

HENDRIL DA SILVA LOPES

**CARACTERIZAÇÃO DE UMA CULTIVAR MINIATURA COMO MODELO
BIOLÓGICO PARA SOJA (*Glycine max* cv. MiniMax)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Agustín Zsögön

Coorientadores: Edgard A. de Toledo Picoli
Maximiller D.Lamas Costa

**VIÇOSA- MINAS GERAIS
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa -
Campus Viçosa**

T

L864c
2024
Lopes, Hendril da Silva, 2000-
Caracterização de uma cultivar miniatura como modelo biológico para soja (*Glycine max* cv. MiniMax) / Hendril da Silva Lopes. – Viçosa, MG, 2024.
1 dissertação eletrônica (91 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Agustin Zsögön.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Vegetal, 2024.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.561>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Soja - Melhoramento genético. 2. Modelos biológicos. 3. Bioensaios. I. Zsögön, Agustin, 1980-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. III. Título.

CDD 22. ed. 633.323

HENDRIL DA SILVA LOPES

**CARACTERIZAÇÃO DE UMA CULTIVAR MINIATURA COMO MODELO
BIOLÓGICO PARA SOJA (*Glycine max* cv. MiniMax)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do Título de *Master Scientiae*

APROVADO: 29 de fevereiro de 2024.

Assentimento:



Documento assinado digitalmente
HENDRIL DA SILVA LOPES
Data: 10/09/2024 12:14:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Hendril da Silva Lopes
Autor



Documento assinado digitalmente
AGUSTIN ZSOGON
Data: 10/09/2024 20:07:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Agustin Zsögön
(Orientador)
(UFV)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus pelo privilégio da vida, e o privilégio de poder seguir nessa trajetória acadêmica com grandes conquistas.

À minha família, especialmente minha mãe Rosangela Lopes Martins, por todo apoio e palavras motivadoras.

Ao meu amigo Frederico por todo apoio e motivação para seguir nesta jornada;

Ao meu orientador Prof. Agustín Zsögön, pela excelente orientação durante o mestrado, motivação, e seu entusiasmo para pesquisa.

Aos meus coorientadores Prof. Maximiller Dal-Bianco Lamas Costa e Prof. Edgard Augusto de Toledo Picoli, por todo apoio na condução dos experimentos e palavras motivadoras.

Aos meus amigos da Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, pelos momentos de alegria, e compartilhamento de experiências e apoio.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e a todos os professores, técnicos e funcionários, por ajudarem nesta conquista.

Ao programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal por todo conhecimento e oportunidades.

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento e assistência.

Obrigado a todos que contribuíram diretamente ou indiretamente e não foram mencionados nestes agradecimentos.

RESUMO

LOPES, Hendril da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa. Fevereiro, 2024.
Caracterização de uma cultivar miniatura como modelo biológico para soja (*Glycine max* cv. MiniMax). Orientador: Prof. Agustín Zsögön

A soja [*Glycine max* (L.) Merr] é a principal cultura oleaginosa do mundo e a principal fonte de proteínas para humanos e animais. Nos últimos anos tem-se buscado entender a função de genes de interesse agrônômico. O principal modelo biológico para estudos fisiológicos e moleculares nas duas últimas décadas é *Arabidopsis thaliana*. No entanto, apesar de sua importância e contribuição para o que sabemos de plantas hoje, não é uma espécie representativa para todos os grupos de plantas que existem, inclusive a soja. Assim, em 2010 foi proposto um modelo biológico para soja: *G. max* cv. Williams 82 teve o seu genoma completamente sequenciado, com um tamanho de 1,15 Gb. Mesmo assim, esta cultivar não possui algumas características cruciais para o pleno estabelecimento e adoção em diversos estudos. Sendo assim, Matthews e colaboradores, propõem um novo potencial modelo biológico para leguminosas, a cultivar anã de soja *G. max* cv. MiniMax (PI643148), que possui uma série de características desejáveis, tais como tamanho compacto, ciclo curto, prolificidade e capacidade regeneração *in vitro*. Surpreendentemente, este material não foi tão explorado até então. Aqui, realizamos alguns estudos básicos que serão cruciais para a adoção de MiniMax como modelo biológico. A caracterização morfológica comparativa entre MiniMax e Williams 82 evidenciou características que tornam MiniMax potencialmente um bom modelo biológico para estudos com soja. Nossos ensaios utilizando MiniMax como modelo de estudo, demonstraram a sua versatilidade em experimentos sob cultivo em casa de vegetação, bem como respostas sobre fixação biológica de nitrogênio ao ser tratada com inoculantes. Além disso, MiniMax tratada com biofertilizante demonstrou ser uma ótima ferramenta para validação de produtos comerciais. Ainda, realizamos o cruzamento inédito entre MiniMax e Williams 82 para geração de populações segregantes, e obtivemos sementes híbridas F₁, que futuramente serão multiplicadas por autofecundação para o desenvolvimento de linhagens endogâmicas recombinantes (RILs). Estas populações serão fundamentais para identificação de QTLs de interesse para a cultura da soja. Os nossos resultados vão fornecer mais informações do cultivo e uso de MiniMax em ensaios experimentais, isso vai proporcionar a adesão deste material biológico cada vez mais por outros grupos de pesquisa, bem como a disponibilização de uma população de mapeamento para estudos moleculares em leguminosas.

Palavras-chave: soja; *Glycine max* cv. MiniMax; *G. max* cv. Williams 82; bioensaios; modelo biológico.

ABSTRACT

LOPES, Hendril da Silva, M.Sc., Federal University of Viçosa. February, 2024. **Characterization of a miniature cultivar as a biological model for soybean (*Glycine max* cv. MiniMax).** Advisor: Prof. Agustín Zsögön

Soybean [*Glycine max* (L.) Merr] is the world's main oilseed crop and the main source of protein for humans and animals. In recent years, efforts have been made to understand the function of genes of agronomic interest. The main biological model for physiological and molecular studies in the last two decades is *Arabidopsis thaliana*. However, despite its importance and contribution to what we know about plants today, it is not a representative species for all groups of plants that exist, including soybeans. Thus, in 2010 a biological model for soybean was proposed: *G. max* cv. Williams 82 had its genome completely sequenced, measuring 1.15 GB. Even so, this cultivar does not have some crucial characteristics for full establishment and adoption in several studies. Therefore, Matthews and collaborators proposed a new potential biological model for legumes, the dwarf soybean cultivar *G. max* cv. MiniMax (PI643148), which has a number of desirable characteristics, such as compact size, short cycle, prolificacy and in vitro regeneration capacity. Surprisingly, this material has not been explored as much until now. Here, we carry out some basic studies that will be crucial for the adoption of MiniMax as a biological model. The morphological characterization between MiniMax and Williams 82 highlighted characteristics that make MiniMax potentially a good biological model for studies with soybean. Our trials using MiniMax as a study model demonstrated its versatility in experiments under greenhouse cultivation, as well as responses on biological nitrogen fixation when treated with inoculants. Furthermore, MiniMax treated with biofertilizer proved to be a great tool for validating commercial products. Furthermore, we carried out the unprecedented crossing between MiniMax and Williams 82 to generate segregating populations, obtaining hybrid F₁ seeds, which in the future will be multiplied by self-fertilization for the development of recombinant inbred lines (RILs), these populations will be fundamental for identifying QTLs of interest for the crop of soybeans. Our results will provide more information on the cultivation and use of MiniMax in experimental trials, this will provide increasing acceptance of this biological material by other research groups, as well as the provision of a mapping population for molecular studies in legumes.

Keywords: soybean; *Glycine max* cv. MiniMax; *G. max* cv. Williams 82; bioassays; biological model.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Aspectos morfológicos de MiniMax e Williams 82.....	51
Figura 2.2 Área foliar entre G. max cv. MiniMax e G. max cv. Williams 82.....	52
Figura 2.3 Fenologia entre as plantas de soja G. max cv. MiniMax e G. max cv. Williams 82	53
Figura 2.4 Parâmetros morfológicas de MiniMax e Williams 82	55
Figura 2.5. Alocação de biomassa entre MiniMax e Williams 82	56
Figura 3.1 Aspectos morfológicos de G. max cv. MiniMax sob ensaio básico de omissão nitrogenada e inoculada com <i>Bradyrhizobium elkanii</i>	57
Figura 3.2 Parâmetros morfológicas do genótipo MiniMax sob omissão de nitrogênio.....	58
Figura 3.3 Partição de massa seca entre os diferentes órgãos de G. max cv. MiniMax sob omissão nitrogenada e tratadas com bactérias nodulantes (<i>Bradyrhizobium elkanii</i>).....	60
Figura 3.4 Parâmetros anatômicos do tecido foliar de G. max cv. MiniMax sob omissão nitrogenada.....	71
Figura 3.5 Parâmetros anatômicos do tecido caulinar de G. max cv. MiniMax sob omissão nitrogenada.....	73
Figura 3.6 Aspectos anatômicos da raiz de G. max cv. MiniMax sob omissão nitrogenada e inoculada com Rizobactérias.....	74
Figura 4. 1 Imagens do cruzamento entre os genótipos G. max cv. MiniMax e G. max cv. Williams 82 para criação de população segregante.....	86
Figura 4. 2 Representação esquemática do modelo utilizado para avanço e geração das linhagens consanguíneas recombinantes	87
Figura 4.3 Varredura de indivíduos polimórficos comparado aos parentais utilizando marcadores microssatélites.....	88

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL	9
1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
1.1.1 A família Fabaceae (Leguminosas).....	13
1.1.2 A cultura da soja (<i>Glycine max</i>).....	14
1.1.3 Identificação de genes de interesse agrônomo em soja.....	15
1.1.3.1 Controle da arquitetura vegetal.....	16
1.1.3.2 Regulação fotoperiódica do florescimento.....	18
1.1.3.3 Tamanho da semente.....	19
1.1.3.4 Resistência aos estresses bióticos e abióticos.....	21
1.1.4 Modelos genéticos em estudos de plantas.....	22
REFERÊNCIAS.....	26
CAPÍTULO 2: Caracterização morfológica comparativa entre soja (<i>Glycine max</i>) cv. MiniMax e cv. Williams 82	46
2.1 INTRODUÇÃO.....	46
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	48
2.2.1 Instalação do experimento.....	49
2.2.2 Avaliações morfológicas.....	49
2.2.3 Partição de biomassa.....	49
2.2.4 Análises estatísticas.....	49
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
2.4 CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS.....	58
CAPÍTULO 3: Resposta do potencial modelo biológico MiniMax sob omissão nitrogenada	63
3.1 INTRODUÇÃO.....	63
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	65
3.2.1 Instalação do experimento.....	65
3.2.2 Avaliações morfológicas.....	65
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
3.4 CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS.....	75
CAPÍTULO 4: Desenvolvimento de uma população endogâmica consanguínea derivada do cruzamento entre cv. MiniMax e cv. Williams 82	78
4.1 INTRODUÇÃO.....	78
4.2. Uso e aplicações de linhagens endogâmicas recombinantes (RILs) em soja.....	80
4.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	82

4.3.1 Desenvolvimento populacional	82
4.3.2 Extração de DNA e PCR.....	83
4.3.3 Instalação do experimento e cruzamento	83
4.4 RESULTADOS E PERSPECTIVAS	84
4.5 CONCLUSÃO.....	88
REFERÊNCIAS.....	89

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL

A soja [*Glycine max* (L.) Merr] é uma importante cultura oleaginosa cultivada em todo o mundo. Foi domesticada a partir da soja silvestre (*Glycine soja* Sieb. e Zucc.) no nordeste da China há aproximadamente 6.000 – 9.000 anos e, foi melhorada como uma cultura de sementes de uso duplo para fornecer óleo e proteína altamente valioso para alimentos, rações e aplicações industriais (Carter *et al.*, 2004). Pertence à família das leguminosas (Fabaceae) que compreende 800 gêneros e mais de 20.000 espécies (Muoni *et al.*, 2019), além de ser a terceira maior família das plantas com flores. Os produtos derivados da soja vem ganhando cada vez mais atenção devido a sua infinidade de fitoquímicos bioativos, atuantes na redução do colesterol, doenças cardiovasculares, diabetes e alívio da perda óssea (Isanga and Zhang, 2008). A princípio, está entre os poucos alimentos proteicos completos de base vegetal com nove aminoácidos essenciais (Living, 2015).

Os inúmeros usos possíveis para soja são um mercado muito promissor, devido à sua versatilidade, possui aplicações em muitos setores industriais, como indústria farmacêutica, indústria veterinária, tintas e plásticos. Essas melhorias na cultura da soja tornam o Brasil o maior exportador do mundo, o que reflete em uma dominância no mercado nacional e internacional e com futuras perspectivas ainda mais promissoras já mais vistas na agricultura moderna (CONAB, 2023). Devido a isso, tem sido investido valores astronômicos no processamento de soja, na tentativa de implementar o uso de biodiesel, buscando reduzir o consumo de combustíveis não-renováveis (Barreiros *et al.*, 2020; Da Silva César *et al.*, 2019).

A fantástica capacidade das leguminosas, como a soja, de fixar biologicamente o nitrogênio através de suas interações simbióticas com procariontes fixadores de nitrogênio (ex. *Bradyrhizobium japonicum*), tornaram essas plantas muito adaptadas a regiões com deficiência nutricional, principalmente o nitrogênio, um dos nutrientes de maior impacto no crescimento e desenvolvimento das plantas (Roy *et al.*, 2020). Vale ressaltar que o intenso trabalho feito pelos geneticistas do melhoramento vegetal, contribuiu significativamente nas últimas décadas, selecionando as principais características agrônômicas de interesse para esta cultura. Os principais caracteres agrônômicos envolvem a arquitetura vegetal, como altura de planta (Islam *et al.*, 2007), número de ramificações (Landi *et al.*, 2006), hábito de crescimento (Bernard, 1972), sistema radicular (Keller *et al.*, 1999), diâmetro do caule (Kashiwagi *et al.*,

2008), número de nós (Chen *et al.*, 2011a), número de vagens (Song *et al.*, 2020), tamanho de vagem (Du *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2016), assim como, outros caracteres agrônômicos regulados fisiologicamente, incluem produtividade (Orf *et al.*, 1999), época de florescimento (Lin *et al.*, 2021), ciclo da cultivar, resistência a pragas e doenças (Shu *et al.*, 2020; Widiasari *et al.*, 2020).

A soja tem sido bastante estudada nas últimas décadas, isso se deve em grande parte o avanço nas ferramentas moleculares. Por exemplo, o avanço notável no campo da biologia molecular com o aporte de novas biotecnologias para o melhoramento vegetal, como interferência de ácido ribonucleico (RNAi), RNA antisense (asRNA), lesões locais induzidas no genoma (TILLING), transcription activator like-effector nuclease (TALEN), repetições palindrômicas curtas agrupadas regularmente interespaçadas (CRISPR) ou mutagênese e tecnologias de seleção de mutações naturais (Bilyeu *et al.*, 2011; Demorest *et al.*, 2016; Jacobs *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2014), permitem a criação de novos materiais biológicos. Prever e compreender as repostas das plantas é uma tarefa difícil, em função de múltiplos fatores agirem de forma coordenada para um mesmo efeito. Assim, o uso de organismos modelos biológicos é extremamente importante para investigar e validar repostas.

Algumas características são determinantes para validação de um bom modelo biológico. Por exemplo, *Arabidopsis thaliana*, uma das plantas mais estudadas do mundo, possui relatos de pesquisa científica desde 1980. Ela pertence à família da mostarda (Brassicaceae) e não possui valor comercial diretamente. Porém, as descobertas nesta espécie foram em muitos casos extrapoladas para outras plantas de interesse comercial. Esta planta possui muitas características que a tornaram o principal modelo biológico em biologia vegetal, tais como ciclo curto, tamanho compacto, alta prolificidade e genoma relativamente pequeno (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). O sequenciamento completo de *Arabidopsis* foi um marco para acelerar o conhecimento de bases genéticas e funções fisiológicas, e também devido a versatilidade do material para experimentos (Koornneef and Meinke, 2010). A planta de *Arabidopsis thaliana* cresce, floresce e frutifica em 60 dias (Krämer, 2015a).

No entanto, grande parte dos resultados obtidos com o modelo *Arabidopsis*, não são representativos para outros grupos de plantas, principalmente aqueles de aptidão agrícola, como tomate, arroz, milho ou soja. Nesta perspectiva, é bastante

comum na comunidade científica que trabalham com grupos de plantas distintos estabelecerem modelos biológicos para seus estudos. Por exemplo, em 1997 foi lançada a cultivar de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) Micro-Tom (Meissner *et al.*, 1997), a qual foram originalmente criada para fins ornamentais. No entanto, as suas características como tamanho compacto, ciclo curto, produção de muitas sementes e interações micorrízicas (Campos *et al.*, 2010). A adoção desta cultivar como modelo pela comunidade de pesquisa de Solanáceas permitiu o desenvolvimento e disponibilização de coleções de plantas transgênicas (Pino *et al.*, 2010), mutantes naturais (Carvalho *et al.*, 2011) e mutantes induzidos química e fisicamente (Pino-Nunes *et al.*, 2009). Importante ressaltar, com a Revolução Verde, promoveu um avanço na seleção de materiais semi-anãs, principalmente para trigo e arroz, o que foi extremamente importante para melhoria de inúmeras culturas que possui porte elevado, neste sentido, passou a ser selecionado cada vez mais materiais com porte e arquitetura compacta.

Existem muitos outros modelos biológicos para estudos de plantas, a partir dos genomas sequenciados como arroz (*Oryza sativa*) cv. Nipponbare (Goff *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002), milho (*Zea mays*) (Schnable *et al.*, 2009), e a leguminosa modelo *Medicago trunculata* (Wang *et al.*, 2010). Recentemente foi lançado um novo modelo miniatura (*Setaria viridis*) para plantas com mecanismos C4, chamando de mini-milho (Z. Yang *et al.*, 2020a). Interessantemente, na década da genômica funcional, foi um marco para comunidade da soja, pois em 2010 tiveram o primeiro genoma de referência para uma cultivar de soja, se trata da *Glycine max* var. Williams 82, de aptidão agrícola e muito cultivada nos Estados Unidos (Schmutz *et al.*, 2010a). A partir disto, uma grande quantidade de outros materiais de soja tiveram seus genomas sequenciados, o que favoreceu no aporte de inúmeros bancos de dados (Kim *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014; Liu and Tian, 2020; Shen *et al.*, 2019, 2018; Tao *et al.*, 2020; Valliyodan *et al.*, 2019; Xie *et al.*, 2019). Isso torna a descoberta, caracterização e validação de genes mais rápida, devido a facilidade de cruzar informações entre esses bancos digitais, mas a velocidade na qual os materiais biológicos chegam aos pesquisadores ainda torna uma difícil tarefa, quando comparado com outros modelos. No momento atual, é necessário mais do que bancos digitais contendo informação, é necessário uma validação e funcionalidade de determinados genes, de forma rápida e eficiente sob condições de cultivo, os organismos modelos denominados como ecótipos são buscados por melhoristas de plantas.

Surpreendentemente, isto não parece ser uma tarefa tão complicada, pois ainda em 2007 foi registrada uma cultivar, chamada de Minimax (PI643148), este material foi lançado com a proposta de servir como modelo para estudos genômicos com soja, isso porque possui todas as características buscadas em um bom modelo biológico, como porte pequeno e compacto, poucas ramificações, ciclo curto e boa produção de sementes (Matthews et al., 2007). Além disso, já em 2008, os mesmos pesquisadores desenvolveram um eficiente protocolo de regeneração *in vitro* (Klink et al., 2008). No entanto, o potencial modelo Minimax não foi tão utilizado a partir de então, quase nenhum trabalho científico reporta o seu uso apesar de todas as suas potenciais vantagens para estudos com soja.

A complexidade do genoma de soja, comparado com outros modelos muito estudados como *Arabidopsis thaliana* e tomateiro cv. Micro-Tom que possuem genoma relativamente muito menor, faz necessário o estabelecimento de um novo modelo para soja. Isso porque aliado toda as ferramentas moleculares que possuem nos dias atuais, e bancos de dados pan-genômicos, a cultura da soja pode ter novos achados no futuro. Por exemplo, a base genética do nanismo em soja não está muito clara para a comunidade científica, algo de extrema importância para o melhoramento desta cultura de interesse econômico mundial. O nanismo em plantas é um fenômeno conhecido em modelos genéticos como *Arabidopsis*, tomateiro e cereais, porém não em soja. Estudos mostram que o controle genético da altura das plantas pode ser regulado por um único gene anão ou por múltiplos locus ou genes associados (Dardick et al., 2013; Kuraparthi et al., 2008; Roy et al., 2021). Recentemente, um mutante anão de soja (*dm*) foi isolado de linhagens mutagenizadas por EMS da cultivar Zhongping 661, e descobriu-se que onze genes candidatos envolvidos no processo de síntese de celulose, ácidos graxos estão associados ao fenótipo anão (Song et al., 2022). Todavia, o que sabemos sobre fatores que estão controlando a altura da soja é muito incipiente, isso carece de vários estudos para se entender a ponto de manipular em culturas elites de forma segura.

Reportar a retomada de novos estudos com Minimax é uma contribuição importante para a comunidade da soja, principalmente na tomada de decisão ao estabelecer um modelo para estudos dessa natureza. Para termos sucesso com este material, é necessário partir de estudos básicos para os mais avançados, isso pode ter sido uma barreira na difusão de Minimax como modelo, já que as suas informações até o momento são insuficientes. Neste sentido, nosso grupo tem avaliado o

comportamento do cultivo de Minimax em condições experimentais, e mais importante ainda, comparada com o atual modelo, passível de averiguar de fato as principais divergências entre as cultivares.

Diante do exposto, temos como objetivo a retomada de estudos experimentais com a soja *Glycine max* cv. Minimax, bem como avaliar a reposta deste potencial modelo sob condições de omissão nutricional e aplicação de biofertilizante. Além disso, vamos fazer uma caracterização morfológica entre Minimax e Williams 82 e especificar quais os principais parâmetros que tornam a cultivar miniatura Minimax um bom modelo para estudos com soja. Por fim, vamos relatar aqui a primeira população de linhagem endogâmica recombinante, ainda se encontra em andamento, no entanto, será de extrema importância nos estudos de função gênica com Minimax, e descoberta de novos QTLs de interesse agrônômico para soja.

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 A família Fabaceae (Leguminosas)

As leguminosas constituem um dos táxons agrícolas mais importantes do mundo. São muito interessante para sistemas de produção, como melhoria da fertilidade do solo através da fixação biológica de nitrogênio (FBN), alimentação animal, controle da erosão do solo, fonte de combustível e uma série de outros benefícios (Muoni *et al.*, 2019). A família das leguminosas compreende 800 gêneros e 20.000 espécies (Lewis *et al.*, 2005) e representa a terceira maior família de Angiospermas. As primeiras leguminosas aparecem durante o Paleoceno, cerca de 56 milhões de anos atrás (Herendeen, 2001; Wing *et al.*, 2004). Tradicionalmente são reconhecidas três subfamílias de leguminosas: cesalpinióideas, mimosóideas e papilionóideas (Polhill *et al.*, 1981). Este último grupo em específico, tem uma importância muito grande com o aumento da população global, estima-se chegar até 8 bilhões de pessoas até 2050, e assim a produção agrícola precisa ser aumentada entre 60% a 100% para alcançar a segurança alimentar mundial (FAO, 2023).

