contexto de CHH é realizado por DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASES 2 (DRM2). Essa enzima também pode catalisar a metilação no contexto CpG (Law e Jacobsen, 2010; Zemach et al., 2013).

A metilação do DNA é conhecida por ser um importante regulador dos processos biológicos e a interrupção na homeostase da metilação do DNA leva a várias anormalidades no desenvolvimento de plantas e animais (Slotkin e Martienssen, 2007; Lang et al., 2017). É envolvida também no silenciamento transcricional de TEs, contribuindo assim para a preservação da integridade do genoma, bem como na regulação de genes específicos, como os sujeitos a *imprinting* gênico (Law e Jacobsen, 2010).

A hipermetilação em regiões promotoras ricas em CG pode levar à redução da expressão gênica. SONG et al. (2013) mostraram que no genoma de soja há extensa metilação do DNA no contexto CG. Em diferentes órgãos, como cotilédones, folhas, caules e raízes existem regiões diferencialmente metiladas (DMRs). Mostraram também que a metilação na região promotora de genes em soja inibiu a expressão gênica. Entretanto, a desmetilação do DNA em regiões promotoras ricas em dinucleotídeos CG leva ao aumento da expressão gênica (Bouyer et al., 2017; Kawakatsu et al., 2017).

3.1.2.2. Proteínas com Domínio de Ligação ao Metil-CpG (MBD) em animais e plantas

O padrão de metilação do DNA pode ser lido por uma família de proteínas evolutivamente conservada com um domínio de ligação metil-CpG (MBD), que é considerado um componente importante no silenciamento transcricional mediado por metilação (Zemach e Grafi, 2006; Grimanelli e Ingouff, 2020).

Em plantas e animais, as proteínas contendo o domínio de ligação metil-CpG são capazes de reconhecer sítios CpG metilados e recrutar remodeladores de cromatina, como histonas deacetilases e histonas metiltransferases para reprimir a transcrição (Hendrich et al., 1999; Zemach e Grafi, 2006). Em mamíferos, foram relatados sete membros da família MBD, MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3, MBD4, MBD5 e MBD6 (Hendrich e Tweedie, 2003; Dhasarathy e Wade, 2008; Menafra e Stunnenberg, 2014). As proteínas MBD, exceto MBD3, ligam-se a dinucleotídeos CpG metilados (mCpG). MBD3 não reconhece seletivamente o mCpG devido à substituição de um resíduo crítico de tirosina-34 por fenilalanina no domínio MBD (Fraga et al., 2003).

A família MBD se associa a co-repressores que podem atuar na formação tanto de heterocromatina quanto de eucromatina, dependendo do membro da família (Fatemi and Wade, 2006). O MeCP2, além da participação na repressão da transcrição, também se associa à ativação transcricional de uma ampla gama de genes (Chahrour et al., 2008). Um estudo de NMR de MBD2 ligado a um DNA metilado mostrou que a alta afinidade de MBD2 para um 5mC depende da guanina no dinucleotídeo mCpG (Scarsdale et al., 2011). O MBD4 está envolvido no reparo do DNA como uma glicosilase que extirpa bases de timina incompatíveis em locais CpG e na repressão transcricional. O domínio MBD de MBD4 liga-se a pares de bases incompatíveis T/G que resultam na desaminação assimétrica de 5mC de dinucleotídeos 5mCG/5mCG (Hendrich et al., 1999). MBD4 também reconhece a sequência 5mCG/5mCG através de resíduos de arginina conservados, sendo análogo ao domínio MBD de MBD1, MBD2 e MeCP2 (Otani et al., 2013).

Em plantas, a família MBD foi caracterizada pela primeira vez no genoma de *Arabidopsis thaliana*, que codifica 13 proteínas MBD (Zemach e Grafi, 2003). Das 13 proteínas, apenas três, AtMBD5, AtMBD6 e AtMBD7, ligam-se especificamente a sítios CpG metilados *in vitro* (Scebba et al., 2003; Zemach e

Grafi, 2006). MBD4 em Arabidopsis é designado como um putativo MBD4 (semelhante a MBD4 de humanos) (Ramiro-Merina et al., 2013). O MBD4-like de Arabidopsis desempenha uma importante função de excisão de uracil e timina em oposição à guanina, conferindo proteção ao genoma da planta das consequências mutagênicas da desaminação de citosina e 5-metilcitosina (Ramiro-Merina et al., 2013). Em Arabidopsis, MBD9 é a maior proteína e possui múltiplos domínios associados à regulação da cromatina além do MBD. AtMBD9 controla o tempo de floração e ramificação axilar através de vias epigenéticas duplas de metilação de DNA e acetilação de histonas (Peng et al., 2006; Yaish et al., 2009). Já AtMBD7 forma um complexo proteico ao interagir com IDM2, IDL1 e IDM1 *in vivo*. Este complexo recruta *REPRESSOR OF SILENCING 1* (ROS1), que desempenham um papel importante na acetilação de histonas e desmetilação ativa do DNA, regulando a supressão do silenciamento de genes em alguns loci (Lang et al., 2015).

Springer e Kaeppler (2005) analisaram a evolução da MBD em Arabidopsis, arroz e milho, com sequências derivadas de ESTs, no caso do milho. Recentemente, um estudo identificou 14 MBD (ZmMBD) no genoma do milho e observou que ZmMBD11 exibia atividade de ligação ao DNA *in vitro* (Qian et al., 2020). Da mesma forma, em tomate (*Solanum lycopersicum*) foram identificados 18 possíveis genes que codificam proteínas contendo domínio MBD (Prasad et al., 2018).

3.1.2.3. Evolução, conservação e eventos de duplicação no genoma de leguminosas

Os genomas de diferentes plantas modernas derivam de repetidos episódios de duplicação do genoma inteiro (WGD). WGD ou poliploidia, é um fenômeno prevalente na história evolutiva das plantas e é particularmente difundido nas angiospermas (Cui et al., 2006; Jaillon et al., 2007). Muitas plantas diploides modernas passaram por um ou mais eventos de poliploidia e possuem vestígios de múltiplas rodadas de poliploidia (Blanc e Wolfe, 2004; Adams e Wendel, 2005). Comparações entre genomas de leguminosas revelaram que leguminosas da grande subfamília Papilionoideae sofreram duplicação do genoma inteiro (Cannon et al., 2006). Estima-se que esse evento de duplicação compartilhado mais antigo

tenha ocorrido por volta de 56 a 65 milhões de anos atrás (Mya) (Fawcett et al., 2009; Cannon et al., 2010).

Soja (*Glycine max*) e o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) estão no subclado Eurosids I no núcleo das eudicotiledôneas. Essas duas leguminosas compartilharam um evento WGD cerca de 59 milhões de anos atrás (Mya). No entanto, o genoma de soja passou por mais uma rodada de WGD cerca de 13 Mya (Schmutz et al., 2010). Aproximadamente 75% dos genes da soja pertencem a famílias multigênicas devido aos dois WGD (Coneryz, 2000).

A duplicação de todo o genoma, a duplicação de genes em tandem e a duplicação segmentar geram pares de genes parálogos. Arabidopsis, arroz e Populus, soja, feijão-comum, dentre outros, são espécies com sequências genômicas completas e isso possibilita diferenciar duplicações do genoma inteiro de duplicações segmentares e em tandem mapeando localizações cromossômicas de genes duplicados ou blocos de genes (Simillion et al., 2002; Blanc et al., 2003; Bowers et al., 2003; Paterson et al., 2004; Schmutz et al., 2010). Após a duplicação do gene, alguns parálogos são silenciados e eventualmente eliminados, enquanto muito dos parálogos preservados podem estar sujeitos a alterações na sequência de DNA ou expressão gênica levando a subfuncionalização ou neofuncionalização (Adams et al., 2003; Wang et al., 2004).

3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1.3.1. Identificação e anotação de genes MBD no genoma de soja e feijãocomum

Para identificar e anotar os genes MBD nos genomas de soja e feijão, foi realizada uma busca no genoma de soja e feijão disponível no banco de dados foram obtidos do Phytozome (v11) (<u>https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html</u>). Foi utilizado como referência sequências relacionadas à genes MBD já anotados no organismo modelo, *Arabidopsis thaliana*. O perfil Hidden Markov Model (HMM) do domínio MBD do banco de dados Pfam (<u>https://pfam.xfam.org/</u>) foi usado em uma busca de alinhamento para proteínas MBDs. Todas as sequências foram

submetidas à análise para confirmar a presença do domínio MBD. As sequências sem domínio MBD foram excluídas. A nomenclatura dos possíveis genes MBD em soja e feijão concorda com seus genes ortólogos em Arabidopsis.

3.1.3.2. Similaridade entre proteínas MBD de diferentes espécies

Para analisar a porcentagem de similaridade entre proteínas MBD de diferentes espécies em plantas e humanos, foi utilizado a ferramenta online Circolleto (<u>http://tools.bat.infspire.org/circoletto/</u>).

O logotipo foi criado usando a ferramenta online Weblogo (<u>http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi</u>).

3.1.3.3. Estrutura gênica e proteica de MBD

A estrutura éxon/íntron de cada MBD foi criada comparando a sequência de codificação e a sequência genômica no Gene Structure Display Server (GSDS) 2.0 (<u>http://gsds.gao-lab.org/</u>) (Hu et al., 2015). As estruturas das proteínas MBDs foram realizadas utilizando a sequência primária de aminoácidos de cada proteína (<u>https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html</u>) e analisando a presença dos domínios no Pfam (<u>https://pfam.xfam.org/</u>).

3.1.3.4. Análise de duplicação de genes e estimativa de taxas de substituição ka/ks

Para detectar a influência da seleção nos genes GmMBD e PvMBDs, a razão do número de substituições causando substituições de aminoácidos - locais não sinônimos (ka) - foi dividida pelo número de substituições silenciosas - sítios sinônimos (ks). O tempo de divergência (Milhões de anos atrás (Mya)) foi estimado usando T = Ks / 2λ (λ = 6.5 × 10⁻⁹) × 10⁻⁶ Mya (Lynch e Conery, 2000). A duplicação e divergência de cada gene foram calculadas a partir da taxa entre a mutação do sinônimo de substituições do sítio λ pelo ano do sinônimo. A duplicação genômica foi avaliada no Plant Genome Duplication Database (<u>http://chibba.agtec.uga.edu/duplication/</u>) e Soybase (<u>http://www.soybase.org/</u>).

3.1.3.5. Análise da região promotora

Para a análise do promotor dos genes GmMBD dos parálogos, utilizou-se a ferramenta M-vista (<u>http://genome.lbl.gov/vista/mvista/submit.shtml</u>). Para identificação dos sítios de ligação dos fatores de transcrição na região promotora, utilizou-se a ferramenta PlantPan2.0 (<u>http://plantpan2.itps.ncku.edu.tw/promoter.php</u>).

3.1.3.6. Perfil de expressão dos genes GmMBD parálogos

Para analisar o perfil de expressão dos GmMBD parálogos, foi utilizado dados RNA-seq disponíveis Expressão de no Atlas de da Soia (http://venanciogroup.uenf.br/cgi-bin/gmax_atlas/search_gene_list.cgi) (Machado et al., 2020). A análise da expressão do gene MBD foi realizada em diferentes tecidos de soja como cotilédone, semente, tegumento, embrião (germinação do embrião e desenvolvimento embrionário), flor, vagem, plântula, raiz, endosperma, folhas, hipocótilo, parte aérea, inflorescências e nódulo. Os dados de expressão foram plotados ferramenta online Heatmapper com а (http://www.heatmapper.ca/expression/) com valores log2-TPM.

3.1.3.7. Análise filogenética dos genes MBD

Para investigar as relações filogenéticas e a evolução molecular da família MBD em soja, foi realizado um alinhamento de múltiplas sequências das proteínas MBD de soja, Arabidopsis, feijão-comum, tomate, batata e milho usando o MUSCLE com os parâmetros padrão no software Jalview (Waterhouse et al., 2009). A árvore filogenética foi construída no software IQTREE (Trifinopoulos et al., 2016) usando máxima verossimilhança e (VT) - modelo + Gamma distribuído (G) e com 1000 repetições. А árvore filogenética foi editada FigTree v1.4.3 no (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/).

3.1.3.8. Modelagem molecular de AtMBD, GmMBD, PvMBD e MBD de humanos e sua interação com metil-CpG

Para identificar proteínas MBD mais semelhantes realizou-se uma pesquisa no algoritmo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., 1990). As sequências proteicas selecionadas foram submetidas ao SWISS-MODEL (Biasini et al., 2014), para identificar os *templates* mais precisos para modelagem molecular, levando em consideração a identidade da sequência, cobertura e resolução do modelo. Estruturas cristalinas de alta resolução de proteínas homólogas foram baixadas do Protein Data Bank (PDB) (Berman et al., 2000).

O *template* escolhido como modelo para modelagem molecular foi o MBD de frango (PDB ID 2KY8). As sequências obtidas e AtMBD, GmMBD, PvMBD, MBD de humanos, SiMBD, PgMBD, foram alinhadas usando MUSCLE, adotando parâmetros padrão no software Jalview (Waterhouse et al., 2009), versão 2.10.2.

A modelagem molecular foi realizada usando Modeller (Webb e Sali, 2016) no software Chimera versão 1.13 (build 41376)) (Pettersen et al., 2004; Webb e Sali, 2016) usando o PDB ID 2KY8 (Scarsdale et al., 2011) como estrutura como modelo. 0 modelo molecular foi visualizado em PyMOL v1.3 (https://www.schrodinger.com/pymol). A validação da qualidade do modelo foi PROCHECK realizada com 0 hospedado SAVES no (http://services.mbi.ucla.edu/SAVES/).

3.1.3.9. Extração de RNA, construção de cDNA e expressão por RT-qPCR

O RNA total foi isolado das folhas e do eixo embrionário com Trizol® (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e integridade do RNA foi medida usando um espectrofotômetro *NanoDrop*[™] 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. O RNA também foi verificado por eletroforese em gel de agarose 1,5% com coloração com brometo de etídio.

O cDNA foi construído usando 4 µg de RNA usando o kit GoScript[™] Reverse (Promega) de acordo com o protocolo do fabricante. Para analisar a expressão gênica, as reações de RT-qPCR foram realizadas com SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). A RT-qPCR foi realizada utilizando o Applied Biosystems Step OneTM Real-Time PCR Systems, de acordo com o fabricante, em placa de 48 poços com volume final de 15 μl, contendo 0,75 μl de cada *primer* direto e reverso, 7,5 de SYBR Green, 3 μl de cDNA e 3 μl de água ultrapura. Os iniciadores (*primers*) foram construídos usando a ferramenta Oligo Analyzer da Integrated DNA Technologies (IDT) (Tabela S1). A expressão relativa das amostras foi quantificada com o cálculo de 2-ΔΔCT conforme descrito anteriormente (Rao et al., 2013), utilizando o gene MED37 de soja como controle interno (Machado et al., 2020)

3.1.4. RESULTADOS

3.1.4.1. Identificação e caracterização das proteínas MBD no genoma de soja e feijão-comum

A busca pelo perfil HMM do domínio MBD em genomas de soja e feijão revelou 21 e 13 genes MBD, respectivamente (Tabela 1). Esses genes MBD foram designados como GmMBDs e PvMBDs, de acordo com seus ortólogos em Arabidopsis (Tabela S1). O comprimento do gene, número de éxons, identificação UniProt, comprimento da proteína, número de domínio MBD, posição e tamanho, presença de outros domínios e localização cromossômica dos genes GmMBD e PvMBD são descritos na Tabela 1. As sequências dos genes MBD dessas duas espécies variaram cerca de 2.000 bp a 14 kb com dois a 11 éxons (Tabela 1). A maioria das proteínas MBD de soja e feijão apresentaram um domínio MBD localizado preferencialmente na região N-terminal (Tabela 1).

	Identificação go gene	Nome do gene	Tamanho do Gene (bp)	Número de éxons	Identificação UniProt	Tamanho das proteínas (aa)	Quantidade domínios MBD	Posição do domínio MBD	Outros domínios	Chr
	Glyma.01G002200	GmMBD2a	4153	4	K7K117	312	1	171 - 230	CW-type Zinc Finger	1
	Glyma.02G150300	GmMBD4a	2917	2	C6TGT6	177	1	87 - 152	CW-type Zinc Finger	2
	Glyma.04G101200	GmMBD8a	8205	3	K7KJ99	863	1	282 - 325	õ	4
	Glyma.04G154300	GmMBD10a	4856	2	A0A0R0K8M4	332	1	66 - 126	0	4
	Glyma.04G154500	GmMBD10b	4971	2	I1JWB8	292	1	17 - 81	0	4
	Glyma.05G205100	GmMBD13a	7522	7	K7KS48	1209	2	34 - 100/ 230 - 276	0	5
Chroine mov	Glyma.06G102900	GmMBD8b	7781	3	K7KUB3	871	1	290 - 333	0	6
Glycine max	Glyma.06G217500	GmMBD10c	5789	2	I1KDC1	305	1	17 - 81	0	6
	Glyma.06G224300	GmMBD10d	4752	2	C6T9F2	306	1	16 - 81	0	6
	Glyma.06G224700	GmMBD10e	5543	2	K7KWN5	306	1	17 - 81	0	6
	Glyma.07G118700	GmMBD7a	7405	5	I1KJG1	251	1	40 - 100	0	7
	Glyma.07G130300	GmMBD2b	4133	4	I1KJW5	309	1	171 - 230	zf-CW (CW-type Zinc Finger)	7
	Glyma.08G012000	GmMBD13b	7142	7	I1KP74	1122	2	33 - 101/ 248 - 294	0	8
	Glyma.10G023600	GmMBD4b	2611	2	A0A0R0HXA8	193	1	103 - 168	zf-CW (CW-type Zinc Finger)	10
	Glyma.11G025500	GmMBD13c	3430	5	K7LMQ4	160	1	87 - 132	0	11
	- Glyma.13G170000	GmMBD9a	14784	11	I1M022	2202	1	247 - 299	PHD-finger; Bromodomain; PHD-finger; WSTF, HB1, Itc1p, MBD9 motif 1	13
	Glyma.13G333300	GmMBD7b	3060	5	I1M4T4	282	1	58 - 106	0	13

Tabela 1: Genes MBD no genoma da soja e do feijão e características de sequência das proteínas correspondentes.

Tabela 1 – Cont.

	Identificação go gene	Nome do gene	Tamanho do Gene (bp)	Número de éxons	Identificação UniProt	Tamanho da proteína (aa)	Quantidade de domínios MBD	Posição do domínio MBD	Outros domínios	Chr
	Glyma.13G365500	GmMBD10f	6517	2	I1M5U1	276	1	18 - 80	0	13
Glycine max	Glyma.15G007700	GmMBD10g	2365	2	C6TKN4	275	1	18 - 80	0	15
	Glyma.16G194400	GmMBD13d	5408	6	K7MIH7	595	2	4-57 / 75 - 121	0	16
	Glyma.19G010200	GmMBD9b	14658	11	I1N5T6	2175	1	235 - 286	PHD-finger; Bromodomain; PHD-finger; WSTF, HB1, Itc1p, MBD9 motif 1	19
	Phvul.004G177500	MBD2	4517	4	-	315	1	170 - 229	CW-type Zinc Finger	4
	Phvul.007G168400	MBD4	2777	2	-	181	1	91-156	CW-type Zinc Finger	7
	Phvul.004G006200		2783	5	-	251	1	54-103	Ő	4
	Phvul.004G007200		2489	5	-	244	1	47-92	0	4
P. vulgaris	Phvul.005G141400	MBD7	2911	5	-	270	1	49-94	0	scaff old_1
	Phvul.004G017600	MBD9	14278	11	-	2204	1	246-297	PHD-finger; Bromodomain; WSTF, HB1, Itc1p, MBD9 motif 1	4
	Phvul.009G031600	MBD8	8885	3	-	841	1	259-304	0	9
	Phvul.009G205300	MBD10	5931	2	-	303	1	18-81	0	9
	Phvul.010G155700		3524	2	-	288	1	18-79	0	1
	Phvul.003G166200	MBD11	5184	2	-	341	1	41-104	0	3

Tabela	1 –	Cont.
--------	-----	-------

	Identificação do gene	Nome do gene	Tamanho do Gene (bp)	Número de éxons	Identificação UniProt	Tamanho da proteína (aa)	Quantidade de domínios MBD	Posição do domínio MBD	Outros domínios	Chr
P. vulgaris	Phvul.002G155600	MBD13	11383	11		1004	3	28-82/ 139-184/ 244-293	0	2
	Phvul.002G287000		6895	6		1225	2	35-96/ 226-275	0	2
	Phvul.004G117900		5094	6		579	2	7-57/ 75-121	0	4

Para obter mais informações sobre a estrutura do gene, foram comparadas as seguências completas de genes e proteínas de GmMBDs e PvMBDs. Com base nas estruturas íntron-éxon e o domínio MBD em proteínas, foram encontradas 8 classes de MBDs em leguminosas (Figura 1 A e B). Com exceção da classe VIII (MBD13), as demais classes foram designadas de acordo com a classe de Arabidopsis MBD. A classe I anotada como MBD10 mostrou GmMBD10 e PvMBD10 com 2 éxons de comprimento semelhante e suas proteínas traduzidas com um domínio MBD (Figura 1B). A classe VII anotada como MBD8 possui apenas um domínio MBD também, mas diferente do MBD10, as proteínas são maiores com cerca de 900 aminoácidos. As classes III e II anotadas como MBD2 e MBD4, respectivamente, diferem no número de éxons, embora ambas as classes tenham apresentado domínio Zinc-finger além do MBD. A classe VI anotada como MBD 7 também possui apenas um domínio MBD. Foi observado que MBD7 apresentou apenas um domínio MBD em soja e feijão, enquanto MBD7 de Arabidopsis apresentou dois domínios MBD. Na classe VIII anotada como MBD13, a maioria das proteínas possui dois domínios MBD. No entanto, 0 PvMBD13 (Phvul.002G155600) possui três domínios MBD 0 GmMBD13 е (Glyma.11G025500) possui apenas um domínio MBD e tamanho menor, comparado aos outros GmMBD13. Na classe V anotada como GmMBD9 e PvMBD9, dois GmMBDs (Glyma.13G170000 e Glyma.19G010200) e PvMBDs (Phvul.004G017600) apresentaram maior tamanho entre os genes MBD com cerca de 13 kb de comprimento. Suas proteínas MBD apresentaram outros domínios além do domínio MBD como PHD-finger, Bromodomain e WSTF, possivelmente envolvidos no reconhecimento de caudas de histonas (Figura 1B).



Figura 1: Estrutura gênica e proteica de MBDs em soja e feijão. (A) Estrutura gênica de genes MBD em soja e feijão. Éxons e íntrons foram representados por caixas e linhas, respectivamente. O tamanho dos éxons e íntrons pode ser estimado usando a barra de escala na parte inferior. (B) Predição de proteínas do domínio MBD. Os domínios são mostrados na legenda. O comprimento e a posição dos domínios podem ser estimados de acordo com a barra de escala.
3.1.4.2. Eventos de duplicação dos genes MBD em soja e feijão

Comparados com Arabidopsis e feijão-comum, a soja apresentou pelo menos o dobro dos genes da família MBD. Para analisar a expansão dos genes MBD no genoma da soja, foi estimado o tempo de divergência dos MBDs da soja e a taxa de substituições não sinônimas (ka) e sinônimas (ks) para 8 pares de parálogos (GmMBD2a/GmMBD2b; GmMBD4a/GmMBD4b; GmMBD8a/GmMBD8b; GmMBD9a/GmMBD9b; GmMBD10f/GmMBD10g; GmMBD13a/GmMBD13b; GmMBD13a/GmMBD13c; GmMBD13c/GmMBD13b) (Tabela 2). No genoma do feijão-comum, não foram encontrados parálogos de genes PvMBD, sugerindo um impacto menor do evento WGD há aproximadamente 59 milhões de anos (Mya).

As proporções dos valores de ka/ks para os pares de genes MBD variaram de 0,11 a 0,67 e todos os pares de parálogos têm baixas razões Ka/Ks < 1 (Tabela 2). Este índice sugere que os genes GmMBD duplicados estão sob forte seleção purificadora ou estabilizadora. Adicionalmente, pode-se estimar que o evento de duplicação gênica para 8 pares de parálogos MBD ocorreu entre 4,61 e 44,61 Mya (Tabela 2). O par de genes parálogos GmMBD4a-GmMBD4b obteve o menor valor de Ka/Ks (0,11) e o segundo menor tempo de divergência (6,92 Mya). Isso sugere que esse par de genes pode ter mantido suas funções após os eventos de duplicação. No entanto, o par de genes parálogos GmMBD2a-GmMBD2b obteve o maior valor de Ka/Ks (0,67) e o menor tempo de divergência (4,61 Mya), este par de genes pode ter perdido suas funções após o processo de duplicação (Tabela 2). A duplicação dos genes GmMBD13a/GmMBD13c e GmMBD13c/GmMBD13b ocorreu em torno de 45 milhões de anos (Tabela 2). Isso mostrou que GmMBD13c divergiu do outro GmMBD13 próximo ao primeiro evento de duplicação do genoma da soja. Eventos de duplicação entre os outros pares de parálogos MBD (Tabela 2) foram previstos para ocorrer entre 4,61 e 11,53 milhões de anos, após a segunda duplicação do genoma da soja (Schmutz et al., 2010). Essa análise sugere que a expansão da maioria dos parálogos ocorreu próximo à última rodada do WGD da soja.

Gene 1	Gene 2	Ka	Ks	Ka/Ks	Dados de duplicação
					(Mya)
GmMBD2a	GmMBD2b	0,04	0,06	0,67	4,61
GmMBD4a	GmMBD4b	0,01	0,09	0,11	6,92
GmMBD8a	GmMBD8b	0,04	0,09	0,44	6,92
GmMBD9a	GmMBD9b	0,04	0,12	0,33	9,23
GmMBD10f	GmMBD10g	0,06	0,15	0,4	11,53
GmMBD13a	GmMBD13b	0,04	0,08	0,5	6,15
GmMBD13a	GmMBD13c	0,29	0,57	0,51	43,84
GmMBD13b	GmMBD13c	0,29	0,58	0,5	44,61

Tabela 2: Taxas de substituições não sinônimas (ka) e sinônimas (ks) foram estimadas para 8 pares de genes MBD parálogos.

Considerando que os parálogos de GmMBD estão sob forte seleção purificadora ou estabilizadora em soja, foi verificado se os pares de genes MBD divergem em seus perfis de expressão em diferentes tecidos e órgãos ao longo do desenvolvimento da soja. As expressões GmMBD foram mostradas em *heatmaps* construídos com a expressão em TPM transformado em log2 (Figura 2A). Foi observado a formação de três grupos de expressão em tecidos e órgãos da soja e um grupo externo - GmMBD13c - com baixo nível de expressão em todos os tecidos. Os pares de genes GmMBD2a/GmMBD2b, GmMBD4a/GmMBD4b, GmMBD13a/GmMBD13b formaram um grupo. O par GmMBD2a/GmMBD2b é mais expresso em raiz, vagem e inflorescência. Apesar de estarem no mesmo grupo, GmMBD2a e GmMBD2b não foram agrupados. GmMBD2b é mais expresso em plântula, tegumento, folhas, cotilédone e embrião durante a germinação, enquanto GmMBD2a apresentou baixa expressão nestes tecidos. O par de genes GmMBD4a e GmMBD4b apresentaram expressão semelhante em quase todos os tecidos, com maior expressão de GmMBD4b em nódulo, semente, hipocótilo e embrião durante a germinação. O par GmMBD13a e GmMBD13b também apresentou expressão semelhante, com maior expressão em nódulo, plântula e hipocótilo. Os pares parálogos GmMBD8a/GmMBD8b e GmMBD9a/GmMBD9b formaram um cluster e

apresentaram baixa expressão em quase todos os tecidos e órgãos da soja, exceto para o par GmMBD8a/GmMBD8b em embrião durante a germinação e o par GmMBD9a/GmMBD9b no endosperma. O par GmMBD10f e GmMBD10g formaram outro grupo e foram expressos em quase todos os tecidos, exceto no hipocótilo e em embrião na germinação.