Os membros das Fabaceae incluem muitas espécies economicamente importantes e versáteis, com a maioria fornecendo grãos ou vagens. Destes, fava (*Vicia faba* L.), ervilha forrageira (*Pisum sativum* L.), grão de bico (*Cicer arietinum* L.), lentilhas (*Lens culinaris* Medik.), ervilha (*Lathyrus sativus* L.), feno-grego (*Trigonella*

foenum-graecum) e tremçoço (*Lupinus albus* L.) são categorizados como leguminosas cultivadas em regiões mais frias (Kebede, 2020). Por outro lado, feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), soja (*Glycine max* L.), feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.), feijão bóer (*Cajanus cajan* L.) são categorizados como leguminosas cultivados nas regiões mais quentes (Kebede, 2020).

A fixação simbiótica do nitrogênio (FSBN) por meio da nodulação radicular é uma característica importante das leguminosas e desempenha papéis importantes no crescimento das plantas. Parte deste sucesso, se deve a simbiose com bactérias do solo fixadoras de nitrogênio, chamadas de rizóbios, isso permite que as leguminosas cresçam em solos com falta de nitrogênio (Roy et al., 2020), Este mecanismo desempenhado por leguminosas, foi alvo de estudo intensivo nos últimos 20 anos. Os próximos esforços futuros é melhorar a FSBN em leguminosas, com também planos audaciosos na implementação deste mecanismo em plantas não-leguminosas (Charpentier and Oldroyd, 2010).

1.1.2 A cultura da soja (*Glycine max*)

A soja é a principal cultura oleaginosa do mundo e a principal fonte de proteínas para frangos e porcos (Graham and Vance, 2003) e ocupa o sétimo lugar entre as culturas mundiais por tonelagem colhida (Ross-Ibarra *et al.*, 2007). Esa cultura de grande importância agrícola e alimentar mundial, é uma planta herbácea, da classe Rosidae, ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Papilionoideae, tribo Phaseoleae, gênero *Glycine* L., espécie *max*. Possui folhas trifolioladas, flores com fecundação autógama, vagens de coloração variando de verde pra marrom, sementes lisas e também rugosas, além disso, estas plantas podem apresentar crescimento determinado, indeterminado e semideterminado.

A soja foi domesticada há cerca de 5.000 anos a partir de *Glycine soja*, seu progenitor silvestre, que está distribuído por todo o Leste Asiático, incluindo maior parte da China, Coréia, Japão e parte da Rússia (Larson *et al.*, 2014). O centro de domesticação da soja foi intensamente investigado, sendo propostas diferentes regiões da China como o centro da domesticação desta leguminosa, com base na variação da sequência do cloroplasto (Xu *et al.*, 2002) e registros arqueológicos (Lee *et al.*, 2011). A produção de soja no Brasil para o segundo semestre de 2023 foi algo entorno de 160,2 milhões de toneladas, um pequeno decréscimo na principal cultura

cultivada no país, em função do comportamento climático visto neste ano (CONAB, 2023).

A soja está entre os poucos alimentos proteicos completos de base vegetal com nove aminoácidos essenciais (Living, 2015). Muitos procedimentos culinários, especialmente do mercado asiático tem proposto diversas receitas para elaborar pratos refinados a partir vagem ainda verde. Esse é outro mercado bastante promissor para a criação de cultivares destinada ao preparo de natto, onde as sementes de soja são fermentadas com leveduras benéficas para consumo humano. Muitos programas de monitoramento de doenças dedicam seus esforços para esta cultura muito importante economicamente, acometida por muitos problemas fitopatológicos (Sikora *et al.*, 2014). Boa parte de toda a produção do Brasil é vendida para a China, sendo a maior importadora do grão de todo o mundo. Sendo assim, o mercado da soja se torna mais promissor, no entanto, desafiador, tendo que bater recordes de produtividade todos os anos devido à demanda crescente por alimento no mundo.

1.1.3 Identificação de genes de interesse agrônômico em soja

A soja é uma oleaginosa de importância agrônômica no mundo e uma importante fonte de proteína e óleo para humanos e animais. Cada vez mais tem-se buscado entender, identificar e caracterizar novos genes envolvidos em aspectos de arquitetura e tolerância em acesso de soja, para aumentar produtividade em situações de seca, frio, calor, doenças e fertilidade do solo (Reinhardt and Kuhlemeier, 2002; Wang *et al.*, 2018). Muitos já foram identificados e compreendido sua regulação, o grande entrave é a introgressão dos mesmos em cultivares elites, isso porque nem sempre esses genes são ou estão no genoma da soja, isso é a busca incessante dos maiores grupos de melhoramento genético de soja. Nos próximos tópicos serão descritos os principais processos fisiológicos com interesse agrônômico em soja, cuja base genética ainda não é completamente conhecida.

1.1.3.1 Controle da arquitetura vegetal

A arquitetura vegetal está relacionada com adensamento de plantio e acamamento, processos que comprometem rendimento e qualidade na cultura da soja e outras. A resistência ao acamamento é um objetivo importante nas principais culturas: muitos estudos tem buscado características morfológicas relacionadas ao acamamento, e possam ser usadas como parâmetro de seleção indireta (Chen *et al.*, 2017). Os principais parâmetros como altura de planta (Islam *et al.*, 2007), resistência do caule (Chen *et al.*, 2011b; Kashiwagi and Ishimaru, 2004), diâmetro do caule (Kashiwagi *et al.*, 2008), comprimento do entrenó (Berry *et al.*, 2006; Sameri *et al.*, 2009), número de nós (Chen *et al.*, 2011b), número de ramos (Landi *et al.*, 2006), sistema radicular (Keller *et al.*, 1999; Landi *et al.*, 2006), componentes químicos estruturais como lignina, celulose (Kashiwagi and Ishimaru, 2004; Ma, 2009; Wang *et al.*, 2012), silício (Ma and Yamaji, 2006), tem sido pesquisados para uso no melhoramento genético.

Atualmente, a altura ideal para cultivares comerciais de soja é normalmente de 70 a 90 cm, com povoamentos mais curtos ou mais lentos levando a reduções de rendimento (Chen and Nelson, 2006; Huang *et al.*, 2011; Josie *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 1997). Os atuais programas de melhoramento moderno, tem utilizado a ferramenta de seleção assistida por marcadores (MAS), isso acelera a criação de soja com altura de planta adequada para rendimento ótimo (Cao *et al.*, 2017). Além disso, numerosos QTLs (loci de características quantitativas) associados à altura de plantas foram identificados em muitas culturas, e vários genes correspondentes foram clonados baseados em mapeamento genômico (Yang *et al.*, 2021).

Para soja, um grande número de QTLs distribuídos ao longo dos 20 cromossomos já foram associados à altura de plantas, número de nós do caule e comprimento dos entrenós, respectivamente, de acordo com a base de dados publicamente disponível (www.soybase.org). Entre esses QTLs, foram identificados dois genes, *Dt1* e *Dt2*, os quais afetam a terminação do caule na soja (Bernard, 1972). Um alelo recessivo *dt1*, e um alelo dominante *Dt2*, aceleram o termino do crescimento apical do caule, o que diminui a altura de planta de número de nós (Liu *et al.*, 2010). Destes, *dt1* tem um efeito mais expressivo, além disso, foram bem documentados na relação com arquitetura da parte aérea da soja e ao rendimento final de grãos (Yang *et al.*, 2021). Outro alelo recessivo, *dt1-t*, também afeta o fenótipo da planta

similarmente a *dt1*, mas compromete significativamente a terminação do caule (Thompson *et al.*, 1997). Interessantemente, foi comprovado que o gene *TERMINAL FLOWER 1 (FT)* de *Arabidopsis thaliana* é ortólogo ao gene *Dt1* na soja, permitindo a validação funcional deste em um sistema heterólogo (Liu *et al.*, 2010).

Outros genes que regulam a arquitetura vegetal também foram bem caracterizados, como *SQUAMOSA-Promoter Binding Protein-Like (SPL)* e *Late Elongated Hypocotyl (LHY)* (Bao *et al.*, 2019). O gene *SPL* parece ser regulado por microRNAs, especialmente o miR156 para afetar a arquitetura da planta de soja (Sun *et al.*, 2019), além disso, foi verificado que isto resultou no aumento de rendimento da planta, maior número de ramos, nós e vagens. O mutante de soja *GmLHY* apresentou redução na altura e entrenós mais curtos (Cheng *et al.*, 2019). Inclusive, recentemente *GmMYB14* foi caracterizado como um fator de importância no controle da arquitetura da planta, além da tolerância a seca através das vias dos brassinoesteróides (BR) na soja (Chen *et al.*, 2021).

Descobriu-se que *GmLPA1*, codifica uma proteína semelhante *APC8*, controla o ângulo do pecíolo (Gao *et al.*, 2017). Um novo regulador responsável pelo controle do desenvolvimento de folhas e flores na soja foi relatado, chamado de *Chicken Toes – Like Leaf and Petalody Flower (CTP)* (Zhao *et al.*, 2017). Assim, foi comprovado que boa partes desses genes desempenham papéis críticos em vários programas de melhoramento (Chen *et al.*, 2018; Miedaner *et al.*, 2019). Por exemplo, o gene da Revolução Verde, *sd1 (semi dwarf 1)*, está associado a plantas de arroz encurtadas (Srivastava *et al.*, 2019). Ainda, o conhecido gene anão do trigo *Rht (Reduced height)* que confere resistência ao acamamento e maior alocação de assimilados nos grãos (Grover *et al.*, 2018; Miedaner *et al.*, 2019). Do mesmo modo, a superexpressão da *ZmPIN1a* (proteínas da família PIN) no milho (*Zea mays*) reduz significativamente a altura da planta, o comprimento dos entrenós e o comprimento das espigas (Li *et al.*, 2018). Igualmente, funções semelhantes foram documentadas para outros QTLs ou genes responsáveis pela altura de plantas, incluindo *qDH1*, *qDTH8*, *D18 (DWARF 18)*, *D61 (DWARF 61)*, *brd1* (dependente de brassinoesteróides 1), *HTD2*, *IPA1*, *MPH1*, *SLR1* e *Sddt* (semi-anão dominante (Chen *et al.*, 2018; B. M. Liu *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2013; Mori *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2016, 2017).

1.1.3.2 Regulação fotoperiódica do florescimento

A soja é uma planta sensível ao fotoperíodo, que floresce em dias curtos (Miranda *et al.*, 2020). A regulação da floração fotoperiódica é uma característica agrônômica importante para qualidade e produtividade da soja. Por tanto, a análise do mecanismo molecular da regulação fotoperiódica da floração da soja pode fornecer uma base teórica para resolver a contradição entre maturidade precoce e alto rendimento, e a criação de variedades de cultivo de soja de alto rendimento e alta qualidade (Luo *et al.*, 2021). Ainda, na década de 1920, pesquisadores observaram que variedades de soja semeadas em épocas diferentes do ano tinham o florescimento quase no mesmo tempo, assim usaram dois modelos para entender o fotoperíodo, soja e tabaco (Garner e Allard., 1920).

Por abordagens tradicionais da genética, descobriu-se que uma série de variações genéticas importantes na soja, incluindo o gene *E1* (Xia *et al.*, 2012), que pode reprimir floração em condições de dias longos. *E2*, codifica uma proteína homóloga de *Arabidopsis GIGANTEA (GI)*, componente chave do relógio circadiano (Bernard, 1972; Watanabe *et al.*, 2011). *E3* (Buzzell, 1971) e *E4* (Buzzell, 1980), estes são funcionalmente redundantes e codificam os fitocromos *GmPHYA3* (Watanabe *et al.*, 2009a) e *GmPHYA2* (B. Liu *et al.*, 2008; Tsubokura *et al.*, 2013). Entre estes existem outros como, *E5* (McBlain and Bernard, 1987), *E6* (Bonato and Vello, 1999), *E7* (Cober and Voldeng, 2001a), *E8* (Cober and Voldeng, 2001b), *E9* (Kong *et al.*, 2014), *E10* (Samanfar *et al.*, 2017), *E11* (Wang *et al.*, 2019), *J* (Ray *et al.*, 1995), locus importante na adaptação da soja a baixas latitudes e também codifica um homólogo *EARLY FLOWERING 3 (ELF3)* (Fang *et al.*, 2021). Assim como, vários QTLs, como *Tof11/Gp11* e *Tof12/Gp1/qFT12-1* (Lu *et al.*, 2020), *Tof16* (Dong *et al.*, 2021), *LJ16.1* e *LJ16.2* (X. Li *et al.*, 2021) foram identificados como envolvidos diretamente no controle da floração e maturidade da soja (Lin *et al.*, 2021). Os alelos dominantes, *E1*, *E2*, *E3*, *E4*, *E7*, *E8* e *E10* inibem a floração, enquanto os alelos dominantes em *E6*, *E9*, *E11* e *J* promovem a floração (Lin *et al.*, 2021). Além disso, *E1*, *E3*, *E4*, *E7* e *E8* estão envolvidos na sensibilidade do fotoperíodo, em diferentes qualidades de luz sob dias longos (DL) induzidos artificialmente (Cao *et al.*, 2016).

Até o momento os genes *E1*, *E4* e *E9* são os mais estudados com profundidade. Tanto *E3* e *E4* são genes do fitocromo A (*PHYA*), *GmPHYA2* e *GmPHYA3*, em virtude disto, sabe-se que as plantas de soja exibem respostas diferentes a comprimentos de

ondas distintos, principalmente em luz vermelha (V) e luz vermelha distante (VD) (Cober *et al.*, 1996). Ainda, *GmPHYA3* (*E3*) participa do controle do florescimento sob dias longos com alta razão quântica (V:VD) (Watanabe *et al.*, 2009b), ao passo que, *GmPHYA2* (*E4*) é responsável pelo florescimento sob baixas razão quântica (V:VD). Entre estes, o locus *E1* da soja tem maior impacto nos períodos de floração e maturidade, localizado no cromossomo 6 (Luo *et al.*, 2021), além do mais, é inibido em dias curtos e, dias longos induzem a expressão de *E1*. Esta é a principal razão pela qual a soja se tornou uma cultura de dia curto.

1.1.3.3 Tamanho da semente

A soja é uma cultura que possui a formação de suas sementes condicionadas em vagens. Existem muitos genes que controlam características agronômicas em soja, muitos deles possuem informação ainda incipiente, um caso destes, é o(s) gene(s) que controlam o tamanho da semente. Esta característica agronômica da soja é de extrema relevância, tendo em vista, que o rendimento da soja está atrelado diretamente ao tamanho e peso da semente. Alguns estudos nos últimos anos foram realizados para identificar a base genética em soja que são responsáveis por controlar o tamanho da semente. Algumas informações da base genética é explorada em outras plantas, como o modelo *Arabidopsis*, em que o tamanho das sementes são controladas por genes da família P450/CYP8A, essa família de genes é altamente conservada na maioria das plantas, como a soja (Fang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2008). Neste sentido, foi identificado genes ortólogos em soja, como *GmCYP78A10*, *GmCYP78A72*, *GmCYP78A7* e *GmCYP78A70* que mostraram funções conservadas para controlar o tamanho da semente (Du *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2016). Além, disso, genes de outras famílias foram relacionados com o controle do tamanho da semente, estes incluem: *BIG SEEDS1* (BS1) (Ge *et al.*, 2016), *GmKIX8-1* (Nguyen *et al.*, 2021), *GmCIF1* (Tang *et al.*, 2016), *GmPSKy1* (Yu *et al.*, 2019), *WRKY15a* (Gu *et al.*, 2017), fosfatase 2C-1 (*PP2C-1*) (Lu *et al.*, 2017).

Ainda neste sentido, outros estudos apontam que *GmST05* está envolvido no rendimento e tamanho das sementes: este gene é um homólogo de *MOTHER OF FLOWERING LOCUS T* de *Arabidopsis* (Duan *et al.*, 2022). Entender as principais bases genéticas do controle de rendimento e tamanho da semente, nos remete a olhar para o passado, ou seja, quais eventos gênicos de seleção ocorreram? Até o momento

não se sabe quais genes governam o tamanho da semente e teor de óleo. Mais recentemente vários loci de características quantitativas (QTLs) foram relatados na base de dados da soja a partir de estudos anteriores que são expressos nas fases crescimento e desenvolvimento das sementes (SoyBase <https://soybase.org/>). O grande questionamento para os pesquisadores de soja tentam descobrir é se o efeito da seleção de materiais para maior rendimento está atribuído por seleção de um gene pleiotrópico ou pela seleção de genes individuais que governam características independentes (S. Wang *et al.*, 2020).

Interessantemente, um estudo recent mostrou que o gene *CONSTANS* (*CO*) que tem sua ação principal na via de regulação fotoperiódica das plantas, controla o tamanho das sementes de forma dependente na soja, os pesquisadores chegaram a essa conclusão devido *CO* inibir a expressão do gene *APETALA 2* (*AP2*), na transição rítmica de dias longos (DL) para dias curtos (DC), essa cascata reguladora *CO-AP2* medeia a proliferação de células de revestimento na semente, e isso faz com que ocorra o incremento no tamanho das sementes (Yu *et al.*, 2023). Um novo gene foi identificado em soja, envolvido no desenvolvimento da semente, denominado como *Novel Seed Size* (*NSS*) a partir de um mutante insercional de T-DNA (S006) da linhagem transgênica *GmFTL4pro:GUS*, a mutação desse gene causa a formação de células tegumentares menores, sementes pequenas e pesos menores de 100 sementes (Zhang *et al.*, 2023). Nos últimos anos muitos QTLs envolvidos no controle do tamanho/peso de sementes de soja foram relatados por meio mapeamento genético e associação genômica, no entanto, determinar com precisão os genes relacionados os QTLs é uma tarefa que os melhoristas estão buscando, isso está relacionado a falta de uma população de mapeamento adequada e a complexidade envolvida na piramidação de múltiplos genes associados a vários loci.

Em um estudo de identificação de QTLs para as principais características de tamanho/peso de sementes em soja, um total de 85 QTLs associados a essa característica foi acessado em material de linhagens endogâmicas recombinantes (RILs) a partir do cruzamento entre Guizao1xB13 (GB13) (Luo *et al.*, 2023). Na tentativa de facilitar a associação genômica entre outros resultados obtidos para os parâmetros de tamanho/peso da semente se soja foi construindo um mapa genético, este recurso é fundamental na seleção assistida por marcadores (Jiang *et al.*, 2023). Apesar de todos os avanços genéticos e moleculares feitos até o momento, existe

muito ainda a se fazer para compreendermos a regulação entre esses múltiplos genes que estão envolvidos no controle do tamanho/peso de sementes de soja.

1.1.3.4 Resistência aos estresses bióticos e abióticos

Os estresses bióticos e abióticos afetam a produtividade e qualidade da soja (Anderson *et al.*, 2019). O estresse causado por seca, salinidade, estresse térmico, inundações e doenças tem sido estudados intensamente em soja (K. Li *et al.*, 2021; Shu *et al.*, 2020; Widyasari *et al.*, 2020). Estresse por seca, foi relatado que vários fatores de transcrição desempenham papéis importantes na tolerância a seca na soja, famílias de genes *WRKY* e *NAC*. Por exemplo, *GmWRKY54* aumenta a tolerância a seca ativando genes da sinalização de ácido abscísico (Wei *et al.*, 2019). Assim como, a superexpressão de *GmNAC8* exibe maior tolerância a seca, sugerindo que *GmNAC8* é um regulador positivo da tolerância à seca (C. Yang *et al.*, 2020). O gene *U-box* da soja *GmPUB6* regula a tolerância à seca em *Arabidopsis* (N. Wang *et al.*, 2020). Vários relatórios sugerem que os genes do relógio circadiano também estão envolvidos na tolerância à seca, como os *GmLHYs* e *GmLCL* (Wang *et al.*, 2021; Yuan *et al.*, 2021). Outros genes envolvidos pela densidade da pubescência (*Pd1*, *P1*, *Ps* e *Pd2*), também estão envolvidos na tolerância à seca na soja (Liu *et al.*, 2020; Pfeiffer *et al.*, 2003). A tolerância à seca na soja por meio da transformação de genes estranhos também foi alcançada pela superexpressão de cistatina de arroz *orizacistatina I (OCI)*, *Arabidopsis DREB1A* e o fator de transcrição do girassol *HB4* (Quain *et al.*, 2014; Rakocevic *et al.*, 2018; Ribichich *et al.*, 2020).

No estresse por salinidade, dois grupos de pesquisa descobriram independentemente que *GmSALT3*, codifica um trocador de cátions/ H^+ , limitando o acúmulo de íons sódio (Na^+) em brotos e aumentando a tolerância a salinidade na soja (Qi *et al.*, 2014). Outro gene que tem efeito na tolerância a salinidade na soja foi relatado, *GmNAC109* e *SALT INDUCED NAC1 (GmSIN1)*, os quais aumentam o sistema radicular e geram tolerância à salinidade por meio da regulação positiva de genes associados a síntese de ABA e geração de ROS (Li *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2019). Curiosamente, o micro-RNA miR172 parece também está envolvido resposta ao estresse salino, isso por promover a clivagem do gene *SSAC1* do fator de transcrição do tipo *AP2/EREBP*, liberando sua inibição no *THI1*, que codifica um regulador positivo na tolerância ao sal (Pan *et al.*, 2016).

Membros da família do fator de transcrição do tipo *AP2/ERF*, incluindo *GmERF3* e *GsERF7*, desempenham papéis sob resistência a doenças, salinidade e a seca (Feng *et al.*, 2020). Além disso, os fatores de transcrição do tipo *DREB1/CBF* funcionam em estresse de calor, seca e frio (Kidokoro *et al.*, 2015). Para doenças, o nematóide do cisto da soja (NCS), é o patógeno mais devastador da soja nos Estados Unidos. *Rhg1* e *Rhg4* são dois principais QTLs/genes que transmitem resistência ao NCS (Mitchum, 2016). Recentemente, descobriu-se que um gene que codifica uma proteína contendo o motivo VQ, *GmVQ58*, aumenta a resistência da soja à lagarta comum (*Spodoptera litura Fabricius*) (Li *et al.*, 2020). Na ferrugem asiática da soja, o gene *CcRpp1* do feijão bóer foi transferido para soja, exibiu resistência a ferrugem asiática (Langenbach *et al.*, 2016). A podridão do caule e da raiz de soja, pode ser controlado quando há expressão dos genes *GmERF5* (Dong *et al.*, 2015), *GmMYB29A2* (Jahan *et al.*, 2020), assim como microRNAs miR393 (Wong *et al.*, 2014). Ainda, recentemente o gene *GmST1*, que codifica uma sulfotransferase, foi identificado por conferir resistência a cepas do vírus do mosaico da soja (Zhao *et al.*, 2021).

1.1.4 Modelos genéticos em estudos de plantas

Uma grande parte do conhecimento sobre biologia vegetal se deve aos organismos modelos estabelecidos. Modelos genéticos bem estabelecidos facilitam a compreensão e a disseminação deste conhecimento para as demais espécies cultivadas no mundo. Tal fato possui tanta magnitude, que o próprio Mendel em seus estudos de segregação em ervilhas (*Pisum sativum*) começa descrevendo a importância das características intrínsecas do material biológico de estudo, como por exemplo, caracteres fenotípicos distinguíveis entre as espécies, fertilidade e vigor, para que pudesse afirmar e validar seus resultados para outras plantas (Mendel, 1970).