Para confirmar os perfis de expressão dos genes MBD, selecionou-se os genes GmMBD2b, GmMBD9a e GmMBD10g (Figura 2 B e C). Os dados de RNA-Seq (TPM) foram validados nos tecidos de eixo embrionário e folhas por RT-qPCR (Figura 2 B e C). GmMBD2b foi mais expresso em folhas do que no eixo embrionário (Figura 2 B e C). A expressão de GmMBD9 foi menor nas folhas do que no eixo embrionário (Figura 2 B e C). GmMBD10 foi consideravelmente mais expresso em folhas do que no eixo embrionário (Figura 2 B e C).

Também foi analisado a conservação da região promotora de parálogos GmMBD usando a ferramenta M-vista e identificou-se sítios de ligação para fatores de transcrição na parte conservada da região promotora dos pares GmMBD (Figura 2 D). GMBD4a e GmMBD4b mostraram um sítio conservado em seu promotor. Este sítio é composto por alguns sítios de ligação de fatores de transcrição, como: AT-Hook, Homeodomain, TCR, MYB, WRKY e TBP. GmMBD9a e GmMBD9b mostraram dois grandes sítios conservados em suas regiões promotoras (Figura 2 D), com AT-Hook, Homeodomain, TCR, bZIP, EIN3, SOX, MYB, TBP e motivos de ligação aos fatores de transcrição MADS-box. GmMBD10f e GmMBD10g mostraram um sítio conservado e um perfil de expressão semelhante, que é distinto entre os outros GmMBD10 (Figura 1 e Figura S1). Este sítio é composto por sítios de ligação de fatores de transcrição, como AT-Hook, Homeodomain, TCR, MYB, WRKY e TBP. GmMBD13a e GmMBD13b mostraram um sítio inverso na região promotora, que difere de GmMBD13c/d. Os motifs de ligação para AT-Hook, Homeodomain, bHLH, bZIP, C2H2, EIN3, GATA, Myb, NAC, SBP, TBP e WRKY foram encontrados na região do promotor GmMBD13a/b.



Figura 2: Perfil de expressão e sítios conservados em regiões promotoras de parálogos GmMBDs e validação de genes GmMBD diferencialmente expressos no eixo embrionário e folhas de soja. (A) Perfil de expressão de genes GmMBD parálogos em tecidos de soja. A barra de escala de cores na parte superior do mapa representa os valores de TPM transformados em log2. (B) Dados de RNA-Seq (TPM) de GmMBD2b, GmMBD9a e GmMBD10g no eixo embrionário e folhas de soja (C). Perfil de expressão por RT-qPCR e (D) Conservação de regiões promotoras de genes GmMBD parálogos com conservação de sítios ao nível de 70% de similaridade. Os fatores de transcrição conservados nas regiões promotoras foram identificados na ferramenta online PlantPan.

3.1.4.3. Análise filogenética de proteínas MBD em plantas

Para investigar melhor a relação evolutiva entre sequências de proteínas MBD em plantas, foi construído uma árvore filogenética com sequências de proteínas MBD de eudicotiledôneas - soja, feijão, Arabidopsis (Zemach e Grafi, 2003), tomate e batata (Prasad et al., 2018), e uma monocotiledônea – milho (Qian et al., 2020). Adicionalmente, foram anotadas proteínas MBD de algas - *Chlamidomonas reinhardtii* (Cre-2), angiosperma basal - *Amborella trichopoda* (Atr-5) e eudicotiledônea basal - *Aquilegia coerulea* (Aco-11) (Tabela S2). Além dessas sequências MBD, foram utilizadas seis proteínas MBD humanas (Figura 3).

De acordo com a distribuição filogenética, as proteínas MBD foram agrupadas em 2 grupos maiores (Figura 3). No grupo I (azul), um cluster mais antigo foi formado por representantes do MBD8 de eudicotiledôneas, incluem Arabidopsis, soja e feijão, duas proteínas MBD encontradas em algas (Cre) e quatro proteínas MBD humanas. Um agrupamento formado por representantes de MBD2, MBD4 e MBD10/11 nas plantas analisadas divergiu do MBD1 humano (Figura 3). Este cluster também possui MBD1, MBD3 e MBD12 da Arabidopsis. A presença de MBDs de angiospermas basais, eudicotiledôneas basais, monocotiledôneas e eudicotiledôneas dentro de aglomerados MBD2, MBD4 e MBD10/11 demonstraram maior conservação dessas classes em plantas.

O segundo grupo formado por MBD7, MBD9 e MBD13 (vermelho) divergiu do grupo 1 (Figura 3). AtMBD6 e AtMBD5 não possuem ortólogos em soja, feijão e milho, mas formaram um grupo irmão com tomate e batata. MBD7 apresentou ortólogos em todas as eudicotiledôneas analisadas e nenhum representante em monocotiledônea (milho) e angiosperma basal (Atr). Cinco proteínas Aco MBD formaram um grupo externo com MBD5, MBD6, MBD7. No cluster MBD13, duas proteínas MBD humanas (MBD2 e MBD3) estão presentes como o grupo mais externo mais próximo de Atr. MBD13 formou um cluster com representantes de eudicotiledôneas, monocotiledôneas, angiospermas basais (Atr) e eudicotiledôneas basais (Aco).

O cluster formado por MBD9 tem representatividade apenas em rosídeos e mostrou-se específico para soja, feijão e Arabidopsis. Apesar de duas proteínas MBD de milho estarem filogeneticamente próximas das proteínas MBD9, elas não mostram a estrutura e os outros domínios além de MBD específicos de MBD9. Além disso, foi verificado os genomas de dez monocotiledôneas e nenhum deles mostrou a presença de proteínas MBD9 (Figura 3). A ausência de proteínas MBD9 em Aco sugere que MBD9 pode ter surgido após o evento de hexaploidização em eudicotiledôneas.



Figura 3: Relações filogenéticas da família de proteínas MBD em diferentes espécies. A análise filogenética de máxima verossimilhança de resíduos das proteínas MBD de soja (Glyma), Arabidopsis (At), feijão-comum (Phvul), Solanum lycopersicum (Solyc), Solanum tuberosum (PGSC), Zea mays (GRMZM), Aquilegia coerulea (Aqcoe), Amborella trichopoda (AmTr), Chlamydomonas reinhardtii (Cre) e Human. A árvore filogenética foi construída usando o modelo Maximum Likelihood VT+F+G4 com 100 repetições bootstrap.

3.1.4.4. Conservação de MBD entre plantas e humanos e sua capacidade de interação com sítios CpG metilados

Para analisar a conservação entre sequências de proteínas MBD completas de soja, feijão-comum, Arabidopsis, angiosperma basal (Atr), eudicotiledônea basal (Aco) e humanos, foi construído um gráfico com a porcentagem de semelhança entre as proteínas MBD (Figura 4). Proteínas AtMBDs e MBD de humanos apresentaram similaridade entre 22% e 70% com seus ortólogos em GmMBDs, PvMBDs, AcoMBD e AtrMBD. Houve uma cobertura completa no alinhamento da proteína entre as proteínas GmMBD2 e PvMBD2 com AtMBD2. Da mesma forma, GmMBD4 e PvMBD4 tiveram cobertura total do alinhamento por AtMBD4 com similaridade em torno de 60 a 70% (cor laranja). Esse resultado pode ser devido a uma maior conservação desses MBDs e à semelhança de dois domínios presentes nessas proteínas - MBD e Zinc Finger (Figura 4).

A proteína AtMBD9 também apresentou conservação proteica completa com GmMBD9 e PvMBD9. No entanto, para outros grupos como MBD7, MBD8, MBD10, MBD11 e MBD13 não houve cobertura completa das proteínas, cobrindo possivelmente apenas o domínio MBD. Além disso, foi observado que uma proteína humana MBD2, MeCP2, MBD3 e MBD4 tem 40% e 55% de identidade (cor azul e verde, respectivamente) com o GmMBD, PvMBD, AcoMBD e AtrMBD. No entanto, os acessos parecem estar vinculados às regiões do domínio MBD (Figura 4).



Figura 4: melhança dos ortólogos entre proteínas MBD de Arabidopsis (At), humana (MBD), soja (GmMBD), feijão-comum (PvMBD), *Aquilegia coerulea* (Aqcoe), *Amborella trichopoda* (AmTr). As cores representam a porcentagem de identidade; azul, para a identidade mais baixa (<= 40%), verde (<= 55%) e laranja (<= 70%).

Foi analisado a conservação de aminoácidos dentro do domínio MBD em diferentes espécies (Figura 5). Alta conservação de resíduos de aminoácidos no domínio MBD entre plantas e humanos, com algumas variações em aminoácidos específicos. Os domínios MBD foram caracterizados em grupos com relação a conservação de quatro resíduos de aminoácidos conservados Arginina (R), Aspartato (D), Tirosina (Y) e Arginina (R) que estão envolvidos com o reconhecimento de mCpG e estabilidade de ligação (Ohki et al., 2001; Sperlazza et al., 2017; Liu et al., 2018b; Shen et al., 2018; Lei et al., 2019). Esses quatro resíduos de aminoácidos são marcados por setas pretas no topo do alinhamento (Figura 5).

O primeiro grupo foi composto por domínios MBD que apresentaram os quatro resíduos de aminoácidos conservados. Esses resíduos são conservados no domínio de MBD1, MBD2, MeCP2 e MBD4 de humanos; AtMBD2, AtmMBD4, AtMBD6 e AtMBD12 de Arabidopsis; GmMBD2 a/b, GmMBD4 a/b e GmMBD7 a/b de soja; PhvulMBD2, PhvulMBD4 e PhvulMBD7 de feijão-comum; e em nove proteínas MBD de batata, oito de tomate, sete de Aco e cinco em Atr (pontas de seta vermelhas). Esses grupos podem ter a capacidade de interagir com citosina metilada no contexto mCpG (Figura 5).

Foi encontrado um segundo grupo de domínios MBD que mostraram substituições dos quatro resíduos de aminoácidos (pontas de seta azuis) (Figura 5). Esta característica foi observada em MBD5 de seres humanos, AtMBD8, GmMBD10g/h, AtMBD9, GmMBD9a/b, PhvulMBD9, batata (PGSC0003DMP400049699), tomate (Solyc06g0681140, Solyc07g008170, Solyc08g080690, Solyc10g18460 e Solyc11g068910), Aco (Aqcoe7G386200, Aqcoe1G075100 е Aqcoe1G075100), e milho (GRMZM2G022365_T01, AC2117264.3_FGT001, GRMZM2G157470_T01, GRMZM2G090163_T02, GRMZM2G161447_T02 e GRMZM2G126545_T02) (Figura 5). As substituições dos quatro resíduos de aminoácidos, principalmente tirosina (Y), podem afetar a ligação específica ao mDNA (Fraga and Ballestar et al., 2003), sugerindo que este grupo pode perder a capacidade de ligação do MBD aos contextos mCpG ou mCpA. O terceiro grupo incluiu MBD6 e MBD3 de humanos, AtMBD7, GmMBD8 a/b, GmMBD13, PhvulMBD8, PhvulMBD13, batata (PGSC0003DMP400025237), tomate (Solyc03q025970 e Solyc03q116680), Aco (Aqcoe2G28200) e algas (Cre06.271550.t1.2 e Cre06.272600.t1.2) que não apresentavam a tirosina conservada (Y), mas tinham o aspartato (D) e arginina (R) ou uma arginina (R) em pelo menos uma das alças de ligação (ponta de seta amarela) (Figura 5).



Figura 5: Alinhamento de múltiplas sequências dos domínios de ligação de metil-CpG (MBD) das proteínas. Os domínios MBDs de humanos, sete plantas e algas foram alinhados. Uma escala de cores em aminoácidos foi usada para indicar similaridade de sequência. Os elementos da estrutura secundária dos MBDs são representados por setas (fita β) e caixa (α hélice). As pontas de seta pretas indicam os resíduos de aminoácidos conservados. O primeiro grupo de domínios MBD que apresentou os quatro resíduos de aminoácidos conservados foi identificado por setas vermelhas. As pontas de seta azuis representam o segundo grupo de domínios MBD que mostraram substituições de todos os quatro resíduos de aminoácidos. As pontas de seta amarelas representam o terceiro grupo que não apresentou a tirosina conservada (Y), mas possui os outros três resíduos conservados (R-D-R).

Para verificar as características dos resíduos de aminoácidos conservados na interação entre os domínios MBD e 5mC no sulco principal do DNA, foi realizado a modelagem molecular de MBDs de plantas, que foram categorizados no grupo 1 com os quatro resíduos de aminoácidos conservados - MBD2, AtMBD2, GmMBD2, PvMBD2, tomate (Solyc05g047450/SIMBD) е batata (PGSC0003DMP400024223/PgMBD) (Figura 6; Tabela S2). Como MBD2 humano, os domínios MBDs de plantas mostraram o potencial de interagir com uma citosina metilada (mC) devido à presença de tirosina (Y) mostrada pela linha pontilhada preta. As argininas (R) em ambas as alças L1 e L2 têm o potencial de interagir com a guanina (GUA) através de uma ligação de hidrogênio, como mostrado pela linha pontilhada vermelha (Fig. 6 A-F). Essa interação R-GUA é possivelmente reforçada pelo anel aromático dos resíduos tirosina (Y) (ciano) e aspartato (D) (ciano), que são aminoácidos cruciais para a correta superfície interfacial com contexto mCpG e mCpA.



Figura 6: Modelagem molecular de domínios de proteínas MBD. Estruturas de (A) MBD2-5mC, (B) AtMBD2-5mC, (C) GmMBD2a-5mC (D) PvMBD2-5mC, (E) SIMBD2-5mC, (F) PgMBD2-5mC, foram mostradas. As metil-citosinas estão indicadas em verde; o laço de ligação MBD é mostrado em ciano e os resíduos de ligação MBD são mostrados em preto. A ligação polar entre os aminoácidos (R) no loop 1 e loop 2 é representada pela linha amarela pontilhada.

3.1.5. DISCUSSÃO

As marcas epigenéticas desempenham um papel importante no desenvolvimento de vários organismos. A metilação do DNA é um mecanismo epigenético que atua em resíduos de citosina, regulando a expressão gênica no desenvolvimento da planta e respostas ambientais (Zhang et al., 2006; Henderson e Jacobsen, 2007; Law e Jacobsen, 2010). Um passo importante para entender o papel da metilação do DNA é a análise estrutural e funcional das proteínas que se ligam especificamente a regiões do DNA metilado. Existem proteínas-chave que reconhecem especificamente e atuam como leitores da metilação do DNA, as proteínas do domínio de ligação ao metil-CpG (MBD) (Grimanelli e Ingouff, 2020). Essas proteínas estão envolvidas no reconhecimento de 5-mC e ativação de uma cascata de sinalização que induz a formação de heterocromatina ou eucromatina, regulando assim a expressão gênica (Clouaire e Stancheva, 2008; Grimanelli e Ingouff, 2020; Law e Jacobsen, 2010; Fatemi e Wade, 2006; Zemach e Grafi, 2003).

Até o momento, as proteínas MBD são mais bem estudadas em animais do que em plantas. No entanto, essas proteínas foram identificadas em Arabidopsis, tomate, batata, milho e arroz (Ito et al., 2003; Thorstensen et al., 2003; Springer e Kaeppler, 2005; Yaish et al., 2009; Prasad et al., 2018; Grimanelli e Ingouff, 2020; Qian et al., 2020). Não há estudos sobre os genes MBD em plantas que compartilharam eventos WGD. No presente estudo, 21 genes GmMBDs e 13 PvMBDs foram identificados e caracterizados nos genomas da soja e do feijão, respectivamente. A diversificação dos genes GmMBD e PvMBD foi observada em vários aspectos, incluindo a estrutura genômica e a estrutura proteica (Figura 1 a e b). Os genes GmMBD e PvMBD têm estruturas gênicas semelhantes aos MBDs de Arabidopsis (Figura 1 suplementar). A família MBD foi caracterizada pela primeira vez em Arabidopsis e foi agrupada devido à sua função em diferentes classes (Classe I a VII) (Zemach e Grafi, 2003; Grimanelli e Ingouff, 2020). A estrutura de genes e proteínas varia de acordo com o subgrupo a que pertencem (Figura 1a e b).

Soja e feijão compartilham um evento de paleopoliploidia do WGD ocorrido há aproximadamente 59 milhões de anos (Mya) seguido por um evento WGD específico de soja de aproximadamente 8-13 Mya, resultando em um genoma de soja altamente duplicado com quase 75% dos genes presentes em múltiplos cópias (Schmutz et al., 2010). De todos os genes MBD identificados na soja, 61,9% eram parálogos, o que concorda com o histórico de duplicação desse genoma. A análise da razão Ka/Ks (Ka/Ks<1) dos parálogos GmMBD revelou que esses genes estão sob forte seleção de purificação. Ao analisar o perfil de expressão dos pares dos parálogos (Figura 2a), verificou-se que GmMBD2a e GmMBD2b apresentaram perfil de expressão divergente. Este par de parálogos tem a maior razão Ka/Ks (0,67), sugerindo que este par de genes pode ter subfuncionalizado após o processo de duplicação. Os demais pares duplicados apresentaram expressão semelhante nos tecidos e órgãos da soja, com pouca divergência em tecidos específicos.

Na análise da região promotora dos genes GmMBD de parálogos (GmMBD4a/b, GmMBD9a/b, GmMBD10f/g e GmMBD13a/b) observou-se regiões conservadas (Figura 2b) com fatores de transcrição comuns a todos os pares de parálogos, como AT- Hook, Homeodomain, TCR, WRKY, bZIP, EIN3, SOX, MYB, TBP, GATA e MADS-box. Esses fatores de transcrição estão envolvidos em diversos processos, como desenvolvimento de plantas, regulação do desenvolvimento de flores e germinação de sementes, resposta ao estresse abiótico, entre outros (Rounsley e Ditta, 1995; Oyama et al., 1997; Theissen et al., 2000; Jakoby e Vicente-carbajosa, 2002; Becker, 2003; Xiao et al., 2009; Jin et al., 2011; Smaczniak et al., 2012; Sornaraj et al., 2015). Assim, os parálogos podem desempenhar papel importante no desenvolvimento da planta, germinação de sementes, e podem responder a estresses bióticos e abióticos.

A análise filogenética mostrou dois agrupamentos principais para proteínas MBD. Os dados suportam o agrupamento entre MBDs de plantas e humanos, que diferem dos resultados obtidos por Springer e Kaepler (Springer e Kaeppler, 2005). Nesse sentido, poder-se-ia encontrar um aglomerado antigo formado por algas, eudicotiledôneas e proteínas humanas MBD. Curiosamente, o grupo I possui representantes de MBDs de todas as plantas analisadas e divergiram do MBD1 humano e do grupo antigo. Um cluster foi formado principalmente por proteínas MBD2 e MBD4, que compartilham um domínio de dedo de zinco do tipo CW (Figura 1b). Este domínio possivelmente facilita a ligação estável da proteína MBD ao DNA, desempenhando um papel importante nos mecanismos epigenéticos (Zemach e Grafi, 2006). No grupo formado por MBD9, existem apenas representantes de

eurosids I. Esta análise sugere que MBD9 emergiu após o evento de hexaploidização em eudicotiledôneas. Estruturalmente, os genes e proteínas GmMBD9 e PvMBD9 foram semelhantes aos de Arabidopsis, o que sugere que eles também podem estar envolvidos no controle epigenético da expressão gênica em plantas leguminosas (Figura S1). As proteínas MBD9, além do domínio MBD, possuem outros domínios que parecem estar envolvidos no reconhecimento de caudas de histonas. Em Arabidopsis, AtMBD9 é responsável por regular o tempo de floração e ramificação axilar e é modulado através de duas vias epigenéticas, como metilação de DNA e acetilação de histonas (Peng et al., 2006; Yaish et al., 2009). Mutantes para o MBD9 (atmbd9) em Arabidopsis causam fenótipos pleiotrópicos, incluindo floração precoce e múltiplos ramos laterais. A floração precoce foi atribuída à repressão do locus C de floração (FLC) devido a uma redução na acetilação das histonas (Yaish et al., 2009).

A análise de conservação da cobertura de proteínas mostrou que a maioria dos MBDs compartilham similaridade dentro do próprio domínio (Fig. 4). Poucos MBDs de plantas apresentaram cobertura proteica completa - MBD2, MBD4 e MBD9. Plantas e humanos mostraram vários resíduos altamente conversados no domínio MBD, como Arg (R), Gly (G), Lys (K), Asp (D), Tyr (Y), Pro (P), Phe (F), Arg (R) e Ser (S) (Figura 4 Complementar). Foi encontrado um grupo composto por MBD1, MBD2, MeCP2 e MBD4 de humanos, e membros MBD de eudicotiledôneas, eudicotiledôneas basais e angiospermas basais que compartilham a conservação em quatro resíduos de aminoácidos - Arg (R), Asp (D), Tyr (Y) e Arg (R) - (Figura 5). Esses resíduos de aminoácidos demonstram sua essencialidade para a ligação metil-CpG visto que conferem potencial para a formação de ligações de hidrogênio entre os resíduos de arginina (R) e guanina (GUA) apenas no contexto mCpG (Fig. 5 e Fig. 6). Esses aminoácidos são essenciais na ligação ao m5C no MBD1, MBD2 e MeCP2, um resíduo de arginina forma ligações de hidrogênio com guanina e concomitantemente com metilcitosina no contexto mCpG (Luscombe et al., 2001; Ohki et al., 2001; Roloff et al., 2003; Klose et al., 2005; Ho et al., 2008; Scarsdale et al., 2011; Zou et al., 2012; Sperlazza et al., 2017; Liu et al., 2018b; Lei et al., 2019).

A análise de conservação dos domínios MBD também mostrou dois grupos que possuem substituições do resíduo tirosina (Y) (Figura 5). Em MBD2 de frango, a cadeia lateral aromática da tirosina tem o potencial de interagir com os grupos metil de mC (Scarsdale et al., 2011). Como já relatado, a especificidade de ligação do MBD1 humano no contexto mCpG é conferida pela tirosina, que forma uma ligação de hidrogênio com mC através do grupo hidroxila em sua cadeia lateral (Ohki et al., 2001). Por outro lado, MBD3 de humanos perdeu a capacidade de se ligar ao mCpG, devido à substituição de lisina (K-30) e tirosina (Y-34) por histidina (H-30) e fenilalanina (F-34), respectivamente (Saito e Ishikawa, 2002). Em milho, ZmMBD11 exibiu atividade de ligação a CpG metilado e não metilado *in vitro* (Qian et al., 2020). Esta proteína possui três (D, Y e R) dos quatro aminoácidos conservados importantes para a ligação ao CpG metilado. A substituição de um dos resíduos de aminoácidos pode sugerir que a capacidade do domínio MBD de interagir especificamente com CpG metilado foi diminuída ou perdida.

Conforme relatado para AtMBD5 e AtMBD6, essas proteínas têm maior especificidade para se ligar a CpG metilado do que CpHpG ou CpHpH (Ichino et al., 2021; Mahana et al., 2022; Zemach and Grafi, 2003). No entanto, os ensaios de polarização de fluorescência (FP) mostraram que o AtMBD5 se liga ao CG não metilado em maior quantidade do que o AtMBD6 (Ichino et al., 2021). Isso sugere que os domínios MBD de plantas que mostram os quatro resíduos conservados (por exemplo, AtMBD6) podem interagir mais especificamente com CpG metilado do que aqueles com substituições nos quatro resíduos de aminoácidos, que também podem interagir com CpG não metilado (por exemplo, AtMBD5 substituição Y). Além disso, AtMBD6 tem menor afinidade de ligação para mCpG quando comparado a domínios MBD de mamíferos, devido à substituição de resíduos carregados positivamente (R17, K23 e R30) por resíduos não carregados (V87, T93 e S100) que possivelmente interagem com o esqueleto do DNA (Mahana et al., 2022).

Assim, as proteínas MBDs de plantas podem mostrar especificidade de ligação diferente a mCpG de acordo com substituições em Arg (R), Asp (D), Tyr (Y) e Arg (R) e afinidade de ligação quando ocorrem substituições em resíduos carregados positivamente. Curiosamente, os domínios MBD9 da soja, Arabidopsis e feijão-comum mostraram substituições dos quatro resíduos de aminoácidos (Figura 5 e Figura 6). Isso também foi encontrado em MBD5 e MBD6 de humanos (Figura 5), que não se ligam ao DNA metilado, mas podem se associar à heterocromatina (Laget et al., 2010), sugerindo que as proteínas MBD9 podem seguir o mesmo padrão.

3.1.6. CONCLUSÃO

O presente estudo visou analisar a evolução e a conservação de proteínas MBD em plantas. Foram identificados 21 e 13 genes MBD do genoma do eurosids I - soja e feijão, respectivamente. Os dois eventos WGDs vivenciados pela soja contribuíram para gerar o dobro de genes MBD em comparação com o feijão-comum. Dos oito pares de parálogos de MBD encontrados no genoma da soja, um par (GmMBD2a-GmMBD2) possivelmente se subfuncionalizou após sua recente divergência corroborada com os diferentes perfis de expressão desse par gênico. A análise filogenética mostrou dois grupos principais de MBDs entre plantas e humanos. A maioria das classes de MBDs divergiu no início da evolução das angiospermas com representantes em Atr (angiospermas basais). Constatou-se que o MBD9 pode ter surgido após a hexaploidização de eudicotiledôneas, uma vez que Aco não apresentou proteínas MBD como outras MBD9.

Os resíduos de aminoácidos Arg (R), Asp (D), Tyr (Y) e Arg (R) são altamente conservados no domínio MBD de MBD2 e MBD4 de humanos, soja, Arabidopsis, feijão-comum, tomate, batata, Amb, e Aco, sendo possivelmente responsável pela ligação a mCpG e mCpA em plantas. No entanto, MBD9 de soja, feijão-comum e Arabidopsis sofreram substituições nesses quatro resíduos, sugerindo a não interação dessa proteína no contexto mCpG ou mCpA, mas uma possível associação com heterocromatina como MBD5 e MBD6 de humanos. Os dados aqui apresentados contribuem para o entendimento da evolução e conservação da família MBD em plantas, bem como a afinidade de ligação do domínio MBD a 5mC em diferentes contextos -mCpG e mCpA

3.2. EFEITO DA METILAÇÃO DO DNA NA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE SOJA

3.2.1. INTRODUÇÃO

A metilação do DNA é uma importante marca epigenética envolvida em diversos processos biológicos e a interrupção da metilação do DNA pode levar a anormalidades no desenvolvimento de plantas, como retardo no amadurecimento de tomate, alteração no tamanho e floração precoce em Arabidopsis, dentre outros (Lang et al., 2017; Grzybkowska et al., 2018; Ogneva et al., 2019). A metilação do DNA é conservada em plantas e mamíferos e, padrões precisos de metilação do DNA genômico são cruciais para o desenvolvimento (Law e Jacobsen, 2010).

Tanto em plantas quanto em mamíferos o estabelecimento e a manutenção da metilação da citosina são mediados por DNA metiltransferases conservadas que usam o S-adenosil-L-metionina como doador de metil, enquanto a desmetilação ativa do DNA envolve uma via de reparo por excisão de bases (Zhu, 2009; Law e Jacobsen, 2010; Zhang e Zhu, 2012). A desmetilação do DNA pode ser realizada por DNA glicosilases, como as *DEMETER* (DME), e DEMETER-Like 2 e 3 (DML2 e DML3) e ROS1 (Penterman et al., 2007b; Zhu, 2009; Zhang e Zhu, 2012).