Alguns critérios são preferidos para determinação de um bom modelo biológico. *Arabidopsis*, pertencente à família Brassicaceae, não possui valor comercial diretamente, no entanto, é a principal planta utilizada em pesquisas científicas desde a década de 1980. Possui muitas vantagens buscadas em um organismo modelo, incluindo curto tempo entre gerações, tamanho pequeno, prolificidade e um genoma relativamente pequeno (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Assim, *Arabidopsis* foi originalmente adotada como organismo modelo devido a sua versatilidade para

experimentos genéticos (Koornneef and Meinke, 2010). Além disso, muito se buscava entender a função e regulação de determinados genes em plantas, depois do sequenciamento completo de *Arabidopsis* no ano de 2000, com 125 megabases, 25.498 genes responsáveis por codificar proteínas de 11.000 famílias (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000).

A planta de *Arabidopsis* germina, floresce e frutifica em 59 dias, isso em virtude do seu habitat e histórico evolutivo (Krämer, 2015b). Esse tipo de ciclo não é comumente encontrado para outros grupos de plantas com importância econômica, assim, *Arabidopsis* não é um modelo biológico suficientemente representativo para todas as plantas, o que faz necessários o estabelecimento de novos modelos biológicos que se encaixem dentro de características ambientais comuns em plantas de interesse comercial. Sabe-se que plantas de *Arabidopsis* não realizam interação ecológica com agentes polinizadores (Vandenbussche et al., 2016), ou ainda, associações fúngicas e bacterianas (Krämer, 2015b).

O ano de 1997 foi um marco para os estudos genéticos, pois uma cultivar foi lançada como modelo biológico, pertencente à família Solanaceae, denominada como *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom, criada a partir de uma cultivar para fins ornamentais. Porém, devido a suas características muito interessantes para cultivo em ambientes laboratoriais, como porte pequeno, crescimento adequado mesmo em alto adensamento, ciclo curto, produção de muitas sementes, interações micorrízicas e facilidade na transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, se tornou um modelo excelente para estudos com plantas (Meissner et al., 1997). Para os estudos genômicos foi de grande importância por representar plantas de aptidão agrícola, isso devido ao sequenciamento completo em 2012, com tamanho de 900 Mb, vislumbrando novos achados em função da complexidade quando comparado com *Arabidopsis* de 125 Mb (The Tomato Genome Consortium, 2012).

A vantagem deste modelo para tomateiro, além das outras características descritas é devido ao seu tamanho muito diminuto, e justamente essa característica é desafiante nos estudos com materiais vegetais de aptidão agrícola. MT é mutante para os genes *SELF-PRUNING* (*SP*) e *DWARF* (*D*) ((Meissner et al., 1997) Marti, 2006). Sabendo isto, foi possível explorar bases genéticas e processos de regulação destes genes e ainda cruzar estas informações por meio de homologia em diferentes plantas como *Arabidopsis*, e descobrir que os genes da família *CETS* responsáveis por codificar proteínas que regulam o crescimento do meristema apical do caule

(Pnueli *et al.*, 2001), e mutações no gene *SP* pode gerar fenótipos de hábito de crescimento determinado (Pnueli *et al.*, 1998). Ainda, o gene *D* é responsável por codificar proteínas da família P450 (Bishop *et al.*, 1999) envolvidas no processo de regulação na rota de biossíntese de brassinoesteróides (Shimada *et al.*, 2001).

Nos estudos de gramíneas dois sistemas modelo são mais estudados como arroz e milho, isso a partir do sequenciamento do genoma de arroz em 2002 (Goff *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002) e o genoma do milho em 2009 (Schnable *et al.*, 2009), inaugurou-se uma nova era da genômica funcional nas gramíneas usando populações mutagenizadas para descobertas de genes (Hirochika *et al.*, 2004). Assim, dentro das perspectivas criadas para os diferentes grupos de plantas como a distinção entre metabolismos C_3 e C_4 , os sistemas modelo de arroz e milho até então apresentam alguns impasses como porte grande, requisitos exigentes de crescimento, longo tempo entre gerações e dificuldade de transformação (Brutnell *et al.*, 2015). Neste sentido, (Z. Yang *et al.*, 2020b) desenvolveram um modelo biológico para metabolismo C_4 , denominado como mini-milheto rabo-de-raposa com um ciclo de vida semelhante ao de *Arabidopsis*.

Para as leguminosas, em estudos principalmente com foco em organismos capazes de fixar nitrogênio a *Medicago truncatula* (Wang *et al.*, 2010) é o principal modelo utilizado, por algumas características únicas: tamanho compacto do genoma (~465 Mb), ciclo de vida rápido, ferramentas genéticas acessíveis, fácil transformação, rica coleção de mutantes e ecótipos (Tang *et al.*, 2014), assim, como um banco de dados de conhecimento especializado para esta leguminosa (Carré *et al.*, 2020).

Ainda sobre leguminosas, a soja *G. max* var. Williams 82 impulsionou uma crescente nos estudos genômicos e seleção de genes de interesse para essa cultura, a partir do sequenciamento genômico completo em 2010 (Schmutz *et al.*, 2010b). Após isso, montaram um genoma de uma soja selvagem (*Glycine soja* var. IT182932) (Kim *et al.*, 2010). Surgiu também o genoma de soja chinês, se trata do cultivar 'Zhonghuang 13' (*Gmax_ZH13*) usando sequenciamento em tempo real, mapeamento óptico e sequenciamento de próxima geração (Hiseq) (Shen *et al.*, 2019, 2018). Em 2019. Montaram um genoma de referência para soja selvagem W05 (Xie *et al.*, 2019). Construção e comparação para o genoma de outras duas cultivares e uma soja selvagem também foi publicado (Valliyodan *et al.*, 2019). Em 2014, tem-se o primeiro pan-genoma de soja montado a partir de sete sojas selvagens (Li *et al.*, 2014). Recentemente, construíram um pan-genoma de soja de 26 sojas silvestres (Liu and

Tian, 2020). Isso fornece aos estudos com soja uma plataforma promissora nos estudos futuros (Liu and Tian, 2020; Tao *et al.*, 2020).

Porém, Williams 82 não tem as características normalmente atribuídas e desejadas para um bom sistema modelo, como foi descrito anteriormente. Então, surge em 2007, antes mesmo do primeiro genoma sequenciado de soja, uma cultivar com características próprias de um bom modelo biológico, chamada de MiniMax (PI643148) que possui ciclo de vida rápido, baixa estatura e marcadores característicos de repetição de sequência simples (Matthews *et al.*, 2007), proposto com a ideia na triagem de mutantes, genômica funcional, mapeamento genético e outros estudos envolvendo soja (Klink *et al.*, 2008). Além, disso foi desenvolvido um protocolo eficiente de regeneração por embriogênese somática (Klink *et al.*, 2008).

No entanto, apesar de MiniMax possuir todos os atributos para um potencial modelo em estudos com leguminosas, observou-se pouco interesse e investimentos de grupos de pesquisa em estudos mais avançados. Alguns experimentos de validação como um bom modelo para pesquisas básicas e refinadas são necessários para consolidar este material, incluindo protocolos de cultivo em casa de vegetação, sequenciamento do genoma, caracterização morfológica e anatômica, uma população mutagenizada variante de MiniMax, além de comparações com mais genótipos de soja diferente. Desta forma, este material em potencial é uma grande promessa para estudos genômicos de soja para o futuro.

REFERÊNCIAS

- Anderson EJ, Ali ML, Beavis WD, Chen P, Clemente TE, Diers BW, Graef GL, Grassini P, Hyten DL, McHale LK, Nelson RL, Parrott WA, Patil GB, Stupar RM, Tilmon KJ (2019).** Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] Breeding: History, Improvement, Production and Future Opportunities, in: Al-Khayri, J.M., Jain, S.M., Johnson, D.V. (Eds.), *Advances in Plant Breeding Strategies: Legumes*. Springer International Publishing, Cham, pp. 431–516. https://doi.org/10.1007/978-3-030-23400-3_12
- Bao A, Chen H, Chen L, Chen S, Hao Q, Guo W, Qiu D, Shan Z, Yang Z, Yuan S, Zhang C, Zhang X, Liu B, Kong F, Li X, Zhou X, Tran LSP, Cao D (2019).** CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of *GmSPL9* genes alters plant architecture in soybean. *BMC Plant Biol* 19, 131. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1746-6>
- Barreiros T, Young A, Cavalcante R, Queiroz E (2020).** Impact of biodiesel production on a soybean biorefinery. *Renewable Energy* 159, 1066–1083. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.06.064>
- Bernard RL (1972).** Two Genes Affecting Stem Termination in Soybeans ¹. *Crop Science* 12, 235–239. <https://doi.org/10.2135/cropsci1972.0011183X001200020028x>
- Berry PM, Sterling M, Mooney SJ (2006).** Development of a Model of Lodging for Barley. *J Agronomy Crop Science* 192, 151–158. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2006.00194.x>
- Bilyeu K, Gillman JD, LeRoy AR (2011).** Novel *FAD3* Mutant Allele Combinations Produce Soybeans Containing 1% Linolenic Acid in the Seed Oil. *Crop Science* 51, 259–264. <https://doi.org/10.2135/cropsci2010.01.0044>
- Bishop GJ, Nomura T, Yokota T, Harrison K, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Jones JDG, Kamiya Y (1999).** The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 1761–1766. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1761>
- Bonato ER, Vello NA (1999).** E6, a dominant gene conditioning early flowering and maturity in soybeans. *Genet. Mol. Biol.* 22, 229–232. <https://doi.org/10.1590/S1415-47571999000200016>

- Brutnell TP, Bennetzen JL, Vogel JP (2015).** *Brachypodium distachyon* and *Setaria viridis*: Model Genetic Systems for the Grasses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66, 465–485. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105528>
- Buzzell RI (1971).** Inheritance of a soybean flowering response to fluorescent-daylength conditions. *Can. J. Genet. Cytol.* 13, 703–707. <https://doi.org/10.1139/g71-100>
- Campos ML, Carvalho R, Benedito VA, Peres LEP (2010).** Small and remarkable: The Micro-Tom model system as a tool to discover novel hormonal functions and interactions. *Plant Signaling & Behavior* 5, 267–270. <https://doi.org/10.4161/psb.5.3.10622>
- Cao D., Takeshima, R., Zhao, C., Liu, B., Jun, A., Kong, F., 2016.** Molecular mechanisms of flowering under long days and stem growth habit in soybean. *EXBOTJ* erw394. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw394>
- Cao Y, Li S, He X, Chang F, Kong J, Gai J, Zhao T (2017).** Mapping QTLs for plant height and flowering time in a Chinese summer planting soybean RIL population. *Euphytica* 213, 39. <https://doi.org/10.1007/s10681-016-1834-8>
- Carrere S, Verdenaud M, Gough C, Gouzy J, Gamas P (2020).** LeGOO: An Expertized Knowledge Database for the Model Legume *Medicago truncatula*. *Plant and Cell Physiology* 61, 203–211. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz177>
- Carvalho RF, Campos ML, Pino LE, Crestana SL, Zsögön A, Lima JE, Benedito VA, Peres LE (2011).** Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: “Micro-Tom” as an effective toolkit for plant development research. *Plant Methods* 7, 18. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-7-18>
- Charpentier M, Oldroyd G (2010).** How close are we to nitrogen-fixing cereals? *Current Opinion in Plant Biology* 13, 556–564. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.08.003>
- Chen H, Shan Z, Sha A, Wu B, Yang Z, Chen S, Zhou R, Zhou X (2011).** Quantitative trait loci analysis of stem strength and related traits in soybean. *Euphytica* 179, 485–497. <https://doi.org/10.1007/s10681-011-0382-5>

- Chen H, Yang Z, Chen L, Zhang C, Yuan S, Zhang X, Qiu D, Wan Q, Zhan Y, Chen S, Shan Z, Zhou X (2017).** Combining QTL and candidate gene analysis with phenotypic model to unravel the relationship between lodging and related traits in soybean. *Mol Breeding* 37, 43. <https://doi.org/10.1007/s11032-017-0645-5>
- Chen L, Yang H, Fang Y, Guo W, Chen H, Zhang X, Dai W, Chen S, Hao Q, Yuan S, Zhang C, Huang Y, Shan Z, Yang Z, Qiu D, Liu X, Tran LP, Zhou X, Cao D (2021).** Overexpression of *GmMYB14* improves high-density yield and drought tolerance of soybean through regulating plant architecture mediated by the brassinosteroid pathway. *Plant Biotechnology Journal* 19, 702–716. <https://doi.org/10.1111/pbi.13496>
- Chen X, Xu P, Zhou J, Tao D, Yu D (2018).** Mapping and breeding value evaluation of a semi-dominant semi-dwarf gene in upland rice. *Plant Diversity* 40, 238–244. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2018.09.001>
- Chen Y, Nelson RL (2006).** Variation in Early Plant Height in Wild Soybean. *Crop Science* 46, 865–869. <https://doi.org/10.2135/cropsci2005.07-0202>
- Cheng Q, Dong L, Su T, Li T, Gan Z, Nan H, Lu S, Fang C, Kong L, Li H, Hou Z, Kou K, Tang Y, Lin X, Zhao X, Chen L, Liu B, Kong F (2019).** CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of *GmLHY* genes alters plant height and internode length in soybean. *BMC Plant Biol* 19, 562. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2145-8>
- Cober ER, Tanner JW, Voldeng HD (1996).** Genetic Control of Photoperiod Response in Early-Maturing, Near-Isogenic Soybean Lines. *Crop Science* 36, 601–605. <https://doi.org/10.2135/cropsci1996.0011183X003600030013x>
- Cober ER, Voldeng HD (2001).** Low R:FR Light Quality Delays Flowering of *E7E7* Soybean Lines. *Crop Science* 41, 1823–1826. <https://doi.org/10.2135/cropsci2001.1823>
- Cober ER, Voldeng HD (2001).** A New Soybean Maturity and Photoperiod-Sensitivity Locus Linked to *E1* and *T*. *Crop Science* 41, 698–701. <https://doi.org/10.2135/cropsci2001.413698x>

- Da Silva CA, Conejero MA, Barros R EC, Batalha MO (2019).** Competitiveness analysis of “social soybeans” in biodiesel production in Brazil. *Renewable Energy* 133, 1147–1157. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.08.108>
- Dardick C, Callahan A, Horn R, Ruiz KB, Zhebentyayeva T, Hollender C, Whitaker M, Abbott A, Scorza R (2013).** Pp1 TAC 1 promotes the horizontal growth of branches in peach trees and is a member of a functionally conserved gene family found in diverse plants species. *The Plant Journal* 75, 618–630. <https://doi.org/10.1111/tpj.12234>
- Demorest ZL, Coffman A, Baltes NJ, Stoddard TJ, Clasen BM, Luo S, Retterath A, Yabandith A, Gamo ME, Bissen J, Mathis L, Voytas DF, Zhang F (2016).** Direct stacking of sequence-specific nuclease-induced mutations to produce high oleic and low linolenic soybean oil. *BMC Plant Biol* 16, 225. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0906-1>
- Dong L, Cheng Y, Wu J, Cheng Q, Li W, Fan S, Jiang L, Xu Z, Kong F, Zhang D, Xu P, Zhang S (2015).** Overexpression of GmERF5, a new member of the soybean EAR motif-containing ERF transcription factor, enhances resistance to *Phytophthora sojae* in soybean. *Journal of Experimental Botany* 66, 2635–2647. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv078>
- Dong, L et al (2021).** Genetic basis and adaptation trajectory of soybean from its temperate origin to tropics. *Nat Commun* 12, 5445. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25800-3>
- Du J, Wang S, He C, Zhou B, Ruan YL, Shou H (2017).** Identification of regulatory networks and hub genes controlling soybean seed set and size using RNA sequencing analysis. *EXBOTJ* erw460. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw460>
- Duan Z, Zhang M, Zhang Z, Liang S, Fan L, Yang X, Yuan Y, Pan Y, Zhou G, Liu S, Tian Z (2022).** Natural allelic variation of *GMST05* controlling seed size and quality in soybean. *Plant Biotechnology Journal* 20, 1807–1818. <https://doi.org/10.1111/pbi.13865>
- Fang C, Liu J, Zhang T, Su T, Li S, Cheng Q, Kong L, Li X, Bu T, Li H, Dong L, Lu S, Kong F, Liu B (2021).** A recent retrotransposon insertion of *J* caused *E6* locus facilitating

soybean adaptation into low latitude. *JIPB* 63, 995–1003. <https://doi.org/10.1111/jipb.13034>

Fang W, Wang Z, Cui R, Li J, Li Y (2012). Maternal control of seed size by *EOD3/CYP78A6* in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 70, 929–939. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.04907.x>

Feng X, Feng P, Yu H, Yu X, Sun Q, Liu S, Minh TN, Chen J, Wang D, Zhang Q, Cao L, Zhou C, Li Q, Xiao J, Zhong S, Wang A, Wang L, Pan H, Ding X (2020). GsSnRK1 interplays with transcription factor GsERF7 from wild soybean to regulate soybean stress resistance. *Plant Cell & Environment* 43, 1192–1211. <https://doi.org/10.1111/pce.13726>

Gao J, Yang S, Cheng W, Fu Y, Leng J, Yuan X, Jiang N, Ma J, Feng X (2017). GmILPA1, Encoding an anaphase-promoting complex-like Protein, affects Leaf Petiole Angle. *Plant Physiol.* pp.00074.2017. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00074>

Ge L, Yu J, Wang H, Luth D, Bai G, Wang K, Chen R (2016). Increasing seed size and quality by manipulating *BIG SEEDS1* in legume species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 12414–12419. <https://doi.org/10.1073/pnas.1611763113>

Goff SA et al (2002). A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* 296, 92–100. <https://doi.org/10.1126/science.1068275>

Graham PH, Vance CP (2003). Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiology* 131, 872–877. <https://doi.org/10.1104/pp.017004>

Grover G, Sharma A, Gill HS, Srivastava P, Bains NS (2018). Rht8 gene as an alternate dwarfing gene in elite Indian spring wheat cultivars. *PLoS ONE* 13, e0199330. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199330>

Gu Y, Li W, Jiang H, Wang Y, Gao H, Liu M, Chen Q, Lai Y, He C (2017). Differential expression of a WRKY gene between wild and cultivated soybeans correlates to seed size. *Journal of Experimental Botany* 68, 2717–2729. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx147>

- Hirochika H, Guiderdoni E, An G, Hsing Y, Eun MY, Han C, Upadhyaya N, Ramachandran S, Zhang Q, Pereira A, Sundaresan V, Leung H (2004).** Rice Mutant Resources for Gene Discovery. *Plant Mol Biol* 54, 325–334. <https://doi.org/10.1023/B:PLAN.0000036368.74758.66>
- Huang ZW, Wang W, Xu XJ, Wen ZX, Li HC, Li JY, Lu WG (2011).** Relationship of Dynamic Plant Height and Its Relative Growth Rate with Yield Using Recombinant Inbred Lines of Soybean: Relationship of Dynamic Plant Height and Its Relative Growth Rate with Yield Using Recombinant Inbred Lines of Soybean. *AA S* 37, 559–562. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1006.2011.00559>
- Isanga J, Zhang GN (2008).** Soybean Bioactive Components and their Implications to Health—A Review. *Food Reviews International* 24, 252–276. <https://doi.org/10.1080/87559120801926351>
- Islam MS, Peng S, Visperas RM, Ereful N, Bhuiya MSU, Julfikar AW (2007).** Lodging-related morphological traits of hybrid rice in a tropical irrigated ecosystem. *Field Crops Research* 101, 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2006.12.002>
- Jacobs TB, LaFayette PR, Schmitz RJ, Parrott WA (2015).** Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. *BMC Biotechnol* 15, 16. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0131-2>
- Jahan MA, Harris B, Lowery M, Infante AM, Percifield RJ, Kovicich N (2020).** Glyceollin Transcription Factor GmMYB29A2 Regulates Soybean Resistance to *Phytophthora sojae*. *Plant Physiol.* 183, 530–546. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01293>
- Jiang A, Liu J, Gao W, Ma R, Tan P, Liu F, Zhang J (2023).** Construction of a genetic map and QTL mapping of seed size traits in soybean. *Front. Genet.* 14, 1248315. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1248315>
- Josie J, Alcivar A, Rainho J, Kassem MA (2007).** Research Article: Genomic regions containing QTL for plant height, internodes length, and flower color in soybean [*Glycine max* (L.) Merr]. *BIOS* 78, 119–126. [https://doi.org/10.1893/0005-3155\(2007\)78\[119:RAGRCQ\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1893/0005-3155(2007)78[119:RAGRCQ]2.0.CO;2)

- Kashiwagi T, Ishimaru K (2004).** Identification and Functional Analysis of a Locus for Improvement of Lodging Resistance in Rice. *Plant Physiology* 134, 676–683. <https://doi.org/10.1104/pp.103.029355>
- Kashiwagi T, Togawa E, Hirotsu N, Ishimaru K (2008).** Improvement of lodging resistance with QTLs for stem diameter in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 117, 749–757. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0816-1>
- Kebede E (2020).** Grain legumes production and productivity in Ethiopian smallholder agricultural system, contribution to livelihoods and the way forward. *Cogent Food & Agriculture* 6, 1722353. <https://doi.org/10.1080/23311932.2020.1722353>
- Keller M, Karutz Ch, Schmid JE, Stamp P, Winzeler M, Keller B, Messmer MM (1999).** Quantitative trait loci for lodging resistance in a segregating wheat×spelt population: *Theor Appl Genet* 98, 1171–1182. <https://doi.org/10.1007/s001220051182>
- Kidokoro S, Watanabe K, Ohori T, Moriwaki T, Maruyama K, Mizoi J, Myint Phyu Sin Htwe N, Fujita Y, Sekita S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2015).** Soybean DREB 1/ CBF -type transcription factors function in heat and drought as well as cold stress-responsive gene expression. *The Plant Journal* 81, 505–518. <https://doi.org/10.1111/tpj.12746>
- Kim MY et al (2010).** Whole-genome sequencing and intensive analysis of the undomesticated soybean (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.) genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 22032–22037. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009526107>
- Klink VP, MacDonald MH, Martins VE, Park SC, Kim KH, Baek SH, Matthews BF (2008).** MiniMax, a new diminutive *Glycine max* genotype with a rapid life cycle, embryogenic potential and transformation capabilities. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 92, 183–195. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9323-3>
- Kong F, Nan H, Cao D, Li Y, Wu F, Wang J, Lu S, Yuan X, Cober ER, Abe J, Liu B (2014).** A New Dominant Gene *E9* Conditions Early Flowering and Maturity in Soybean. *Crop Science* 54, 2529–2535. <https://doi.org/10.2135/cropsci2014.03.0228>
- Koornneef M, Meinke D (2010).** The development of Arabidopsis as a model plant. *The Plant Journal* 61, 909–921. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04086.x>

- Krämer U (2015).** Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *eLife* 4, e06100. <https://doi.org/10.7554/eLife.06100>
- Kuraparthi V, Sood S, Gill BS (2008).** Genomic targeting and mapping of tiller inhibition gene (*tin3*) of wheat using ESTs and synteny with rice. *Funct Integr Genomics* 8, 33–42. <https://doi.org/10.1007/s10142-007-0057-4>
- Landi P, Sanguineti M, Liu C, Li Y, Wang T, Giuliani S, Bellotti M, Salvi S, Tuberosa R (2006).** Root-ABA1 QTL affects root lodging, grain yield, and other agronomic traits in maize grown under well-watered and water-stressed conditions. *Journal of Experimental Botany* 58, 319–326. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl161>
- Langenbach C, Schultheiss H, Rosendahl M, Tresch N, Conrath U, Goellner K (2016).** Interspecies gene transfer provides soybean resistance to a fungal pathogen. *Plant Biotechnology Journal* 14, 699–708. <https://doi.org/10.1111/pbi.12418>
- Larson, G. et al (2014).** Current perspectives and the future of domestication studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 6139–6146. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323964111>
- Lee GA, Crawford GW, Liu L, Sasaki Y, Chen X (2011).** Archaeological Soybean (*Glycine max*) in East Asia: Does Size Matter? *PLoS ONE* 6, e26720. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026720>
- Li K, Wong C, Cheng C, Cheng S, Li M, Mansveld S, Bergsma A, Huang T, Van Eijk MJT, Lam H (2021).** GmDNJ1, a type-I heat shock protein 40 (HSP40), is responsible for both Growth and heat tolerance in soybean. *Plant Direct* 5, e00298. <https://doi.org/10.1002/pld3.298>
- Li S, Wang N, Ji D, Zhang W, Wang Y, Yu Y, Zhao S, Lyu M, You J, Zhang Y, Wang L, Wang X, Liu Z, Tong J, Xiao L, Bai M, Xiang F (2019).** A GmSIN1/GmNCED3s/GmRbohBs Feed-Forward Loop Acts as a Signal Amplifier That Regulates Root Growth in Soybean Exposed to Salt Stress. *Plant Cell* 31, 2107–2130. <https://doi.org/10.1105/pc.18.00662>
- Li X, Fang C, Yang Y, Lv T, Su T, Chen L, Nan H, Li S, Zhao X, Lu S, Dong L, Cheng Q, Tang Y, Xu M, Abe J, Hou X, Weller JL, Kong F, Liu B (2021).** Overcoming the

genetic compensation response of soybean florigens to improve adaptation and yield at low latitudes. *Current Biology* 31, 3755–3767.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.06.037>

Li X, Qin R, Du Q, Cai L, Hu D, Du H, Yang H, Wang J, Huang F, Wang H, Yu D (2020). Knockdown of GmVQ58 encoding a VQ motif-containing protein enhances soybean resistance to the common cutworm (*Spodoptera litura* Fabricius). *Journal of Experimental Botany* 71, 3198–3210. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa095>

Li, Ying-hui, Zhou, G. et al (2014). De novo assembly of soybean wild relatives for pan-genome analysis of diversity and agronomic traits. *Nat Biotechnol* 32, 1045–1052. <https://doi.org/10.1038/nbt.2979>

L, Z, Zhang X, Zhao Y, Li Y, Zhang G, Peng Z, Zhang J (2018). Enhancing auxin accumulation in maize root tips improves root growth and dwarfs plant height. *Plant Biotechnology Journal* 16, 86–99. <https://doi.org/10.1111/pbi.12751>

Lin X, Liu B, Weller JL, Abe J, Kong F (2021). Molecular mechanisms for the photoperiodic regulation of flowering in soybean. *JIPB* 63, 981–994. <https://doi.org/10.1111/jipb.13021>

Liu B, Kanazawa A, Matsumura H, Takahashi R, Harada K, Abe J (2008). Genetic Redundancy in Soybean Photoresponses Associated With Duplication of the Phytochrome A Gene. *Genetics* 180, 995–1007. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.092742>

Liu B, Watanabe S, Uchiyama T, Kong F, Kanazawa A, Xia Z, Nagamatsu A, Arai M, Yamada T, Kitamura K, Masuta C, Harada K, Abe J (2010). The Soybean Stem Growth Habit Gene *Dt1* Is an Ortholog of Arabidopsis *TERMINAL FLOWER1*. *Plant Physiology* 153, 198–210. <https://doi.org/10.1104/pp.109.150607>

Liu BM, Wu YJ, Fu XD, Qian Q (2008). Characterizations and molecular mapping of a novel dominant semi-dwarf gene *Sdd(t)* in rice (*Oryza sativa*). *Plant Breeding* 127, 125–130. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2007.01444.x>

- Liu S, Fan L, Liu Z, Yang X, Zhang Z, Duan Z, Liang Q, Imran M, Zhang M, Tian Z (2020).** A Pd1–Ps–P1 Feedback Loop Controls Pubescence Density in Soybean. *Molecular Plant* 13, 1768–1783. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.10.004>
- Liu W, Wu C, Fu Y, Hu G, Si H, Zhu L, Luan W, He Z, Sun Z (2009).** Identification and characterization of HTD2: a novel gene negatively regulating tiller bud outgrowth in rice. *Planta* 230, 649–658. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-0975-6>
- Liu Y, Tian Z (2020).** From one linear genome to a graph-based pan-genome: a new era for genomics. *Sci. China Life Sci.* 63, 1938–1941. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1808-0>
- Lu S. et al (2020).** Stepwise selection on homeologous PRR genes controlling flowering and maturity during soybean domestication. *Nat Genet* 52, 428–436. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-0604-7>
- Lu X, Xiong Q, Cheng T, Li QT, Liu XL, Bi YD, Li W, Zhang WK, Ma B, Lai YC, Du WG, Man WQ, Chen SY, Zhang JS (2017).** A PP2C-1 Allele Underlying a Quantitative Trait Locus Enhances Soybean 100-Seed Weight. *Molecular Plant* 10, 670–684. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.03.006>
- Lu Z, Yu H, Xiong G, Wang J, Jiao Y, Liu G, Jing Y, Meng X, Hu X, Qian Q, Fu X, Wang Y, Li J (2013).** Genome-Wide Binding Analysis of the Transcription Activator IDEAL PLANT ARCHITECTURE1 Reveals a Complex Network Regulating Rice Plant Architecture. *Plant Cell* 25, 3743–3759. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.113639>
- Luo S, Jia J, Liu R, Wei R, Guo Z, Cai Z, Chen B, Liang F, Xia Q, Nian H, Cheng Y (2023).** Identification of major QTLs for soybean seed size and seed weight traits using a RIL population in different environments. *Front. Plant Sci.* 13, 1094112. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1094112>
- Luo X, Yin M, He Y (2021).** Molecular Genetic Understanding of Photoperiodic Regulation of Flowering Time in Arabidopsis and Soybean. *IJMS* 23, 466. <https://doi.org/10.3390/ijms23010466>
- Ma JF, Yamaji N (2006).** Silicon uptake and accumulation in higher plants. *Trends in Plant Science* 11, 392–397. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.06.007>

- Ma QH (2009).** The expression of caffeic acid 3-O-methyltransferase in two wheat genotypes differing in lodging resistance. *Journal of Experimental Botany* 60, 2763–2771. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp132>
- Marti E (2006).** Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. *Journal of Experimental Botany* 57, 2037–2047. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj154>
- Matthews BF, MacDonald MH, Song QJ, Cregan PB, Lewers KS (2007).** Registration of 'MiniMax' Soybean. *J of Plant Registrations* 1, 97–98. <https://doi.org/10.3198/jpr2006.10.0653crc>
- McBlain BA, Bernard RL (1987).** A new gene affecting the time of flowering and maturity in soybeans. *Journal of Heredity* 78, 160–162. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a110349>
- Meissner R, Jacobson Y, Melamed S, Levyatuv S, Shalev G, Ashri A, Elkind Y, Levy A (1997).** A new model system for tomato genetics. *The Plant Journal* 12, 1465–1472. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1997.12061465.x>
- Mendel G (1970).** Versuche über Pflanzenhybriden, in: *Versuche über Pflanzenhybriden*. Vieweg+Teubner Verlag, Wiesbaden, pp. 21–64. https://doi.org/10.1007/978-3-663-19714-0_4
- Miedaner T, Herter CP, Ebmeyer E, Kollers S, Korzun V (2019).** Use of non-adapted quantitative trait loci for increasing Fusarium head blight resistance for breeding semi-dwarf wheat. *Plant Breeding* 138, 140–147. <https://doi.org/10.1111/pbr.12683>
- Miranda C, Scaboo A, Cober E, Denwar N, Bilyeu K (2020).** The effects and interaction of soybean maturity gene alleles controlling flowering time, maturity, and adaptation in tropical environments. *BMC Plant Biol* 20, 65. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-2276-y>
- Mitchum MG (2016).** Soybean Resistance to the Soybean Cyst Nematode *Heterodera glycines*: An Update. *Phytopathology*® 106, 1444–1450. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-16-0227-RVW>

- Mori M, Nomura T, Ooka H, Ishizaka M, Yokota T, Sugimoto K, Okabe K, Kajiwara H, Satoh K, Yamamoto K, Hirochika H, Kikuchi S (2002).** Isolation and Characterization of a Rice Dwarf Mutant with a Defect in Brassinosteroid Biosynthesis. *Plant Physiology* 130, 1152–1161. <https://doi.org/10.1104/pp.007179>
- Muoni T, Barnes AP, Öborn I, Watson CA, Bergkvist G, Shiluli M, Duncan AJ (2019).** Farmer perceptions of legumes and their functions in smallholder farming systems in east Africa. *International Journal of Agricultural Sustainability* 17, 205–218. <https://doi.org/10.1080/14735903.2019.1609166>
- Nguyen CX, Paddock KJ, Zhang Z, Stacey MG (2021).** GmKIX8-1 regulates organ size in soybean and is the causative gene for the major seed weight QTL *qSw17-1*. *New Phytologist* 229, 920–934. <https://doi.org/10.1111/nph.16928>
- Orf JH, Chase K, Adler FR, Mansur LM, Lark KG (1999).** Genetics of Soybean Agronomic Traits: II. Interactions between Yield Quantitative Trait Loci in Soybean. *Crop Science* 39, 1652–1657. <https://doi.org/10.2135/cropsci1999.3961652x>
- Pan WJ, Tao JJ, Cheng T, Bian XH, Wei W, Zhang WK, Ma B, Chen SY, Zhang JS (2016).** Soybean miR172a Improves Salt Tolerance and Can Function as a Long-Distance Signal. *Molecular Plant* 9, 1337–1340. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.05.010>
- Pfeiffer TW, Peyyala R, Ren Q, Ghabrial SA (2003).** Increased Soybean Pubescence Density: Yield and *Soybean mosaic virus* Resistance Effects. *Crop Science* 43, 2071–2076. <https://doi.org/10.2135/cropsci2003.2071>
- Pino LE, Lombardi-Crestana S, Azevedo MS, Scotton DC, Borgo L, Quecini V, Figueira A, Peres LE (2010).** The Rg1 allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato “Micro-Tom” model system. *Plant Methods* 6, 23. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-6-23>
- Pino-Nunes L, Figueira AVO, Tulmann Neto A, Zsögön A, Piotto FA, Bernardi WF, Peres LEP (2009).** Induced Mutagenesis and Natural Genetic Variation in Tomato ‘Micro-Tom.’ *Acta Horticulturae* 821.

- Pnueli L, Carmel-Goren L, Hareven D, Gutfinger T, Alvarez J, Ganai M, Zamir D, Lifschitz E (1998).** The *SELF-PRUNING* gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of *CEN* and *TFL1*. *Development* 125, 1979–1989. <https://doi.org/10.1242/dev.125.11.1979>
- Pnueli L, Gutfinger T, Hareven D, Ben-Naim O, Ron N, Adir N, Lifschitz E (2001).** Tomato SP-Interacting Proteins Define a Conserved Signaling System That Regulates Shoot Architecture and Flowering. *Plant Cell* 13, 2687–2702. <https://doi.org/10.1105/tpc.010293>
- Qi, X. et al (2014).** Identification of a novel salt tolerance gene in wild soybean by whole-genome sequencing. *Nat Commun* 5, 4340. <https://doi.org/10.1038/ncomms5340>
- Quain MD, Makgopa ME, Márquez-García B, Comadira G, Fernandez-Garcia N, Olmos E, Schnaubelt D, Kunert KJ, Foyer CH (2014).** Ectopic phytocystatin expression leads to enhanced drought stress tolerance in soybean (*Glycine max*) and *Arabidopsis thaliana* through effects on strigolactone pathways and can also result in improved seed traits. *Plant Biotechnology Journal* 12, 903–913. <https://doi.org/10.1111/pbi.12193>
- Rakocevic M, Müller M, Matsunaga FT, Neumaier N, Farias JRB, Nepomuceno AL, Fuganti-Pagliarini R (2018).** Daily heliotropic movements assist gas exchange and productive responses in DREB 1A soybean plants under drought stress in the greenhouse. *The Plant Journal* 96, 801–814. <https://doi.org/10.1111/tpj.14069>
- Ray JD, Hinson K, Mankono JEB, Malo MF (1995).** Genetic Control of a Long-Juvenile Trait in Soybean. *Crop Science* 35, 1001–1006. <https://doi.org/10.2135/cropsci1995.0011183X003500040012x>
- Reinhardt D, Kuhlemeier C (2002).** Plant architecture. *EMBO reports* 3, 846–851.
- Ribichich KF, Chiozza M, Ávalos-Britez S, Cabello JV, Arce AL, Watson G, Arias C, Portapila M, Trucco F, Otegui ME, Chan RL (2020).** Successful field performance in warm and dry environments of soybean expressing the sunflower transcription factor HB4. *Journal of Experimental Botany* 71, 3142–3156. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa064>

- Ross-Ibarra J, Morrell PL, Gaut BS (2007).** Plant domestication, a unique opportunity to identify the genetic basis of adaptation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 8641–8648. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700643104>
- Roy NS, Ban YW, Yoo H, Ramekar RV, Cheong EJ, Park NI, Na JK, Park KC, Choi IY (2021).** Analysis of genome variants in dwarf soybean lines obtained in F6 derived from cross of normal parents (cultivated and wild soybean). *Genomics Inform* 19, e19. <https://doi.org/10.5808/gi.21024>
- Roy S, Liu W, Nandety RS, Crook A, Mysore KS, Pislariu CI, Frugoli J, Dickstein R, Udvardi MK (2020).** Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. *Plant Cell* 32, 15–41. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00279>
- Samanfar B, Molnar SJ, Charette M, Schoenrock A, Dehne F, Golshani A, Belzile F, Cober ER (2017).** Mapping and identification of a potential candidate gene for a novel maturity locus, E10, in soybean. *Theor Appl Genet* 130, 377–390. <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2819-7>
- Sameri M, Nakamura S, Nair SK, Takeda K, Komatsuda T (2009).** A quantitative trait locus for reduced culm internode length in barley segregates as a Mendelian gene. *Theor Appl Genet* 118, 643–652. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0926-9>
- Schmutz, J. et al (2010).** Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463, 178–183. <https://doi.org/10.1038/nature08670>
- Schnable PS (2009).** The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity, and Dynamics. *Science* 326, 1112–1115. <https://doi.org/10.1126/science.1178534>
- Shen Y, Du H, Liu Y, Ni L, Wang Z, Liang C, Tian Z (2019).** Update soybean Zhonghuang 13 genome to a golden reference. *Sci. China Life Sci.* 62, 1257–1260. <https://doi.org/10.1007/s11427-019-9822-2>
- Shen Y, Liu J, Geng H, Zhang J, Liu Y, Zhang H, Xing S, Du J, Ma S, Tian Z (2018).** De novo assembly of a Chinese soybean genome. *Sci. China Life Sci.* 61, 871–884. <https://doi.org/10.1007/s11427-018-9360-0>

- Shimada Y, Fujioka S, Miyauchi N, Kushiro M, Takatsuto S, Nomura T, Yokota T, Kamiya Y, Bishop GJ, Yoshida S (2001)**. Brassinosteroid-6-Oxidases from Arabidopsis and Tomato Catalyze Multiple C-6 Oxidations in Brassinosteroid Biosynthesis. *Plant Physiology* 126, 770–779. <https://doi.org/10.1104/pp.126.2.770>
- Shu Y, Zhou Y, Mu K, Hu H, Chen M, He Q, Huang S, Ma H, Yu X (2020)**. A transcriptomic analysis reveals soybean seed pre-harvest deterioration resistance pathways under high temperature and humidity stress. *Genome* 63, 115–124. <https://doi.org/10.1139/gen-2019-0094>
- Sikora, E.J. et al (2014)**. A Coordinated Effort to Manage Soybean Rust in North America: A Success Story in Soybean Disease Monitoring. *Plant Disease* 98, 864–875. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-14-0121-FE0>
- Singh L, Schoen A, Mahlandt A, Chhabra B, Steadham J, Tiwari V, Rawat N (2019)**. Development of Targeting Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING) Populations in Small Grain Crops by Ethyl Methanesulfonate Mutagenesis. *JoVE* 59743. <https://doi.org/10.3791/59743>
- Song J, Sun X, Zhang K, Liu S, Wang J, Yang C, Jiang S, Siyal M, Li X, Qi Z, Wang Y, Tian X, Fang Y, Tian Z, Li WX, Ning H (2020)**. Identification of QTL and genes for pod number in soybean by linkage analysis and genome-wide association studies. *Mol Breeding* 40, 60. <https://doi.org/10.1007/s11032-020-01140-w>
- Song J, Wang X, Huang L, Li Z, Ren H, Wang J (2022)**. Genetic dissection of the soybean dwarf mutant dm with integrated genomic, transcriptomic and methylomic analyses. *Front. Plant Sci.* 13, 1017672. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1017672>
- Sun Z, Su C, Yun J, Jiang Q, Wang L, Wang Y, Cao D, Zhao F, Zhao Q, Zhang M, Zhou B, Zhang L, Kong F, Liu B, Tong Y, Li X (2019)**. Genetic improvement of the shoot architecture and yield in soya bean plants via the manipulation of *GmmiR156b*. *Plant Biotechnology Journal* 17, 50–62. <https://doi.org/10.1111/pbi.12946>
- Tang H, Krishnakumar V, Bidwell S, Rosen B, Chan A, Zhou S, Gentzbittel L, Childs KL, Yandell M, Gundlach H, Mayer KF, Schwartz DC, Town CD (2014)**. An improved

genome release (version Mt4.0) for the model legume *Medicago truncatula*. *BMC Genomics* 15, 312. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-312>

Tang X, Su T, Han M, Wei L, Wang W, Yu Z, Xue Y, Wei H, Du Y, Greiner S, Rausch T, Liu L (2016). Suppression of extracellular invertase inhibitor gene expression improves seed weight in soybean (*Glycine max*). *EXBOTJ* erw425. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw425>

Tao Y, Jordan DR, Mace ES (2020). A Graph-Based Pan-Genome Guides Biological Discovery. *Molecular Plant* 13, 1247–1249. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.07.020>

The Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796–815. <https://doi.org/10.1038/35048692>

The Tomato Genome Consortium (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485, 635–641. <https://doi.org/10.1038/nature11119>

Thompson JA, Bernard RL, Nelson RL (1997). A Third Allele at the Soybean *dt1* Locus. *Crop Science* 37, 757–762. <https://doi.org/10.2135/cropsci1997.0011183X003700030011x>

Tsubokura Y, Matsumura H, Xu M, Liu B, Nakashima H, Anai T, Kong F, Yuan X, Kanamori H, Katayose Y, Takahashi R, Harada K, Abe J (2013). Genetic Variation in Soybean at the Maturity Locus *E4* Is Involved in Adaptation to Long Days at High Latitudes. *Agronomy* 3, 117–134. <https://doi.org/10.3390/agronomy3010117>

Valliyodan, B. et al (2019). Construction and comparison of three reference-quality genome assemblies for soybean. *The Plant Journal* 100, 1066–1082. <https://doi.org/10.1111/tpj.14500>

Vandenbussche M, Chambrier P, Rodrigues BS, Morel P (2016). *Petunia*, Your Next Supermodel? *Front. Plant Sci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00072>

Wang B, Smith SM, Li J (2018). Genetic Regulation of Shoot Architecture. *Annu. Rev. Plant Biol.* 69, 437–468. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040422>

- Wang D, Griffiths J, Starker C, Fedorova E, Limpens E, Ivanov S, Bisseling T, Long S (2010).** A Nodule-Specific Protein Secretory Pathway Required for Nitrogen-Fixing Symbiosis. *Science* 327, 1126–1129. <https://doi.org/10.1126/science.1184096>
- Wang F, Nan H, Chen L, Fang C, Zhang H, Su T, Li S, Cheng Q, Dong L, Liu B, Kong F, Lu S (2019).** A new dominant locus, E11, controls early flowering time and maturity in soybean. *Mol Breeding* 39, 70. <https://doi.org/10.1007/s11032-019-0978-3>
- Wang J, Zhu J, Huang R, Yang Y (2012).** Investigation of cell wall composition related to stem lodging resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.) by FTIR spectroscopy. *Plant Signaling & Behavior* 7, 856–863. <https://doi.org/10.4161/psb.20468>
- Wang JW, Schwab R, Czech B, Mica E, Weigel D (2008).** Dual Effects of miR156-Targeted *SPL* Genes and *CYP78A5/KLUH* on Plastochron Length and Organ Size in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 20, 1231–1243. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.058180>
- Wang K, Bu T, Cheng Q, Dong L, Su T, Chen Z, Kong F, Gong Z, Liu B, Li M (2021).** Two homologous *LHY* pairs negatively control soybean drought tolerance by repressing the abscisic acid responses. *New Phytologist* 229, 2660–2675. <https://doi.org/10.1111/nph.17019>
- Wang N, Liu Y, Cai Y, Tang J, Li Y, Gai J (2020).** The soybean U-box gene GmPUB6 regulates drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* 155, 284–296. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.07.016>
- Wang S, Liu S, Wang J, Yokosho K, Zhou B, Yu YC, Liu Z, Frommer WB, Ma JF, Chen LQ, Guan Y, Shou H, Tian Z (2020).** Simultaneous changes in seed size, oil content and protein content driven by selection of *SWEET* homologues during soybean domestication. *National Science Review* 7, 1776–1786. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa110>
- Wang X, Li Y, Zhang H, Sun G, Zhang W, Qiu L (2015).** Evolution and association analysis of GmCYP78A10 gene with seed size/weight and pod number in soybean. *Mol Biol Rep* 42, 489–496. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3792-3>

- Watanabe S, Hideshima R, Xia Z, Tsubokura Y, Sato S, Nakamoto Y, Yamanaka N, Takahashi R, Ishimoto M, Anai T, Tabata S, Harada K (2009).** Map-Based Cloning of the Gene Associated With the Soybean Maturity Locus *E3*. *Genetics* 182, 1251–1262. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.098772>
- Watanabe S, Xia Z, Hideshima R, Tsubokura Y, Sato S, Yamanaka N, Takahashi R, Anai T, Tabata S, Kitamura K, Harada K (2011).** A Map-Based Cloning Strategy Employing a Residual Heterozygous Line Reveals that the *GIGANTEA* Gene Is Involved in Soybean Maturity and Flowering. *Genetics* 188, 395–407. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.125062>
- Wei J, Li DX, Zhang JR, Shan C, Rengel Z, Song ZB, Chen Q (2018).** Phyto-melatonin receptor PMTR1-mediated signaling regulates stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Pineal Research* 65, e12500. <https://doi.org/10.1111/jpi.12500>
- Wei W, Liang D, Bian X, Shen M, Xiao J, Zhang W, Ma B, Lin Q, Lv J, Chen X, Chen S, Zhang J (2019).** GmWRKY54 improves drought tolerance through activating genes in abscisic acid and Ca²⁺ signaling pathways in transgenic soybean. *The Plant Journal* 100, 384–398. <https://doi.org/10.1111/tpj.14449>
- Widyasari K, Alazem M, Kim KH (2020).** Soybean Resistance to Soybean Mosaic Virus. *Plants* 9, 219. <https://doi.org/10.3390/plants9020219>
- Wong J, Gao L, Yang Y, Zhai J, Arikiti S, Yu Y, Duan S, Chan V, Xiong Q, Yan J, Li S, Liu R, Wang Y, Tang G, Meyers BC, Chen X, Ma W (2014).** Roles of small RNAs in soybean defense against *Phytophthora sojae* infection. *The Plant Journal* 79, 928–940. <https://doi.org/10.1111/tpj.12590>
- Xia Z, Watanabe S, Yamada T, Tsubokura Y, Nakashima H, Zhai H, Anai T, Sato S, Yamazaki T, Lü S, Wu H, Tabata S, Harada K (2012).** Positional cloning and characterization reveal the molecular basis for soybean maturity locus *E1* that regulates photoperiodic flowering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117982109>
- Xie, M. et al (2019).** A reference-grade wild soybean genome. *Nat Commun* 10, 1216. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09142-9>