A soja destaca-se entre uma das mais importantes oleaginosas cultivadas mundialmente, é responsável por mais da metade da produção global de sementes oleaginosas. Essa cultura de sementes possui dupla finalidade, fornece tanto proteína quanto óleo, principalmente para ração animal e consumo humano. O Brasil se tornou em 2020 o maior produtor mundial de soja (CONAB 2020). Foi a primeira leguminosa a ter seu genoma totalmente sequenciado (Schmutz et al., 2010), o que possibilitou a realização de pesquisas genéticas e genômicas. Poucos são os estudos relacionando a metilação do DNA em soja (Song et al., 2013; An et al., 2017; Shen et al., 2018), os quais não relacionam o efeito da metilação do DNA na germinação e no desenvolvimento de plântulas de soja. Song et al. (2013) analisaram o perfil da metilação em raiz, caule, folhas e cotilédones de sementes de soja em desenvolvimento. An et al. (2017) mostraram alterações na dinâmica da metilação do DNA durante o desenvolvimento de sementes de soja. Shen et al. (2018) mostraram um mapa da metilação do DNA em diversos acessos de soja e a relação entre a variação da metilação do DNA e a variação epigenética durante a domesticação de soja, auxiliando em melhor compreensão da domesticação e melhoramento de soja.

O entendimento acerca do efeito da metilação do DNA nos processos de desenvolvimento das plântulas auxiliará na compreensão de processos importantes para desenvolvimento da soja. Para isso, o presente estudo analisou o efeito da metilação do DNA na germinação e no desenvolvimento de plântulas de soja. Para tal, foi utilizado um inibidor da metilação do DNA, o 5-azacitina (5-azaC).

3.2.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.2.2.1. Soja: Classificação botânica, morfologia, origem e importância econômica

A soja pertence a subdivisão das Angiospermas, classe eudicotiledôneas, ordem Rosales, família Fabaceae (Leguminosae), subfamília Faboideae (Papilionoideae), gênero *Glycine*, espécie *Glycine max* (L.) Merrill (Sediyama, 2009; Boerma e Specht, 2016). É uma espécie diploide (2n) com 40 cromossomos, autógama, herbácea anual, de porte ereto, pubescente, de tricomas brancos, pardos, queimados ou tostados e mostra variação na característica morfológica de acordo com o cultivar. A soja possui raiz principal pivotante com ramificações distribuídas em quatro ordens, ricas em nódulos de bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico. O caule é ramificado e se desenvolve a partir do eixo embrionário (Sediyama, 1996). Possui crescimento do caule determinado ou indeterminado (Müller, 1981; Sediyama, 2009). Em cultivares com crescimento determinado, a gema apical encerra sua atividade vegetativa com o início do florescimento. Já no crescimento indeterminado, a gema terminal tem sua atividade vegetativa continuada concomitantemente com a fase reprodutiva da planta (Müller, 1981; Sediyama, 2009). No primeiro nó, possui um par de folhas simples inseridas opostamente, acima do nó cotiledonar, de pecíolos longos. As demais folhas são trifoliadas e as dimensões foliares dependem do tipo foliar, posição na planta, condições de luminosidade e do cultivar e vigor da planta (Müller, 1981; Sediyama, 1996, 2009).

A inflorescência é um racemo axilar, com pedúnculo variando de 2 a 35 cm. As flores variam de coloração podendo ser brancas, amarelas ou violáceas, segundo o cultivar. As vagens são achatadas, curtas, de 2 a 7 cm de comprimento, de cor cinzenta, amarelo-palha ou preta e podem chegar a 400 por planta, com número de grãos variando de 1 a 5 por vagem; porém, na maioria dos cultivares, possuem de 2 a 3 sementes (Fehr e Caviness, 1977; Müller, 1981; Sediyama, 1996, 2009).

Fehr e Caviness (1977) descreveram os estádios do desenvolvimento da soja. Dividiram em estádios vegetativo (V) e reprodutivo (R). Os estádios vegetativos são determinados pela contagem do número de nós no tronco principal, sendo denominados VE, VC, V1, V2 e V3. Nos estádios vegetativos, VE é caracterizada pela emergência dos cotilédones e VC quando os cotilédones se encontram completamente abertos e expandidos. Já os estádios reprodutivos são determinados pela letra R, o qual é acompanhado pelos números de um (1) até oito (8), que descrevem com detalhes o período de florescimento/maturação. Os estádios reprodutivos compreendem as fases R1 e R2 (florescimento), R3 e R4 (desenvolvimento da vagem), R5 e R6 (desenvolvimento do grão) e a fase R7 e R8 (maturação da planta).

A soja, é uma leguminosa originária da costa leste da Ásia, tem como centro de origem primário a China e, a Manchúria como centro secundário ou centro de diversidade genética (EMBRAPA SOJA, 2000; Hymowitz, 1970). Foi introduzida no Ocidente a partir do século XVIII e em 1739 foi introduzida experimentalmente na

Europa. A introdução da soja nos Estados Unidos (EUA) foi em 1804 onde foi cultivada como forrageira e, posteriormente, como produtora de grãos (Federizzi, 2005). Entretanto, foi nas décadas de 1940 até 1980 que os EUA foram líderes absolutos na produção e exportação mundial de soja (Embrapa Soja, 2000).

As primeiras cultivares de soja introduzidas no Brasil eram provenientes do Sul dos EUA. Essas cultivares foram introduzidas no estado da Bahia em 1882 (Santos, 1988) e posteriormente foram levadas e semeadas na região sul do Brasil devido as condições climáticas serem semelhantes àquelas das regiões tradicionais de cultivo nos EUA (Vernetti, 1983). Foi na década de 70 e 80 que o cultivo comercial da soja teve grande expansão através da criação de programas de melhoramento de soja, resultando em cultivares adaptadas às condições climáticas brasileiras. O desenvolvimento de cultivares adaptadas às condições do solo do cerrado e às condições tropicais foram de extrema importância para a expansão da cultura de soja na região Centro-oeste do Brasil (Embrapa Soja, 2000). Atualmente, a produção de soja concentra-se na região Centro-oeste e Sul do país, sendo o estado do Mato Grosso o maior produtor brasileiro de soja (CONAB, 2021), devido a cultivares geneticamente adaptadas à região. A produção é seguida pelos estados do Paraná, Rio Grande do Sul e Goiás (CONAB, 2021; Embrapa Soja, 2000).

O Brasil se tornou o maior produtor mundial de grãos de soja, na safra de 2019/2020 com produção 120,4 milhões de toneladas, ultrapassando os EUA (CONAB, 2020). Esse marco de produção mundial da soja no Brasil, deve-se à novas cultivares adaptadas desenvolvidas por programas de melhoramento genético (Cavalcante et al., 2010).

3.2.2.2. Semente de soja: aspectos gerais da germinação e desenvolvimento da planta

As sementes de soja, geralmente são achatadas e elípticas, lisas por completo e levemente brilhantes. A semente é formada internamente por eixo embrionário (tecido meristemático) e por cotilédones (Bewley e Black, 1994; Le et al., 2007). O eixo embrionário contém os meristemas apicais do caule e da raiz, que contém células meristemáticas que possuem capacidade de divisão celular, e permitirão a adição dos órgãos vegetativos após o processo germinativo,

permitindo o crescimento indeterminado das plantas (Bewley e Black, 1994; Le et al., 2007). Os cotilédones armazenam compostos de reserva que serão usados pelo eixo embrionário durante e após a germinação da semente (Le et al., 2007)(Bewley e Black, 1994; Le et al., 2007; Goldberg et al., 1994). Externamente, a semente possui tegumento e hilo (Bewley e Black, 1994; Le et al., 2007). O tegumento atua na proteção e delimitação da semente, protege contra a entrada de microrganismos, contra choques e regula a velocidade de trocas gasosas durante o processo de germinação (Bewley e Black, 1994; Le et al., 2007).

Em geral, o processo de germinação de sementes quiescentes pode ser divido em duas fases, que são referidas como fases I e II (Luján-Soto e Dinkova, 2021; Smolikova et al., 2021). A fase I é caracterizada pela rápida absorção de água, que resulta na hidratação e amolecimento do tegumento devido à degradação dos polímeros da parede celular das células do tegumento. A absorção da água permite a reativação das atividades metabólicas, o que leva à síntese de proteínas provenientes de mRNA pré-existentes, e reparo no DNA e em mitocôndrias, e ocorre também a liberação de solutos para o ambiente externo (Luján-Soto e Dinkova, 2021; Smolikova et al., 2021)(Figura 7). Na fase II, a absorção de água para o interior da semente é posteriormente reduzida e ocorre a ativação dos principais processos metabólicos associados à germinação de sementes – mobilização de substâncias de reserva, tradução de mRNAs transcrição tradução de mRNAs armazenados. е recém-sintetizados, processamento de proteínas e sua modificação co e pós-traducional (Luján-Soto e Dinkova, 2021; Smolikova et al., 2021). Ambas as fases I e II são críticas para manter a viabilidade das sementes. O final da fase II e início da fase III é marcado pela protusão da radícula. A fase III ou pós-germinação, é caracterizada pela divisão progressiva e alongamento das células da radícula, degradação do endosperma e protrusão da radícula (Luján-Soto e Dinkova, 2021; Smolikova et al., 2021) (Figura 7).

A transição de semente para plântula é uma das etapas críticas do desenvolvimento, afetando drasticamente o crescimento e a viabilidade das plantas. Nessa fase há expressão que controlam a maturação das sementes e na ativação de genes envolvidos na regulação do crescimento vegetativo (Smolikova et al., 2021).



Figura 7: Esquema geral de processos moleculares, bioquímicos e fisiológicos na germinação e pós-germinação em sementes de eudicotiledônea (Adaptado de Luján-Soto e Dinkova (2021).

3.2.2.3. Regulação epigenética em plantas

Epigenética refere-se a alterações hereditárias na arquitetura da cromatina que não acarreta mudança na sequência de nucleotídeos do DNA, mas afetam consideravelmente a expressão gênica e a função celular (Weinhold, 2006). As modificações epigenéticas podem constituir uma camada adicional complexa para a variação fenotípica hereditária e o potencial evolutivo das populações naturais, pois estímulos ambientais podem induzir modificações epigenéticas, que podem ser herdadas pelas gerações futuras (Law e Jacobsen, 2010).

A regulação epigenética é realizada por mecanismos específicos envolvendo a metilação do DNA, modificações pós-traducionais de histonas e mecanismo de pequenos RNAs. A ativação dessas vias leva a mudanças na arquitetura da cromatina que impacta na expressão gênica. A conformação de eucromatina ou de heterocromatina estão associadas à ativação ou silenciamento de genes, respectivamente. A remodelação da cromatina é acoplada às mudanças de estados transcricionais, que é acompanhada por marcas epigenéticas.

A metilação do DNA a cada ciclo celular é mantida pela enzima MET1. A metilação *de novo* do DNA ocorre em todos os contextos CG, CHG e CHH através da via de metilação do DNA dirigida por RNA (RdDM) (Kankel et al., 2003; Henderson e Jacobsen, 2007; Law e Jacobsen, 2010). Uma das proteínas chave desse processo é a DRM2, que direciona a metilação de sítios específicos a partir de pequenos RNAs de interferência (siRNAs) gerados a partir da expressão de repetições diretas ou invertidas (Chan et al., 2004; Zilberman et al., 2004). As plantas codificam múltiplos homólogos dos componentes da maquinaria de RNA de Interferência (RNAi), alguns dos quais são especializados para a função de metilação de DNA dirigida por RNA (Xie et al., 2004; Henderson et al., 2006). RdDM foi reconhecido como um mecanismo geral de silenciamento transcional em plantas. Está envolvido em vários fenômenos epigenéticos, que incluem silenciamento de transgenes, supressão de transposons, *imprinting* de genes e paramutação (Xie et al., 2004; Herr et al., 2005; Law e Jacobsen, 2010).

Os níveis de metilação do DNA são determinados pelas atividades combinadas das DNA metiltransferase e desmetilases. Assim, a desmetilação ativa do DNA é um processo epigenético igualmente importante para controlar os níveis de metilação em todo o genoma (Gong et al., 2002; Penterman et al., 2007a, b; Zhu et al., 2007; Ortega-Galisteo et al., 2008). As DNA desmetilases removem citosinas

metiladas através do mecanismo de reparo por excisão de base e as substituem por uma citosina não metilada (Zhang e Zhu, 2012). Em Arabidopsis foram identificados quatro parálogos de DNA desmetilase para desmetilação ativa do DNA: *REPRESSOR OF SILENCING 1* (ROS1), DEMETER (DME), DME-like2 e 3 (DML2 DML3) (Choi et al., 2002; Gong et al., 2002; Agius et al., 2006; Gehring et al., 2006; Morales-Ruiz et al., 2006; Zhu et al., 2007). ROS1 é rigidamente controlado pelo nível de metilação de uma sequência alvo RdDM *upstream* do início da transcrição, região chamada de sequência de monitoramento de metilação do DNA (MEMS). A metilação MEMS induz a expressão de ROS1 ativando a demetilação do DNA (Lei et al., 2015).

Um outro mecanismo epigenético é a modificação nas caudas N-terminal das histonas. Cada variante de histonas pode sofrer modificações pós-traducionais, tais como: acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, ribosilação e biotinilação (Tariq e Paszkowski, 2004; Grativol et al., 2012). Alterações na transcrição gênica em plantas estão associadas a várias modificações nas caudas das histonas (Grativol et al., 2012). Quando ocorre a acetilação, fosforilação, monoubiquitinação e trimetilação na H3K4 (histona H3 lisina 4), há um aumento da transcrição gênica, já quando as H3K9 (histona H3 lisina 9) e H3K27 (histona H3 lisina 27) são desmetiladas ocorre a repressão transcrição (Zhang et al., 2007; Chinnusamy, 2009).

3.2.2.4. Regulação epigenética na germinação de sementes e no desenvolvimento da planta

As marcas epigenéticas demonstram ter papel crucial durante a germinação e desenvolvimento da planta (Kawashima e Berger, 2014; Bouyer et al., 2017; Luján-Soto e Dinkova, 2021). A interação entre metilação e desmetilação do DNA e outras modificações epigenéticas são vitais para vários processos do desenvolvimento da planta, como a regulação da formação do tubo polínico, amadurecimento de frutos e desenvolvimento estomático (Li et al., 2018; Zhang et al., 2018). A regulação epigenética mediada por marcas de histonas é necessária para mudanças dinâmicas de expressão gênica para promover a mudança de embrião maduro para programas de desenvolvimento de plântulas (Li et al., 2018).

Em Arabidopsis, milho e arroz, o genoma materno é globalmente hipometilado no endosperma, o que promove a expressão de genes provenientes da mãe e o genoma do paterno sofre *imprinting* genômico, uma vez que os siRNAs oriundos de uma das células espermáticas promovem a hipermetilação de regiões genômicas paternas (Jiang e Köhler, 2012). Acredita-se que a hipometilação do genoma materno no endosperma é originária da desmetilação ativa no DNA na célula central, bem como da expressão reduzida de enzimas que transferem o grupo metil, como as metiltransferases de DNA (Hsieh, et al., 2009; Jullien, et al., 2012; Ingouff et al., 2017)). Em contraste, no embrião não há atividade detectável de desmetilação, visto que tanto o genoma materno quanto o paterno encontramse hipermetilados (Jiang e Köhler, 2012). Estudos mostram que há desmetilação ativa do DNA no genoma paterno no núcleo vegetativo do pólen, mas que este está limitado a apenas algumas sequências de TE (Calarco, et al., 2012; Ibarra, et al., 2012). A perda da metilação no DNA em regiões de TE no endosperma e no VN foram propostas para servir como fonte de siRNAs que desencadeiam a metilação do DNA via RdDM direcionada no embrião, contribuindo desse modo para reforçar a metilação do DNA ao longo das gerações (Bouyer et al., 2017).

A transição da fase de quiescência para a germinação tem sido relacionada à metilação de genes como DELAY OF GERMINATION 1 e ABA INSENSITIVE 3 em sementes de Arabidopsis (Nonogaki, 2014). Em sementes de trigo, a germinação é acompanhada de uma rápida redução da metilação do DNA durante as primeiras 30h de embebição (Zluvova; Janousek; Vyskot, 2001), mostrando que a desmetilação tem um papel importante na ativação de genes nas primeiras etapas da germinação. Recentemente, foi demonstrado que a germinação precoce de sementes de tomate pode ser promovida pelo silenciamento de MET1 (Yao et al., 2020). Isso foi associado a uma diminuição no conteúdo de mRNAs que codificam 9-cis-epoxicarotenoide-dioxigenase – uma enzima chave da biossíntese de ABA.

Em sementes de *A. thaliana*, foi observado que há uma extensa desmetilação do DNA no final da germinação das sementes e na plântula formado em evento pós-germinativo (Xiao et al., 2006). Análises de DMRs nos contextos CG, CHG e CHH ao longo do tempo de germinação, revelaram baixa mudança no nível de metilação do DNA na comparação entre a semente quiescente, e após a estratificação e depois de 6h foram expostas a luz (Narsai et al., 2017). Estes autores observaram também que os níveis de metilação do DNA diminuíram após

24h com estratificação e a uma intensa hipometilação foi observada em 48h. Essa hipometilação é realizada por demetilases, DME e DML2) que tem a expressão aumentada, enquanto a expressão da principal demetilase ROS1 foi bem menor do que em sementes quiescentes (Narsai et al., 2017).

Em estádio pós-germinativos em Arabidopsis, a acetilação da lisina 9 e lisina 4 na histona 3 (H3K9) e H3K4) nas regiões 5' de LEC1, LEC2 e FUS3 genes é reduzido por histonas desacetilases (HDACs) (HDA6 e HDA19), reprimindo a expressão de genes de maturação de sementes em plântulas, desempenhando assim papel crucial na regulação da transição da maturação das sementes para o crescimento das plântulas (Zhou et al., 2013). Foram descritas modificações pós-traducionais de histonas no controle do desenvolvimento das plantas. A trimetilação na lisina 27 da histona 3 (H3K27me3) desempenha um papel crítico na regulação de genes envolvidos no controle do desenvolvimento de plantas (Lebedeva et al., 2017; Lepiniec et al., 2018). Em plantas, H3K27me3 é encontrado em promotores em regiões transcricionalmente inativas e em regiões transcritas de genes individuais, enquanto H3K4me3 é uma modificação antagônica de histonas em regiões transcricionalmente ativas (Zhang et al., 2007).

3.2.2.5. Correlação entre os hormônios vegetais e a metilação do DNA no desenvolvimento das plantas

A biossíntese e a sinalização de hormônios vegetais desempenham um papel crítico em diversos processos biológicos. Um crescente número de estudos vem relacionando mecanismos epigenéticos, como metilação do DNA, remodelação da cromatina e modificação de histonas, com a biossíntese e sinalização de hormônios vegetais (Zhu, 2010; Yamamuro et al., 2016; Maury et al., 2019; Bennett et al., 2021).

Alguns estudos sugerem uma ligação potencial entre a manutenção da metilação do DNA e a sinalização dos hormônios vegetais no crescimento e desenvolvimento das plantas. Embriões de Arabidopsis mutantes para met1 apresentaram expressão anormal do transportador de auxina PIN-FORMED1 (PIN1) e distribuição de auxina alterada. Exibiram variações no fenótipo de desenvolvimento, atraso na transição da fase vegetativa para a fase reprodutiva e anormalidades embrionárias (Xiao et al., 2006). Bratzel et al (2010), Chen et al

(2016) e Mozgová et al (2017) observaram que os componentes das vias de sinalização de fitormônios controlam diretamente a atividade dos principais modificadores da cromatina, como o POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX (PRC)
1 e 2, com a atividade da histona-metiltransferase desempenhando um papel importante na regulação da transcrição durante o desenvolvimento.

Outro hormônio que pode influenciar nas modificações da estrutura de cromatina é o ABA (Maury et al., 2019). A resposta do ABA tem sido associada a remodelação da cromatina (Han et al., 2012), desacetilação de histonas (Zhu et al., 2008; Luo et al., 2012; Ryu et al., 2014) e desmetilação de histonas (Zhao et al., 2015). A sinalização do ABA induz a fosforilação mediada por SnRK da ATPase (BRM) de remodelação da cromatina, inibindo sua atividade repressiva em genes responsivos a ABA. A atividade dos modificadores de cromatina pode ser direcionada a loci específicos ou diretamente modulada por cascatas de sinalização de fitormônios (Peirats-Llobet et al., 2016).

Mudanças na estrutura da cromatina podem controlar a biossíntese e sinalização e resposta dos hormônios vegetais. A variação na metilação do DNA em resposta à disponibilidade de água em álamo ou entre linhagens epigenéticas recombinantes de Arabidopsis foram associadas a alterações nas respostas de ácido jasmônico (JA), ácido salicílico (AS) e etileno (Zhang et al., 2012; Lafon-placette et al., 2018). Plantas de arroz com redução da metilação na H3K27me3 exibiram diferenças significativas no conteúdo endógeno de auxina ácido indol-3-ácetico (AIA), giberelina (GA), ABA, JA e AS (Liu et al., 2016).

Os genes de resposta aos fitormônios estão sob controle direto dos modificadores de cromatina. Em Arabidopsis, a Argonauta AGO1 é envolvida na homeostase da auxina, e quando guiada por pequenos RNAs e associada a complexos SWI/SNF liga genes ativados por estímulos da JA, AIA e AS (Liu et al., 2018a). Em Arabidopsis, os genes responsivos ao ABA são reprimidos pela desacetilação de histonas (Perrella et al., 2013) por ação do MULTICOPY SUPRESSOR OF IRA (MSI) que recruta o HISTONE DEACETYLASE (HDA19) (Alexandre et al., 2009; Mehdi et al., 2016) e também por remodelação da cromatina mediada por BRM (Han et al., 2012).

Um estudo recente avaliou a conexão entre metilação e desmetilação do DNA e o fitormônios. As vias de metilação e desmetilação atuam sinergicamente e antagonicamente em vários tecidos e em resposta a tratamentos com seis fitormônios, sugerem existência de mecanismos de regulação do metiloma ligado a hormônios que podem contribuir para a diferenciação e desenvolvimento do tecido (Bennett et al., 2021). Os tratamentos com AUX, CK, ET e ABA exógenos impactaram a atividade promotora de certos genes relacionados à metilação e desmetilação do DNA em vários tecidos radiculares, sugerindo que um mecanismo de regulação do metiloma ligado a hormônios pode contribuir para o crescimento e desenvolvimento da raiz (Bennett et al., 2021).

Além da correlação da metilação do DNA com hormônios, alterações nos níveis de poliaminas (PAs) podem afetar a metilação do DNA (Fraga et al., 2004). As principais PAs encontradas em plantas são Putrescina (Put), Espermidina (Spd) e Espermina (Spm). Estão envolvidas em diversos eventos fisiológicos, como crescimento e desenvolvimento vegetal, embriogênese somática e zigótica, iniciação e desenvolvimento floral, senescência foliar, desenvolvimento e maturação de frutos, bem como nas respostas a estresses bióticos e abióticos (Bouchereau et al., 1999; Bagni e Tassoni, 2001; Alcázar et al., 2006, 2010; Silveira et al., 2006; Santa-Catarina et al., 2007; Kusano et al., 2008; Chen et al., 2019). Além disso, interagem outros metabólitos, incluindo hormônios e em resposta a estresses (Kusano et al., 2008).

Em plantas, a biossíntese de PAs se inicia com a síntese da Put. A biossíntese de Put acontece diretamente a partir da ornitina ou pela descarboxilação da arginina, enquanto a Spd e Spm são sintetizados a partir de Put por sucessivas transferências de grupos aminopropil fornecidos pela S-adenosilmetionina descarboxilada (dcSAM) através da SAM (Santa-Catarina et al., 2006; Kusano et al., 2008; Campestre et al., 2011; Chen et al., 2019). O catabolismo de PAs é realizado por duas principais amina oxidases, a amina oxidase dependente de cobre (CuAOs) e PA oxidases contendo flavina (PAOs). CuAOs exibem preferência por catalisar Put e Cad, sua oxidação em grupos amino primários, gerando 4-aminobitanal (Wang et al., 2019). Já PAOs apresentam forte afinidade na degradação de Spd e Spm, bem como seus derivados (Alcázar et al., 2010).

3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.3.1. Material vegetal e condições de crescimento

Sementes de soja das cultivares BRS-284, Embrapa 48 e BR-16 (cedidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) foram desinfetadas superficialmente com hipoclorito a 2% por 30 segundos e lavadas em água destilada esterilizada por 30 segundos. Essas sementes foram cultivadas em tubos de ensaio (150 × 25 mm) contendo 20 mL de meio de cultura Murashige e Skoog (MS) (Phytotechnology Lab, Overland Park, KS, EUA) (Murashige e Skoog 1962) suplementado com 30 g/L de sacarose, 7 g/L de ágar (Sigma-Aldrich). O pH foi ajustado para 5.8 e o meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 120°C por 15 min. Os tubos foram mantidos em incubadora com demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D) a 28°C, fotoperíodo de 12/12h e intensidade de luz de 100 µmol m⁻² s⁻¹ por 7 dias.

3.2.3.2. Tratamento com 5-azacitidina (5-azaC)

Foi preparada uma solução estoque de 5-azaC (Sigma) à 100 mM diluído em dimetilsulfóxido (DMSO). A partir da solução estoque, foi preparada uma solução de 5-azaC à 10 mM diluída em água ultrapura (Sigma) e foi adicionada ao meio MS. Foram testadas diferentes concentrações de 5-azaC, sendo 0 μ M o controle e 25, 50 e 100 μ M.

3.2.3.3. Análises de variáveis biométricas

O experimento foi realizado utilizando delineamento inteiramente casualizado (DIC) e quatro réplicas biológicas de cada tratamento (pool de 4 plântulas por réplica) foram escolhidas aleatoriamente. Foram submetidas às avaliações de variáveis biométricas referentes a comprimento (cm), massa da matéria fresca e massa da seca de raiz e da parte aérea.

3.2.3.4. Extração de pigmentos fotossintéticos

Folhas de plântulas controle e tratadas com 7 dias de desenvolvimento (primeiro par de folhas) foram utilizadas para a extração dos pigmentos fotossintéticos. Aproximadamente 20 mg de massa fresca de folha foram submersas em 300 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) e mantidas no escuro por 2 dias à 23°C até a extração total dos pigmentos fotossintéticos. Os teores de clorofila *a a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*) e carotenoides (CR) foram determinados através da leitura no espectrofotômetro em comprimento de onda de 665, 649 e 480 nm, respectivamente. Os teores de pigmentos por área foliar em mg/g foram estimados utilizando as seguintes equações proposta por Wellburn (1994):

Clorofila $a = Ca = 12,19 A_{665} - 3,45 A_{649}$ Clorofila $b = Cb = 21,99 A_{649} - 5,32 A_{665}$ Carotenoides = $C_{x+c} = (1000 A_{480} - 2,14 Ca - 70,16 Cb)/220$

3.2.3.5. Microscopia de fluorescência

Raízes das plântulas crescidas por 7 dias em meio MS com metade da com e sem 5-azaC foram coletadas e foram realizados cortes longitudinais e transversais da raiz. O material foi dividido em duas zonas: zona de alongamento e zona meristemática, região de divisão celular, com tamanho aproximado de 5 cm em cada. Posteriormente, foram fixados em solução de gluteraldeído 2% por 24h, conforme Ruzin (1999). Após a fixação, o material foi lavado em álcool 50% por 10 min.

Para realizar a análise de fluorescência por microscopia, o material foi cortado à mão livre, aderido às lâminas histológicas e lavado com tampão PBS (pH 7.0). O material foi tratado com as seguintes soluções: foi corado com dicloridrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) a partir de uma solução estoque de 0,1 mg mL⁻¹ em tampão PBS (pH 7,0), para detecção de núcleo e DNA. Em seguida, foi lavada com tampão PBS e com água destilada. Após a lavagem, o material foi corado com iodeto de propídio (IP) (1mg 1mL⁻¹) diluído em água destilada por 1min para coloração da parede celular, seguindo de lavagem em água destilada e examinadas em microscópio confocal Leica TCS-SPE, utilizando o software Leica LAS interactive, para obtenção das imagens.