- Xu D, Abe J, Gai J, Shimamoto Y (2002).** Diversity of chloroplast DNA SSRs in wild and cultivated soybeans: evidence for multiple origins of cultivated soybean. *Theor Appl Genet* 105, 645–653. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-0972-7>
- Yang C, Huang Y, Lv W, Zhang Y, Bhat JA, Kong J, Xing H, Zhao J, Zhao T (2020).** GmNAC8 acts as a positive regulator in soybean drought stress. *Plant Science* 293, 110442. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110442>
- Yang Q, Lin G, Lv H, Wang C, Yang Y, Liao H (2021).** Environmental and genetic regulation of plant height in soybean. *BMC Plant Biol* 21, 63. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-02836-7>
- Yang X, Kim MY, Ha J, Lee SH (2019).** Overexpression of the Soybean NAC Gene GmNAC109 Increases Lateral Root Formation and Abiotic Stress Tolerance in Transgenic Arabidopsis Plants. *Front. Plant Sci.* 10, 1036. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01036>
- Yang Z, Zhang H, Li X, Shen H, Gao J, Hou S, Zhang B, Mayes S, Bennett M, Ma J, Wu C, Sui Y, Han Y, Wang X (2020).** A mini foxtail millet with an Arabidopsis-like life cycle as a C4 model system. *Nat. Plants* 6, 1167–1178. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0747-7>
- Yu B, He X, Tang Y, Chen Z, Zhou L, Li X, Zhang C, Huang X, Yang Y, Zhang W, Kong F, Miao Y, Hou X, Hu Y (2023).** Photoperiod controls plant seed size in a CONSTANS-dependent manner. *Nat. Plants* 9, 343–354. <https://doi.org/10.1038/s41477-023-01350-y>
- Yu, J. et al (2002).** A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science* 296, 79–92. <https://doi.org/10.1126/science.1068037>
- Yu L, Liu Y, Zeng S, Yan J, Wang E, Luo L (2019).** Expression of a novel PSK-encoding gene from soybean improves seed growth and yield in transgenic plants. *Planta* 249, 1239–1250. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03101-w>

- Yuan L, Xie GZ, Zhang S, Li B, Wang X, Li Y, Liu T, Xu X (2021).** GMLCLs negatively regulate ABA perception and signalling genes in soybean leaf dehydration response. *Plant Cell & Environment* 44, 412–424. <https://doi.org/10.1111/pce.13931>
- Zhang L, Yang X, Zhang Y, Yang J, Qi G, Guo D, Xing G, Yao Y, Xu W, Li H, L, Q, Dong Y (2014).** Changes in Oleic Acid Content of Transgenic Soybeans by Antisense RNA Mediated Posttranscriptional Gene Silencing. *International Journal of Genomics* 2014, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/921950>
- Zhang M, Dong R, Huang P, Lu M, Feng X, Fu Y, Zhang X (2023).** Novel Seed Size: A Novel Seed-Developing Gene in *Glycine max*. *IJMS* 24, 4189. <https://doi.org/10.3390/ijms24044189>
- Zhang Y, Bian X, Zhang S, Ling J, Wang Y, Wei X, Fang X (2016).** Identification of a novel gain-of-function mutant allele, *slr1-d5*, of rice DELLA protein. *Journal of Integrative Agriculture* 15, 1441–1448. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61208-4](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61208-4)
- Zhang Y, Yu C, Lin J, Liu J, Liu B, Wang J, Huang A, Li H, Zhao T (2017).** *OsMPH1* regulates plant height and improves grain yield in rice. *PLoS ONE* 12, e0180825. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180825>
- Zhao, B, Dai A, Wei H, Yang S, Wang B, Jiang N, Feng X (2016).** Arabidopsis KLU homologue *GmCYP78A72* regulates seed size in soybean. *Plant Mol Biol* 90, 33–47. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0392-0>
- Zhao J, Chen L, Zhao T, Gai J (2017).** Chicken Toes-Like Leaf and Petalody Flower (CTP) is a novel regulator that controls leaf and flower development in soybean. *Journal of Experimental Botany* 68, 5565–5581. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx358>
- Zhao X, Jing Y, Luo Z, Gao S, Teng W, Zhan Y, Qiu L, Zheng H, Li W, Han Y (2021).** *GMST1*, which encodes a sulfotransferase, confers resistance to soybean mosaic virus strains G2 and G3. *Plant Cell & Environment* 44, 2777–2792. <https://doi.org/10.1111/pce.14066>

CAPÍTULO 2: Caracterização morfológica comparativa entre soja (*Glycine max*) cv. MiniMax e cv. Williams 82

2.1 INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max*. (L.) Merr.] pertence à família Fabaceae. Devido aos seus diversos usos e enorme importância, possui diversos nomes, como “feijão dourado”, “super leguminosa”, “cultura do planeta” e “feijão milagroso”. É uma fonte de óleo, proteínas, minerais e vitaminas (Baianu *et al.*, 2012). O Brasil é o país líder na produção de soja com participação de 38,71%, seguido pelos Estados Unidos, China, Argentina, Índia e outros (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, 2023). No melhoramento vegetal da soja, várias técnicas foram desenvolvidas, uma delas é por métodos transgênicos, no entanto, com a mudança no cenário jurídico entorno dos alimentos transgênicos, o futuro da soja transgênica não está claro (Rahman *et al.*, 2023). Desta forma, métodos convencionais foram e continuam sendo importantíssimos no melhoramento vegetal da soja.

Durante o curso da domesticação e melhoramento das culturas, a diversidade genética das cultivares foi reduzida para características impulsionadas pela preferência humana, práticas de cultivos e ambientes agrícolas (Smýkal *et al.*, 2018). Espécies de plantas domesticada são encontradas em mais de 160 famílias taxonômicas (Meyer *et al.*, 2012). As mais importantes delas são Poaceae, Fabaceae e Brassicaceae. Aproximadamente 2.500 espécies sofreram algum grau de domesticação, mas apenas 250 são consideradas totalmente domesticadas (Meyer *et al.*, 2012). A soja é uma cultura cultivada em todo o mundo em uma ampla faixa de latitudes (50°N-35°S) (McBlain and Bernard, 1987). Após a redescoberta das leis da hereditariedade de Mendel em 1900, o melhoramento de plantas fez um enorme progresso no desenvolvimento de diversas metodologias para criar e selecionar variações usando princípios genéticos.

Desde o início do século XXI, o melhoramento de plantas tem sido sistematizado com tecnologias de ponta auxiliado por abordagens transgênicas e genômicas. No futuro, os melhoristas serão capazes de piramidar alelos ou genes desejáveis em variedades promissoras com desempenho otimizado, utilizando uma abordagem que englobe campos científicos (Lee *et al.*, 2015). O uso de modelos biológicos é de fundamental importância para a pesquisa, que investiga e procura

características agronômicas de interesse na cultura da soja. Os modelos biológicos são utilizados para validação de inúmeros estudos com plantas, boa parte desses resultados são cruzados a partir dos parâmetros morfológicos conhecido. A validação funcional de um gene utiliza como principal ferramenta a variação genotípica, ou seja, a expressão ou silenciamento de um determinado ou vários genes que resulta numa expressão fenotípica na planta, mesmo assim, é necessário conhecer os padrões morfológicos esperados e principalmente identificar os divergentes do comum

Assim, se faz necessário conhecer quais as principais características morfológicas importantes para o melhoramento vegetal. Na atualidade, as pesquisas seguem um caminho em identificar as principais problemáticas, para desenvolver soluções e validá-las. Boa parte dos modelos biológicos utilizados para isso são: *Arabidopsis thaliana* Col-0, tomateiro (*Solanum lycopersicum*) cv. Micro-Tom, arroz (*Oryza sativa*) cv. Nipponbare, tabaco (*Nicotiana tabacum*) cv. K326, entre outros. Estabelecer as principais diferenças morfológicas entre cultivares, como a soja, é determinante para propor novos *insights* no melhoramento vegetal, na busca de características agronômicas de interesse econômico para plantas de aptidão agrícola. Características agronômicas voltadas para o melhoramento vegetal, nem sempre estão atreladas diretamente ao processo de produtividade, isso porque na arquitetura vegetal de uma planta, vários atributos morfológicos contribuem no sucesso para o desenvolvimento e crescimento.

O atual modelo biológico para soja é *Glycine max* cv. Williams 82, um dos primeiros materiais de soja a ter o genoma sequenciado e continua sendo bastante importante para pesquisas que envolvem a soja (Schmutz et al., 2010). A soja Williams 82 foi registrada em 1988, derivada de quatro plantas individuais selecionadas de um cruzamento Williams x Kingwa BC₆F₃ (Bernard and Cromeens, 1988). A partir disso, a soja Williams 82 foi crucial para estudos de resistência a fatores bióticos e abióticos (Chai et al., 2022; Othman et al., 2024; Zaynab et al., 2024), melhorias em componentes de produtividade em diversos genótipos comerciais (Castro-Valdecantos et al., 2023; Clark et al., 2022), além das descobertas e modificações de fitoquímicos bioativos na semente de soja (Chen et al., 2022; Fields et al., 2023; Knizia et al., 2021; Ma and Shang, 2023).

Com a era genômica, diversos outros acessos de soja tiveram seu genoma sequenciado (Kim et al., 2010; Li et al., 2014; Liu and Tian, 2020; Shen et al., 2019, 2018; Tao et al., 2020; Valliyodan et al., 2019; Xie et al., 2019). Notavelmente, o

modelo Williams 82 é muito importante para a comunidade científica da soja, no entanto, existe alguns problemas presentes no fenótipo deste material, como por exemplo, porte arquitetônico grande, algo que gera dificuldades em realizar estudos com espaço reduzido para cultivar este material. Além disso, ocorre uma dificuldade ao testar as propriedades emergentes dos genes na pesquisa com *G. max*, por conta do tempo que demora para crescer e transformar genes nestes materiais. A utilização de cultivares semi-anãs foi extremamente importante na Revolução Verde, principalmente para arroz (*Oriza sativa*) e trigo (*Triticum aestivum*), deveu-se principalmente ao aumento da densidade de plantio, folhas com ângulo vertical, diminuindo sombreamento sobre outras plantas (Lambert and Johnson, 1978; Tian *et al.*, 2019). Para tal, antes mesmo do primeiro genoma de soja, surge uma grande aposta para se tornar um bom modelo biológico para estudos com soja, a soja anã *Glycine max* cv. MiniMax, de rápido crescimento e tamanho compacto (Matthews *et al.*, 2007). Logo depois o mesmo grupo de pesquisa disponibilizou um eficiente protocolo de regeneração *in vitro* (Klink *et al.*, 2008).

No entanto, o uso da soja anã MiniMax em pesquisa básica foi pouco explorado, talvez pela falta de informações básicas, como relatos morfológicos, condições e protocolos de cultivo, assim como a sua utilização em ensaios experimentais. Enfatizamos aqui, a importância de levantar estas informações na tentativa de consolidar o uso de MiniMax em pesquisas futuras. O principal objetivo deste capítulo é identificar as principais diferenças e similaridades morfológicas entre MiniMax e Williams 82, mas também levantar os principais pontos, que podem ser alvo de estudos neste organismo modelo, como a base genética do nanismo em soja, produtividade, entre outros. Desta forma, objetivou-se neste capítulo realizar uma caracterização morfológica entre o potencial modelo MiniMax e a cv. Williams 82. Entendemos, que nossos resultados podem ser fundamentais no estabelecimento de *G. max* cv. MiniMax como modelo para pesquisa em soja e outras leguminosas.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais (20°45”S, 42°51”W). Para realizar avaliações morfológicas entre *Glycine max* cv. MiniMax (PI643148) e *G. max* cv. Williams 82, cultivamos as plantas em casa de vegetação com sistema de temperatura e umidade controlado.

2.2.1 Instalação do experimento

Assim, foram colocadas 20 sementes de cada material para germinação, dispostas a 1 cm de profundidade em bandeja de polietileno com substrato comercial Tropstrato HT[®], foi irrigado diariamente de acordo com a necessidade. Posteriormente, seis (06) plântulas de cada genótipo, contendo o primeiro par de unifolíolos, não necessariamente expandidas, foram cuidadosamente retiradas da bandeja, sem danificar o torrão, as raízes foram lavadas em água corrente, em seguida, transplantadas em vasos com capacidade de 1 Litro. O solo para o cultivo foi preparado da seguinte forma, a proporção foi de 3:1 (solo+substrato comercial), pH do solo corrigido com 5g de calcário dolomítico, acrescido com 5,43 g de N-P-K (04-14-08), 1 g de cloreto de potássio e 5,43 g de superfosfato simples, para a correção da fertilidade em cada vaso.

2.2.2 Avaliações morfológicas

Para determinação das diferenças morfológicas, acessamos os seguintes parâmetros: altura da planta, número de folhas, diâmetro do caule, comprimento do pecíolo, diâmetro do pecíolo, área foliar e número de vagens. Além disso, avaliamos alocação de biomassa entre os órgãos: folha, caule e vagens. Para os parâmetros de altura e comprimento foi utilizado régua graduada, para o diâmetro utilizou-se o paquímetro digital eletrônico (Vinwer[®]). Também realizamos registro fotográfico das plantas em ambiente de casa de vegetação.

2.2.3 Partição de biomassa

Os órgãos foram acondicionados separadamente em sacos de papel, mantido em estufa de circulação forçada de ar sob 65°C até atingir massa constante. Em seguida, o material foi pesado em balança analítica de precisão (SHIMADZU[®], modelo ATX224R).

2.2.4 Análises estatísticas

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Todas as variáveis foram analisadas através da análise de variância (ANOVA). Para comparação de média foi aplicado o teste de Tukey ($p < 0,05$). Essas análises foram

feitas com software R 3.4.0 (R Core Team 2018). E os gráficos de barra elaborados no SigmaPlot (versão 14.0)

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O potencial modelo MiniMax apresentou características diante do atual modelo biológico bastante interessantes para o uso em pesquisas futuras. A altura entre os dois materiais é um ponto bastante distinto (Fig.2.1, A), visto que apresentam hábito de crescimento diferente, MiniMax com crescimento determinado e Williams 82 com crescimento indeterminado. A média da altura de MiniMax é 12,58 cm ($p=0,004$), enquanto que para Williams 82 é de 27,67 cm (Fig.4, A). O tamanho da parte área entre os dois modelos é bem interessante (Fig.2.1, A), em que MiniMax apresenta arquitetura mais compacta (Fig.2.1, D) e Williams 82 apresenta estrutura arquitetônica grande para um modelo biológico (Fig.2.1, B). Além disso, outra característica agrônômica como diâmetro do caule menor é vista na diminuta MiniMax (Fig.4, B e Fig.2.1, D), com média de 2,26 mm, enquanto que para Williams 82 (Fig.2.1 B) algo entorno de 3,53 mm ($p=0,001$).

O número médio de folhas entre MiniMax e Williams 82 (Fig.2.4, C), são diferentes, variando de 10 folhas para MiniMax e 16 folhas para Williams 82 ($p=0,004$). Ainda, o comprimento do pecíolo do modelo Williams 82 chega em média à 10,35 cm (Fig.2.4, D e Fig.2.1, E), enquanto que MiniMax possui 4,3 cm (Fig.2.4, D e Fig.2.1, F). Medimos também o diâmetro do pecíolo (Fig.2.4, E), verificamos que Williams 82 possui valor médio de 1,83 mm, e MiniMax apenas 0,7 mm. Com apenas algumas características morfológicas medidas entre os dois modelos, podemos perceber a dificuldade em conduzir um estudo mais amplo em casa de vegetação com Williams, em contrapartida, a facilidade de manejo e espaço ao utilizar a soja anã Minimax (Fig.2.1, C). A área foliar entre os dois modelos biológicos diferem bastante (Fig.2.4, F e Fig.2.2): Williams 82 possui média de 717 cm² por planta (Fig.2.4, F), e MiniMax

39,74 cm² por planta apenas ($p=0,002$), isso permite o cultivo de uma grande quantidade de plantas MiniMax para estudos em casa de vegetação.

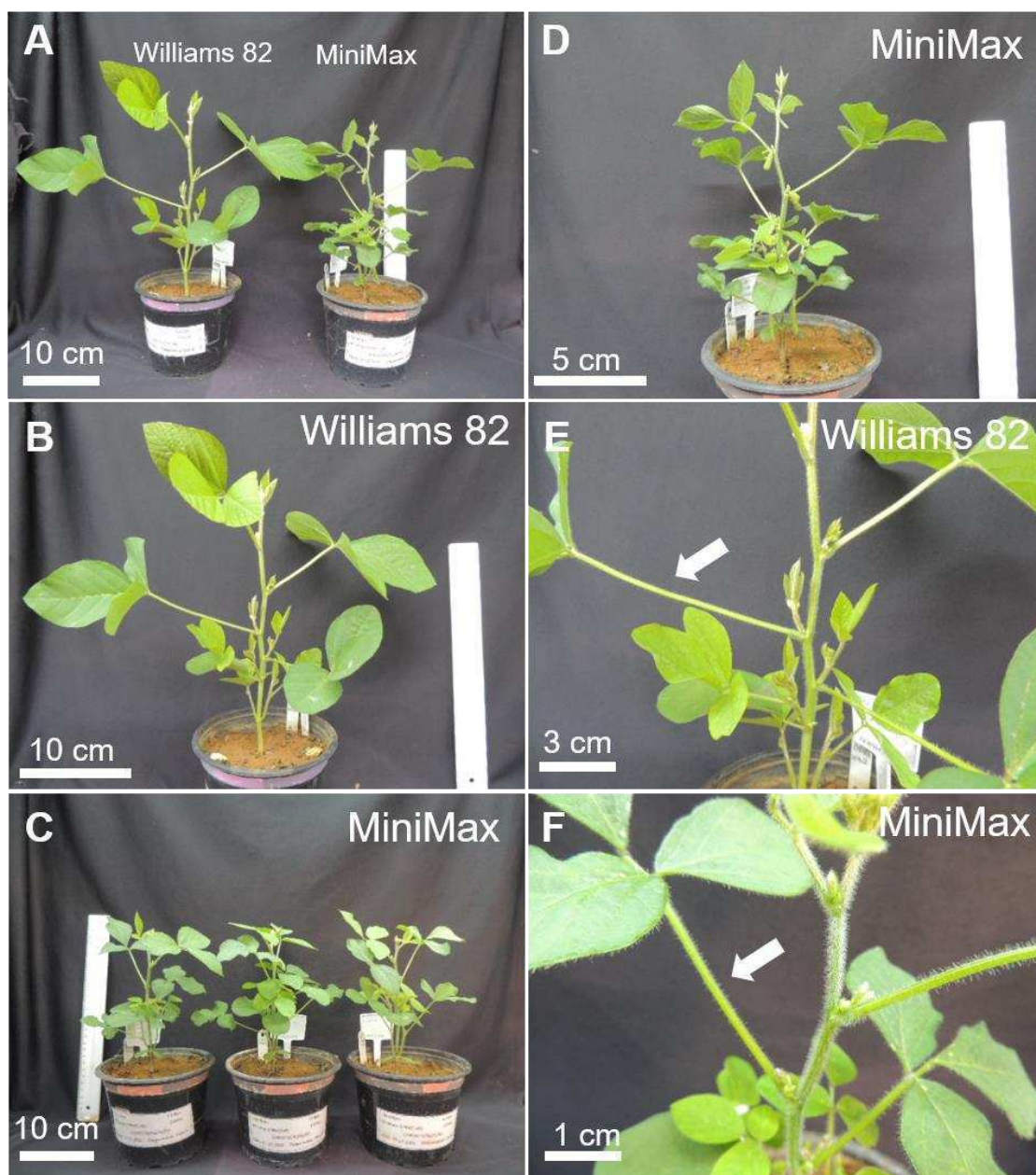


Figura 2.1 Aspectos morfológicos de MiniMax e Williams 82.

A) Comparação entre Williams 82 e Minimax. B) Aspecto morfológico e altura de Williams 82. C) Comparação média entre três indivíduos de MiniMax. D) Aspecto morfológico e altura de MiniMax. E) Focando no pecíolo de Williams 82. F) Focando no pecíolo de MiniMax. Escala: (A; B; C= 10 cm), (D= 5cm), (E= 3 cm) e (F= 1 cm).

Para os resultados de alocação de biomassa, o atual modelo biológico para soja possui valores maiores quando comparado com Minimax (Fig.2.5), a alocação média de biomassa nas folhas de Williams 82 (Fig.2.5, A) é 3,36 g, isso porque possui quantidade e área foliar bastante expressiva, enquanto, que MiniMax por ter o porte mais compacto apresenta valores menores, com a média de 0,39 g ($p=0,004$), também é justificável, levando em consideração os dados apresentados acima para área foliar. A massa seca do caule (Fig.2.5, C) também é diferente entre os modelos, em que Williams 82 possui valor médio de 1,46 g e MiniMax 0,16 g ($p=0,001$).

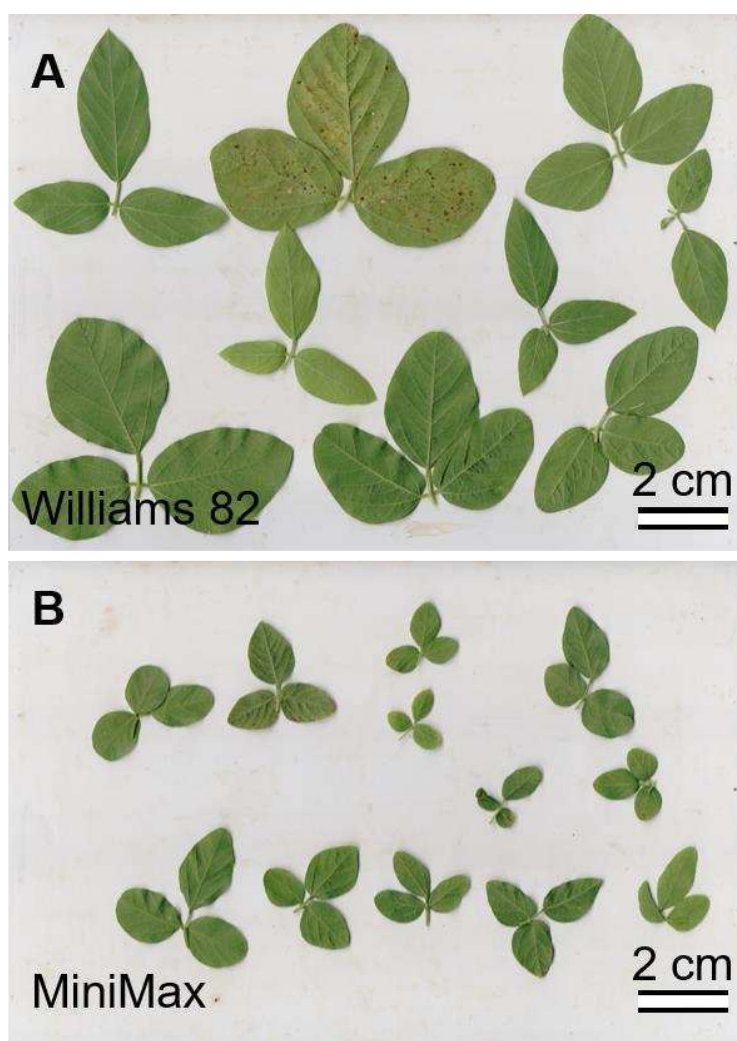


Figura 2.2 Área foliar entre *G. max* cv. MiniMax e *G. max* cv. Williams 82.

A) MiniMax. B) Williams 82. Escala= 2cm.

Também nesse sentido, a massa seca das vagens e o número de vagens são maiores para Williams 82, com 1,96 g e 24,6 vagens (Fig.2.5, B), diferentemente, MiniMax apresenta 0,60 g e 7,16 vagens ($p=0,001$). Todas as contribuições para pesquisa com o uso de Williams 82 é indiscutível, porém, MiniMax apresenta características morfológicas melhores para se tornar o principal modelo em estudos com soja. No entanto, apenas com alguns parâmetros medidos e mostrados nesse trabalho conseguimos demonstrar as inúmeras vantagens que o potencial modelo diminuto MiniMax poderia agregar em experimentos como soja ou leguminosas de modo geral. Apesar de Minimax apresentar quantidade de folhas bem inferior comparado com Williams 82, podemos dizer que é proporcional ao seu tamanho compacto (Fig.2.1, C), além disso, o uso de MiniMax não resultaria em dificuldade para análises foliar, problema este encontrando, por exemplo, em *Arabidopsis thaliana*, que dispõe de uma quantidade de tecido vegetal muito pequena.

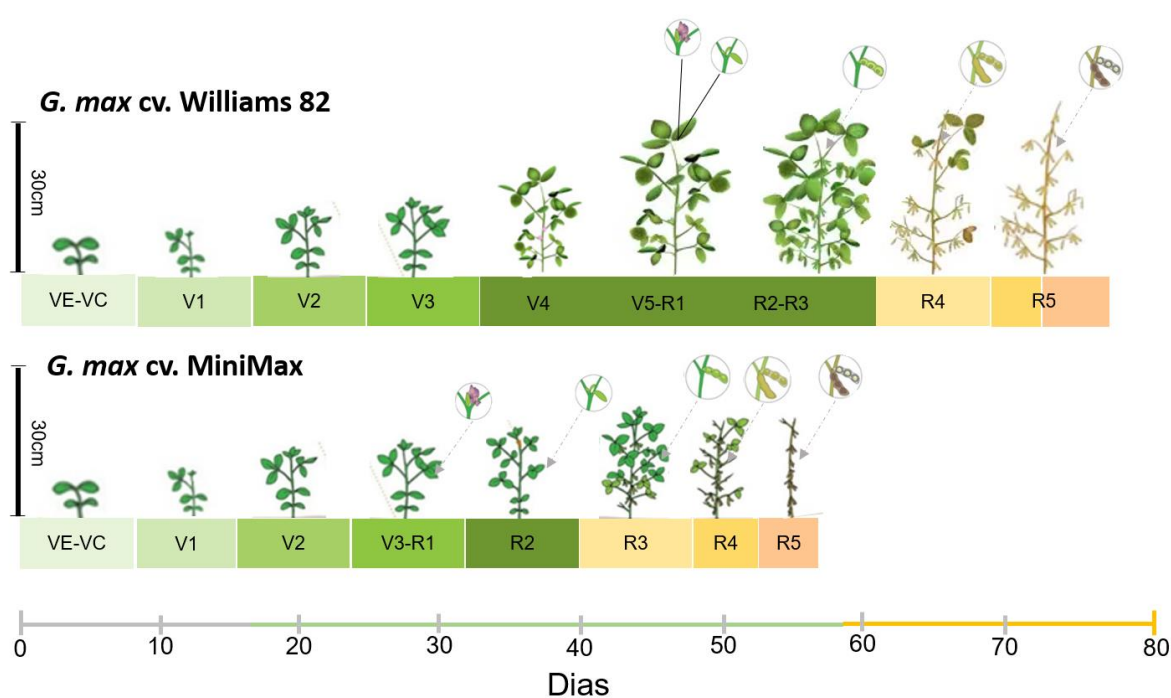


Figura 2.3 Fenologia entre as plantas de soja *G. max* cv. MiniMax e *G. max* cv. Williams 82.

Outro ponto negativo de Williams 82 como modelo é o comprimento do pecíolo (Fig.2.1, E), isso faz com que as plantas ocupem um espaço muito grande em bancada de vegetação. O porte da planta de Williams 82 não corresponde ao aspecto esperado para um organismo modelo, sua característica mais voltada para cultivares de aptidão agrícola. Isso enfatiza a dificuldade encontrada por geneticistas ao utilizar materiais

com porte grande e crescimento tardio em pesquisa para validação de genes em soja. O uso potencial de MiniMax em estudos se justifica de modo que, o ciclo entre gerações entre os dois materiais modelos se deve ao hábito de crescimento diferente. Algumas avaliações qualitativas feitas durante o cultivo das plantas, mostram a velocidade de transição entre fases vegetativas e reprodutivas, aos 30 dias de cultivo as plantas de MiniMax já se encontravam na fase reprodutivas, especificamente no estágio reprodutivo R1, enquanto que o modelo Williams 82 se encontrava ainda no estágio vegetativo, referido como V3, tendo o terceiro par de trifólio completamente expandido (Fig.2.3). Para estudos da comunidade científica que buscam entender características reguladas por genes de interesse para cultura da soja, o uso de MiniMax nesses estudos poderia acelerar novos achados, atrelado ao seu crescimento precoce e tamanho diminuto. O genótipo Williams 82 possui arquitetura grande, isso explica o tempo que as plantas demoram pra crescer, desenvolver e realizar o enchimento das vagens em casa de vegetação.

A MiniMax apresenta não somente um crescimento acelerado, mas também a fase de finalização do estágio reprodutivo mais rápido, ou seja, o enchimento das vagens e maturação (secagem das vagens), comprovando uma grande quantidade de vantagens que poderiam ser obtidas com o uso deste genótipo como material de estudo. As fases iniciais de germinação entre os dois materiais não apresentam diferenças, embora isso esteja mais relacionado ao crescimento por meio das reservas oriundas da semente (Fig.2.3). Ainda, a MiniMax após atingir cinco pares de trifólio na aste principal, cessa o crescimento em altura e isso a possibilita investir em órgãos reprodutivos (flores e vagens) mais cedo do que Williams 82 que ainda permanece crescendo em altura, e nisso precisa de mais tempo no estágio vegetativo. A proposta de expressão fenotípica entre os dois materiais foi elaborada para uso diferente, MiniMax para estudos com leguminosas, enquanto que Williams inicialmente foi desenvolvida para aptidão agrícola, dado o seu porte e produtividade por planta.

O uso de modelos biológicos com essas características semelhantes encontradas em *Glycine max* cv. MiniMax, foram e continuam sendo muito importante para estudos com plantas (Bishop et al., 1999; Koornneef and Meinke, 2010; Meinke et al., 1998; Meissner et al., 1997; Pnueli et al., 2001; Yang et al., 2020). Importante frisar, que estes dados apresentados é algo inédito até o momento, visto que quase nenhuma informação para este material promissor são relatados na literatura, muito

menos uma comparação com Williams 82, o atual modelo estabelecido para soja (Schmutz et al., 2010). A quantidade de caminhos que podem ser traçados para estudos com MiniMax são infinitos, tendo em vista todo o seu potencial.

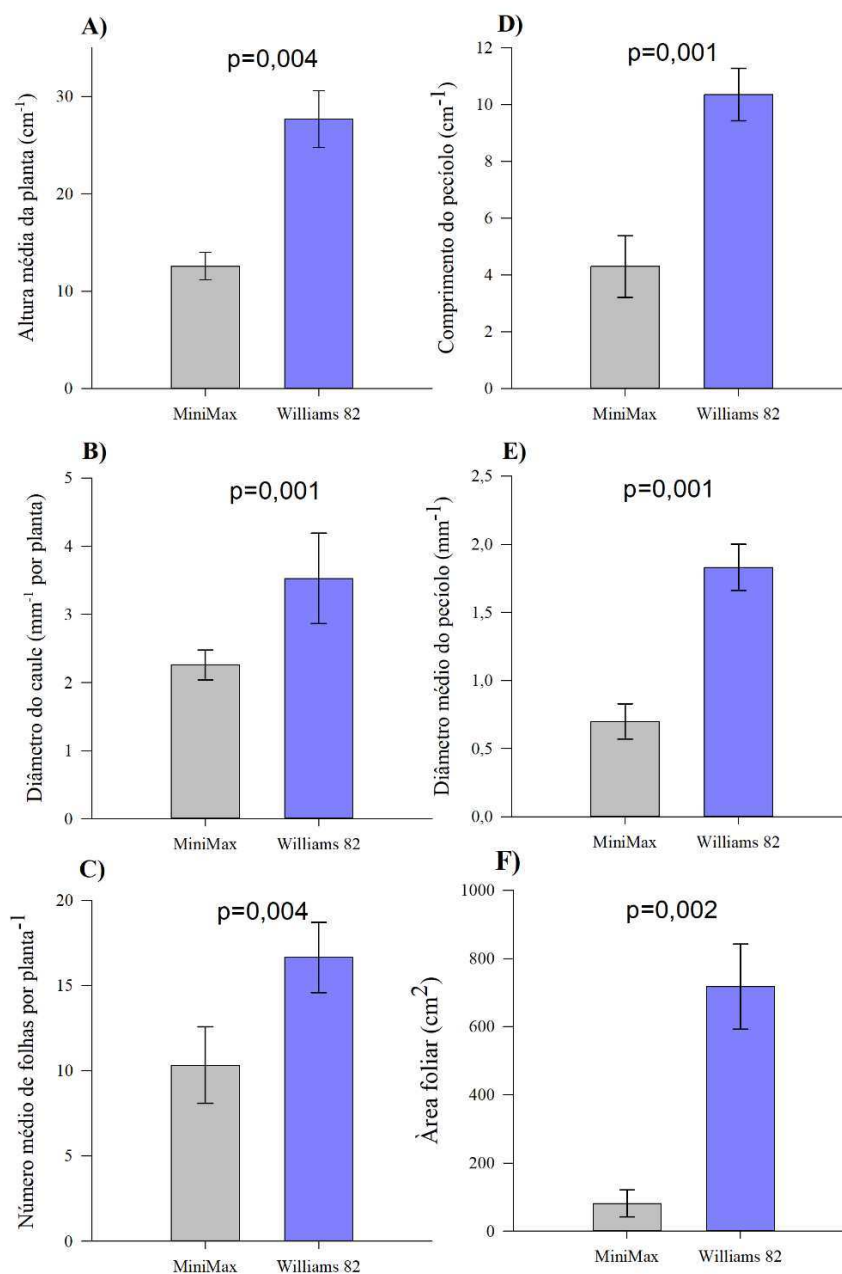


Figura 2.4 Parâmetros morfológicas de MiniMax e Williams 82.

(A) Altura média da planta. (B) Diâmetro do caule. (C) Número médio de folhas. (D) Comprimento do pecíolo. (E) Diâmetro médio do pecíolo. (F) Área foliar. (n=12), (média ± desvio padrão).

O estabelecimento de um modelo para soja que não somente se conheça as bases genéticas, mas também possua características morfológicas adequadas para estudos com plantas, tendem a agregar ainda mais o futuro da soja. Além disso, o desenvolvimento de uma população de mutantes derivada um material aceito por toda a comunidade científica como fonte de estudos se faz necessário, isso porque é observado uma vasta quantidade de estudos feitos com soja, mas normalmente o uso de diferentes acessos, isso dificulta um censo comum para melhoristas de soja e grupos de pesquisas afins, o que difere para *Arabidopsis thaliana* como organismo modelo, possuem coleções de mutantes caracterizados e disponível acesso para a comunidade científica de plantas (Provar *et al.*, 2016).

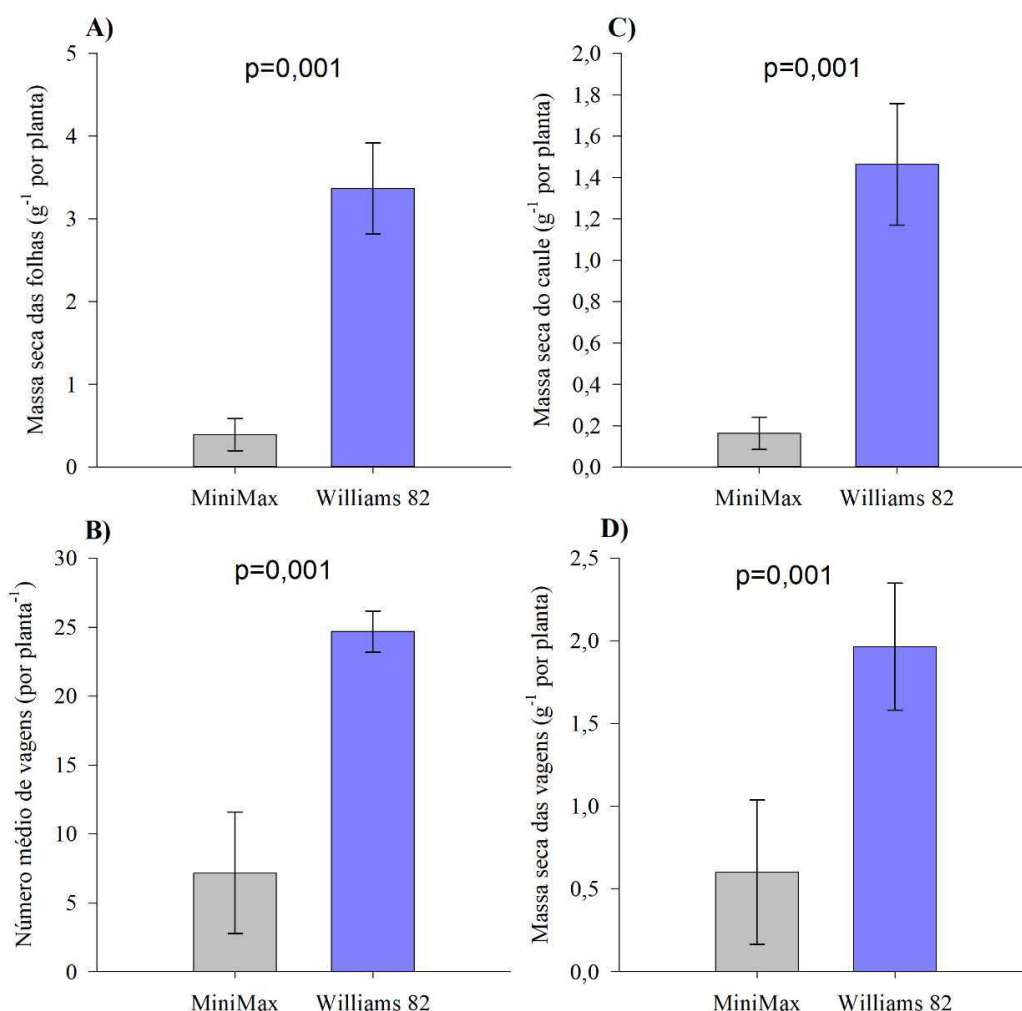


Figura 2.5 Alocação de biomassa entre MiniMax e Williams 82.

A) Massa seca das folhas. B) Número de vagens. C) Massa seca do caule. D) Massa seca das vagens. (n=12), (média \pm desvio padrão).

Desta forma, resgatar e estabelecer MiniMax para uso em pesquisas de soja, tem como principal ponto de partida estudos básicos como esse. O material biológico MiniMax relatado por (Matthews et al., 2007), apesar de ser extremamente promissor, possui alguns problemas, um deles é o cruzamento com materiais que apresentam hábito de crescimento indeterminado, fato este visto em um dos nossos experimentos que serão discutidos mais à frente, no entanto isto torna limitante o uso de Minimax para cruzamento com acessos diferentes, passo muito importante para desenvolver populações segregantes, utilizadas para a identificação de QTLs (loci de características quantitativas) de interesse para cultura da soja, mas tivemos sucesso e isso será discutido mais adiante (Capítulo 4).

2.4 CONCLUSÃO

Nossos resultados confirmam características bastante promissoras da cv. miniatura de soja MiniMax. Os atributos morfológicos, principalmente o que envolve a estrutura compacta da planta, será de extrema importância para pesquisadores de soja. A comparação com o modelo estabelecido *G. max* cv. Williams 82 mostrou que MiniMax pode ter êxito no seu estabelecimento como modelo também para cultura da soja. O tamanho reduzido da soja MiniMax e seu crescimento rápido serão determinantes para futuro estudos. Assim, podemos concluir que MiniMax apresenta características que a torna um bom modelo genético, isso inclui altura da planta reduzida aliado à sua arquitetura compacta com diâmetro do caule, comprimento e diâmetro do pecíolo, número de folhas e área foliar.

REFERÊNCIAS

- Baianu I, You T, Costescu D, Lozano P, Prisecaru V, Nelson R (2012).** Determination of Soybean Oil, Protein and Amino Acid Residues in Soybean Seeds by High Resolution Nuclear Magnetic Resonance (NMRS) and Near Infrared (NIRS). *Nat Prec npre*.2012.7053.1. <https://doi.org/10.1038/npre.2012.7053.1>
- Bernard RL, Cremeens CR (1988).** Registration of 'Will' Soybean. *Crop Science* 28, 1028–1028. <https://doi.org/10.2135/cropsci1988.0011183X002800060050x>
- Bishop GJ, Nomura T, Yokota T, Harrison K, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Jones JDG, Kamiya Y (1999).** The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 1761–1766. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1761>
- Castro-Valdecantos P, Puértolas J, Dodd IC (2023).** Similar soil drying-induced stomatal closure in soybean genotypes varying in abscisic acid accumulation and stomatal sensitivity to abscisic acid. *Funct. Plant Biol.* 51. <https://doi.org/10.1071/FP23012>
- Chai M, Fan R, Huang Y, Jiang X, Wai MH, Yang Q, Su H, Liu K, Ma S, Chen Z, Wang F, Qin Y, Cai H (2022).** GmbZIP152, a Soybean bZIP Transcription Factor, Confers Multiple Biotic and Abiotic Stress Responses in Plant. *IJMS* 23, 10935. <https://doi.org/10.3390/ijms231810935>
- Chen Z, Zhong W, Zhou Y, Ji P, Wan Y, Shi S, Yang Z, Gong Y, Mu F, Chen S (2022).** Integrative analysis of metabolome and transcriptome reveals the improvements of seed quality in vegetable soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Phytochemistry* 200, 113216. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113216>
- Clark CB, Wang W, Wang Y, Fear GJ, Wen Z, Wang D, Ren B, Ma J (2022).** Identification and molecular mapping of a major quantitative trait locus underlying branch angle in soybean. *Theor Appl Genet* 135, 777–784. <https://doi.org/10.1007/s00122-021-03995-9>

- Fields J, Saxton AM, Beyl CA, Kopsell DA, Cregan PB, Hyten DL, Cuvaca I, Pantalone VR (2023).** Seed Protein and Oil QTL in a Prominent Glycine max Genetic Pedigree: Enhancing Stability for Marker Assisted Selection. *Agronomy* 13, 567. <https://doi.org/10.3390/agronomy13020567>
- Kim, M.Y. et al (2010).** Whole-genome sequencing and intensive analysis of the undomesticated soybean (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.) genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 22032–22037. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009526107>
- Klink VP, MacDonald MH, Martins VE, Park SC, Kim KH, Baek SH, Matthews B (2008).** MiniMax, a new diminutive Glycine max genotype with a rapid life cycle, embryogenic potential and transformation capabilities. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 92, 183–195. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9323-3>
- Knizia D, Yuan J, Bellaloui N, Vuong T, Usovsky M, Song Q, Betts F, Register T, Williams E, Lakhssassi N, Mazouz H, Nguyen HT, Meksem K, Mengistu A, Kassem MA (2021).** The Soybean High Density ‘Forrest’ by ‘Williams 82’ SNP-Based Genetic Linkage Map Identifies QTL and Candidate Genes for Seed Isoflavone Content. *Plants* 10, 2029. <https://doi.org/10.3390/plants10102029>
- Koornneef M, Meinke D (2010).** The development of Arabidopsis as a model plant. *The Plant Journal* 61, 909–921. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04086.x>
- Lambert RJ, Johnson RR (1978).** Leaf Angle, Tassel Morphology, and the Performance of Maize Hybrids¹. *Crop Science* 18, 499–502. <https://doi.org/10.2135/cropsci1978.0011183X001800030037x>
- Lee J, Chin JH, Ahn SN, Koh HJ (2015).** Brief History and Perspectives on Plant Breeding, in: Koh, H.-J., Kwon, S.-Y., Thomson, M. (Eds.), *Current Technologies in Plant Molecular Breeding*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 1–14. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9996-6_1
- Li Ying-hui Zhou G. et al (2014).** De novo assembly of soybean wild relatives for pan-genome analysis of diversity and agronomic traits. *Nat Biotechnol* 32, 1045–1052. <https://doi.org/10.1038/nbt.2979>

- Liu Y, Tian Z (2020).** From one linear genome to a graph-based pan-genome: a new era for genomics. *Sci. China Life Sci.* 63, 1938–1941. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1808-0>
- Ma Y, Shang Y (2023).** Is bitter actually better? Targeting a soyasaponin acetyltransferase affects soybean seed germination. *JIPB* 65, 2409–2411. <https://doi.org/10.1111/jipb.13563>
- Matthews BF, MacDonald MH, Song QJ, Cregan PB, Lewers KS (2007).** Registration of 'MiniMax' Soybean. *J of Plant Registrations* 1, 97–98. <https://doi.org/10.3198/jpr2006.10.0653crc>
- McBlain BA, Bernard RL (1987).** A new gene affecting the time of flowering and maturity in soybeans. *Journal of Heredity* 78, 160–162. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a110349>
- Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M (1998).** *Arabidopsis thaliana* : A Model Plant for Genome Analysis. *Science* 282, 662–682. <https://doi.org/10.1126/science.282.5389.662>
- Meissner R, Jacobson Y, Melamed S, Levyatuv S, Shalev G, Ashri A, Elkind Y, Levy A (1997).** A new model system for tomato genetics. *The Plant Journal* 12, 1465–1472. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1997.12061465.x>
- Meyer RS, DuVal AE, Jensen HR (2012).** Patterns and processes in crop domestication: an historical review and quantitative analysis of 203 global food crops. *New Phytologist* 196, 29–48. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04253.x>
- Othman SMIS, Mustaffa AF, Mohd Zahid NII, Che-Othman MH, Samad AFA, Goh HH, Ismail I (2024).** Harnessing the potential of non-coding RNA: An insight into its mechanism and interaction in plant biotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 207, 108387. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2024.108387>
- Pnueli L, Gutfinger T, Hareven D, Ben-Naim O, Ron N, Adir N, Lifschitz E (2001).** Tomato SP-Interacting Proteins Define a Conserved Signaling System That