3.2.3.6. Avaliação do conteúdo relativo de DNA das plântulas em citômetro de fluxo

O conteúdo relativo de DNA do tecido radicular de plântulas controle e tratadas com 5-azac crescidas por 7 dias em BOD foram obtidos com o auxílio de um citômetro de fluxo. Suspensões de núcleos de raízes jovens foram preparadas por meio de "*chopping*" dos tecidos com uma lâmina de aço descartável (Galbraith et al., 1983) em tampão de isolamento WPB (Loureiro et al., 2007). A suspensão de núcleos foi filtrada em membrana de nylon com malha de 30 µm (CellTrics®) para a remoção de fragmentos de células e restos de tecidos. Em seguida foi adicionado iodeto de propídio (1 mg mL⁻¹) em cada amostra, para corar o DNA. As amostras foram mantidas no escuro por 15min e posteriormente foram analisadas no CytoFLEX (Beckman Coulter, CA, EUA). Os histogramas gerados foram analisados utilizando o software CytExpert 2.0.1 (Beckman Coulter) e o conteúdo de DNA (pg) foi calculado de acordo com Dolezel e Bartos (2005) e Dolezel et al. (2007).

3.2.3.7. Análise proteômica label-free

Para análise proteômica, foram coletadas e preparadas raízes de plântulas controle e tratadas com 5-azac por 7 dias. Três réplicas biológicas de cada tratamento (300 mg massa fresca de cada réplica) foram maceradas em nitrogênio líquido. As amostras foram misturadas em microtubos com 1 mL de tampão de extração TCA/Acetona 10% e 20 mM de DTT. Em seguida, foram agitadas em vórtex por 30min à 4°C e posteriormente foram deixadas no freezer (-20°C) por 1 h para a precipitação. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 16.000 g por 30min a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e a concentração de proteínas foi mensurada com o kit Bradford Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA) utilizando a gamaglobulina bovina (BGG; Bio-Rad) como padrão.

As amostras foram ressuspensas em uma solução composta por ureia (7 M) e tioureia (2 M), e a digestão de proteínas com tripsina foi realizada usando unidades de filtro Microcon-30 kDa (Millipore) (Lipecka et al., 2016), seguindo a metodologia de preparação de amostra auxiliada por filtro (FASP) descrita por (Wiśniewski et al., 2009), com algumas modificações. A quantificação dos peptídeos nas amostras foi realizada após a digestão em espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific) e 1 µg de proteínas digeridas foram injetadas em espectrômetro de massa nanoAcquity UPLC conectado a um instrumento SYNAPT G2-Si Q-TOF (Waters, Manchester, Reino Unido) com os parâmetros descritos por (Botini et al., 2021). O processamento de espectros e a busca no banco de dados foram realizados usando o software ProteinLynx Global SERVER (PLGS) v.3.02 (Waters), e as análises de quantificação sem rótulo foram realizadas usando o software ISOQuant v.1.7 (Distler et al., 2014). Para análise de abundância diferencial, foi realizado um teste t de Student bicaudal. As proteínas foram consideradas *Down* ou *Up* acumuladas, respectivamente, as que apresentaram valores de p \leq 0,05 e log2 do *fold change* (comparação tratada/controle) \leq -0,5 ou \geq 0,5.

A análise de anotação funcional de proteínas diferencialmente acumuladas foi realizada com base no banco de dados KO (KEGG Orthology) usando a ferramenta KOALA (disponíveis em <u>https://www.kegg.jp/blastkoala/</u>). Os números de KO foram usados para determinar as principais vias metabólicas no banco de dados de mapeamento KEGG PATHWAY (<u>https://www.genome.jp/kegg/pathway.html</u>).

3.2.3.8. Determinação de poliaminas (PAs) livres

As amostras de raízes e de parte aérea de plântulas controle e tratadas com 5-azaC com 7 dias de desenvolvimento foram coletadas para determinação dos conteúdos endógenos de PAs, seguindo a metodologia descrita por Santa-Catarina et al. (2006). Foram separadas três repetições biológicas (200 mg de massa fresca cada), os quais foram maceradas com 1,2 mL de PCA a 5 % (v/v), e mantidas no gelo por 1h, em seguida foram centrifugadas a 20.000 x g por 20min a 4°C. O pellet foi ressuspendido em 100 μ L de PCA a 5% centrifugado a 20.000 x g a 4°C durante 20min, e o sobrenandate foi unido ao anterior, respectivamente. Posteriormente, as PAs foram dansiladas. Para tanto, 40 μ L da amostra de PAs foram misturados com 100 μ L de cloreto de dansil (5 mg mL⁻¹ em acetona 100% gelada- 1,8 mM), 50 μ L de solução saturada de bicarbonato de sódio (NaHCO3) e 20 μ L de 1,7 - diaminoheptano (DAH) 0,05 mM, utilizado como padrão interno. Em seguida, as amostras foram incubadas no escuro por 50min a 70°C. Foi realizado

a remoção do excesso de cloreto de dansil pela adição de 25 µL de solução de prolina (100 mg mL⁻¹) com posterior incubação por 30min no escuro em temperatura ambiente.

As PAs dansiladas foram particionadas com 200 µL de tolueno e 175 µL da fase apolar (orgânica) que contém as PAs foram coletadas, secas sob jato de nitrogênio, e ressuspendida em 175 µL de acetonitrila absoluta. Foi utilizado HPLC com coluna C18 de fase reversa (Shimadzu Shim-pack CLC ODS) de 5 µm para identificação e quantificação das PAs. Foram utilizados os solventes A e B - solvente A - acetonitrila 10% em água, pH 3,5 ajustado com HCl 1N e solvente B – acetonitrila absoluta, para o gradiente. A mudança na proporção da solução B em relação à solução A definiu o gradiente de corrida. O gradiente de acetonitrila absoluta (solução B) foi programado para 65% durante os primeiros 10 min, de 65 a 100% entre 10 e 13min e 100% até 21min com fluxo de 1 mL min ⁻¹ a 40°C. O detector de fluorescência foi ajustado para excitação a 340 nm e emissão em 510 nm. Foram injetados 20 µL da solução de PAs dansilada. As áreas dos picos e os tempos de retenção de cada PAs foram avaliados por comparação com PAs padrão de Put, Spd e Spm (Sigma-Aldrich) em concentrações conhecidas.

3.2.3.9. Quantificação dos níveis de etileno

A emissão de etileno foi avaliada em plântulas controle e tratadas com 5azaC com 7 dias de desenvolvimento em tubo tampado com fita microporo, permitindo as trocas gasosas. Os tubos foram vedados com plástico filme para tornar o recipiente fechado por 2h para acúmulo dos gases. Com o auxílio de uma seringa (5 mL) foi coletada uma amostra do ar. A amostra gasosa foi injetada em um cromatógrafo de gases (modelo Trace 1310, Thermo Scientific, Italy) equipado com um loop de 1 mL, coluna empacotada Porapak Q, detector de ionização em chamas e metanador. As condições da análise foram: pressão de 140 KPa no injetor e temperaturas do forno, injetor, detector e metanador, respectivamente, de 80°C, 150°C, 300°C e 360°C. Para cada um dos analitos foi realizada uma curva de calibração utilizando gás padrão (White Martins, Brazil), possibilitando por meio de regressão linear quantificá-los nas amostras.

3.2.3.10. Quantificação ABA e AIA

A extração de ABA e AIA nas amostras de parte aérea e raiz de plântulas controle e tratadas com 5-azac foi baseada na descrita por Álvarez-Flórez et al. (2017). AIA e ABA foram determinadas em três amostras biológicas dos tratamentos controle e tratadas com 5-azaC de acordo com Silveira et al. (2004).

As amostras (1 g de massa fresca cada amostra) foram maceradas em nitrogênio líquido, e adicionado 2,5 mL de solução de extração contendo metanol:isopropanol (2:8, v/v, com 1% de ácido acético glacial). [³H]AIA e [³H]ABA radioativos foram utilizados como padrão interno. O extrato foi agitado em vórtex por 5min. Em seguida, foi centrifugado por 15min a 20.000 g à 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e os pellets foram reextraídos com solução de extração e foram novamente agitado em vórtex e centrifugado novamente. Posteriormente, os sobrenadantes foram concentrados em "speed vac" à 45°C, até 20% do volume inicial (1 ml). Os volumes foram ajustados para 3 mL com água Milli'Q e o pH ajustado para 2.5 usando HCI (1N). As amostras foram divididas duas vezes com éter etílico.

As fases orgânicas contendo AIA e ABA foram secas em "speed vac" a 45°C, dissolvidas em 300 µL de metanol 100% e armazenadas a -70°C até a análise. Alíquotas dos extratos armazenados foram analisados por HPLC, usando coluna de fase reversa de 5-µm (Shimadzu Shin-pack CLC ODS). O gradiente foi desenvolvido misturando proporções crescentes de metanol absoluto a 10% de metanol mais 0,5% de ácido acético em água. O gradiente de metanol absoluto foi programado para 20% nos primeiros 15min, de 20% a 45% entre 15min e 22min, de 45% a 54% entre 22min e 33min, de 54% a 100% entre 33min e 34min, e 100% entre 34min e 50min, com fluxo de 1 ml min–1 a 40°C. A concentração de AIA foi determinada usando um detector de fluorescência a 280 nm (excitação) e 350 nm (emissão). A concentração de ABA foi determinada usando um detector UV-VIS a 254 nm. As frações contendo AIA e ABA foram coletadas e analisadas no contador de cintilação líquida Packard Tri-Carb para estimar as perdas.

3.2.3.11. Extração de RNA, construção de cDNA e análise por RT-qPCR

O RNA total foi isolado das raízes das plântulas com 7 dias de desenvolvimento com e sem adição de 5-azaC utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. A concentração e integridade do RNA foi medida usando um espectrofotômetro *NanoDrop*[™] 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 integridade do RNA também foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,5% com coloração com brometo de etídio.

O cDNA foi construído usando 4 µg de RNA usando o kit GoScript[™] Reverse (Promega) de acordo com o protocolo do fabricante. Para analisar a expressão gênica, as reações de RT-qPCR foram realizadas com SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). A RT-qPCR foi realizada utilizando o Applied Biosystems Step OneTM Real-Time PCR Systems, de acordo com o fabricante, em placa de 48 poços com volume final de 15 µL, contendo 0,75 µL de cada *primer* direto e reverso, 7,5 de SYBR Green, 3 µL de cDNA e 3 µL de água ultrapura.Os iniciadores (*primers*) foram construídos usando a ferramenta Oligo Analyzer da Integrated DNA Technologies (IDT) (Tabela S3). A expressão relativa das amostras foi quantificada com o cálculo de 2-ΔΔCT conforme descrito anteriormente (Rao et al., 2013), utilizando o gene MED37 de soja como controle interno (Machado et al., 2020).

3.2.3.12. Análises estatísticas

Os dados obtidos, foram submetidos à análise do Teste t com nível de significância de 95% (P<0,05), utilizando GraphPad Prism suíte v8.0.

3.2.4. RESULTADOS

3.2.4.1. 5-azaC afeta o desenvolvimento de plântulas de soja, mas não a germinação
Para determinar se a metilação do DNA influência no desenvolvimento de plântulas de soja, sementes da cultivar BRS 284 foram crescidas em diferentes concentrações do inibidor da metilação 5-azaC. A figura 8 mostra o fenótipo das plântulas de soja nas concentrações de 0 µM (controle), 25, 50 e 100 µM de 5-azaC por 7 Dias Após a Embebição (DAE). A redução no crescimento da parte aérea e da raiz foi proporcional ao aumento de concentração de 5-azaC, sendo a concentração de 100 µM a que induziu redução no tamanho das plântulas (Figura 8).



Figura 8: Efeito do inibidor da metilação (5-azaC) no desenvolvimento de soja com 7 DAE em diferentes concentrações de 5-azac (0, 25, 50 e 100 μ M). Escala da barra = 1 cm. DAE – Dias Após a Embebição

A concentração de 100 µM de 5-azaC, reduziu o tamanho das plântulas (Figura 9 A). Neste tratamento, as plântulas apresentaram redução no comprimento e na massa fresca da parte área e raízes (Figura 9 B e C), e na massa seca apenas nas raízes (Figura 9 D). No entanto, não houve diferença significativa entre a massa seca da parte aérea de plântulas controle e tratada (Figura 9 D).



Figura 9: Análise fenotípica das plântulas de soja cultivar BRS 284 com 7 DAE. (A) Plântulas controle e tratadas com 5-azaC (100 μ M). (B) Comprimento (cm) da parte aérea e raiz das plântulas. (C) Massa fresca da parte aérea e raiz das plântulas. (D) Massa seca da parte aérea e raiz das plântulas. A escala da barra = 1cm. ns - indica que não houve diferença significativa. *** - indica diferença significativa do tratamento com 5-azaC em relação ao controle P<0,001 de acordo com o teste t.

Com o intuito de analisar a influência da metilação do DNA em outras cultivares de soja, foram testadas as concentrações de 0 (controle) e 100 µM de 5azaC nas cultivares Embrapa 48 e BR-16, uma resistente e a outra suscetível a seca, respectivamente (Figura 10). Apesar das cultivares possuírem características diferentes, o fenótipo das plântulas tratadas com 5-azaC, tanto da Embrapa 48 quanto da BR-16, apresentaram redução no comprimento da parte aérea e raiz, bem como redução na massa fresca da parte área e raiz (Figura 10 A-B e E-F), assim como foi observado na cultivar BRS-284, (Figura 10). Também foram analisados os pigmentos fotossintéticos das cultivares contrastantes e o tratamento com 5-azaC não induziu redução significativa nos níveis de pigmentos fotossintéticos em ambas cultivares (Figura S4).



Figura 10: Análise fenotípica e crescimento de plântulas da cultivar BR-16 (A-D) e Embrapa 48 (E-H). (A) Morfologia das plântulas controle e tratadas ao final de 7 dias, (B) Comprimento (cm), (C) Massa fresca (g), (D) Massa seca (g) de plântulas controle e tratadas com 5-azaC da cultivar BR16. (E) Plântulas controle e tratadas, (F) Comprimento (cm), (G) Massa fresca (g), (H) Massa seca (g) de plântulas controle e tratadas com 5-azaC da cultivar Embrapa 48. Barra de escala = 1cm. ns - indica que não houve diferença significativa. *** - indica diferença significativa do tratamento com 5-azaC em relação ao controle P<0,001 de acordo com o teste t.

Considerando que o tratamento com 100 μ M de 5-azaC afetou o desenvolvimento de plântulas de soja, sendo o maior impacto no desenvolvimento da raiz, foi analisado o efeito dessa concentração de 5-azaC na germinação de sementes da BRS 284 (até 24 Horas Após a Embebição (HAE)) e no desenvolvimento da radícula (até 3 dias após a embebição (DAE)) (Figura 11 A e B).

A taxa de germinação de sementes tratadas com 5-azaC foi de 80% e de sementes controle foi de 75%. Esse resultado sugere que o tratamento com 5-azaC não afetou a germinação (24 HAE) (Figura 11B). O tratamento com 5-azaC não afetou a massa fresca e seca das radículas no controle e no tratamento com 5-azaC ao longo dos 3 DAEs (Figura 11 D e E). Entretanto, causou redução significativa na área da radícula tratada em comparação com a radícula controle a partir do 2 DAE (Figura 11 C).



Figura 11: Efeitos do 5-azaC na germinação e no desenvolvimento radicular plântulas de soja cultivar BRS 284 após 1, 2 e 3 dias de tratamento. (A) Germinação e desenvolvimento da radícula de soja. (B) Porcentagem de germinação (HAE). (C) Área (mm²), (D) Massa fresca (g), (E) Massa seca (g), da radícula em 1, 2 e 3 DAE. DAE (Dias Após a Embebição); HAE (Horas Após a Embebição). ns - indica que não houve diferença significativa. ** - indica diferença significativa do tratamento com 5-azaC em relação ao controle P<0,01 de acordo com o teste t.

3.2.4.2. 5-azaC afeta a expressão de genes relacionados à metilação e desmetilação do DNA em plântulas de soja

O tratamento com 5-azaC casou uma redução de 69% no tamanho das raízes das plântulas de soja. Assim, prosseguiu-se a análise dos perfis de expressão de genes que codificam DNA metilases (MET1 e DRM2), DNA desmetilase (ROS1) e doadores do grupo metil (SAM) em raízes de plântulas tratadas e não tratadas com 5-azaC por 7 dias (Figura 12). MET1 não sofreu alteração na expressão em ambas as condições de tratamento (com e sem inibidor da metilação). Entretanto, o gene que controla a metilação do DNA *de novo*, DRM2, apresentou um nível de expressão significativamente maior em raízes de plântulas tratadas com 5-azaC (Figura 12). Em comparação com os genes que controlam a metilação do DNA, o gene que controla a desmetilação ativa do DNA, ROS1a (Glyma.10G065900) teve a expressão significativamente menor, sendo regulado negativamente em raízes tratadas com 5-azaC, (Figura 12).

Além dos genes que estão envolvidos diretamente na metilação e desmetilase do DNA, também foi analisado o nível de expressão do gene S-adenosylmethionine synthase 2 (SAMS) em raízes tratadas e não-tratadas com inibidor da metilação (figura 12). A expressão de SAM (Glyma.03G223000) foi significativamente maior em plântulas tratadas (Figura 12).



Figura 12: Expressão de genes relacionados à metilação (MET 1 e DRM2) e desmetilação do DNA (ROS1) em raiz de plântulas de soja com 7 DAE. ns - indica que não houve significância estatísticas. **e****- indicam diferença significativa do tratamento com 5-azaC em relação ao controle P<0,01 e P<0,0001, respectivamente, de acordo com o teste t.

3.2.4.3. 5-azaC afeta a morfologia das raízes

Considerando que o desenvolvimento das raízes das plântulas foram as mais impactadas pelo tratamento com 5-azaC, prosseguiu-se a análise das alterações morfológicas das raízes com 7 DAE tratadas e não-tratadas com 5-azac por microscopia confocal (Figura 13). Em raízes de plantas controle, as zonas meristemáticas (Figura 13 A-C) e de alongamento (Figura 13 D-F) apresentaram desenvolvimento normal. Nestas raízes, os núcleos são uniformes, pequenos e de tamanho semelhante (Figura 13 A-F). Em raízes de plântulas tratadas com 5-azaC (Figura 13 G-L) verificou-se má formação da coifa (Figura 13 H-I) e há presença de pelos na zona meristemática (Figura 13 K-L). Os núcleos são maiores e desuniformes. Além dessas alterações, a figura 13 K mostra uma marcação do núcleo em células de raízes com IP diferente do que foi observado para as células radiculares das plântulas controle marcada. A figura 13 L mostra a marcação sobreposta de DAPI e IP em núcleos das células das raízes de plântulas tratadas com 5-azac. O IP não é permeável a membrana, assim sugere-se que em raízes tratadas com 5-azac pode estar ocorrendo uma desestabilização da parede celular, o que permitiria a entrada do IP nestas células.



Figura 13: Efeito do 5-azac nas raízes de plântulas de soja controle e tratadas com 5-azac aos 7 DAE. (A-F) Raíz controle. (G-L) Raiz tratada com 5-azaC. (A-C) Corte longitudinal da ponta da raiz controle (região meristemática). (D-F) Região meristemática da raiz controle. (G-I) Corte longitudinal da ponta da raiz tratada com 5-azaC (região meristemática). (J-L) Região meristemática da raiz tratada. Coloração por DAPI, lodeto de propídeo (IP) e sobreposição das imagens de raiz de soja controle e tratadas com 5-azaC.

3.2.4.4. O tratamento com 5-azaC induziu aumento do conteúdo relativo de DNA em raízes de plântulas de soja

Sabendo que as raízes tratadas com 5-azaC apresentaram alterações na morfologia com núcleos maiores e desuniformes, buscou-se investigar o envolvimento da regulação epigenética e estabilidade genômica relacionada ao conteúdo de DNA em células da raiz por citometria de fluxo (Figura 14). Raízes das plântulas controle apresentaram um perfil característico de plantas em desenvolvimento inicial (Figura 14 A). por outro lado, raízes tratadas com 5-azacC foi verificado alteração na distribuição dos picos 2C e 4C, sendo o pico 4C duas vezes maior que o pico 2C e, ainda, a presença de um pico em 8C (Figura 14 B). Esses dados sugerem que o 5-azaC causa aumento nos níveis de ploidia em raízes de soja. O tratamento com 5-azaC não causou alteração no conteúdo de DNA de parte aérea (Figura S5)



Figura 14: Conteúdo de DNA das raízes de plântulas de soja com 7 DAE. (A) Raiz controle. (B) Raiz tratada com 5-azaC.

3.2.4.5. Influência do 5-azaC no perfil proteômico das raízes

Com o intuito de descobrir mecanismos moleculares envolvidos com a inibição da metilação do DNA, foi realizada uma análise proteômica *label-free* para comparar raízes controle e tratadas com 5-azaC. Um total de 1.205 proteínas foram identificadas nas amostras controle e tratadas (tratamento com 5-azaC/ controle sem 5-azaC) (Tabela S4). Dentre as 1.205 proteínas, 127 proteínas foram diferencialmente acumuladas (Tabela S4). Destas, 13 proteínas foram exclusivas (únicas) em raízes de plântulas tratadas com 5-azaC e 3 proteínas únicas em raízes de plântulas controle (Tabela S4). Os pontos vermelhos representam as 66 proteínas *up*-acumuladas enquanto 45 proteínas *down*-acumuladas foram representadas como pontos azuis (Figura 15 A) em raízes tratadas comparativamente com às raízes mantidas no controle (comparação 5-azaC/Controle sem 5-azaC),

Para determinar a anotação funcional foi utilizada a ferramenta KOALA com as sequências de proteínas diferencialmente acumuladas em raízes controle e tratadas. O tratamento com 5-azaC promoveu o acúmulo de proteínas associadas ao processamento da informação genética, metabolismo lipídico, processamento e metabolismo da informação genética, sistemas do organismo, processamento da informação ambiental e metabolismo de outros aminoácidos (Figura 15 B). Por outro lado, reduz o acúmulo de proteínas associadas ao metabolismo de carboidratos, de aminoácidos, biossíntese de metabólitos secundários, processos celulares, biossíntese de outros metabólitos secundários e metabolismo de energia foram *down*-acumuladas (Figura 15 B).



Figura 15: Proteínas diferencialmente acumuladas em raízes de plântulas tratadas com 5-azaC comparadas com controle (sem 5-azaC). (A) Gráfico volcano de proteínas diferencialmente acumuladas. Pontos vermelhos: Proteínas *up*-acumuladas (log2 FC \ge 0.5 p \le 0.05). Pontos azuis: Proteínas *down*-acumuladas (log2 FC \le -0.5 P \le 0.05). (B) Gráfico de barras horizontais das proteínas diferencialmente acumuladas em raiz tratada com 5-azaC comparada com controle usando a anotação funcional da ferramenta BlastKOALA.

3.2.4.6. Vias metabólicas alteradas pelo tratamento com 5-azaC

O mapeamento das proteínas diferencialmente acumuladas identificadas por análise proteômica mostrou variações importantes nas vias metabólicas de raízes de plântulas tratadas e não com 5-azaC durante 7 dias (Figura 16 C). Em raízes tratadas com 5-azaC foram identificadas proteínas *down*-acumuladas relacionadas à assimilação de nitrogênio nos aminoácidos glutamina e glutamato através do ciclo das enzimas GLUTAMINE SYNTHASE CLONE R1 (GS) e NADH-DEPENDENT GLUTAMATE SYNTHASE 1 (GOGAT) e ASPARAGINE SYNTHETASE 3 (AS). Além disso, em raízes tratadas com 5-azaC a GLUTAMATE DEHYDROGENASE 1 (GDH) foi *up*-acumulada (Figura 16).

Em raízes tratadas com 5-azaC foram identificadas proteínas downacumuladas relacionadas a glicólise, como PHOSPHOFRUCTOKINASE (PFK), proteínas da superfamília de ALDOLASE, PYRUVATE KINASE (PK), MALATE DEHYDROGENASE (MDH). MALATE SYNTHASE (MLS) е uma PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE (PEPC) relacionada com a produção de oxaloacetato (OAA). PEPC citosólica fixa CO₂ atmosférico e respiratório em oxalacetato, usando o fosfoenolpiruvato formado pela decomposição glicolítica de carboidratos armazenados (Figura 16 C). As enzimas PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE 1 (PEPCK), ALDEHYDE DEHYDROGENASE (ALDH) e THIAMINE PYROPHOSPHATE DEPENDENT PYRUVATE DECARBOXYLASE (TPP) foram up-acumuladas no tratamento com 5-azaC (Figura 16). A PYRUVATE DECARBOXYLASE 1 (PCD) foi downacumulada.

Em raízes tratadas há um considerável número de proteínas *up*acumuladas relacionadas ao metabolismo de parede celular, tais como enzimas estruturais, como as proteínas ARABINOGALACTAN PROTEIN 31 (AGP) e GLYCINE-RICH RNA-BINDING (GRP) e as proteínas modificadoras da parede celular, como as proteínas UDP-D-XYLOSE SYNTHASE (UXS), UDP-D-APIOSE/UDP-D-XYLOSE SYNTHASE (AXS), BETA-D-XYLOSIDASE, XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE/HYDROLASE PROTEIN A (XTH), PECTIN METHYLESTERASE 3 OU PECTINESTERASE 3 (PME), PECTIN ACETYLESTERASE 8-LIKE (PAE). PUTATIVE GALACTOSE-BINDING DOMAIN-CONTAINING PROTEIN (GAL) e COPPER AMINE OXIDASE FAMILY PROTEIN (CuAOs). A β-1,3-GLUCANASE (GLU) foi *down*-acumulada em raízes tratadas (Figura 16).

Além do maior acúmulo de proteínas relacionadas à síntese de parede celular em raízes tratadas, há maior número de proteínas up-acumuladas relacionadas na resposta a estresses, como a proteínas ISOFLAVONE REDUCTASE-LIKE (IFR) e NUCLEOREDOXIN 1 (NRX1). Proteínas relacionadas a defesa por ataque de insetos ou patógenos, como as POLYPHENOL OXIDASE A1 CHLOROPLASTIC (PPO), KUNITZ-TYPE TRYPSIN INHIBITOR-LIKE 2 (KII), proteínas D-MANNOSE BINDING LECTIN PROTEIN WITH APPLE-LIKE CARBOHYDRATE-BINDING DOMAIN (D-MBL) foram up-acumuladas. Proteínas de mecanismo redox também foram up-acumuladas, como as FERRETIN 1 (Ferretin), PEROXIDASE (POX), GLUTATHIONE S-TRANSFERASE U9 (GSTF), L-ASCORBATE OXIDASE (AO), 2-OXOGLUTARATE and Fe(II)-DEPENDENT OXYGENASE (20G); e proteínas de reparo, como a proteína PROTEASOME 26S, proteínas HEAT SHOCK 70 kDA (HSP70s), proteína 40S RIBOSOMAL PROTEIN S3-3 (RPS3), proteína 40S RIBOSOMAL PROTEIN S7 (RPS7) e proteína 60S RIBOSOMAL PROTEIN L9-LIKE (RPL6). As proteínas 60S RIBOSOMAL PROTEIN L4 (RPL4) e CELL DIVISION CYCLE PROTEIN 48 HOMOLOG (CDC48) foram unicamente acumuladas em raízes tratadas (Figura 16).

Foram identificadas proteínas *down*-acumuladas relacionadas à divisão celular, tais como α e β-tubulinas, enquanto as proteínas CDC48 e do fator de iniciação (elf3 e elf4) que são envolvidas no controle do ciclo celular e proliferação celular, foram *up*-acumuladas em raízes tratadas (Figura 16). Um outro ponto importante observado em raiz tratada com 5-azaC foram proteínas *up*-acumuladas relacionadas à produção de JA, sendo STEAROYL-[ACYL-CARRIER-PROTEIN] 9-DESATURASE (ACP), LINOLEATE 9S-LIPOXYGENASE 1 (9-LOX), ALLENE OXIDE CYCLASE (AOC), 12-OXOPHYTODIENOATE REDUCTASE 2 (OPR). A enzima 9-LOX pode usar o ácido linoleico como substrato e dar continuidade na produção de JA. Esse resultado sugere que o 5-azaC pode interferir nas vias de resposta a patógenos ou ferimentos (Figura 16).



Figura 16: Vias metabólicas mapeadas a partir dos dados de proteômica comparativa entre raízes tratadas com 5-azaC e controle. Os quadrados vermelhos indicam proteínas up-acumuladas e azuis indicam proteínas downacumuladas em raízes tratadas com 5-azaC. Os quadrados amarelos e azul claro indicam proteínas exclusivamente acumuladas em raiz tratada e raiz controle, respectivamente. Proteínas destacadas nas vias metabólicas: GLUTAMINE SYNTHASE CLONE R1 (GS) e NADH-DEPENDENT GLUTAMATE SYNTHASE 1 (GOGAT), ASPARAGINE SYNTHETASE 3 (AS), GLUTAMATE DEHYDROGENASE 1 (GDH). PHOSPHOFRUCTOKINASE (PFK), ALDOLASE, PYRUVATE KINASE (PK), MALATE DEHYDROGENASE (MDH), MALATE SYNTHASE (MLS), PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE (PEPC), PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE 1 (PEPCK), ALDEHYDE DEHYDROGENASE (ALDH), PYROPHOSPHATE DEPENDENT PYRUVATE DECARBOXYLASE (TPP), A PYRUVATE DECARBOXYLASE 1 (PCD), ARABINOGALACTAN PROTEIN 31 (AGP), GLYCINE-RICH RNA-BINDING (GRP), UDP-D-XYLOSE SYNTHASE UDP-D-APIOSE/UDP-D-XYLOSE (UXS). SYNTHASE (AXS), BETA-D-XYLOSIDASE, XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE/HYDROLASE PROTEIN A (XTH), PECTIN METHYLESTERASE 3 OU PECTINESTERASE 3 (PME), PECTIN ACETYLESTERASE 8-LIKE (PAE), PUTATIVE GALACTOSE-BINDING DOMAIN-CONTAINING PROTEIN (GAL) e COPPER AMINE OXIDASE FAMILY PROTEIN (CuAOs), β-1,3-GLUCANASE (GLU), ISOFLAVONE REDUCTASE-LIKE (IFR), NUCLEOREDOXIN 1 (NRX1), POLYPHENOL OXIDASE A1 CHLOROPLASTIC (PPO), KUNITZ-TYPE TRYPSIN INHIBITOR-LIKE 2 (KII), D-MANNOSE BINDING LECTIN PROTEIN WITH APPLE-LIKE CARBOHYDRATE-BINDING DOMAIN (D-MBL), FERRETIN 1 (Ferretin), PEROXIDASE (POX), GLUTATHIONE S-TRANSFERASE U9 (GSTF), L-ASCORBATE OXIDASE (AO), 2-OXOGLUTARATE and Fe(II)-DEPENDENT OXYGENASE (20G), PROTEASOME 26S, CELL DIVISION CYCLE PROTEIN 48 HOMOLOG (CDC48), HEAT SHOCK 70 kDA (HSP70s), 40S RIBOSOMAL PROTEIN S3-3 (RPS3), 40S RIBOSOMAL PROTEIN S7 (RPS7) e proteína 60S RIBOSOMAL PROTEIN L9-LIKE (RPL6), 60S RIBOSOMAL PROTEIN L4 (RPL4), STEAROYL-JACYL-CARRIER-PROTEIN 9-DESATURASE (ACP), LINOLEATE 9S-LIPOXYGENASE 1 (9-LOX), ALLENE OXIDE CYCLASE (AOC), 12-OXOPHYTODIENOATE REDUCTASE 2 (OPR).

3.2.4.7. 5-azaC induz redução do conteúdo endógeno de PAs, ácido abscísico (ABA), ácido indolacético (AIA) e etileno

Considerando o possível desbalanço em vias metabólicas envolvidas no ciclo da ureia e que este pode implicar na produção de PAs e, ainda, o *crosstalk* entre as vias de síntese de PAS, etileno e metilação do DNA através do SAM, foi analisado o conteúdo endógeno de PAs e etileno em parte aérea e raízes de plântulas de soja com 7 DAE obtidas no controle e tratadas com 100 µM de 5-azaC. O tratamento com 5-azaC causou redução nos níveis de PAs livres totais em raiz. No entanto, os níveis de PAs livres em parte aérea de plântulas controle e tratada não apresentou alteração estatística (Figura 17A).

O conteúdo endógeno de Putrescina (Put) e Cadaverina (Cad) foram significativamente reduzidos em parte aérea e raiz de plântulas tratadas com 5-azaC (Figura 17 B e C). No entanto, o tratamento com 5-azaC, não alterou o conteúdo de Spm e Spd em parte aérea e raiz de plântulas (Figura 18 D e E). Com relação a razão das PAs [Put/(Spd+Spm)], não há diferença significativa entre parte aérea de plântulas controle e tratada (Figura 17 F). Entretanto, raízes tratadas com 5-azaC apresentaram redução significativa da razão (Figura 17 F), possivelmente ocasionada pela redução da Put (Figura 17 B). A soma do conteúdo de Spd e Spm, mostrou um resultado diferente do que foi observado na razão das PAs (dados não mostrados). A parte área de plântulas tratadas com 5-azaC teve redução significativa, enquanto não houve diferença entre raiz das plântulas obtidas no controle e tratada.



Figura 17: Conteúdo endógeno de PA em parte aérea e raiz de plântulas de soja controle e tratadas com 5-azaC por 7 DAE. (A) Conteúdo endógeno de PAs livres totais (μg.g⁻¹ de MS). (B) Conteúdo de Put. (C) Conteúdo de Cad. (D) Conteúdo de Spd. (E) Conteúdo de Spm. (F) Razão entre PAs [Put/(Spd+Spm)] em parte aérea e raiz. MS - Massa Seca. ns - indica que não houve diferença significativa. *, ** e *** - indicam diferença significativa do tratamento com 5-azaC em relação ao controle P<0,05, P<0,01 e P<0,001, respectivamente, de acordo com o teste t.

O tratamento com 5-azaC reduziu os níveis endógenos de Put e Cad. Considerando que as PAs e etileno utilizam o SAM como precursor, foi avaliado se o 5-azaC causa alteração nos níveis de etileno. O tratamento de plântulas com 5azaC levou a menor emissão do gás etileno em comparação com plântulas controle (Figura 18).



Figura 18: Taxa de emissão de etileno em raízes de plântulas de soja do controle e tratadas com 5-azaC aos 7 DAE. * - indica diferença significativa entre tratamento com 5-azaC em relação ao controle P<0,05 de acordo com o teste t.

O metabolismo de PAs em plantas está intimamente ligado a muitas outras vias metabólicas. Assim, além do conteúdo endógeno de PAs, foi analisado se o tratamento com 5-azaC influenciou no conteúdo endógeno dos hormônios ABA e AIA. O tratamento com 5-azaC causou redução no conteúdo endógeno de ABA nas raízes, porém não alterou o conteúdo na parte aérea (Figura 19 A).

Além da relação de ABA com Put, ABA possui uma relação recíproca com carotenoides, onde a diminuição de carotenoides bloqueia a biossíntese de ABA (Xu et al., 2017). Assim, foi quantificado os teores de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a, b* e carotenoides) de folhas de plântulas controle e tratadas com 5-azaC. Plântulas tratadas com 5-azaC possuem níveis reduzidos de clorofila *a, b* e carotenoides em comparação com controle (Figura 19 B-D). Esse resultado sugere que o ABA pode ter uma regulação recíproca com a Put e que a redução de carotenoides pode contribuir para os níveis mais baixos de ABA.





Outro fitormônio que desempenha papel importante na regulação do crescimento e desenvolvimento de plantas e na interação planta-patógeno, é o ácido indol-3-acético (AIA). O tratamento com 5-azaC aumentou o nível de AIA endógeno em raízes, mas não causou alteração na parte aérea (Figura 20).



Figura 20: Conteúdo endógeno de AIA em parte aérea e raiz de plântulas no controle e tratadas com 5-azaC aos 7 DAE. MF: Massa Fresca. ns – indica que não houve diferença significativa. *- indica diferença significativa entre tratamento com 5-azaC em relação ao controle P<0,05 e P<0,01, respectivamente, de acordo com teste t.

3.2.5. DISCUSSÃO

3.2.5.1. Papel da metilação na germinação e no desenvolvimento de plântulas de soja

A metilação do DNA é conhecida por ser uma marca epigenética importante e por regular diversos processos biológicos. A interrupção na homeostase da metilação do DNA leva a várias anormalidades no desenvolvimento das plantas e animais (Slotkin e Martienssen, 2007; Lang et al., 2017; Kumar e Mohapatra, 2021). No presente estudo, plântulas da cultivar BRS-284 tratadas com 5-azaC apresentaram alteração no fenótipo, com redução do comprimento, da massa fresca da parte área e raiz (Figura 8, 9 e 21). Um fenótipo semelhante ao encontrado na cultivar BRS-284 foi observado também mas cultivares BR-16 e Embrapa 48 (susceptível e resistente à seca, respectivamente) tratadas com 5azaC (Figura 10).

O inibidor da metilação do DNA, 5-azaC, é utilizado para a compreensão do papel metilação do DNA nos processos de desenvolvimento. É um análogo do nucleotídeo citosina e, é incorporado aleatoriamente em uma fita do DNA recémsintetizada no lugar da citosina. Esse mecanismo leva a uma hipometilação do genoma em sequências aleatórias (Christman, 2002; Emani et al., 2002; Issa e Kantarjian, 2009). Alguns estudos utilizaram o 5-azaC com o intuito de avaliar o efeito da metilação no desenvolvimento da planta e na embriogênese somática. Virdi et al. (2015) observaram redução no tamanho das raízes de Arabidopsis tratadas com 5-azaC. O tratamento de sementes de espinafre com 100 a 1000 µM de 5-azaC regula negativamente a germinação, o comprimento de raiz e altura da planta (Li et al., 2015). Plântulas de Sorghum bicolor tratadas com 5-azac apresentaram menor desenvolvimento de parte aérea e de raízes aos 4 dias de tratamento (Turco et al., 2017). Grzybkowska et al. (2018) observaram que culturas embriogênicas de Arabidopsis tratadas com 5-azaC durante) apresentaram diminuição da metilação global do DNA e uma regulação positiva de DNA metilases, enquanto as DNA desmetilases foram reguladas negativamente. Em plântulas de Arabidopsis, o tratamento com 5-azaC não afetou o acúmulo de biomassa fresca e seca, mas levou a uma maior porcentagem de flores. Além disso, o tratamento com 5-azaC diminuiu o nível de resistência ao calor, à seca e ao estresse salino (Ogneva et al., 2019).

O tratamento com 5-azaC afetou o desenvolvimento das plântulas de soja, entretanto não afetou a germinação de sementes (Figura 11 A/B e Figura 21). O processo germinativo inicia-se com a embebição de água pela semente quiescente e culmina com a emergência da radícula. Iniciando assim a retomada do metabolismo e o crescimento do embrião (Kim et al., 2011). A absorção de água resulta na ativação de enzimas que auxiliam no afrouxamento da parede celular, facilitando a expansão celular e a protusão do eixo embrionário (BEWLEY et al., 2013; Luján-Soto e Dinkova, 2021). Durante a germinação de sementes de soja, ocorre a reativação da maquinária da expansão celular nas primeiras horas de embebição, levando a modulação estrutural da parede celular via expansão celular divisão (Bellieny-Rabelo et al., 2016; Sangi et al., 2019; Luján-Soto e Dinkova, 2021). O processo de germinação em soja finaliza com a emissão da radícula, o que geralmente ocorre até 24 HAE (Sangi et al., 2019). Bellieny-Rabelo et al. (2016) mostraram que a maquinária de divisão celular é iniciada em 12 HAE, e possivelmente só estará pronta após o processo germinação com a emissão da radícula. Após a germinação, a radícula se desenvolve por divisão celular o que permite o desenvolvimento da plântula (Steinbrecher e Leubner-metzger, 2017).

Luján-Soto e Dinkova (2021) relacionaram a fase III, ocorrida em 36 HAE, como uma fase pós germinativa, caracterizada pela mobilização de reservas armazenadas no endosperma para o eixo embrionário. O que desencadeia a segunda absorção de água e crescimento das plântulas mediada por divisão celular, dentre outros eventos moleculares e regulação nos níveis hormonais. Em raízes de milho tratadas com 5-azaC foi observado hipometilação global do DNA durante a interfase e na mitose (Yang et al., 2010). Portanto, sugere-se que o 5-azaC começa a atuar a partir do 2º DAE do desenvolvimento da radícula com redução significativa na área da radícula (Figura 11 A e C) e onde o desenvolvimento é condicionado por processo de divisão celular.

3.2.5.2. Análise do efeito da metilação na expressão de genes envolvidos na metilação e desmetilação do DNA em plântulas de soja

Na presente pesquisa, o 5-azaC teve efeito primordial no desenvolvimento da radícula e consequentemente da raiz (Figura 11 A e Figura 12). Assim, foram analisados genes relacionados à regulação da metilação do DNA em raízes de soja (Figura 12). Genes DNA metilases que estão envolvidos na metilação de manutenção da metilação (MET1) e metilação de novo (DRM2) são expressos de forma diferente em raízes de plântulas de soja tratadas com 5-azaC em comparação com raízes de plântulas controle (Figura 12 e Figura 21). Neste estudo, o 5-azaC não promoveu alteração na expressão de MET1, mas regulou positivamente a expressão do gene DRM2. Esse resultado sugere que a metilação do DNA parece estar sendo controlada pela via RdDM, devido à alta expressão da DRM2 em raízes tratadas (Figura 12 e Figura 21). Grzybkowska et al. (2018) verificaram o impacto da metilação na embriogênese somática (ES) de Arabidopsis thaliana tratadas com 5-azaC. Observaram uma diminuição na metilação global do DNA durante a ES que foi contrastante com a regulação positiva dos genes MET1 e CMT3. Isso também foi observado para DRM2, que apresentou maior expressão em ES. Observaram também a correlação negativa dos genes de DNA desmetilases, ROS1, DME e DML2 (Grzybkowska et al., 2018). O maior tempo de expressão dos genes MET1 e CMT3 coincide com o tempo das divisões celulares intensivas que estão associadas à aquisição do destino embrionário pelas células do explante (Kurczyńska et al., 2007).

A metilação do DNA é acompanhada pela desmetilação do DNA, ocorrendo um equilíbrio entre esses processos antagônicos controlando o padrão de metilação do DNA no desenvolvimento da planta. Na análise de expressão relativa, o gene ROS 1 foi regulado negativamente em raízes tratadas com 5-azaC (Figura 12 e Figura 21). Isso pode indicar que o padrão de metilação das raízes tratadas foi alterado, sugerindo uma diminuição da metilação. A diminuição da expressão da ROS1 pode ser condicionada por um mecanismo compensatório, onde ROS1 é bloqueada para evitar que ocorra mais desmetilação no genoma.

ROS1, Repressor de Silenciamento 1, é um importante DNA desmetilase que está envolvida na regulação transcricional dinâmica do genoma que desempenha um papel nos processos de desenvolvimento e respostas ao estresse biótico e abiótico. Grzybkowska et al. (2018), além de observar a diminuição da metilação global do DNA e aumento da expressão de MET1, CMT3 e DRM2 durante a ES, observou também a regulação negativa dos genes que codificam DNA desmetilases (ROS1, DME, DML2). Em Arabidopsis, mostraram que em um triplo mutante para ros1, dml2 e dml3, houve alteração da metilação do DNA (Penterman et al., 2007b). De acordo com Hsieh et al. (2009) a falta de uma correlação direta entre a atividade da DNA metilase e o nível de 5mC pode ser uma consequência da complexidade das interações que controlam o equilíbrio entre a replicação do DNA, a metilação e desmetilação do DNA de manutenção *de novo*.

S- adenosil-L-metionina (SAM) é uma molécula chave presente nas células eucarióticas que participa de várias reações biológicas importantes (Fontecave et al., 2004; Martínez-López et al., 2008). SAM é produzida pela enzima S-adenosilmetionina sintetase (SAMS) (Fontecave et al., 2004). Além de participar de diferentes vias, como a biossíntese do etileno, PAs e resposta a estresses ambientais, atua como doador de grupo metil com muitas proteínas, ácidos nucleicos, fosfolipídios e pequenas moléculas sendo metiladas principalmente por SAM (Bauerle et al., 2015). A regulação positiva da SAM em raízes tratadas com 5-azaC, sugere que ela possa estar sendo utilizada como fonte doadora de grupo metil para a DRM2.

3.2.5.3. 5-azaC afeta o desenvolvimento das raízes de plântulas de soja

As análises demonstraram que as raízes tratadas com 5-azaC apresentaram má formação na região da coifa, da columela e meristemática, onde os núcleos são maiores e irregulares (Figura 13 M-R). Além da má formação da coifa, a região da columela e região meristemática parecem ser mais densas (Figura 13 J e M). Um estudo com Arabidopsis mostrou que a região da columela da raiz é hipermetilada em CHH, com a função principalmente de silenciar a transcrição de TEs (Kawakatsu et al., 2016). Isso sugere que o tratamento com 5-azaC pode ter diminuído a metilação naquela região, influenciando na má formação das raízes. A sobreposição das marcações com DAPI e IP em núcleos de raízes tratadas com 5-azaC sugere um desbalanço da parede celular/membrana, que permite a entrada do IP nas células (Figura 13 F e O). Nas análises de proteômica comparativa foram observadas proteínas *up*-acumuladas relacionadas a modificações da parede celular em raízes tratadas com 5-azaC (Figura 16 e Figura 21). Esses resultados sugerem uma remodelação de parede celular, de forma a responder ao estresse causado pelo 5-azaC.

Em raízes tratadas com 5-azaC houve alteração nos níveis de ploidia, com sobreposição de dois níveis, sendo característico um pico maior em 4C e um pico menor em 8C (Figura 14B). Em raízes de milho tratadas com 5-azaC foi observada alteração global da metilação, levando a diminuição da metilação em histona 4 lisina 9 H4K9 e aumento da acetilação em H4, durante a mitose de células meristemáticas de raízes de milho (Yang et al., 2010). Portanto, a interrupção no ciclo celular pode afetar os níveis de ploidia observado em raízes de soja o que pode ter contribuído para núcleos maiores e desuniformes (Figura 13 J-R).

3.2.5.4. 5-azaC afeta a regulação de vias metabólicas importantes para desenvolvimento e resposta a estresses

Na análise proteômica das raízes, foram identificadas 66 proteínas *up*acumuladas em raízes tratadas com 5-azaC e 45 proteínas *down*-acumuladas. Dentre estas proteínas, foram identificadas em raízes tratadas proteínas *down*acumuladas relacionadas ao ciclo da ureia e assimilação de nitrogênio, sugerindo que este pode ter sido prejudicado. As proteínas GOGAT, GS e AS são relacionadas à assimilação de nitrogênio e foram *down*-acumuladas em raízes (Figura 16). No entanto, as GS e GDH foram *up*-acumuladas em raízes tratadas (Figura 16). A GOGAT catalisa a conversão de glutamina e 2-oxoglutarato em duas moléculas de glutamato, fornecendo glutamato para assimilação de amônio. Como resultado do ciclo GS-GOGAT, ocorre a produção de glutamato, que pode então ser incorporado em outros aminoácidos através da ação de aminotransferases ou transaminases. Isso sugere que a assimilação de nitrogênio em plântulas tratadas pode estar sendo prejudicada. A proteína GDH, catalisa uma reação reversível que sintetiza ou desamina o glutamato, assimilando o amônio em uma via alternativa (Kumar e Trivedi, 2018).

Além do comprometimento do ciclo da ureia e da assimilação de nitrogênio em raízes de plântulas tratada, quase todas proteínas da via glicolítica são *down*acumuladas, sugerindo que a via glicolítica possa também estar comprometida. Entretanto, a enzima PEPCK é *up*-acumulada em raízes tratadas (Figura 16). A PEPCK é empregada na gliconeogênese e apresenta alta afinidade para descarboxilação do OAA (Rojas et al., 2019). Em muitos tecidos a gliconeogênese está associada ao metabolismo dos ácidos do ciclo de Krebs e/ou compostos nitrogenados quando são liberados do vacúolo (Walker et al., 2021). Em raízes, a PEPCK aparece em resposta à alimentação com amônio (Walker et al., 2021).

Na análise proteômica, proteínas relacionadas à fermentação, como ALDH foi *up*-acumuladas em raízes tratadas com 5-azaC (Figura 16). Como a via glicolítica parece estar prejudicada e a produção de ATP também, esse resultado sugere a utilização dessa via como alternativa para gerar ATP. Plantas em resposta à inundação ativam a fermentação, como uma via metabólica alternativa para produzir ATP e regenerar NAD⁺ (Gibbs e Greenway, 2003). Em sementes, as enzimas ALDH usam NAD+ ou NADP+ como cofator para converter acetaldeído, produzido por fermentação etanólica, em acetato, que é subsequentemente usado para a síntese de Acetil-CoA (Min et al., 2019).

Nas análises microscópicas, foram observadas má formação das raízes em regiões de extrema importância para o desenvolvimento da planta – como na coifa. Além disso, observou-se que a marcação do IP se sobrepôs ao DAPI em núcleos de células de raízes tratadas com 5-azac (Figura 13K). Na análise proteômica, foram observadas proteínas estruturais e modificadoras da parede celular *up*-acumuladas em raízes tratadas com 5-azac (Figura 16 e Tabela S4). Esse resultado

sugere que o 5-azac modula proteínas estruturais de parede celular induzindo a remodelação, o que pode ter facilitado a entrada de IP nas células. A parede celular primária da planta é uma estrutura dinâmica composta principalmente por polissacarídeos organizados em uma rede polimérica altamente reticulada (Albersheim et al., 2010; Haas et al., 2021; Zhang et al., 2021). Foram identificadas proteínas estruturais da parede, como as proteínas GRPs e AGPs (Figura 16). As GRPs são relacionadas à resposta a condições de estresse por frio e adaptação ao ritmo circadiano (Carpenter et al., 1994; Kim et al., 2010). Genes GRPs foram regulados negativamente em zona de alongamento do hipocótilo de plântulas de soja expostas ao déficit hídrico (Creelman e Mullet, 1991). As AGPs são proteoglicanos e podem atuar como precursores de carboidratos e estão envolvidas no crescimento dos tubos polínicos de lírio (Jauh e Lord, 1996; Majewska-sawka e Nothnagel, 2000). Estudos anteriores detectaram AGPs em ponta de raiz de Arabidopsis, desempenhando um papel fundamental no controle da expansão das células epidérmicas da raiz (Ding e Zhu, 1997; Majewska-sawka e Nothnagel, 2000). Podem participar também na regulação do balanço hídrico na célula (Showalter, 2001). Estas demonstram desempenhar um papel essencial no crescimento, desenvolvimento, reprodução, sinalização e respostas ao estresse das plantas (Nguema-Ona et al., 2012, 2013; Lamport e Várnai, 2013; Knoch et al., 2014; Olmos et al., 2017; Ma et al., 2018; Silva et al., 2020).

As proteínas modificadoras de parede celular identificadas foram as pectinas esterases (PAE), pectinas metilesterases (PME) e as xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase (XTHs) (Figura 16). As pectinas são importantes polissacarídeos estruturais da parede celular primária. As PAEs atuam em conjunto com uma série de outras enzimas que degradam pectina, podendo estar envolvidos no amolecimento e afrouxamento da pectina da parede celular primária em raízes de plantas infectadas por nematoides (Vercauteren et al., 2002). As PAE foram reguladas positivamente logo após a infecção por nematoides em raízes de Arabidopsis. Em mutantes de acetilação de parede reduzida (rwa2) de Arabidopsis, houve redução de 20% na acetilação da parede celular, que levou ao um aumento da resistência à *Botrytis cinerea* (Manabe et al., 2011). A super expressão de uma pectina acetilesterase fúngica (*Aspergillus nidulans*) em Arabidopsis resultou em tolerância à *Botrytis cinerea* (Pogorelko et al., 2013; Philippe et al., 2017). A PME tem como função a desesterificação do grupo carboxila metilado (COOCH₃) da

pectina para formar pectinas elásticas e acompanhar a geração de MeOH durante a divisão e maturação da célula vegetal (Komarova et al., 2014). Esta proteína é necessária para resposta da planta ao estresse por calor (Wolf et al., 2009; Wu et al., 2018). Isso sugere que as plântulas no tratamento com 5-azaC ativam vias de remodelação de parede celular de forma similar a resposta contra estresses bióticos e abióticos.

Outra proteína modificadora de parede celular identificada foi a XTH. Esta proteína atua no afrouxamento da parede celular, funciona no alongamento e reconstrução da parede celular através do rearranjo das ligações entre as cadeias de xiloglucano (Van Sandt et al., 2007). A superexpressão de XTHs afeta o crescimento e a mecânica da parede celular em Arabidopsis estioladas (Miedes et al., 2013). Estas enzimas desempenham importante papel na construção, remodelação e desmontagem da estrutura xiloglucana/celulose nas paredes celulares do tipo I durante o crescimento e diferenciação celular, regulando o desenvolvimento da raiz (Hara et al., 2014).

Além da identificação das proteínas modificadores da parede, a proteína UXS são *up*-acumuladas em raízes tratadas. Essa proteína catalisa irreversivelmente a descarboxilação do ácido UDP-glucurônico (UDP-GlcA) formando UDP-Xyl (Bar-Peled et al., 2001; Kuang et al., 2016; Zhong et al., 2017). A UDP-Xyl funciona como um doador de açúcar para a biossíntese dos principais polissacarídeos da parede celular, como o xilano (monossacarídeos da cadeia principal) e o xiloglucano (Hayashi et al., 1988; Rodgers e Bolwell, 1992; Reiter, 2008). Os xilanos podem atuar auxiliando na defesa contra a herbívoros e patógenos, visto que aumentam a recalcitração da parede (Rennie e Scheller, 2014). A AXS é responsável por sintetizar a UDP-D-apoiose (UDP-Api). A enzima AXS pode formar dois açucares UDP, a UDP-Api e a UDP-xilose (UDP-Xil) ao mesmo tempo via descarboxilação da UDP-D-glucaronato (UDP-Glca)(Mølhøj et al., 2003).

As proteínas relacionadas ao metabolismo da parede celular podem atuar em conjunto com proteínas *up*-acumuladas em raízes tratadas envolvidas na resposta a estresses (IFR, NRX1) e ataque de patógenos (PPO, KII e D-MBL) (Figura 16). Além destas proteínas, a enzima GST também foi *up*-acumulada em raízes tratadas. Essa enzima atua nas reações de desintoxicação, eliminando moléculas reativas com a adição da glutationa (GSH) e protegendo assim a célula do dano oxidativo (Oakley, 2011; Kumar e Trivedi, 2018). Esses resultados sugerem que plântulas tratadas com 5-azaC parecem remodelar a parede celular primária para minimizar os danos causados pelo 5-azaC de forma semelhante às respostas aos estresses abióticos e ao ataque de patógenos.

Além da modulação da parede celular em resposta a estresses, raízes tratadas com 5-azaC tiveram maior acúmulo de proteínas relacionadas a reparo, como a proteína subunidade reguladora do proteassoma 26S e CDC48 (Figura 16). O proteassoma 26S degrada proteínas mal enoveladas e desnaturadas produzidas por erros de tradução ou danos pós-sintéticos, sendo essencial para o controle de qualidade de proteínas (Kurepa e Smalle, 2008). As proteínas não funcionais são primeiramente reconhecidas por chaperonas, sendo ubiquitinadas através de Ub ligases de ligação a chaperonas e posteriormente são degradadas pelo 26S (Jiang et al., 2001; Murata et al., 2001; Yan et al., 2003; Kurepa et al., 2009). Em plantas, CDC48 desempenha funções regulatórias essenciais no desenvolvimento e possível contribuição para a degradação de proteínas através do sistema ubiquitina-proteassoma (UPS). Foi relatado que essa proteína está envolvida também na resposta imune das plantas, não atuando no ciclo celular, como em animais (Hervé Bègue, Arnaud Mounier, Claire Rosnoblet, 2019; Rosnoblet et al., 2021). Em arroz, foi relatado que a ativação de genes que codificam CDC48 contribui para aumentar a tolerância ao estresse abiótico (Raja et al., 2021).