Regulates Shoot Architecture and Flowering. *Plant Cell* 13, 2687–2702. <https://doi.org/10.1105/tpc.010293>

Provart NJ, Alonso J, Assmann SM, Bergmann D, Brady SM, Brkljacic J, Browse J, Chapple C, Colot V, Cutler S, Dangl J, Ehrhardt D, Friesner JD, Frommer WB, Grotewold E, Meyerowitz E, Nemhauser J, Nordborg M, Pikaard C, Shanklin J, Somerville C, Stitt, M, Torii KU, Waese J, Wagner D, McCourt P (2016). 50 years of Arabidopsis research: highlights and future directions. *New Phytologist* 209, 921–944. <https://doi.org/10.1111/nph.13687>

Rahman SU, McCoy E, Raza G, Ali Z, Mansoor S, Amin I (2023). Improvement of Soybean; A Way Forward Transition from Genetic Engineering to New Plant Breeding Technologies. *Mol Biotechnol* 65, 162–180. <https://doi.org/10.1007/s12033-022-00456-6>

Schmutz J. et al (2010). Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463, 178–183. <https://doi.org/10.1038/nature08670>

Shen Y, Du H, Liu Y, Ni L, Wang Z, Liang C, Tian Z (2019). Update soybean Zhonghuang 13 genome to a golden reference. *Sci. China Life Sci.* 62, 1257–1260. <https://doi.org/10.1007/s11427-019-9822-2>

Shen Y, Liu J, Geng H, Zhang J, Liu Y, Zhang H, Xing S, Du J, Ma S, Tian Z (2018). De novo assembly of a Chinese soybean genome. *Sci. China Life Sci.* 61, 871–884. <https://doi.org/10.1007/s11427-018-9360-0>

Smýkal P, Nelson M, Berger J, Von Wettberg E (2018). The Impact of Genetic Changes during Crop Domestication. *Agronomy* 8, 119. <https://doi.org/10.3390/agronomy8070119>

Tao Y, Jordan DR, Mace ES (2020). A Graph-Based Pan-Genome Guides Biological Discovery. *Molecular Plant* 13, 1247–1249. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.07.020>

Tian J, Wang C, Xia J, Wu L, Xu G, Wu W, Li D, Qin W, Han X, Chen Q, Jin W, Tian F (2019). Teosinte ligule allele narrows plant architecture and enhances high-

density maize yields. *Science* 365, 658–664. <https://doi.org/10.1126/science.aax5482>

Valliyodan B. et al (2019). Construction and comparison of three reference-quality genome assemblies for soybean. *The Plant Journal* 100, 1066–1082. <https://doi.org/10.1111/tpj.14500>

Xie M, Chung CYL, Li MW, Wong FL, Wang X, Liu A, Wang Z, Leung AKY, Wong TH, Tong SW, Xiao Z, Fan K, Ng MS, Qi X, Yang L, Deng T, He L, Chen L, Fu A, Ding Q, He J, Chung G, Isobe S, Tanabata T, Valliyodan B, Nguyen HT, Cannon SB, Foyer CH, Chan TF, Lam HM (2019). A reference-grade wild soybean genome. *Nat Commun* 10, 1216. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09142-9>

Yang Z, Zhang H, Li X, Shen H, Gao J, Hou S, Zhang B, Mayes S, Bennett M, Ma J, Wu C, Sui Y, Han Y, Wang X (2020). A mini foxtail millet with an Arabidopsis-like life cycle as a C4 model system. *Nat. Plants* 6, 1167–1178. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0747-7>

Zaynab M, Xu ZS, Yad HassanA, Hussain A, Sharif Y, Al-Yahyai R, Sadler M, Aloufi AS, Li S (2024). Genome-wide analysis and expression profiling of CalS genes in *Glycine max* revealed their role in development and salt stress. *Journal of King Saud University - Science* 36, 103049. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2023.103049>

CAPÍTULO 3: Resposta do potencial modelo biológico MiniMax sob omissão nitrogenada

3.1 INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merr] é uma das culturas mais importantes do mundo, de amplo cultivo como fonte de proteína e óleo para alimentação humana e animal. A soja é uma leguminosa, pertencente à família Fabaceae. Estudos revelaram que as leguminosas surgiram por volta sessenta milhões de anos atrás (Lavin *et al.*, 2005). Os legumes são o segundo maior grupo de culturas agrícolas importantes em todo o mundo, e em termos de área cultivada, e a soja é a quarta cultura do mundo, apenas atrás do trigo (*Triticum aestivum*), milho (*Zea mays*) e arroz (*Oryza sativa*) (Raza *et al.*, 2020). Neste sentido, a soja tem a produtividade relacionada e ao mesmo tempo afetada pela oferta de nitrogênio durante o cultivo, sendo este o nutriente com maior demanda pela planta (Bellaloui *et al.*, 2015). A soja além de outras leguminosas, obtém o nitrogênio através da fixação biológica com bactérias do solo. A associação simbiótica estabelecida entre leguminosas e bactérias do tipo *Bradyrhizobium* ocorre por meio dos nódulos radiculares (Karmakar *et al.*, 2015). O processo de fixação biológica do nitrogênio, resumidamente, se trata da conversão do nitrogênio molecular atmosférico (N_2) em amônia (NH_3), em seguida, pode ser assimilado organicamente e direcionado para síntese de outros componentes orgânicos nitrogenados necessários pela planta.

Apesar da concentração de nitrogênio atmosférico ser bastante abundante (Bernhard, A. 2010), pouquíssimas espécies são capazes de fixar biologicamente o nitrogênio, o que torna extremamente limitante o crescimento e desenvolvimento das plantas (Aboelfadel *et al.*, 2023). A busca de proteína é de interesse para humanos ao longo da história, e o processo de fixação de N está diretamente relacionado com o teor proteico (Semba, 2016; Webb *et al.*, 2018). Isso, em função da disponibilidade limitada do nitrogênio para produzir aminoácidos, que é assegurado pelo fornecimento nitrogenado de origem biológica ou química (Henchion *et al.*, 2017; Parisi *et al.*, 2020). As mudanças climáticas tem sido o tema de muitos estudos nas últimas décadas, e não é diferente para a comunidade científica da soja, que busca incessantemente reduzir o uso de fertilizantes químicos na agricultura, muito em virtude dos custos diretos para o cultivo da soja e os impactos causados ao meio ambiente. A

preocupação com este tema é relacionado principalmente ao processo de fabricação de fertilizantes nitrogenados pelo método de Haber-Bosch, que é responsável pela liberação de uma enorme quantidade de dióxido de carbono anualmente na atmosfera (Zhang *et al.*, 2013).

Nos últimos anos, a busca de entender e melhorar a fixação biológica do nitrogênio em leguminosas foi bastante explorada. Recentemente, o conhecimento da base molecular rizóbio-leguminosa tem sido bastante estudado, permitindo o desenvolvimento de novas cepas bacterianas capazes de melhorar etapas do processo de simbiose (Quelas *et al.*, 2021). Existem muitos cenários no estabelecimento de uma eficiente cepa de rizóbio para atender o mercado, isso porque envolve múltiplos fatores bióticos e abióticos (Goyal *et al.*, 2021), além disso o próprio modo de validação em uma cultivar de soja, na qual necessita de amostragens durante o cultivo para classificar eficiência de nodulação, número de nódulos, quantidade de nitrogênio fixada em cada estágio da planta. Em geral, *Arabidopsis thaliana* tem um uso amplo como espécie modelo, no entanto, muitos processos biológicos não ocorrem em *Arabidopsis* e precisa ser estudado em outras espécies. Na busca incessante em descobrir os genes responsáveis pela nodulação em plantas leguminosas, alguns modelos biológicos foram submetidos a técnicas de mutagênese, como por exemplo, *Lotus japonicus*, *Medicago truncatula*, soja e feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) (Bolon *et al.*, 2011; Espina *et al.*, 2018; Penmetsa and Cook, 2000; Perry *et al.*, 2003; Szczyglowski *et al.*, 1998).

Para estudos com soja e principalmente para leguminosas, a *Glycine max* cv. MiniMax, é um potencial modelo para estudos que abrange diferentes espécies leguminosas, foi lançada em 2007 por (Matthews *et al.*, 2007) com objetivo de se tornar o principal modelo para estudos que envolve interesse buscados para soja e leguminosas de modo geral. No entanto, poucos estudos são encontrados buscando evidenciar as respostas deste modelo em condições experimentais para omissão nutricional, bem como o potencial de simbiose com bactérias do tipo rizobium (fixadoras de nitrogênio). Neste sentido, neste capítulo temos como principal objetivo testar o genótipo *G. max* cv. MiniMax sob cultivo em casa de vegetação, com omissão de nitrogênio e inocular com *Bradyrhizobium elkanii* para avaliar as repostas morfológicas durante o cultivo.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais (20°45”S, 42°51”W). Para avaliar a reposta de *Glycine max* cv. MiniMax sob omissão nitrogenada e inoculada com bactérias nodulantes do tipo *Bradyrhizobium elkanil*, cultivamos as plantas em casa de vegetação com controle de temperatura e umidade.

3.2.1 Instalação do experimento

Para a instalação do experimento duas situações foram impostas. Primeiro, o tratamento Controle: seis (6) vasos com capacidade de 1 L, acrescido com (solo + substrato comercial Tropstrato HT®) na proporção 3:1, pH do solo corrigido com 5g de calcário dolomítico, acrescido com 5,43 g de N-P-K (04-14-08), 1 g de cloreto de potássio e 5,43 g de superfosfato simples, para a correção da fertilidade em cada vaso. Segundo, o tratamento com Inoculante: seis (6) vasos com capacidade de 1 L, acrescido com (solo + substrato comercial Tropstrato HT®) na proporção 3:1, pH do solo corrigido com 5g de calcário dolomítico, acrescido com 1,8 de cloreto de potássio e 5,43g de superfosfato simples para a correção da fertilidade. Em cada vaso foi semeado três (3) sementes por vaso, na profundidade de 1 cm. No tratamento com inoculante turfoso, as sementes foram tratadas *Bradyrhizobium elkanil* (Biomax® Premium), para melhor aderência as sementes foram umedecidas com solução açucarada, foi uniformemente espalhado sobre as sementes e semeado logo em seguida. Após sete dias da semeadura, selecionamos plântulas homogêneas de cada vaso, de modo que ficasse somente uma plântula por vaso.

3.2.2 Avaliações morfológicas

Para determinar as principais diferenças morfológicas de MiniMax sob um ensaio básico de inoculação, acessamos os seguintes parâmetros: altura da planta, diâmetro do caule, número de folhas, comprimento da raiz, número de vagens, número de sementes. Além disso, avaliamos alocação de biomassa entre os órgãos: folha, caule, raiz e sementes. Para os parâmetros de altura e comprimento foi utilizado régua graduada, para o diâmetro utilizou-se o paquímetro digital eletrônico (Vinwer®). Também realizamos registro fotográfico das plantas em ambiente de casa de vegetação.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O genótipo MiniMax apresentou resultados bastante interessantes, tendo em vista que este material tem como objetivo ser utilizados em estudos com leguminosas no futuro. Além disso, respondeu surpreendentemente à inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio (*Bradyrhizobium elkanii*). Em suma, podemos observar aos 55 dias de cultivo em casa de vegetação um desenvolvimento da arquitetura área das plantas com inoculantes superior ao ensaio controle (Fig.3.1), isso pode ser em função do maior fornecimento de nitrogênio fixado biologicamente pelas bactérias nodulantes, bem como a melhor eficiência na absorção de outros nutrientes. A arquitetura do ensaio controle apesar de não ter sido comprometida, apresentou um padrão divergente ao ensaio com inoculante (Fig.3.1, a).

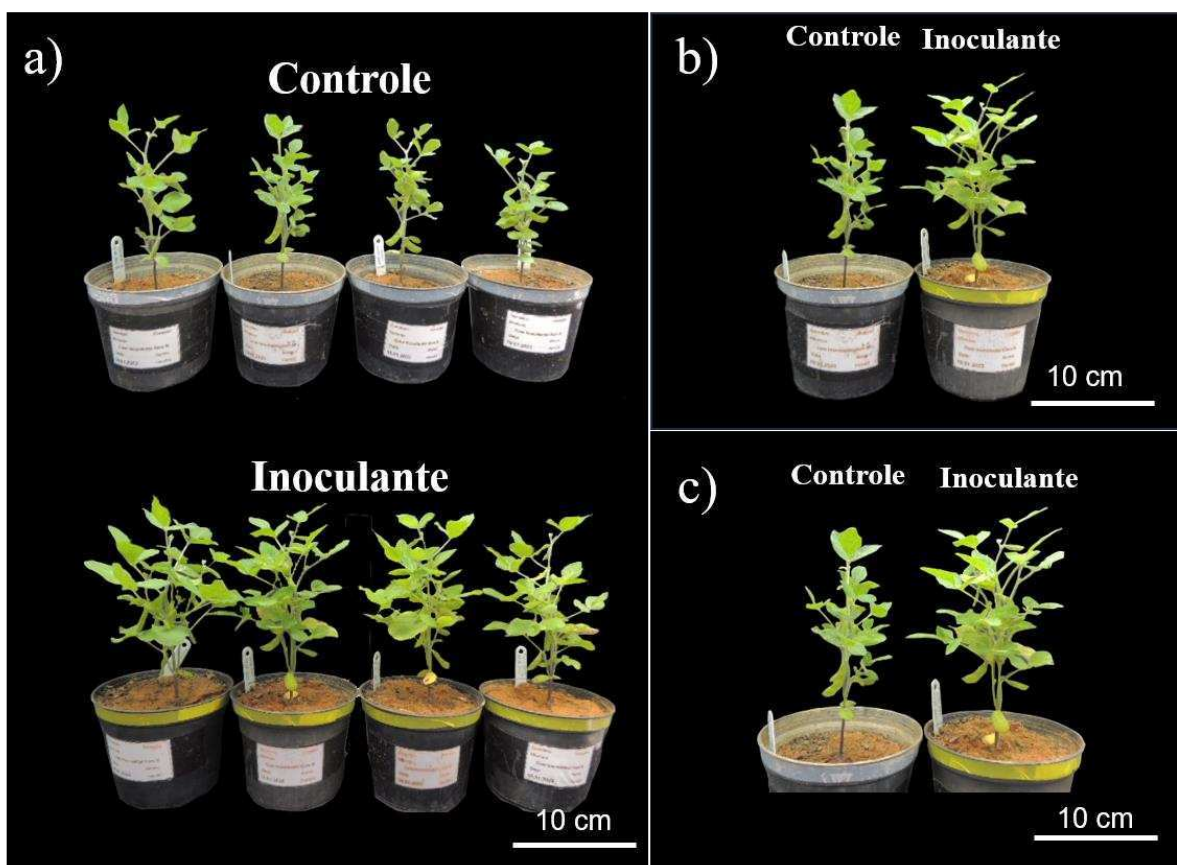


Figura 3.1 Aspectos morfológicos de *G. max* cv. MiniMax sob ensaio básico de omissão nitrogenada e inoculada com *Bradyrhizobium elkanii*.

A) Aspecto morfológico comparativo entre o ensaio controle e o inoculado. B) Comparação de MiniMax sob ensaio experimental. C) Imagem aproximada entre as plantas do controle e inoculadas.

Ao avaliarmos as características morfológicas, observamos que o parâmetro da altura das plantas (Fig.3.2, a) não apresentaram diferenças significativas ($p=0,173$). Ainda, o número de folhas foi bastante similar ($p=0,488$) entre o controle e o ensaio com inoculante (Fig.3.2, b), isso mostra que o padrão morfológico do genótipo MiniMax não foi afetado, mas comprometeu o desenvolvimento da área foliar, apesar de não ter sido feito este parâmetro.

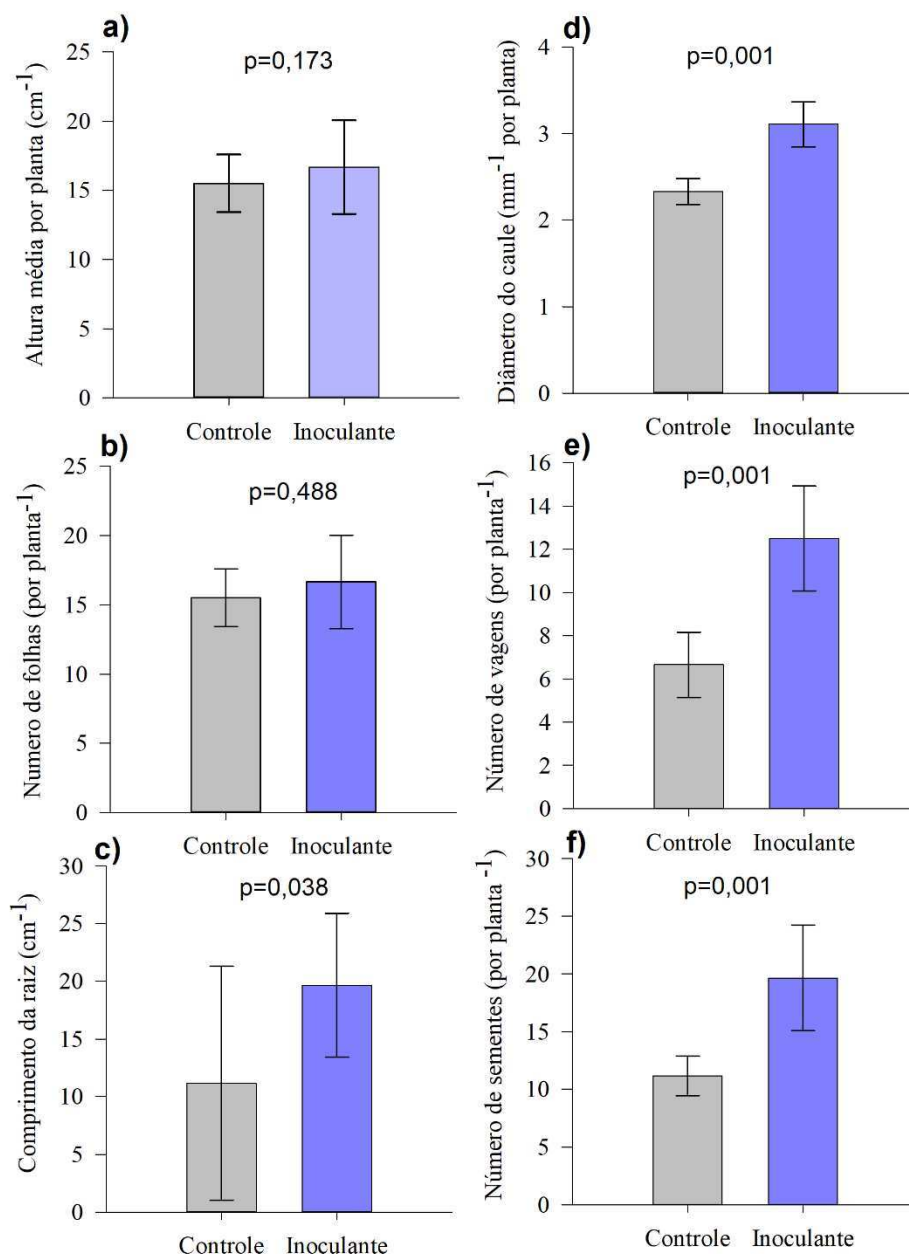


Figura 3.2 Parâmetros morfológicas do genótipo MiniMax sob omissão de nitrogênio.

A) Altura da planta. B) Número de folhas. C) Comprimento da raiz. D) Diâmetro do caule. E) Número de vagens. F) Número de sementes. (n=12), (média \pm desvio padrão).

Além disso, o comprimento da raiz (Fig.3.2, c) foi o parâmetro com maior diferença no ensaio experimental ($p=0,038$). O mesmo padrão de desenvolvimento da parte aérea discutido acima ocorreu para o sistema radicular, evidenciando uma melhor expressão fenotípica numa situação de bactérias nodulantes, promovendo maior oferta nitrogenada para as plantas. O diâmetro do caule (Fig.3.2, d) também apresentou diferenças ($p=0,001$), mas não tão divergentes, o controle com média de 2,33 mm e o ensaio com inoculante com 3,11 mm. O número de vagens (Fig.3.2, e) foi o parâmetro com maior incremento para o ensaio com inoculante ($p=0,001$), o controle com seis vagens e o com inoculante contendo duas vezes mais vagens. Neste sentido, o número médio de sementes (Fig.3.2, f) foi maior para o ensaio com melhor oferta de nitrogênio ($p=0,001$).

Para alocação de biomassa, as informações favorecem melhor rendimento para o ensaio com inoculante. A massa seca das folhas (Fig.3.3, a) foi superior ao controle ($p=0,0001$). A massa seca do caule (Fig.3.3, b) também teve maior incremento ($p=0,001$). A massa seca acumulada no sistema radicular (Fig.3.3, c) do ensaio com bactérias fixadoras de nitrogênio foi bastante superior ao controle ($p=0,0001$), com médias de 0,56 g e 0,2 g, respectivamente. As plantas com maior oferta nitrogenada mediada por bactérias *Bradyrhizobium elkanii* favoreceu maior acúmulo de massa seca ($p=0,001$) nas sementes (Fig.3.3, e). Avaliando o acúmulo de massa total (Fig.3.3, d) entre os ensaios, as plantas tratadas com inoculantes obtiveram o dobro em relação ao controle ($p=0,0002$). Apesar de alguns parâmetros não terem sido abordados neste ensaio experimental, entre eles a arquitetura do sistema radicular, número de nódulos e anatomia foliar e radicular, podem ser estudados em outros estudos com este genótipo anão. Os estudos com omissão nutricional, principalmente em relação ao nitrogênio já foi bastante explorado em plantas leguminosas. No entanto, pouquíssimos estudos foram realizados com este potencial modelo para estudos com leguminosas, assim, estes resultados básicos são evidências da importância que MiniMax pode favorecer em estudos científicos para plantas.

Este é o primeiro relato do uso de *G. max* cv. MiniMax (PI643148) sob um ensaio experimental de omissão nitrogenada e tratada com bactérias nodulantes (*Bradyrhizobium elkanii*), além disso, demonstrou sob condições de cultivo grande facilidade para distinguir e classificar as principais diferenças morfológicas. Estas características que MiniMax em especial apresenta, é de fundamental aplicabilidade

para estudos desta natureza, isso porque a classificação da eficiência de diferentes cepas nodulantes necessita de amostras durante o ciclo da planta, para poder determinar quais se destacam para o mercado. A facilidade de cultivo, manipulação e pouco espaço são qualidades que MiniMax possui frente a outros genótipos de ciclo longo e porte grande.