Outra classe de proteínas *up*-acumuladas em raízes tratadas relacionada ao reparo, foi a proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70s) (Figura 16). As HSP70s, são chaperonas envolvidas em uma variedade de processos celulares, como o dobramento de proteínas, transporte de proteínas através da membrana e regulação da degradação de proteínas. Portanto, desempenham papéis críticos durante o ciclo de vida normal das plantas. As HSP70s estão particularmente envolvidas na regulação das respostas ao estresse biótico e abiótico (Aghaie e Tafreshi, 2020). A superexpressão de Hsp70-1 citosólico em Arabidopsis resultou em maior tolerância ao calor sob certas condições (Sung e Guy, 2003).

Outras proteínas relacionadas à regulação da qualidade das proteínas foram identificadas e estão envolvidas no reparo mitocondrial, como as proteínas ribossômicas S (RPS) e proteínas ribossômicas L (RPL) (Figura 16 e Tabela S4). As RPS estão envolvidas na estabilização do complexo ribossomal e atuam também na mediação de síntese de proteínas (Ban et al., 2000; Barakat et al., 2001;

Hanson et al., 2004). Esse resultado sugere que estas proteínas podem atuar em conjunto no controle de qualidade e reparo das proteínas em raízes tratadas.

Raízes tratadas tiveram maior acúmulo de proteínas da via de síntese de ácido jasmônico (JA) (Figura 16 e Tabela S4). O JA é um fitormônio derivado de ácidos graxos poli-insaturados e desempenha papel crucial na resposta a vários estresses bióticos e abióticos (Fahad et al., 2015; Hu et al., 2017; Aslam et al., 2021; Wang et al., 2021). Um estudo recente mostrou que a ativação do sistema de defesa da planta causa acúmulo de hormônios de defesa, como o JA e sistemas antioxidantes como a GSH (Aslam et al., 2021). O JA e a GSH desempenham importante papel na tolerância ao estresse abiótico (Aslam et al., 2021). Em raízes de soja após inundação, o JA apresentou função de recuperação, modulando os níveis de atividade da nucleotidililtransferase (Khan e Komatsu, 2016). Esses resultados sugerem que plântulas tratadas com 5-azaC podem estar produzindo potenciais respostas contra estresses biótico e abiótico.

3.2.5.5. 5-azaC afeta o conteúdo endógeno de PAs, ABA, AIA e a emissão de etileno

No presente estudo, a concentração de duas PAs, Put e Cad, diminuiu significativamente em parte aérea e raiz de plântulas tratadas (Figura 17 B/C e 21). No entanto, a concentração de Spd e Spm não se alterou (Figura 17 D/E e 21). A redução de Put e Cad pode ser relacionada ao catabolismo dessas PAs por CuAOs *up*-acumuladas em raízes de plântulas tratadas com 5-azaC (Figura 16 e Tabela S4). Essas proteínas exibem preferência por catalisar Put e Cad, sua oxidação em grupos amino primários, gerando 4-aminobitanal (Wang et al., 2019). O catabolismo de PAs produz H₂O₂ como produto final e desempenha papel essencial nas interações planta-patógeno (Jiménez-Bremont et al., 2014; Tavladoraki et al., 2016; Rossi et al., 2018). A redução da Put pode influenciar também redução da divisão celular e no conteúdo de DNA observado em raízes de plântulas tratadas com 5-azaC (Figura 14 B). De acordo com Santa-Catarina et al. (2006), a Put desempenha papel fundamental no início da embriogênese, visto que nesta etapa as taxas de divisão celular é alta.

Um estudo com Cad em soja mostrou que esta diamina é essencial para o desenvolvimento normal de raiz e para germinação em sementes de soja

(Gamarnik e Frydman, 1991). Neste sentido, a redução de Cad corrobora com o descrito inicialmente para soja, mostrando que esta PA é importante para o desenvolvimento da raiz, e redução no conteúdo poderia afetar o crescimento da raiz. Adicionalmente, foi mostrado que o estresse salino provoca redução do crescimento do hipocótilo em soja e induz alterações nos níveis de PAs, principalmente de Put e Cad pela ação da enzima CuAOs (Campestre et al., 2011). A análise demonstrou que Spd e Spm não sofreram alteração em plântulas tratadas. Esse resultado pode ter ocorrer devido à redução de Put, que é precursora dessas duas PAs (Santa-Catarina et al., 2006; Kusano et al., 2008; Chen et al., 2019) e pelo acúmulo da proteína S-adenosilmetionina sintase (SAMS) em raiz tratada e controle (Figura 16). A SAMS catalisa a síntese de SAM, que atua na síntese de PAs e também é um precursor para a síntese de etileno (Lasanajak et al., 2014). Apesar da alta expressão de SAMS em raízes tratadas, a análise da taxa de emissão de etileno mostrou diminuição deste hormônio em raízes tratadas com 5-azaC (Figura 18 e Figura 21), sugerindo que o SAM produzido pode estar funcionando como doador do grupo aminopropil par DMR2 e secundariamente ser direcionado para a manutenção dos níveis de Spd e Spm.

Além da diminuição de Put, Cad e etileno, houve também a redução nos níveis de ABA em raízes de plântulas tratadas com 5-azaC (Figura 19 A e Figura 21). ABA e Put possuem regulação recíproca de sua biossíntese e atuam desencadeando o sistema antioxidante, aumentando assim a tolerância ao frio em melão (Santa-Catarina et al., 2006; Li et al., 2021). Essa relação recíproca entre Put e ABA também foi observada neste estudo.

Além da correlação recíproca de ABA com Put, ABA também possui correlação com carotenoides e etileno. Calos de Citros tratados com 5-azaC tiveram redução nos teores totais de carotenoides e de ABA. A degradação de carotenoides culmina na diminuição da biossíntese de ABA (Xu et al., 2017). Resultados semelhantes foram observados no presente estudo em relação à redução de carotenoide e de ABA. Os níveis de ABA também foram correlacionados com os níveis de etileno em Arabidopsis. Estudos com Arabidopsis mostraram que que altas concentrações de ABA exógeno promove a biossíntese do etileno (Zhang et al., 2010a; Joshi-Saha et al., 2011; Arc et al., 2013; Luo et al., 2014; Shu et al., 2018).

Outro fitormônio que sofreu alteração em raízes tratadas com 5-azaC foi AIA. Ao contrário de ABA e etileno, os níveis de AIA aumentaram em raízes tratadas (Figura 20 e Figura 21). O aumento da auxina é correlacionado também com a resistência contra patógenos. Em Arabidopsis, observaram aumento na concentração endógena de AIA após 48 a 96h após a inoculação com Pst DC3000 em comparação com plantas de controle simuladas (Schmelz et al., 2004). Plantas de arroz suscetíveis acumularam mais AIA do que plantas resistentes durante a infecção com diferentes patógenos (Ding et al., 2008; Fu et al., 2011). Esses dados sugerem que o aumento da auxina em raiz de plântulas de soja tratadas com 5-azaC seja um componente importante envolvido nas respostas de defesa.

A figura 21 representa esquematicamente os principais eventos biológicos observados em plântulas de soja em resposta ao tratamento com 5-azaC.



Figura 21: Representação esquemática dos principais eventos biológicos alterados em plântulas de soja com 7 DAE em resposta ao 5-azaC. Traço tracejado – não afeta; seta preta contínua – aumenta; seta cinza – redução; ROS1 - *REPRESSOR OF SILENCING 1*; MET1 – *DNA METHYLTRANSFERASE 1*; DRM2 - *DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASES 2*; ABA – Ácido Abscísico, AIA - ácido indol acético; PAs – Poliaminas; Put - Putrescina; Cad – Cadaverina; Spd – Espermidina; Spm – Espermina; SAM – S- adenosil-L-metionina.

3.2.6. CONCLUSÕES

Este estudo, visou observar o papel da metilação do DNA na germinação e no desenvolvimento de plântulas de soja. O inibidor da metilação do DNA, 5-azaC, afeta o desenvolvimento das plântulas a partir do segundo dia de desenvolvimento da radícula, mas não afeta a germinação. Em plântulas de 7 DAE o 5-azaC regulou positivamente a expressão de genes envolvidos na via de metilação por RdDM e negativamente os genes ROS1, participante da desmetilação ativa do DNA. Foram encontradas alterações morfológicas e no conteúdo de DNA nas raízes tratadas com 5-azaC, sugerindo papel essencial da metilação do DNA no desenvolvimento de plântulas de soja. Por proteômica quantitativa, foram identificadas 66 proteínas up-acumuladas e 45 proteínas down-acumuladas em raízes tratadas com 5-azac. Essas proteínas estão relacionadas com a modulação da parede celular, alterações no metabolismo em resposta ao estresse abiótico, bem como em resposta a patógenos, sugerindo que a diminuição da metilação do DNA modula vias semelhantes à resposta ao ataque por patógenos ou estresse abiótico. O 5-azaC modulou negativamente os níveis endógenos de ABA, Put, Cad e etileno. Entretanto, modulou positivamente AIA. Esses crosstalk hormonal possui papel fundamental no desenvolvimento das plântulas. Os resultados desta pesquisa auxiliam em uma melhor compreensão do importante papel da metilação do DNA na modulação de vias semelhantes à resposta ao ataque por patógenos ou estresse abiótico e envolvidas no desenvolvimento de plântulas de soja.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desta pesquisa contribuem para uma melhor compreensão da evolução e conservação das proteínas da família MBD e sua relação com a metilação do DNA em plantas, principalmente no genoma de uma leguminosa que passou por dois eventos de duplicação do genoma, como a soja. Destaca-se a conservação de importantes resíduos de aminoácidos dentro do domínio MBD relacionados a afinidade de ligação ao DNA metilado nos contextos mCpG e mCpA. Além disso, contribui com uma ampla visão do papel da metilação do DNA em plântulas de soja, obtendo resultados inéditos que sugerem que a diminuição da metilação do DNA pode influenciar no desenvolvimento de plântulas de soja, alterando os níveis endógenos hormonais, bem como afetando o acúmulo de proteínas relacionadas à defesa por ataque de patógenos e em resposta a estresses abióticos. Os próximos passos relacionados a este trabalho serão a análise de plântulas tratadas com 5-azaC e submetidas à estresse biótico e a regulação da parede celular das raízes de plântulas de soja. Novos estudos com foco nessa relação da diminuição da metilação do DNA e resistência a patógenos serão importantes para aumentar a compreensão da relação da metilação do DNA e resposta a estresses em plântulas de soja que afetam o crescimento e viabilidade da planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ABASTECIMENTO, C.-C.N. DE. (2017) Acompanhamento da safra brasileira: grãos safra 2016/2017.
- Adams, K.L., Cronn, R., Percifield, R., Wendel, J.F. (2003) Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4649–4654.
- Adams, K.L., Wendel, J.F. (2005) Polyploidy and genome evolution in plants. *Curr Opin Plant Biol* 8: 135–141.
- Aghaie, P., Tafreshi, S.A.H. (2020) Central role of 70-kDa heat shock protein in adaptation of plants to drought stress. *Cell Stress Chaperones* 25: 1071–1081.
- Agius, F., Kapoor, A., Zhu, J.K. (2006) Role of the Arabidopsis DNA glycosylase/lyase ROS1 in active DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 11796–11801.
- Albersheim, P., Darvill, A., Roberts, K., Sederoff, R., Staehelin, A. (2010) Plant cell walls: from chemistry to biology. Choice Rev Online. doi: 10.5860/choice.48-2072
- Alcázar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Koncz, C., Carrasco, P., Tiburcio, A.F. (2010) Polyamines: Molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta* 1237–1249.

- Alcázar, R., Marco, F., Cuevas, J.C., Patron, M., Ferrando, A., Carrasco, P., Tiburcio, A.F., Altabella, T. (2006) Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnol Lett* 1867–1876.
- Alexandre, C., Möller-Steinbach, Y., Schönrock, N., Gruissem, W., Hennig, L. (2009) Arabidopsis MSI1 is required for negative regulation of the response to drought stress. *Mol Plant* 2: 675–687.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403–410.
- Alvarez-Flórez, F., López-Cristoffanini, C., Jáuregui, O., Melgarejo, L.M., López-Carbonell, M. (2017) Changes in ABA, IAA and JA levels during calyx, fruit and leaves development in cape gooseberry plants (Physalis peruviana L.). *Plant Physiol Biochem* 115: 174–182.
- An, Y.C., Goettel, W., Han, Q., Bartels, A., Liu, Z., Xiao, W. (2017) Dynamic Changes of Genome-Wide DNA Methylation during Soybean Seed Development. *Sci Rep* 7: 12263.
- Arc, E., Sechet, J., Corbineau, F., Rajjou, L., Marion-Poll, A. (2013) ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. *Front Plant Sci* 63.
- Aslam, S., Gul, N., Mir, M.A., Asgher, M., Al-Sulami, N., Abulfaraj, A.A., Qari, S. (2021) Role of Jasmonates, Calcium, and Glutathione in Plants to Combat Abiotic Stresses Through Precise Signaling Cascade. *Front Plant Sci* 12: 1–29.
- Bagni, N., Tassoni, A. (2001) Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids* 20: 301–317.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B., Steitz, T.A. (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science (80-)* 289: 905–920.
- Bar-Peled, M., Griffith, C.L., Doering, T.L. (2001) Functional cloning and characterization of a UDP-glucuronic acid decarboxylase: The pathogenic fungus Cryptococcus neoformans elucidates UDP-xylose synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 12003–12008.

- Barakat, A., Szick-Miranda, K., Chang, I.F., Guyot, R., Blanc, G., Cooke, R., Delseny, M., Bailey-Serres, J. (2001) The organization of cytoplasmic ribosomal protein genes in the arabidopsis genome. *Plant Physiol* 127: 398– 415.
- Bauerle, M.R., Schwalm, E.L., Booker, S.J. (2015) Mechanistic diversity of radical S-adenosylmethionine (SAM)-dependent methylation. *J Biol Chem* 290: 3995– 4002.
- Becker, A. (2003) The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. 29: 464–489.
- Bellieny-Rabelo, D., Alves Gamosa de Oliveira, E., da Silva Ribeiro, E., Pessoa Costa, E., Elenir Amâncio Oliveira, A., Motta Venancio, T. (2016)
 Transcriptome analysis uncovers key regulatory and metabolic aspects of soybean embryonic axes during germination. *Sci Rep* 6: 36009.
- Bennett, M., Cleaves, K., Hewezi, T. (2021) Expression Patterns of DNA Methylation and Demethylation Genes during Plant Development and in Response to Phytohormones. J Mol Biol 22: 9681.
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., Bourne, P.E. (2000) The Protein Data Bank Helen. *Nucleic Acids Res* 28: 235–242.
- Bewley, J. D. Black, M. (1994) SEEDS: Physiology of Development and Germination. 3nd ed. *Plenum Press* 35–42: 445.
- Bewley, J.D., Bradford, K., Hilhorst, H., Nonogaki, H. (2013) Seeds. *Springer* 3rd.ed: 381.
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer,
 F., Cassarino, T.G., Bertoni, M., Bordoli, L., Schwede, T. (2014) SWISSMODEL : modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary
 information. *Nucleic Acids Res* 42: 252–258.
- Blanc, G., Hokamp, K., Wolfe, K.H. (2003) A recent polyploidy superimposed on older large-scale duplications in the Arabidopsis genome. *Genome Res* 13: 137–144.

- Blanc, G., Wolfe, K.H. (2004) Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes. *Plant Cell* 16: 1667–1678.
- BOND, D. M.; FINNEGAN, E.J. (2007) Passing the message on: inheritance of epigenetic traits. *Trends Plant Sci* 12: 211–216.
- Botini, N., Almeida, F.A., Cruz, K.Z.C.M., Reis, R.S., Vale, E.M., Garcia, A.B., Santa-Catarina, C., Silveira, V. (2021) Stage-specific protein regulation during somatic embryo development of Carica papaya L. 'Golden.' *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* 1869: 140561.
- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F., Martin-Tanguy, J. (1999) Polyamines and environmental challenges: Recent development.
- Bouyer, D., Kramdi, A., Kassam, M., Heese, M., Schnittger, A., Roudier, F., Colot,
 V. (2017) DNA methylation dynamics during early plant life. *Genome Biol* 18: 1–12.
- Bowers, J.E., Chapman, B.A., Rong, J., Paterson, A.H. (2003) Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events. *Nature* 4: 10.
- Bratzel, F., López-Torrejón, G., Koch, M., Del Pozo, J.C., Calonje, M. (2010) Keeping cell identity in arabidopsis requires PRC1 RING-finger homologs that catalyze H2A monoubiquitination. *Curr Biol* 20: 1853–1859.
- Calarco, J. P. Borges, F. Donoghue, M. T. Van Ex, F. Jullien, P. E. Lopes, T., et al. (2012) Reprogramming of DNA methylation in pollen guides epigenetic inheritance via small RNA. *Cell* 151: 194–205.
- Campestre, M.P., Bordenave, C.D., Origone, A.C., Menéndez, A.B., Ruiz, O.A., Rodríguez, A.A., Maiale, S.J. (2011) Polyamine catabolism is involved in response to salt stress in soybean hypocotyls. *J Plant Physiol* 168: 1234–1240.
- Cannon, S.B., Ilut, D., Farmer, A.D., Maki, S.L., May, G.D., Singer, S.R., Doyle, J.J.
 (2010) Polyploidy did not predate the evolution of nodulation in all legumes. *PLoS One* 5: e11630.
- Cannon, S.B., Sterck, L., Rombauts, S., Sato, S., Cheung, F., Gouzy, J., Wang, X., Mudge, J., Vasdewani, J., Scheix, T., Spannagl, M., Monaghan, E., Nicholson,
C., Humphray, S.J., Schoof, H., Mayer, K.F.X., Rogers, J., Quétier, F., Oldroyd, G.E., Debellé, F., Cook, D.R., Retzel, E.F., Roe, B.A., Town, C.D., Tabata, S., Van De Peer, Y., Young, N.D. (2006) Legume genome evolution viewed through the Medicago truncatula and Lotus japonicus genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 14959–14964.

- Carpenter, C.D., Kreps, J.A., Simon, A.E. (1994) Genes encoding glycine-rich Arabidopsis thaliana proteins with RNA-binding motifs are influenced by cold treatment and an endogenous circadian rhythm. *Plant Physiol* 104: 1015–1025.
- Cavalcante, A.K. et al. (2010) Variabilidade genética de genótipos de soja de ciclo precoce no município de Uberaba-MG. 05: 115–119.
- Chahrour, M., Sung, Y.J., Shaw, C., Zhou, X., Wong, S.T.C., Qin, J., Zoghbi, H.Y. (2008) MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. *Science (80-)* 30: 1224–1229.
- Chan, S.W.L., Zilberman, D., Xie, Z., Johansen, L.K., Carrington, J.C., Jacobsen, S.E. (2004) RNA Silencing Genes Control de Novo DNA Methylation. *Science* (80-) 303: 1336.
- Chen, D., Molitor, A.M., Xu, L., Shen, W.H. (2016) Arabidopsis PRC1 core component AtRING1 regulates stem cell-determining carpel development mainly through repression of class I KNOX genes. *BMC Biol* 14: 112.
- Chen, D., Shao, Q., Yin, L., Younis, A., Zheng, B. (2019) Polyamine function in plants: Metabolism, regulation on development, and roles in abiotic stress responses. *Front Plant Sci* 9: 1–13.
- Choi, Y., Gehring, M., Johnson, L., Hannon, M., Harada, J.J., Goldberg, R.B., Jacobsen, S.E., Fischer, R.L. (2002) DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in Arabidopsis. *Cell* 110: 33–42.
- Christman, J.K. (2002) 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: Mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 21: 5483–5495.

- Clouaire, T., Stancheva, I. (2008) Methyl-CpG binding proteins: specialized transcriptional repressors or structural components of chromatin?. *Cell Mol Life Sci* 65: 1509–1522.
- Coneryz, J.S. (2000) The Evolutionary Fate and Consequences of Duplicate Genes. *Science (80-)* 290: 1151–1154.
- Creelman, R.A., Mullet, J.E. (1991) Water deficit modulates gene expression in growing zones of soybean seedlings. Analysis of differentially expressed cDNAs, a new β-tubulin gene, and expression of genes encoding cell wall proteins. *Plant Mol Biol* 17: 591–608.
- Cui, L., Wall, P.K., Leebens-Mack, J.H., Lindsay, B.G., Soltis, D.E., Doyle, J.J., Soltis, P.S., Carlson, J.E., Arumuganathan, K., Barakat, A., Albert, V.A., Ma, H., DePamphilis, C.W. (2006) Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. *Genome Res* 16: 738–749.
- Dhasarathy, A., Wade, P.A. (2008) The MBD protein family-Reading an epigenetic mark?.
- Ding, L., Zhu, J.K. (1997) A role for arabinogalactan-proteins in root epidermal cell expansion. *Planta* 203: 289–294.
- Ding, X., Cao, Y., Huang, L., Zhao, J., Xu, C., Li, X., Wang, S. (2008) Activation of the indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3-8 suppresses expansin expression and promotes salicylate- and jasmonate-independent basal immunity in rice. *Plant Cell* 20: 228–240.
- Distler, U., Kuharev, J., Navarro, P., Levin, Y., Schild, H., Tenzer, S. (2014) Drift time-specific collision energies enable deep-coverage data-independent acquisition proteomics. *Nat Methods* 11: 167–170.
- Emani, C., Sunilkumar, G., Rathore, K.S. (2002) Transgene silencing and reactivation in sorghum. *Plant Sci* 181–192.
- Embrapa Soja EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA. (2000) A cultura da soja no Brasil. *Cent Nac Pesqui Soja* 179.
- Fahad, S., Hussain, S., Bano, A., Saud, S., Hassan, S., Shan, D., Khan, F.A., Khan, F., Chen, Y., Wu, C., Tabassum, M.A., Chun, M.X., Afzal, M., Jan, A., Jan, M.T.,

Huang, J. (2015) Potential role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in abiotic stresses: consequences for changing environment. *Environ Sci Pollut Res* 22: 4907–4921.

- Fatemi, M., Wade, P.A. (2006) MBD family proteins: reading the epigenetic code. 119: 3033–7.
- Fawcett, J.A., Maere, S., Van De Peer, Y. (2009) Plants with double genomes might have had a better chance to survive the Cretaceous-Tertiary extinction event. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 5737–5742.
- Federizzi, L.C. (2005) A SOJA COMO FATOR DE COMPETITIVIDADE NO MERCOSUL: HISTÓRICO, PRODUÇÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS. Cent Estud e Pesqui em Agronegocios – CEPAN/UFRGS 10.
- Fehr, W.R., Caviness, C.E. (1977) Stages of Soybean Development. 11p.
- Fontecave, M., Atta, M., Mulliez, E. (2004) S-adenosylmethionine: Nothing goes to waste. *Trends Biochem Sci* 29: 243–249.
- Fraga, M.F., Ballestar, E., Montoya, G., Taysavang, P., Wade, P.A., Esteller, M. (2003) The affinity of of different MBD proteins for a specific methylated locus depends on their intrinsic binding properties. *Nucleic Acids Res* 31: 1765–1774.
- Fraga, M.F., Berdasco, M., Diego, L.B., Rodríguez, R., Cañal, M.J. (2004) Changes in polyamine concentration associated with aging in Pinus radiata and Prunus persica. *Tree Physiol* 24: 1221–1226.
- Fransz, P.F., De Jong, J.H. (2002) Chromatin dynamics in plants. *Curr Opin Plant Biol* 43: 143–166.
- Fu, J., Liu, H., Li, Y., Yu, H., Li, X., Xiao, J., Wang, S. (2011) Manipulating broadspectrum disease resistance by suppressing pathogen-induced auxin accumulation in rice. *Plant Physiol* 155: 589–602.
- Gamarnik, A., Frydman, R.B. (1991) Cadaverine, an essential diamine for the normal root development of germinating soybean (Glycine max) seeds. *Plant Physiol* 97: 778–785.
- Gehring, M., Huh, J.H., Hsieh, T.F., Penterman, J., Choi, Y., Harada, J.J., Goldberg, R.B., Fischer, R.L. (2006) DEMETER DNA glycosylase establishes MEDEA

polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation. *Cell* 124: 495– 506.

- Gibbs, J., Greenway, H. (2003) Review: Mechanisms of anoxia tolerance in plants.I. Growth, survival and anaerobic catabolism. *Funct Plant Biol* 30: 1–47.
- Goldberg, R.B., De Paiva, G., Yadegari, R. (1994) Plant embryogenesis: Zygote to seed. *Science (80-)* 266: 605–614.
- Gong, Z., Morales-ruiz, T., Ariza, R.R., Rolda, T., David, L., Zhu, J., Gene, D. De. (2002) ROS1, a Repressor of Transcriptional Gene Silencing in Arabidopsis, Encodes a DNA Glycosylase / Lyase. *Cell* 111: 803–814.
- Grafi, G., Zemach, A., Pitto, L. (2007) Methyl-CpG-binding domain (MBD) proteins in plants. *Biochim Biophys Acta Gene Struct Expr* 1769: 287–94.
- Grativol, C., Hemerly, A.S., Cavalcanti, P., Ferreira, G. (2012) Genetic and epigenetic regulation of stress responses in natural plant populations ☆. *Biochim Biophys Acta* 1819: 176–185.
- Grimanelli, D., Ingouff, M. (2020) DNA Methylation Readers in Plants. *J Mol Biol* 432: 1706–1717.
- Grzybkowska, D., Morończyk, J., Wójcikowska, B., Gaj, M.D. (2018) Azacitidine (5-AzaC)-treatment and mutations in DNA methylase genes affect embryogenic response and expression of the genes that are involved in somatic embryogenesis in Arabidopsis. *Plant Growth Regul* 85: 243–256.
- 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.
- Han, S.K., Sang, Y., Rodrigues, A., Wu, M.F., Rodriguez, P.L., Wagner, D. (2012)
 The SWI2/SNF2 chromatin remodeling ATPase BRAHMA represses abscisic acid responses in the absence of the stress stimulus in arabidopsis. *Plant Cell* 24: 4892–4906.
- Hanson, C.L., Videler, H., Santos, C., Ballesta, J.P.G., Robinson, C. V. (2004) Mass spectrometry of ribosomes from Saccharomyces cerevisiae: Implications for assembly of the stalk complex. *J Biol Chem* 279: 42750–42757.

- Hara, Y., Yokoyama, R., Osakabe, K., Toki, S., Nishitani, K. (2014) Function of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolases in rice. *Ann Bot* 114: 1309–1318.
- Hayashi, T., Koyama, T., Matsuda, K. (1988) Formation of UDP-xylose and Xyloglucan in soybean Golgi membranes. *Plant Physiol* 87: 341–345.
- He, X., Chen, T., Zhu, J. (2011) Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell Res* 21: 442–465.
- Henderson, I.R., Jacobsen, S.E. (2007) Epigenetic inheritance in plants. *Nature* 447: 418–424.
- Henderson, I.R., Zhang, X., Lu, C., Johnson, L., Meyers, B.C., Green, P.J., Jacobsen, S.E. (2006) Dissecting Arabidopsis thaliana DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. *Nat Genet* 38: 721–725.
- Hendrich, B., Hardeland, U., Ng, H., Jiricny, J., Bird, A. (1999) The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature* 401: 301–304.
- Hendrich, B., Tweedie, S. (2003) The methyl-CpG binding domain and the evolving role of DNA methylation in animals. 19: 269–277.
- Herr, A.J., Jensen, M.B., Dalmay, T., Baulcombe, D.C. (2005) RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science (80-)* 308: 118–120.
- Hervé Bègue, Arnaud Mounier, Claire Rosnoblet, D.W. (2019) Toward the understanding of the role of CDC48, a major component of the protein quality control, in plant immunity. *Plant Sci* 279: 34–44.
- Hewezi, T., Lane, T., Piya, S., Rambani, A., Rice, J.H., Staton, M. (2017) Cyst nematode parasitism induces dynamic changes in the root epigenome. *Plant Physiol* 174: 405–420.
- Ho, K.L., Mcnae, I.W., Schmiedeberg, L., Klose, R.J., Bird, A.P., Walkinshaw, M.D.
 (2008) MeCP2 Binding to DNA Depends upon Hydration at Methyl-CpG. *Mol Cell* 29: 525–531.

- Hsieh, T.F. Ibarra, C.A. Silva, P. Zemach, A. Eshed-Williams, L. Fischer, R.L. et al. (2009) Genome-wide demethylation of Arabidopsis endosperm. *Science (80-)* 324: 1451–1454.
- Hsieh, T.F., Ibarra, C.A., Silva, P., Zemach, A., Eshed-Williams, L., Fischer, R.L., Zilberman, D. (2009) Genome-wide demethylation of Arabidopsis endosperm. *Science (80-)* 324: 1451–1454.
- Hu, Y., Jiang, Y., Han, X., Wang, H., Pan, J., Yu, D. (2017) Jasmonate regulates leaf senescence and tolerance to cold stress: Crosstalk with other phytohormones. *J Exp Bot* 68: 1361–1369.
- Huang, H., Liu, R., Niu, Q., Tang, K., Zhang, B., Zhang, H., Chen, K., Zhu, J.K., Lang, Z. (2019) Global increase in DNA methylation during orange fruit development and ripening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116: 1430–1436.
- Hymowitz, T. (1970) On the domestication of the soybean. *Econ Bot* 24: 408–421.
- Ibarra, C. A. Feng, X. Schoft, V. K. Hsieh, T.F. Uzawa, R. Rodrigues, J. A, et al. (2012) Active DNA demethylation in plant companion cells reinforces transposon. *Science (80-)* 337: 1360–1364.
- Ichino, L., Boone, B.A., Strauskulage, L., Harris, C.J., Kaur, G., Gladstone, M.A., Tan, M., Feng, S., Jami-Alahmadi, Y., Duttke, S.H., Wohlschlegel, J.A., Cheng, X., Redding, S., Jacobsen, S.E. (2021) MBD5 and MBD6 couple DNA methylation to gene silencing through the J-domain protein SILENZIO. *Science* (80-) 372: 1434–1439.
- Ingouff, M. Selles, B. Michaud, C. Vu TM, Berger F. Schorn, A.J. et al. (2017) Livecell analysis of DNA methylation during sexual reproduction in Arabidopsis reveals context and sex-specific dynamics controlled by noncanonical RdDM. *Genes Dev* 31: 72–83.
- Ingouff, M., Selles, B., Michaud, C., Vu, T.M., Berger, F., Schorn, A.J., Autran, D., Van Durme, M., Nowack, M.K., Martienssen, R.A., Grimanelli, D. (2017) Livecell analysis of DNA methylation during sexual reproduction in arabidopsis reveals context and sex-specific dynamics controlled by noncanonical RdDM. *Genes Dev* 31: 72–83.

- Issa, J.P.J., Kantarjian, H.M. (2009) Targeting DNA methylation. *Clin Cancer Res* 15: 3938–3946.
- Ito, M., Koike, A., Koizumi, N., Sano, H. (2003) Methylated DNA-Binding Proteins from Arabidopsis. *Plant Physiol* 133: 1747–1754.
- Jaillon, O., Aury, J.M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., Wincker,
 P., et al. (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 16: 738–749.
- Jakoby, M., Vicente-carbajosa, J. (2002) bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci* 7: 1360–1385.
- Jauh, G.Y., Lord, E.M. (1996) Localization of pectins and arabinogalactan-proteins in lily (Lilium longiflorum L.) pollen tube and style, and their possible roles in pollination. *Planta* 199: 251–261.
- Jiang, H., Köhler, C. (2012) Evolution, function, and regulation of genomic imprinting in plant seed development. *J Exp Bot* 63: 4713–4722.
- Jiang, J., Ballinger, C.A., Wu, Y., Dai, Q., Cyr, D.M., Höhfeld, J., Patterson, C. (2001) CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase: Identification of Hsc70 as a target for ubiquitylation. *J Biol Chem* 276: 42938–42944.
- Jiménez-Bremont, J.F., Marina, M., Guerrero-González, M. de la L., Rossi, F.R., Sánchez-Rangel, D., Rodríguez-Kessler, M., Ruiz, O.A., Gárriz, A. (2014) Physiological and molecular implications of plant polyamine metabolism during biotic interactions. *Front Plant Sci* 5: 1–14.
- Jin, Y., Luo, Q., Tong, H., Wang, A., Cheng, Z., Tang, J., Li, D., Zhao, X., Li, X., Wan, J., Jiao, Y., Chu, C., Zhu, L. (2011) An AT-hook gene is required for palea formation and fl oral organ number control in rice. *Dev Biol* 359: 277–288.
- Joshi-Saha, A., Valon, C., Leung, J. (2011) Abscisic acid signal off the STARTing block. *Mol Plant* 562–580.
- Jullien, P.E. Susaki, D. Yelagandula, R. Higashiyama, T. Berger, F. (2012) DNA methylation dynamics during sexual reproduction in Arabidopsis thaliana. *Curr Biol* 22: 1825–1830.

- K. Zhang, V.V. Sridhar, J. Zhu, A. Kapoor, J.-K.Z. (2007) Distinctive core histone posttranslational modification patterns in Arabidopsis thaliana. *PLoS One* 2: 1210.
- Kankel, M.W., Ramsey, D.E., Stokes, T.L., Flowers, S.K., Haag, J.R., Jeddeloh, J.A., Riddle, N.C., Verbsky, M.L., Richards, E.J. (2003) Arabidopsis MET1 cytosine methyltransferase mutants.
- Kawakatsu, T., Nery, J.R., Castanon, R., Ecker, J.R. (2017) Dynamic DNA methylation reconfiguration during seed development and germination. *Genome Biol* 18: 1–12.
- Kawakatsu, T., Stuart, T., Valdes, M., Break, N., Schmitz, R.J., Nery, J.R., Urich,
 M.A., Han, X., Lister, R., Benfey, P.N., Ecker, J.R. (2016) Unique cell-typespeci fi c patterns of DNA methylation in the root meristem. Nat PLANTS. doi: 10.1038/nplants.2016.58
- Kawashima, T., Berger, F. (2014) Epigenetic reprogramming in plant sexual reproduction. *Nat Rev Genet* 15: 613–624.
- Khan, M.N., Komatsu, S. (2016) Characterization of post-flooding recoveryresponsive enzymes in soybean root and hypocotyl. *J Plant Biol* 59: 478–487.
- Kim, K. Do., Baidouri, M. El., Abernathy, B., Iwata-otsubo, A., Chavarro, C., Gonzales, M., Libault, M., Grimwood, J., Jackson, S.A., Genetic, A., Georgia, K.D.K. (2015) A Comparative Epigenomic Analysis of Polyploidy-Derived Genes in Soybean and. *Plant Physiol* 168: 1433–1447.
- Kim, H.T., Choi, U.K., Ryu, H.S., Lee, S.J., Kwon, O.S. (2011) Mobilization of storage proteins in soybean seed (Glycine max L.) during germination and seedling growth. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* 1814: 1178– 1187.
- Kim, J.Y., Kim, W.Y., Kwak, K.J., Oh, S.H., Han, Y.S., Kang, H. (2010) Glycine-rich RNA-binding proteins are functionally conserved in arabidopsis thaliana and oryza sativa during cold adaptation process. *J Exp Bot* 61: 2317–2325.
- Klose, R.J., Sarraf, S.A., Schmiedeberg, L., Mcdermott, S.M., Stancheva, I., Bird, A.P. (2005) DNA Binding Selectivity of MeCP2 Due to a Requirement for A / T Sequences Adjacent to Methyl-CpG. 19: 667–678.

- Knoch, E., Dilokpimol, A., Geshi, N. (2014) Arabinogalactan proteins: Focus on carbohydrate active enzymes. *Front Plant Sci* 5: 1–9.
- Komarova, T. V., Pozdyshev, D. V., Petrunia, I. V., Sheshukova, E. V., Dorokhov,
 Y.L. (2014) Pectin methylesterase-generated methanol may be involved in tobacco leaf growth. *Biochem* 79: 102–110.
- Kuang, B., Zhao, X., Zhou, C., Zeng, W., Ren, J., Ebert, B., Beahan, C.T., Deng, X., Zeng, Q., Zhou, G., Doblin, M.S., Heazlewood, J.L., Bacic, A., Chen, X., Wu, A.M. (2016) Role of UDP-Glucuronic Acid Decarboxylase in Xylan Biosynthesis in Arabidopsis. *Mol Plant* 9: 1119–1131.
- Kumar, S., Mohapatra, T. (2021) Dynamics of DNA Methylation and Its Functions in Plant Growth and Development. *Front Plant Sci* 12: 596236.
- Kumar, S., Trivedi, P.K. (2018) Glutathione S-transferases: Role in combating abiotic stresses including arsenic detoxification in plants. *Front Plant Sci* 9: 1–9.
- Kurczyńska, E.U., Gaj, M.D., Ujczak, A., Mazur, E. (2007) Histological analysis of direct somatic embryogenesis in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. *Planta* 226: 619–628.
- Kurepa, J., Smalle, J.A. (2008) Structure, function and regulation of plant proteasomes. *Biochimie* 90: 324–335.
- Kurepa, J., Wang, S., Li, Y., Smalle, J. (2009) Proteasome regulation and stress tolerance. *Plant Signal Behav* 4: 924–927.
- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., Takahashi, Y. (2008) Polyamines: Essential factors for growth and survival. *Planta* 228: 367–381.
- Lafon-placette, C., Gac, A. Le., Chauveau, D., Segura, V., Delaunay, A. (2018) Changes in the epigenome and transcriptome of the poplar shoot apical meristem in response to water availability affect preferentially hormone pathways. *J Exp Bot* 69: 537–551.
- Laget, S., Joulie, M., Le Masson, F., Sasai, N., Christians, E., Pradhan, S., Roberts, R.J., Defossez, P.A. (2010) The human proteins MBD5 and MBD6 associate

with heterochromatin but they do not bind methylated DNA. *PLoS One* 5: e11982.

- Lamport, D.T.A., Várnai, P. (2013) Periplasmic arabinogalactan glycoproteins act as a calcium capacitor that regulates plant growth and development. *New Phytol* 197: 58–64.
- Lang, Z., Lei, M., Wang, X., Tang, K., Miki, D., Zhang, H. (2015) The Methyl-CpG-Binding Protein MBD7 Facilitates Active DNA Demethylation to Limit DNA Hyper-Methylation and Transcriptional Gene Silencing. *Mol Cell* 57: 971–983.
- Lang, Z., Wang, Y., Tang, K., Tang, D., Datsenka, T., Cheng, J., Zhang, Y., Handa, A.K., Zhu, J.K. (2017) Critical roles of DNA demethylation in the activation of ripening-induced genes and inhibition of ripening-repressed genes in tomato fruit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: E4511–E4519.
- Lasanajak, Y., Minocha, R., Minocha, S.C., Goyal, R., Fatima, T., Handa, A.K., Mattoo, A.K. (2014) Enhanced flux of substrates into polyamine biosynthesis but not ethylene in tomato fruit engineered with yeast S-adenosylmethionine decarboxylase gene. *Amino Acids* 46: 729–742.
- Law, J.A., Jacobsen, S.E. (2010) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet* 11: 204–220.
- Le, B.H., Wagmaister, J.A., Kawashima, T., Bui, A.Q., Harada, J.J., Goldberg, R.B. (2007) Using Genomics to Study Legume Seed Development. *Plant Physiol* 144: 562–574.
- Lebedeva, M.A., Tvorogova, V.E., Tikhodeyev, O.N. (2017) Epigenetic mechanisms and their role in plant development. *Russ J Genet* 53: 1057–1071.
- Lei, M., Tempel, W., Chen, S., Liu, K., Min, J. (2019) BBA Gene Regulatory Mechanisms Plasticity at the DNA recognition site of the MeCP2 mCG-binding domain. *BBA - Gene Regul Mech* 1862: 194409.
- Lei, M., Zhang, H., Julian, R., Tang, K., Xie, S., Zhu, J.K. (2015) Regulatory link between DNA methylation and active demethylation in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 3553–3557.

- Lepiniec, L., Devic, M., Roscoe, T.J., Bouyer, D., Zhou, D.X., Boulard, C., Baud, S., Dubreucq, B. (2018) Molecular and epigenetic regulations and functions of the LAFL transcriptional regulators that control seed development. *Plant Reprod* 31: 291–307.
- Li, C., Liu, Y., Shen, W.H., Yu, Y., Dong, A. (2018) Chromatin-remodeling factor OsINO80 is involved in regulation of gibberellin biosynthesis and is crucial for rice plant growth and development. *J Integr Plant Biol* 60: 144–159.
- Li, E. (2002) Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* 3: 662–673.
- Li, M., Wang, C., Shi, J., Zhang, Y., Liu, T., Qi, H. (2021) Abscisic acid and putrescine synergistically regulate the cold tolerance of melon seedlings. *Plant Physiol Biochem* 166: 1054–1064.
- Li, S.F., Zhang, G.J., Yuan, J.H., Deng, C.L., Lu, L.D., Gao, W.J. (2015) Effect of 5 azaC On the Growth, Flowering Time and Sexual Phenotype of Spinach 1. *PLANT Physiol* 62: 670–675.
- Lipecka, J., Chhuon, C., Bourderioux, M., Bessard, M.A., van Endert, P., Edelman, A., Guerrera, I.C. (2016) Sensitivity of mass spectrometry analysis depends on the shape of the filtration unit used for filter aided sample preparation (FASP). *Proteomics* 16: 1852–1857.
- Liu, C., Xin, Y., Xu, L., Cai, Z., Xue, Y., Liu, Y., Xie, D., Liu, Y., Qi, Y. (2018a) Arabidopsis ARGONAUTE 1 Binds Chromatin to Promote Gene Transcription in Response to Hormones and Stresses. *Dev Cell* 44: 348–361.
- Liu, K., Xu, C., Lei, M., Yang, A., Loppnau, P., Hughes, T.R., Min, J. (2018b) Structural basis for the ability of MBD domains to bind methyl-CG and TG sites in DNA. *J Biol Chem* 293: 7344–7354.
- Liu, X., Wei, X., Sheng, Z., Jiao, G., Tang, S., Luo, J., Hu, P. (2016) Polycomb protein OsFIE2 affects plant height and grain yield in rice. *PLoS One* 11: e0164748.
- Liu, Z.W., Shao, C.R., Zhang, C.J., Zhou, J.X., Zhang, S.W., Li, L., Chen, S., Huang, H.W., Cai, T., He, X.J. (2014) The SET Domain Proteins SUVH2 and SUVH9

Are Required for Pol V Occupancy at RNA-Directed DNA Methylation Loci. *PLoS Genet* 10: e1003948.

- Luján-Soto, E., Dinkova, T.D. (2021) Time to wake up: Epigenetic and small-RNAmediated regulation during seed germination. *Plants* 10: 1–19.
- Luo, M., Wang, Y.Y., Liu, X., Yang, S., Lu, Q., Cui, Y., Wu, K. (2012) HD2C interacts with HDA6 and is involved in ABA and salt stress response in Arabidopsis. *J Exp Bot* 63: 3297–3306.
- Luo, X., Chen, Z., Gao, J., Gong, Z. (2014) Abscisic acid inhibits root growth in Arabidopsis through ethylene biosynthesis. *Plant J* 79: 44–55.
- Luscombe, N.M., Laskowski, R.A., Thornton, J.M. (2001) Amino acid-base interactions : A three- dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level Amino acid – base interactions : a three-dimensional analysis of protein – DNA interactions at an atomic level. *Nucleic Acids Res* 29: 2860– 2874.
- Lynch, M., Conery, J.S. (2000) The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science (80-)* 1151–1155.
- Ma, Y., Zeng, W., Bacic, A., Johnson, K. (2018) *AGPS through time and space*. 767–804p.
- Machado, F.B., Moharana, K.C., Almeida-Silva, F., Gazara, R.K., Pedrosa-Silva, F., Coelho, F.S., Grativol, C., Venancio, T.M. (2020) Systematic analysis of 1298
 RNA-Seq samples and construction of a comprehensive soybean (Glycine max) expression atlas. *Plant J* 103: 1894–1909.
- Mahana, Y., Ohki, I., Walinda, E., Morimoto, D., Sugase, K., Shirakawa, M. (2022) Structural Insights into Methylated DNA Recognition by the Methyl-CpG Binding Domain of MBD6 from Arabidopsis thaliana . ACS Omega 7: 3212– 3221.
- Majewska-sawka, A., Nothnagel, E.A. (2000) Update on Extracellular Matrix The Multiple Roles of Arabinogalactan Proteins in Plant Development 1 COMPLEX STRUCTURES AMENABLE TO. *Plant Physiol* 122: 3–9.

- Manabe, Y., Nafisi, M., Verhertbruggen, Y., Orfila, C., Gille, S., Rautengarten, C., Cherk, C., Marcus, S.E., Somerville, S., Pauly, M., Paul Knox, J., Sakuragi, Y., Scheller, H.V. (2011) Loss-of-function mutation of REDUCED WALL ACETYLATION2 in Arabidopsis leads to reduced cell wall acetylation and increased resistance to Botrytis cinerea. *Plant Physiol* 155: 1068–1078.
- Mario F. Fraga, Esteban Ballestar, G.M., Taysavang2, P., Esteller, P.A.W. and M. (2003) The affinity of different MBD proteins for a specific methylated locus depends on their intrinsic binding properties. *Nucleic Acids Res* 31: 1765–1774.
- Martínez-López, N., Varela-Rey, M., Ariz, U., Embade, N., Vazquez-Chantada, M., Fernandez-Ramos, D., Gomez-Santos, L., Lu, S.C., Mato, J.M., Martinez-Chantar, M.L. (2008) S-adenosylmethionine and proliferation: New pathways, new targets. *Biochem Soc Trans* 36: 848–852.
- Matzke, M.A., Mosher, R.A. (2014) RNA-directed DNA methylation: An epigenetic pathway of increasing complexity. *Nat Rev Genet* 15: 394–408.
- Maury, S., Sow, M.D., Le Gac, A.L., Genitoni, J., Lafon-Placette, C., Mozgova, I. (2019) Phytohormone and chromatin crosstalk: The missing link for developmental plasticity?. *Front Plant Sci* 10: 1–6.
- Mehdi, S., Derkacheva, M., Ramström, M., Kralemann, L., Bergquist, J., and Hennig, L. (2016) No The WD40 domain protein MSI1 functions in a HDAC complex to fine-tune ABA signaling. *Plant Cell* 28: 42–54.
- Menafra, R., Stunnenberg, H.G. (2014) MBD2 and MBD3: Elusive functions and mechanisms. *Front Genet* 5: 428.
- Miedes, E., Suslov, D., Vandenbussche, F., Kenobi, K., Ivakov, A., Van Der Straeten, D., Lorences, E.P., Mellerowicz, E.J., Verbelen, J.P., Vissenberg, K. (2013) Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) overexpression affects growth and cell wall mechanics in etiolated Arabidopsis hypocotyls. *J Exp Bot* 64: 2481–2497.
- Min, C.W., Gupta, R., Agrawal, G.K., Rakwal, R., Kim, S.T. (2019) Concepts and strategies of soybean seed proteomics using the shotgun proteomics approach. *Expert Rev Proteomics* 16: 795–804.

- Mølhøj, M., Verma, R., Reiter, W.D. (2003) The biosynthesis of the branched-chain sugar d-apiose in plants: Functional cloning and characterization of a UDP-D-apiose/UDP-D-xylose synthase from Arabidopsis. *Plant J* 35: 693–703.
- Morales-Ruiz, T., Ortega-Galisteo, A.P., Ponferrada-Marin, M.I., Martinez-Macias, M.I., Ariza, R.R., Roldan-Arjona, T. (2006) DEMETER and REPRESSOR OF SILENCING 1 encode 5-methylcytosine DNA glycosylases. *Proc Natl Acad Sci* 103: 6853–6858.
- Mozgová, I., Muñoz-Viana, R., Hennig, L. (2017) PRC2 Represses Hormone-Induced Somatic Embryogenesis in Vegetative Tissue of Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet* 13: e1006562.
- Müller, L. (1981) Morfologia, anatomia e desenvolvimento. A soja no Bras 65–104.
- Murata, S., Minami, Y., Minami, M., Chiba, T., Tanaka, K. (2001) CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO Rep* 2: 1133–1138.
- Narsai, R., Gouil, Q., Secco, D., Srivastava, A., Karpievitch, Y. V., Liew, L.C., Lister, R., Lewsey, M.G., Whelan, J. (2017) Extensive transcriptomic and epigenomic remodelling occurs during Arabidopsis thaliana germination. *Genome Biol* 18: 1–18.
- Nguema-Ona, E., Coimbra, S., Vicré-Gibouin, M., Mollet, J.C., Driouich, A. (2012) Arabinogalactan proteins in root and pollen-tube cells: distribution and functional aspects. *Ann Bot* 110: 383–404.
- Nguema-Ona, E., Vicré-Gibouin, M., Cannesan, M.A., Driouich, A. (2013) Arabinogalactan proteins in root-microbe interactions. *Trends Plant Sci* 18: 440–449.
- NONOGAKI, H. (2014) Seed dormancy and germination-emerging mechanisms and new hypotheses. *Front Plant Sci* 5: 233.
- Oakley, A. (2011) Glutathione transferases: A structural perspective.
- Ogneva, Z. V., Suprun, A.R., Dubrovina, A.S., Kiselev, K. V. (2019) Effect of 5azacytidine induced DNA demethylation on abiotic stress tolerance in Arabidopsis Thaliana. *Plant Prot Sci* 55: 73–80.

- Ohki, I., Shimotake, N., Fujita, N., Jee, J.G., Ikegami, T., Nakao, M., Shirakawa, M. (2001) Solution structure of the methyl-CpG binding domain of human MBD1 in complex with methylated DNA. *Cell* 105: 487–497.
- Olmos, E., De La Garma, J.G., Gomez-Jimenez, M.C., Fernandez-Garcia, N. (2017) Arabinogalactan proteins are involved in salt-adaptation and vesicle trafficking in tobacco by-2 cell cultures. *Front Plant Sci* 8: 1–14.
- Ortega-Galisteo, A.P., Morales-Ruiz, T., Ariza, R.R., Roldán-Arjona, T. (2008) Arabidopsis DEMETER-LIKE proteins DML2 and DML3 are required for appropriate distribution of DNA methylation marks. *Plant Mol Biol* 67: 671–681.
- Otani, J., Arita, K., Kato, T., Kinoshita, M., Kimura, H., Suetake, I., Tajima, S., Ariyoshi, M., Shirakawa, M. (2013) Structural Basis of the Versatile DNA Recognition Ability of the Methyl-CpG Binding Domain of Methyl-CpG Binding Domain Protein 4 *. *J Biol Chem* 288: 6351–6362.
- Oyama, T., Shimura, Y., Okada, K. (1997) The Arabidopsis HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *GENES Dev* 11: 2983–2995.
- Paterson, A.H., Bowers, J.E., Chapman, B.A., Peterson, D.G., Rong, J., Wicker, T.M. (2004) Comparative genome analysis of monocots and dicots, toward characterization of angiosperm diversity. *Curr Opin Biotechnol* 15: 120–125.
- Peirats-Llobet, M., Han, S.K., Gonzalez-Guzman, M., Jeong, C.W., Rodriguez, L., Belda-Palazon, B., Wagner, D., Rodriguez, P.L. (2016) A Direct Link between Abscisic Acid Sensing and the Chromatin-Remodeling ATPase BRAHMA via Core ABA Signaling Pathway Components. *Mol Plant* 9: 136–147.
- Peng, M., Cui, Y., Bi, Y.M., Rothstein, S.J. (2006) AtMBD9: A protein with a methyl-CpG-binding domain regulates flowering time and shoot branching in Arabidopsis. *Plant J* 282–296.
- Penterman, J., Uzawa, R., Fischer, R.L. (2007a) Genetic interactions between DNA demethylation and methylation in arabidopsis. *Plant Physiol* 145: 1549–1557.
- Penterman, J., Zilberman, D., Jin, H.H., Ballinger, T., Henikoff, S., Fischer, R.L.
 (2007b) DNA demethylation in the Arabidopsis genome. *Proc Natl Acad Sci U* S A 104: 6752–6757.

- Perrella, G., Lopez-Vernaza, M.A., Carr, C., Sani, E., Gosselé, V., Verduyn, C., Kellermeier, F., Hannah, M.A., Amtmann, A. (2013) Histone deacetylase Complex1 expression level titrates plant growth and abscisic acid sensitivity in Arabidopsis. *Plant Cell* 25: 3491–3505.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng,
 E.C., Ferrin, T.E. (2004) UCSF Chimera A Visualization System for
 Exploratory Research and Analysis. *J Comput Chem* 25: 1605–1612.
- Philippe, F., Pelloux, J., Rayon, C. (2017) Plant pectin acetylesterase structure and function: New insights from bioinformatic analysis. *BMC Genomics* 18: 1–18.
- Pogorelko, G., Lionetti, V., Fursova, O., Sundaram, R.M., Qi, M., Whitham, S.A., Bogdanove, A.J., Bellincampi, D., Zabotina, O.A. (2013) Arabidopsis and Brachypodium distachyon transgenic plants expressing Aspergillus nidulans acetylesterases have decreased degree of polysaccharide acetylation and increased resistance to pathogens. *Plant Physiol* 162: 9–23.
- Prasad, A., Utkarsh, P., Amit, R., Vijendra, P., Rahul, S. (2018) Genome-wide analysis of genes encoding MBD domain-containing proteins from tomato suggest their role in fruit development and abiotic stress responses. *Mol Biol Rep* 45: 2653–2669.
- Qian, Y., Ren, Q., Jiang, L., Zhang, J., Chen, C., Chen, L. (2020) Genome-wide analysis of maize MBD gene family and expression profiling under abiotic stress treatment at the seedling stage. *Plant Biotechnol Rep* 14: 323–338.
- Qu, M., Chen, Z., Chen, Z. Overexpression of a methyl-CpG-binding Protein Gene OsMBD707, Leads to Larger Tiller Angles and Reduced Photoperiod Sensitivity in Rice. 1–15.
- Raja, K.V., Sekhar, K.M., Reddy, V.D., Reddy, A.R., Rao, K.V. (2021) Activation of CDC48 and acetyltransferase encoding genes contributes to enhanced abiotic stress tolerance and improved productivity traits in rice. *Plant Physiol Biochem* 168: 329–339.
- Rambani, A., Pantalone, V., Yang, S., Rice, J.H., Song, Q., Mazarei, M., Arelli, P.R., Meksem, K., Stewart, C.N., Hewezi, T. (2020) Identification of introduced and

stably inherited DNA methylation variants in soybean associated with soybean cyst nematode parasitism. *New Phytol* 227: 168–184.

- Ramiro-Merina, Á., Ariza, R.R., Roldán-Arjona, T. (2013) Molecular characterization of a putative plant homolog of MBD4 DNA glycosylase. *DNA Repair (Amst)* 12: 890–898.
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., Lin, X. (2013) An improvement of the 2^(-delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis.
 Biostat Bioinforma Biomath 3: 71–85.
- Reiter, W.D. (2008) Biochemical genetics of nucleotide sugar interconversion reactions. *Curr Opin Plant Biol* 236–243.
- Rennie, E.A., Scheller, H.V. (2014) Xylan biosynthesis. *Curr Opin Biotechnol* 26: 100–107.
- Rodgers, M.W., Bolwell, G.P. (1992) Partial purification of golgi-bound arabinosyltransferase and two isoforms of xylosyltransferase from French bean (Phaseolus vulgaris L.). *Biochem J* 288: 817–822.
- Roger Boerma, H., Specht, J.E. (2016) Soybeans: Improvement, production, and uses. Soybeans Improv Prod Uses 5: 560–567.
- Rojas, B.E., Hartman, M.D., Figueroa, C.M., Leaden, L., Podestá, F.E., Iglesias,
 A.A. (2019) Biochemical characterization of phosphoenolpyruvate carboxykinases from Arabidopsis thaliana. *Biochem J* 476: 2939–2952.
- Roloff, T.C., Ropers, H.H., Nuber, U.A. (2003) Comparative study of methyl-CpGbinding domain proteins. *BioMed Cent* 9: 1–9.
- Rosnoblet, C., Chatelain, P., Klinguer, A., Bègue, H., Winckler, P., Wendehenne, D. (2021) The chaperone-like protein Cdc48 regulates ubiquitin-proteasome system in plants. *Plant Cell Environ* 44: 2636–2655.
- Rossi, F.R., Romero, F.M., Ruíz, O.A., Marina, M., Gárriz, A. (2018) Phenotypic and genotypic characterization of mutant plants in polyamine metabolism genes during pathogenic interactions. *In: Methods in Molecular Biology*. p. 405–416 405–416

- Rounsley, S.D., Ditta, G.S. (1995) Diverse Roles for MADS Box Genes in Arabidopsis Development. *Plant Cell* 7: 1259–1269.
- Ruzin, S.E. (1999) Plant Microtechnique and Microscopy. Taxon 86: 708.
- Ryu, H., Cho, H., Bae, W., Hwang, I. (2014) Control of early seedling development by BES1/TPL/HDA19-mediated epigenetic regulation of ABI3. *Nat Commun* 5: 4138.
- Saito, M., Ishikawa, F. (2002) The mCpG-binding domain of human MBD3 does not bind to mCpG but interacts with NuRD/Mi2 components HDAC1 and MTA2. *J Biol Chem* 277: 35434–35439.
- Sangi, S., Santos, M.L.C., Alexandrino, C.R., Da Cunha, M., Coelho, F.S., Ribeiro, G.P., Lenz, D., Ballesteros, H., Hemerly, A.S., Venâncio, T.M., Oliveira, A.E.A., Grativol, C. (2019) Cell wall dynamics and gene expression on soybean embryonic axes during germination. *Planta* 250: 1325–1337.
- Santa-Catarina, C., Silveira, V., Balbuena, T.S., Viana, A.M., Estelita, M.E.M., Handro, W., Floh, E.I.S. (2006) IAA, ABA, polyamines and free amino acids associated with zygotic embryo development of Ocotea catharinensis. *Plant Growth Regul* 49: 237–247.
- Santa-Catarina, C., Silveira, V., Scherer, G.F.E., Floh, E.I.S. (2007) Polyamine and nitric oxide levels relate with morphogenetic evolution in somatic embryogenesis of Ocotea catharinensis. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 90: 93–101.
- Santos, O.S. (1988) A cultura da soja. Ed Globo 299.
- Scarsdale, J.N., Webb, H.D., Ginder, G.D., Jr, D.C.W. (2011) Solution structure and dynamic analysis of chicken MBD2 methyl binding domain bound to a targetmethylated DNA sequence. *Nucleic Acids Res* 39: 6741–6752.
- Scebba, F., Bernacchia, G., Bastiani, M. De., Evangelista, M. (2003) Arabidopsis MBD proteins show different binding specificities and nuclear localization Arabidopsis MBD proteins show different binding specificities and nuclear localization. 53: 715–731.

- Schmelz, E.A., Engelberth, J., Tumlinson, J.H., Block, A., Alborn, H.T. (2004) The use of vapor phase extraction in metabolic profiling of phytohormones and other metabolites. *Plant J* 39: 790–808.
- 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., Futrellgriggs, 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.
- Sediyama, T. (2009) Tecnologias de produção e usos da soja. Mecenas 1: 1–314.
- Sediyama, T. et al. (1996) Cultura da Soja I Parte. UFV 1–96.
- Shen, Y., Zhang, J., Liu, Y., Liu, S., Liu, Z., Duan, Z., Wang, Z., Zhu, B., Guo, Y.L., Tian, Z. (2018) DNA methylation footprints during soybean domestication and improvement. *Genome Biol* 19: 25–27.
- Showalter, A.M. (2001) Arabinogalactan-proteins: Structure, expression and function. *Cell Mol Life Sci* 58: 1399–1417.
- Shu, K., Zhou, W., Chen, F., Luo, X., Yang, W. (2018) Abscisic acid and gibberellins antagonistically mediate plant development and abiotic stress responses. *Front Plant Sci* 9: 1–8.
- Silva, J., Ferraz, R., Dupree, P., Showalter, A.M., Coimbra, S. (2020) Three Decades of Advances in Arabinogalactan-Protein Biosynthesis. *Front Plant Sci* 11: 610377.
- Silveira V, Balbuena TS, Santa-Catarina C, F.E., Guerra MP, H.W. (2004) Biochemical changes during zygotic embryogenesis in Pinus taeda L. *Plant Growth Regul* 44: 147–156.
- Silveira, V., Santa-Catarina, C., Tun, N.N., Scherer, G.F.E., Handro, W., Guerra,M.P., Floh, E.I.S. (2006) Polyamine effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic

suspension cultures of Araucaria angustifolia (Bert.) O. Ktze. *Plant Sci* 171: 91– 98.

- Simillion, C., Vandepoele, K., Van Montagu, M.C.E., Zabeau, M., Van de Peer, Y.
 (2002) The hidden duplication past of Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci* U S A 99: 13627–13632.
- Slotkin, R.K., Martienssen, R. (2007) Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat Rev Genet* 8: 272–285.
- Smaczniak, C., Immink, R.G.H., Angenent, G.C., Kaufmann, K. (2012) Developmental and evolutionary diversity of plant MADS- domain factors : insights from recent studies. *Development* 139: 3081–3098.
- Smolikova, G., Strygina, K., Krylova, E., Leonova, T., Frolov, A., Khlestkina, E., Medvedev, S. (2021) Transition from seeds to seedlings: Hormonal and epigenetic aspects. *Plants* 10: 1884.
- Song, Q., Lu, X., Li, Q., Chen, H., Hu, X., Ma, B., Zhang, W. (2013) Genome-Wide Analysis of DNA Methylation in Soybean. *Mol Plant* 6: 1961–1974.
- Soppe, W.J.J., Jacobsen, S.E., Alonso-Blanco, C., Jackson, J.P., Kakutani, T., Koornneef, M., Peeters, A.J.M. (2000) The late flowering phenotype of fwa mutants is caused by gain-of-function epigenetic alleles of a homeodomain gene. *Mol Cell* 6: 791–802.
- Sornaraj, P., Luang, S., Lopato, S., Hrmova, M. (2015) Basic leucine zipper (bZIP) transcription factors involved in abiotic stresses: A molecular model of a wheat bZIP factor and implications of its structure in function. *BBA - Gen Subj* 1860: 46–56.
- Sperlazza, M.J., Bilinovich, S.M., Sinanan, L.M., Javier, F.R., Jr, D.C.W. (2017) Structural Basis of MeCP2 Distribution on Non-CpG Methylated and Hydroxymethylated DNA. *J Mol Biol* 429: 1581–1594.
- Springer, N.M., Kaeppler, S.M. (2005) Evolutionary divergence of monocot and dicot methyl-CpG-binding domain proteins. *Plant Physiol* 138: 92–104.
- Steinbrecher, T., Leubner-metzger, G. (2017) The biomechanics of seed germination. 68: 765–783.

- Sung, D.Y., Guy, C.L. (2003) Physiological and molecular assessment of altered expression of Hsc70-1 in Arabidopsis. Evidence for pleiotropic consequences. *Plant Physiol* 132: 979–987.
- Tariq, M., Paszkowski, J. (2004) DNA and histone methylation in plants. *Trends Genet* 20: 244–251.
- Tavladoraki, P., Cona, A., Angelini, R. (2016) Copper-Containing Amine Oxidases and FAD-Dependent Polyamine Oxidases Are Key Players in Plant Tissue Differentiation and Organ Development. *Front Plant Sci* 7: 824.
- Theissen, G., Becker, A., Rosa, A. Di., Kanno, A., Kim, J.T., Winter, K., Saedler, H. (2000) A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Mol Biol* 42: 115– 149.
- Thorstensen, T., Kristiansen, K., Berg, A., Meza, T.J., Mahic, M., Aalen, R.B. (2003) Ten members of the Arabidopsis gene family encoding methyl-CpG-binding domain proteins are transcriptionally active and at least one, AtMBD11, is crucial for normal development. *Nucleic Acids Res* 31: 5291–304.
- Trifinopoulos, J., Nguyen, L.T., von Haeseler, A., Minh, B.Q. (2016) W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res* 44: W232–W235.
- Turco, G.M., Kajala, K., Kunde-ramamoorthy, G., Ngan, C., Olson, A., Deshphande,
 S., Tolkunov, D., Waring, B., Stelpflug, S., Klein, P., Schmutz, J., Kaeppler, S.,
 Ware, D., Wei, C., Etchells, J.P., Brady, S.M., Brady, S.M. (2017) DNA
 methylation and gene expression regulation associated with vascularization in
 Sorghum bicolor. *New Phytol* 1213–1229.
- V. Chinnusamy, J. -kan. Z. (2009) Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Plant Biol* 12: 133–139.
- Van Sandt, V.S.T., Suslov, D., Verbelen, J.P., Vissenberg, K. (2007) Xyloglucan endotransglucosylase activity loosens a plant cell wall. *Ann Bot* 100: 1467– 1473.
- Vercauteren, I., De Almeida Engler, J., De Groodt, R., Gheysen, G. (2002) An Arabidopsis thaliana pectin acetylesterase gene is upregulated in nematode

feeding sites induced by root-knot and cyst nematodes. *Mol Plant-Microbe Interact* 15: 404–407.

Vernetti, F.J. (1983) Soja: planta, clima, pragas, moléstias e invasoras.

- Virdi, K.S., Laurie, J.D., Xu, Y.Z., Yu, J., Shao, M.R., Sanchez, R., Kundariya, H., Wang, D., Riethoven, J.J.M., Wamboldt, Y., Arrieta-Montiel, M.P., Shedge, V., Mackenzie, S.A. (2015) Arabidopsis MSH1 mutation alters the epigenome and produces heritable changes in plant growth. *Nat Commun* 6: 1–9.
- Vongs, A., Kakutani, T., Martienssen, R.A., Richards, E.J. (1993) Arabidopsis thaliana DNA methylation mutants. *Science (80-)* 260: 1926–1928.
- Walker, R.P., Chen, Z.H., Famiani, F. (2021) Gluconeogenesis in Plants: A Key Interface between Organic Acid/Amino Acid/Lipid and Sugar Metabolism. *Molecules* 26: 1–18.
- Wang, J.P.Z., Lindsay, B.G., Leebens-Mack, J., Cui, L., Wall, K., Miller, W.C., DePamphilis, C.W. (2004) EST clustering error evaluation and correction. *Bioinformatics* 20: 2973–2984.
- Wang, W., Paschalidis, K., Feng, J.C., Song, J., Liu, J.H. (2019) Polyamine catabolism in plants: A universal process with diverse functions. *Front Plant Sci* 10: 561.
- Wang, Y., Mostafa, S., Zeng, W., Jin, B. (2021) Function and mechanism of jasmonic acid in plant responses to abiotic and biotic stresses. *Int J Mol Sci* 22: 8568.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M., Barton, G.J. (2009) Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25: 1189–91.
- Webb, B., Sali, A. (2016) Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Bioinformatics* 1–37.
- Weinhold, B. (2006) Epigenetics: the science of change. *Environ Heal Perspect* 114: A160-7.

- Wellburn, A.R. (1994) The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *J Plant Physiol* 144: 307–313.
- Wiśniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N., Mann, M. (2009) Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods* 6: 359–362.
- Wolf, S., Mouille, G., Pelloux, J. (2009) Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. *Mol Plant* 2: 851–860.
- Wu, H.C., Bulgakov, V.P., Jinn, T.L. (2018) Pectin methylesterases: Cell wall remodeling proteins are required for plant response to heat stress. *Front Plant Sci* 871: 1–21.
- Xiao, C., Chen, Æ.F., Yu, Æ.X., Fu, C.L.Æ.Y. (2009) Over-expression of an AThook gene, AHL22, delays flowering and inhibits the elongation of the hypocotyl in Arabidopsis thaliana. 39–50.
- Xiao, W., Custard, R.D., Brown, R.C., Lemmon, B.E., Harada, J.J., Goldberg, R.B., Fischer, R.L. (2006) DNA methylation is critical for Arabidopsis embroyogenesis and seed viability. *Plant Cell* 18: 805–814.
- Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman,
 D., Jacobsen, S.E., Carrington, J.C. (2004) Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol* 2: e104.
- Xu, J., Wang, X., Cao, H., Xu, H., Xu, Q., Deng, X. (2017) Dynamic changes in methylome and transcriptome patterns in response to methyltransferase inhibitor 5-azacytidine treatment in citrus. *DNA Res* 24: 509–522.
- Yaish, M.W.F., Peng, M., Rothstein, S.J. (2009) AtMBD9 modulates Arabidopsis development through the dual epigenetic pathways of DNA methylation and histone acetylation. *Plant J* 59: 123–135.
- Yamamuro, C., Zhu, J.K., Yang, Z. (2016) Epigenetic Modifications and Plant Hormone Action. *Mol Plant* 9: 57–70.
- Yan, J., Wang, J., Li, Q., Hwang, J.R., Patterson, C., Zhang, H. (2003) AtCHIP, a U-Box-containing E3 ubiquitin ligase, plays a critical role in temperature stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol* 132: 861–869.

- Yang, F., Zhang, L., Li, J., Huang, J., Wen, R., Ma, L., Zhou, D., Li, L. (2010) Trichostatin A and 5-azacytidine both cause an increase in global histone H4 acetylation and a decrease in global DNA and H3K9 methylation during mitosis in maize. *BMC Plant Biol* 10: 178.
- Yao, M., Chen, W., Kong, J., Zhang, X., Shi, N., Zhong, S., Ma, P., Gallusci, P., Jackson, S., Liu, Y., Hong, Y. (2020) METHYLTRANSFERASE1 and ripening modulate vivipary during tomato fruit development1. *Plant Physiol* 183: 1883– 1897.
- Zemach, Assaf and Grafi, G. (2003) Characterization of Arabidopsis thaliana methyl-CpG-binding domain (MBD) proteins. *Plant J* 34: 565–572.
- Zemach, A., Grafi, G. (2006) Methyl-CpG-binding domain proteins in plants: interpreters of DNA methylation. 12: 10–15.
- Zemach, A., Grafi, G. (2003) Characterization of Arabidopsis thaliana methyl-CpGbinding domain (MBD) proteins. *Plant J* 34: 565–572.
- Zemach, A., Kim, M.Y., Hsieh, P.H., Coleman-Derr, D., Eshed-Williams, L., Thao, K., Harmer, S.L., Zilberman, D. (2013) The arabidopsis nucleosome remodeler DDM1 allows DNA methyltransferases to access H1-containing heterochromatin. *Cell* 153: 193–205.
- Zhang, B., Gao, Y., Zhang, L., Zhou, Y. (2021) The plant cell wall: Biosynthesis, construction, and functions. *J Integr Plant Biol* 63: 251–272.
- Zhang, H., Han, W., De Smet, I., Talboys, P., Loya, R., Hassan, A., Rong, H., Jürgens, G., Paul Knox, J., Wang, M.H. (2010a) ABA promotes quiescence of the quiescent centre and suppresses stem cell differentiation in the Arabidopsis primary root meristem. *Plant J* 64: 764–774.
- Zhang, H., Lang, Z., Zhu, J.K. (2018) Dynamics and function of DNA methylation in plants. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19: 489–506.
- Zhang, H., Zhu, J.K. (2012) Active DNA demethylation in plants and animals. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 77: 161–173.
- Zhang, M., Kimatu, J.N., Xu, K., Liu, B. (2010b) DNA cytosine methylation in plant development. *J Genet Genomics* 37: 1–12.

- Zhang, X., Clarenz, O., Cokus, S., Bernatavichute, Y. V., Pellegrini, M., Goodrich, J., Jacobsen, S.E. (2007) Whole-genome analysis of histone H3 lysine 27 trimethylation in Arabidopsis. *PLoS Biol* 5: e129.
- Zhang, X., Yazaki, J., Sundaresan, A., Cokus, S., Chan, S.W., Chen, H., Henderson, I.R., Shinn, P., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., Ecker, J.R. (2006) Resource Mapping and Functional Analysis of DNA Methylation in Arabidopsis. *Cell* 126: 1189–1201.
- Zhang, Y., Moritz, K.K., Fischer, M., Bossdorf, O. (2012) Epigenetic variation in plant responses to defence hormones. *Ann Bot* 110: 1423–1428.
- Zhao, M., Yang, S., Liu, X., Wu, K. (2015) Arabidopsis histone demethylases LDL1 and LDL2 control primary seed dormancy by regulating DELAY OF GERMINATION 1 and ABA signaling-related genes. *Front Plant Sci* 6: 159.
- Zhong, R., Teng, Q., Haghighat, M., Yuan, Y., Furey, S.T., Dasher, R.L., Ye, Z.H. (2017) Cytosol-localized UDP-xylose synthases provide the major source of UDP-xylose for the biosynthesis of Xylan and xyloglucan. *Plant Cell Physiol* 58: 156–174.
- Zhou, Y., Tan, B., Luo, M., Li, Y., Liu, C., Chen, C., Yu, C.W., Yang, S., Dong, S., Ruan, J., Yuan, L., Zhang, Z., Zhao, L., Li, C., Chen, H., Cui, Y., Wu, K., Huang, S. (2013) HISTONE DEACETYLASE19 interacts with HSL1 and participates in the repression of seed maturation genes in Arabidopsis seedlings. *Plant Cell* 25: 134–148.
- Zhu, J., Jae, C.J., Zhu, Y., Sokolchik, I., Miyazaki, S., Zhu, J.K., Hasegawa, P.M., Bohnert, H.J., Shi, H., Yun, D.J., Bressan, R.A. (2008) Involvement of Arabidopsis HOS15 in histone deacetylation and cold tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 4945–4950.
- Zhu, J., Kapoor, A., Sridhar, V. V., Agius, F., Zhu, J.K. (2007) The DNA Glycosylase/Lyase ROS1 Functions in Pruning DNA Methylation Patterns in Arabidopsis. *Curr Biol* 17: 54–59.
- Zhu, J.K. (2009) Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annu Rev Genet* 43: 143–66.

- Zhu, Y.X. (2010) The epigenetic involvement in plant hormone signaling. *Chinese Sci Bull* 55: 2198–2203.
- Zilberman, D., Cao, X., Johansen, L.K., Xie, Z., Carrington, J.C., Jacobsen, S.E. (2004) Role of Arabidopsis ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation triggered by inverted repeats. *Curr Biol* 12: 1214–1220.
- Zilberman, D., Gehring, M., Tran, R.K., Ballinger, T., Henikoff, S. (2007) Genomewide analysis of Arabidopsis thaliana DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nat Genet* 39: 61–69.
- ZLUVOVA, J.; JANOUSEK, B.; VYSKOT, B. (2001) Immunohistochemical study of DNA methylation dynamics during plant development. J Exp Bot 52: 2265– 2273.
- Zou, X., Ma, W., Solov, I.A., Chipot, C., Schulten, K. (2012) Recognition of methylated DNA through methyl-CpG binding domain proteins. *Nucleic Acids Res* 40: 2747–2758.

APÊNDICE

CAPÍTULO 1

Target	Foward	Reverse
Glyma.07G130300	CTATCACTATCACCCCTCCTTC	
(GmMBD2b)	CTATCAGTATCAGCCGTCCTTC	ACAATGCACATAACACGAAAGG
Glyma.13G170000	TOCONTOCTTOTTOTTOT	CCCTTTCTCACACTATCCAC
(GmMBD9a)	recentering	CGGCTTCTGACACTATGGAC
Glyma.15G007700	TGAACGGCGAAAATGTGATTG	CAGTCTCCGCAGTATTAGCAG
(GmMBD10g)		

 Tabela S1: Desenho dos iniciadores dos genes GmMBD.

	Identificação do gene	Nome do gene	Tamanho do Gene (bp)	Número de éxons	Tamanho da proteína (aa)	Número de domínios MBD	Outros domínios	Chr
	AT4G22745	MBD1	1445	2	204	1	CW-type Zinc Finger	4
	AT5G35330	MBD2	2313	4	272	1	CW-type Zinc Finger	5
	AT4G00416	MBD3	492	1	163	1	0	4
	AT3G63030	MBD4	1255	2	186	1	CW-type Zinc Finger	3
	AT3G46580	MBD5	1248	3	182	1	0	3
	AT5G59380	MBD6	1447	3	225	1	0	5
	AT5G59800	MBD7	2059	6	306	2	0	5
Arabidopsis	AT1G22310	MBD8	2206	2	524	1	AT hook motif	1
thaliana	AT3G01460	MBD9	9139	10	2176	1	PHD-finger; FYRN (F/Y-rich N- terminus); FYRC (F/Y rich C- terminus); WHIM1; Williams- Beuren syndrome DDT (WSD)	3
	AT1G15340	MBD10	2013	2	384	1	0	1
	AT3G15790	MBD11	1685	2	254	1	0	3
	AT5G35338	MBD12	782	3	155	1	CW-type Zinc Finger	5
	AT5G52230	MBD13	3922	6	746		Non MBD domain	5

Tabela S2: Genes MBD no genoma da Arabidopsis thaliana, Amborella trichopoda, Aquilegia coerulea, Chlamydomonas reinhardtii e Medicago truncatula, e características de sequência das proteínas correspondentes.

Tabela S2: Cont.

	Identificação do gene	Nome do gene	Tamanho do Gene (bp)	Número de éxons	Tamanho da proteína (aa)	Número de domínios MBD	Posição domínios	Chr
	evm_27.model.AmTr_v1	AmTr_scaffold						CW-type
	.0_scaffold00025.161	00025.161	911	2	175	1	88-150	Zinc Finger
	evm_27.model.AmTr_v1	AmTr_scaffold						CW-type
	.0_scaffold00025.248	00025.248	7093	4	379	1	221-281	Zinc Finger
	evm_27.model.AmTr_v1	AmTr_scaffold						
Amborella	.0_scaffold00004.189	00004.189	16859	3		1	28-88	-
trichopoda	evm_27.model.AmTr_v1	AmTr_scaffold						
	.0_scaffold00012.149	00012.149					127-229	-
							7-57/ 108-160/	
	evm 27.model.AmTr v1	AmTr scaffold	10111	40	4000	-	218-267/ 335-	
	.0 scaffold00009.332	00009.332	16114	16	1239	1	385/455-504/	-
	—						573-623/ 654-	
							707	
	A 3000 E C 066200	-	1049	4	202	1	116 100	
	Aqc0e5G000500		1940	4	202	I	110-102	
	Ageoo2C322800	-	2/30	2	170	1	77-14	
	Aqc0e20322000		2430	2	170	I	11-14	CW-type
	Agcoe7G285900	-	6906	4	365	1	193-252	Zinc Finger
Aauileaia	Agcoe7G040100	-	12151	8	806	2	30-78/102-149	
coerulea	Agcoe1G460100	-	2008	3	144	1	12 73	-
	Aqcoe2G183100	-	2811	3	134	1	62-102	-
	Aqcoe2G282000	-	3652	3	157	1	78-122	-
	Aqcoe7G075300	-	2268	3	152	1	24-76	-
	Aqcoe7G075400	-	4844	3	149	1	48-98	-
	Aqcoe7G386200	-	3133	2	339	1	21-84	-
	Aqcoe1G075100	-	4059	3	354	1	24-83	-

Tabela	S2 –	Cont.
--------	-------------	-------

	Identificação do gene	Nome do gene	Tamanho do Gene (bp)	Número de éxons	Tamanho da proteína (aa)	Número de domínios MBD	Posição domínios	Chr
Chlamydomonas	Cre06.g271550.t1. 2	-	1392	3	161	1	68-122	-
reinhardtii	Cre06.g272600.t1. 2	-	3282	3	164	1	68-125	-
	Medtr0339s0010		957	1	318	1	0	scaffold0 339
	Medtr0339s0020		3302	3	324	1	0	scaffold0 339
	Medtr4a010210	MBD10	1086	1	361	1	0	4
	Medtr4g114770		5007	2	355			4
M. truncatula	Medtr4g114785	MBD8 MBD9 MBD4	2012	2	219			4
	Medtr6a052050		1656	3	124	1	0	6
	Medtr2a009040		5004	3	806	1	0	2
	Medtr3g074640		7299	4	885	1	0 PHD-finger:	3
	Medtr6g007650		13107	10	2161	1	Bromodomain ; WHIM1	6
	Medtr0019s0270		586	2	167	1	0	scaffold0 019
	Medtr0019s0310		1442	2	174	1	0	scaffold0 019
	Medtr0019s0330		321	1	106			scaffold0 019
	Medtr1g089750		1990	2	176	1	CW-type Zinc Finger	1
	Medtr6g027240		339	1	112	1	0	6
	Medtr6g027250		1154	2	159	1	CW-type Zinc Finger	6

	Identificação do gene	Nome do gene	Tamanho do Gene (bp)	Número de éxons	Tamanho da proteína (aa)	Número de domínios MBD	Posição domínios	Chr
	Medtr6g055750		1330	2	174	1	0	6
	Medtr7g013320	MBD4	621	3	113	1	0	7
	Medtr6g060685		4063	4	213	1	0	6
	Medtr6g060845		5737	2	140	1	0	6
M. truncatula	Medtr6g060860	MBD11	3681	4	181	1	0	6
	Medtr3g435470		1464	4	292	1	CW-type Zinc Finger	3
	Medtr6g093020	IVIBD2	3669	4	303	1	CW-type Zinc Finger	6
	Medtr8g096930	MBD13	9563	7	1325	1	Õ	8
	Medtr2g096520		4091	6	286	2	0	2
	Medtr4g008590	MBD7	2719	5	250	1	0	4
	Medtr6g054960		4377	5	459	2	0	6

Tabela S2 - Cont.



Figura S1: Estrutura gênica de genes MBD em Arabidopsis thaliana. (A) Estrutura gênica de genes MBD projetados em Genes Display Server GSDS. (B) Predição de proteínas do domínio MBD. Os domínios são mostrados na legenda. O comprimento e a posição dos domínios podem ser estimados de acordo com a barra de escala.







Figura S3: Conservação de sequências de proteínas do domínio de ligação de metil-CpG (MBD). (A) Sequência LOGO dos domínios MBD de soja, feijão, Arabidopsis, tomate, batata, milho, Aco e Atr. O LOGO foi gerado a partir das sequências do domínio MBDs de 21, 12, 13 e 7 de soja, feijão, Arabidopsis, respectivamente. (B) Sequência LOGO dos 7 domínios MBD de humanos. Os elementos da estrutura secundária dos MBDs são indicados por setas (fita- β) e caixa (α -hélice).

CAPÍTULO 2

 Tabela S3:
 Desenho dos iniciadores dos genes envolvidos na metilação e desmetilação do DNA

Target	Foward	Reverse
GmMET1	TGAATGTGCTCGGTCTCAAG	TTACTGTCCACTGCTTCCTTG
GmMBD2	CTATCAGTATCAGCCGTCCTTC	ACAATGCACATAACACGAAAGG
GmROS1	GCCAACAGAGACAAATGAGC	CCTAATCTGGAAAAACTGCTCAG
GmSAM	CCATCTTCCACCTTAACCCTTC	CTTCCAGTGAGACCAGCATC


Figura S4: Teor de pigmentos fotossintéticos. (A) clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoide nas folhas de plântulas da cultivar BR16 com 7 dias de desenvolvimento. (B) clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoide nas folhas de plântulas da cultivar Embrapa 48 com 7 dias de desenvolvimento.



Figura S5: Conteúdo de DNA da parte aérea de plântulas com 7 dias de desenvolvimento. (A) Folha controle. (B) folha de plântula tratada com 5-azaC.