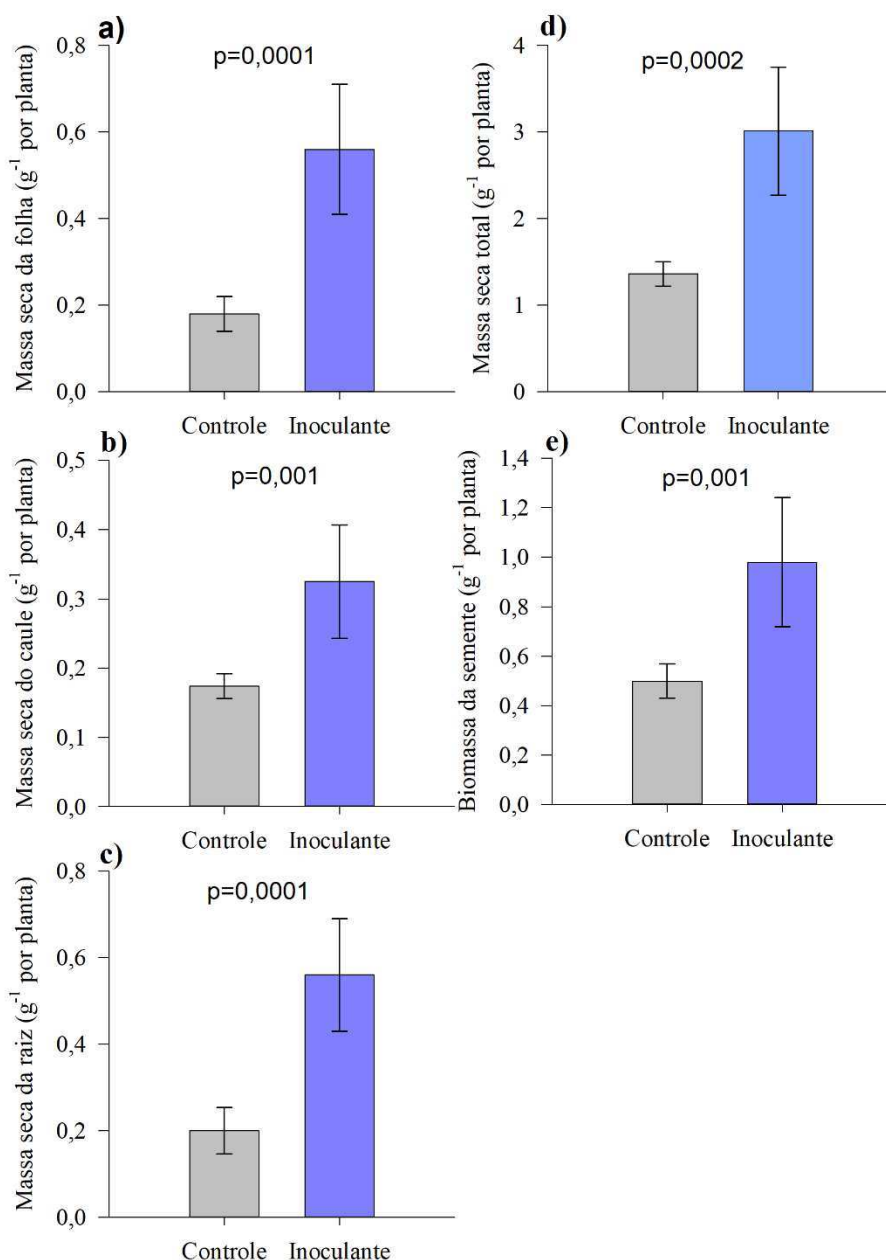


Figura 3.3 Partição de massa seca entre os diferentes órgãos de *G. max* cv. MiniMax sob omissão nitrogenada e tratadas com bactérias nodulantes (*Bradyrhizobium elkanii*).

A) Massa seca das folhas. B) Massa seca do caule. C) Massa seca da raiz. D) Massa seca total. E) Massa seca das sementes. (n=12), (média ± desvio padrão).

Ao acessarmos os parâmetros anatômicos entre o tecido foliar dos ensaios controle e inoculado, observamos incrementos superiores e significativos não tão evidentes quando avaliado somente os parâmetros morfológicos. Em suma, a espessura total da folha e a espessura do mesofilo apresentaram diferenças estatísticas (Figura 3.3, A, E).

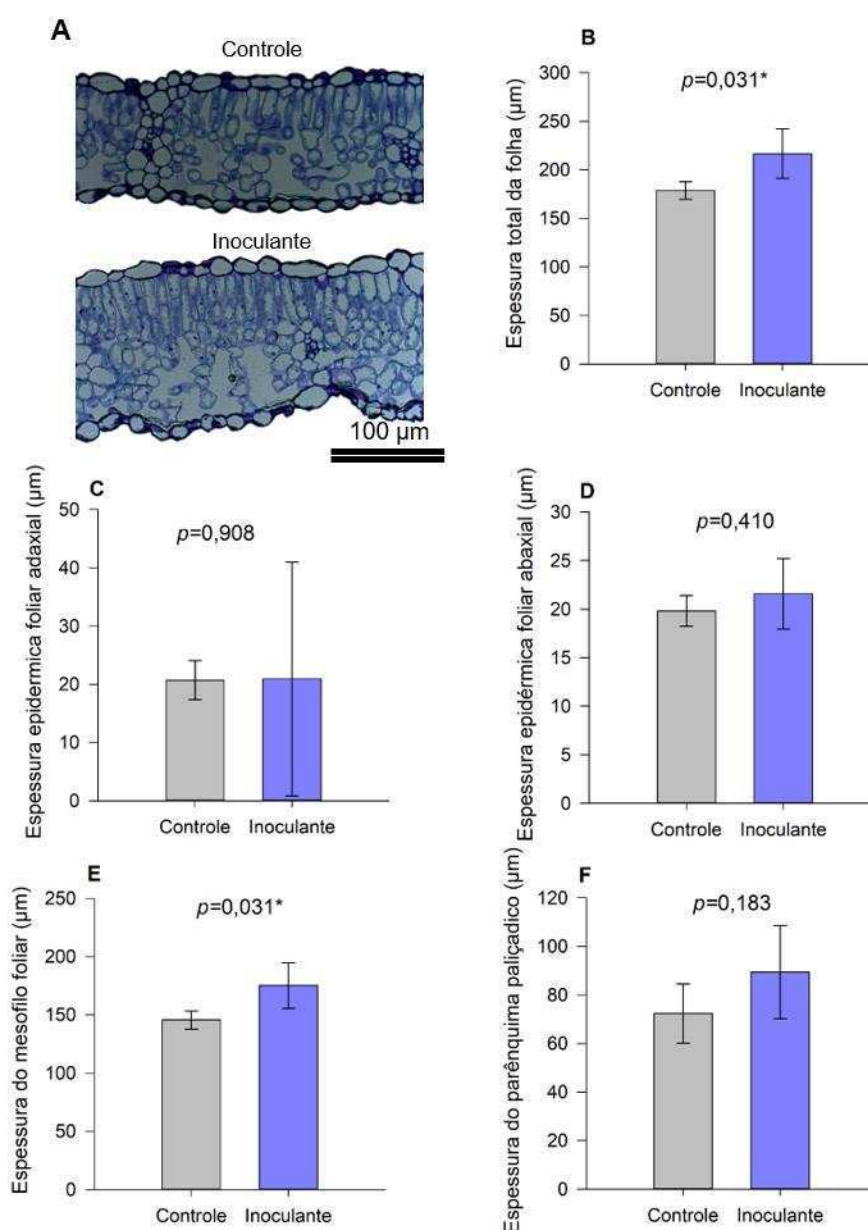


Figura 3.4 Parâmetros anatômicos do tecido foliar de *G. max* cv. MiniMax sob omissão nitrogenada.

A) Comparação anatômica das folhas entre os ensaios. B) Espessura total da folha. C) Espessura da epiderme adaxial. D) Espessura da epiderme abaxial. E) Espessura do mesofilo. F) Espessura do parênquima paliçádico. (n=8), (média \pm desvio padrão).

Outros parâmetros foliares como espessura da epiderme adaxial e abaxial não apresentaram variações discrepantes entre si (Figura 3.3, C, D). Ainda, sem apresentar diferença estatística, observamos maior investimento em parênquima paliçádico. O parênquima paliçádico é o tecido que apresenta maiores conteúdo de pigmento fotossintético na folha, isso explica o maior incremento de biomassa nas plantas e sementes do ensaio com inoculante. Com tudo, o ensaio controle não apresentou uma desorganização celular, mas afetou o desenvolvimento das folhas, principalmente nos tecidos anatômicos de grande importância para a planta como um todo, estes incluem o parênquima paliçádico e mesofilo.

Os cortes transversais do caule entre o controle e o inoculante não mostraram diferenças entre si (Figura 3.4). Para o tratamento controle, o único parâmetro que apresentou maior incremento ($p=0,726$) anatômico caulinar foi para espessura do córtex (Figura 3.4, C). Os demais parâmetros, espessura epidérmica e da área xilemática (Figura 3.4, B, E) não apresentaram diferenças ($p=0,906$ e $0,797$, respectivamente). Este ensaio experimental mostra que o impacto da pouca ou nenhuma disponibilidade nitrogenada no solo de cultivo, impacta ligeiramente modificações caulinares, a modo que possa comprometer o desenvolvimento das plantas de MiniMax, diferentemente observado para as folhas.

Na anatomia de raízes das plantas de MiniMax, quando acessado as medições dos tecidos anatômicos, observamos diferenças para ambas (Figura 3.5, B, C, D). A imagem dos cortes de ambos os ensaios (controle e inoculante), foi possível visualizar diferenças estruturais das raízes (Figura 3.5, A). A pouca disponibilidade nitrogenada para as plantas de MiniMax demonstra ter comprometido o crescimento e desenvolvimento, justificado pelo comprimento radicular e biomassa nas raízes (Figura 3.2, C e Figura 3.3, C). A espessura da epiderme ($p=0,0276$) teve maior incremento para as plantas inoculadas (Figura 3.6, B), bem como a espessura do córtex (Figura 3.6, C) com médias de ($59,472 \mu\text{m}$ e $274,83 \mu\text{m}$), respectivamente. O tecido cortical bem desenvolvido nas plantas inoculadas demonstra a eficiência das bactérias fixadoras de nitrogênio nas plantas leguminosas, principalmente a diminuta MiniMax, como potencial material de estudo para interações com rizobactérias. O cilindro vascular apresentou maior grau de desenvolvimento (Figura 3.4, A e D) quando comparado com o controle ($p=0,007$).

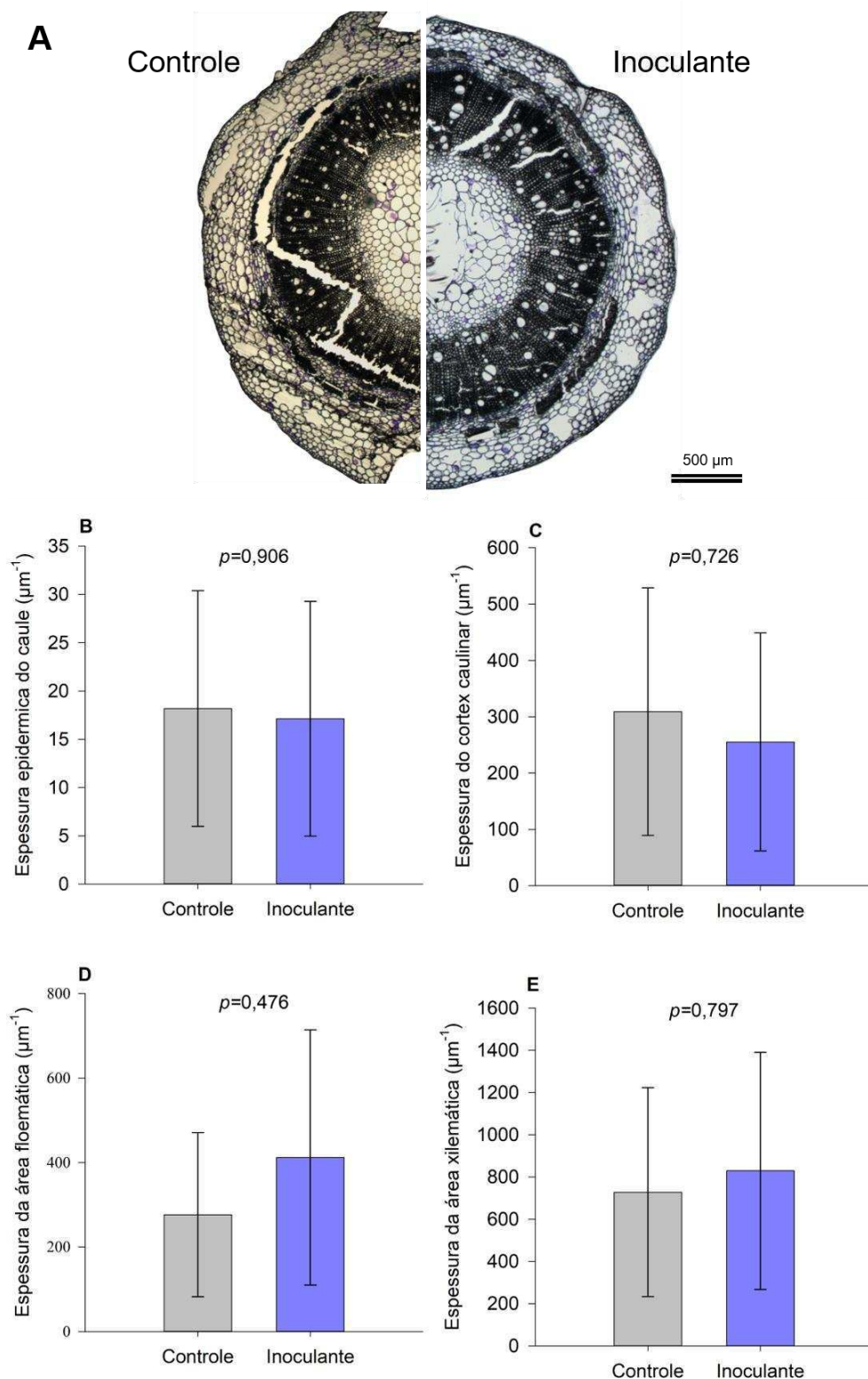


Figura 3.5 Parâmetros anatômicos do tecido caulinar de *G. max* cv. MiniMax sob omissão nitrogenada.

A) Corte transversal do caule. B) Espeçura epidérmica do caule. C) Espeçura do córtex. D) Espeçura da área floemática. E) Espeçura da área xilemática. (n=8), (média \pm desvio padrão).

Neste bioensaio com MiniMax, apresentamos pela primeira vez características anatômicas de MiniMax atribuídas a um estudo de omissão nitrogenada. Todas essas informações serão de extrema importância para correlacionar estudos mais complexos, na busca de entender mecanismos de interação entre planta e rizobactérias, tendo em vista que, tem se interessado bastante não somente a comunidade da soja bem como de leguminosas de modo geral em entender e selecionar bactérias mais eficientes para características edafoclimáticas de cada região. A MiniMax como potencial modelo para estudo de soja, pode ser utilizada para mapear cepas bacterianas não somente as fixadoras de nitrogênio, mas também as chamadas bactérias promotoras de crescimento.

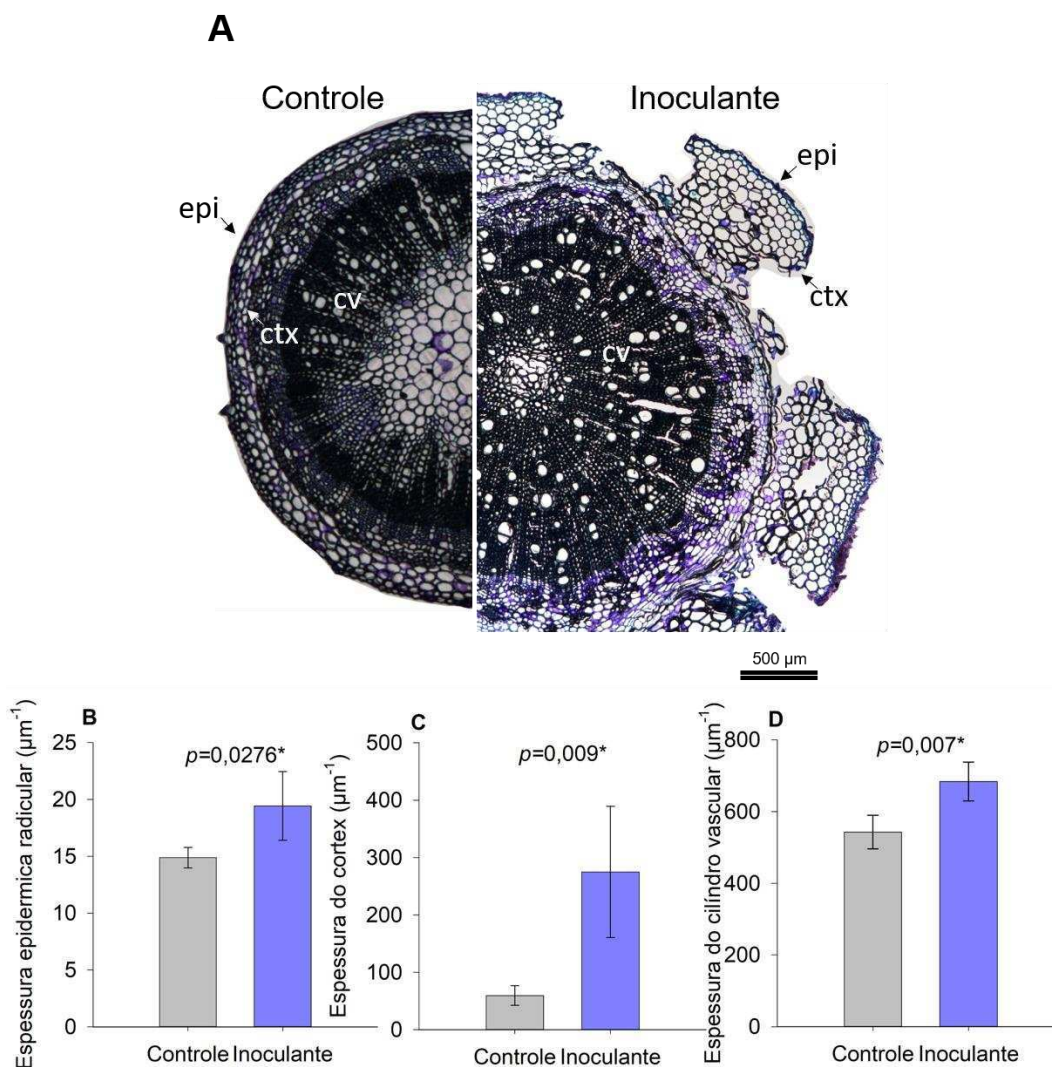


Figura 3.6 Aspectos anatômicos da raiz de *G. max* cv. MiniMax sob omissão nitrogenada e inoculada com Rizobactérias.

A) Corte transversal da raiz de MiniMax. B) Espessura epidérmica da raiz. C) Espessura do córtex. D) Espessura do cilindro vascular. (n=8), (média \pm desvio padrão).

Diante das novas perspectivas para a biotecnologia de cepas nodulantes em plantas leguminosas, para determinar a eficiência de uma cepa estudada a amostragem é crucial, assim plantas com o cultivo e monitoramento que facilitam a manipulação, seja em casa de vegetação ou em campo serão muito importantes para nova era científica das leguminosas, além do entusiasmo para implementação do processo de fixação biológica do nitrogênio em plantas não-leguminosas.

3.4 CONCLUSÃO

O genótipo MiniMax mostrou ser bastante eficiente sob ensaio de omissão nitrogenada e tratadas com inoculante apresentado neste capítulo. Em geral, as plantas de MiniMax com inoculantes obteve maior incremento no crescimento e desenvolvimento da parte área tal qual na parte radicular, evidenciando uma eficiente simbiose para fixação de nitrogênio. Isto foi observado também nas variáveis de alocação de biomassa. Ainda neste sentido, podemos concluir que MiniMax é potencialmente eficiente em estudos desta natureza, bem como, pode ser muito importante para estudos futuros com leguminosas. Nossos resultados mostram que MiniMax é uma cultivar miniatura de soja e demonstra todas as características esperadas para uma planta leguminosa.

REFERÊNCIAS

- Aboelfadel M, Hassan G, Taha M (2023).** Impact of Nitrogen Fertilization Types on Leaf Miner, *Liriomyza trifolii* Infestation, Growth and Productivity of Pea Plants under Pest Control Program. *Journal of the Advances in Agricultural Researches* 28, 92–105. <https://doi.org/10.21608/jalexu.2023.187908.1110>
- Bellaloui N, Bruns HA, Abbas HK, Mengistu A, Fisher DK, Reddy KN (2015).** Effects of Row-Type, Row-Spacing, Seeding Rate, Soil-Type, and Cultivar Differences on Soybean Seed Nutrition under US Mississippi Delta Conditions. *PLoS ONE* 10, e0129913. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129913>
- Bolon YT, Haun WJ, Xu WW, Grant D, Stacey MG, Nelson RT, Gerhardt DJ, Jeddelloh JA, Stacey G, Muehlbauer GJ, Orf JH, Naeve SL, Stupar RM, Vance CP (2011).** Phenotypic and Genomic Analyses of a Fast Neutron Mutant Population Resource in Soybean. *Plant Physiology* 156, 240–253. <https://doi.org/10.1104/pp.110.170811>
- Espina MJ, Ahmed CMS, Bernardini A, Adeleke E, Yadegari Z, Arelli P, Pantalone V, Taheri A (2018).** Development and Phenotypic Screening of an Ethyl Methane Sulfonate Mutant Population in Soybean. *Front. Plant Sci.* 9, 394. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00394>
- Goyal RK, Schmidt MA, Hynes MF (2021).** Molecular Biology in the Improvement of Biological Nitrogen Fixation by Rhizobia and Extending the Scope to Cereals. *Microorganisms* 9, 125. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010125>
- Henchion M, Hayes M, Mullen A, Fenelon M, Tiwari B (2017).** Future Protein Supply and Demand: Strategies and Factors Influencing a Sustainable Equilibrium. *Foods* 6, 53. <https://doi.org/10.3390/foods6070053>
- Karmakar K, Rana A, Rajwar A, Sahgal M, Johri BN (2015).** Legume-Rhizobia Symbiosis Under Stress, in: Arora, N.K. (Ed.), *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets*. Springer India, New Delhi, pp. 241–258. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2068-8_12

- Lavin M, Herendeen PS, Wojciechowski MF (2005).** Evolutionary Rates Analysis of Leguminosae Implicates a Rapid Diversification of Lineages during the Tertiary. *Systematic Biology* 54, 575–594. <https://doi.org/10.1080/10635150590947131>
- Matthews BF, MacDonald MH, Song QJ, Cregan P.B, Lewers KS (2007).** Registration of ‘MiniMax’ Soybean. *J of Plant Registrations* 1, 97–98. <https://doi.org/10.3198/jpr2006.10.0653crc>
- Parisi G, Tulli F, Fortina R, Marino R, Bani P, Dalle Zotte A, De Angelis A, Piccolo G, Pinotti L, Schiavone A, Terova G, Prandini A, Gasco L, Roncarati A, Danieli PP (2020).** Protein hunger of the feed sector: the alternatives offered by the plant world. *Italian Journal of Animal Science* 19, 1204–1225. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2020.1827993>
- Penmetsa RV, Cook DR (2000).** Production and Characterization of Diverse Developmental Mutants of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 123, 1387–1398. <https://doi.org/10.1104/pp.123.4.1387>
- Perry JA, Wang TL, Welham TJ, Gardner S, Pike JM, Yoshida S, Parniske M (2003).** A TILLING Reverse Genetics Tool and a Web-Accessible Collection of Mutants of the Legume *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* 131, 866–871. <https://doi.org/10.1104/pp.102.017384>
- Quelas JI, Lastra RA, Lorenze C, Escobar M, Lepek VC (2021).** Site-directed mutagenesis of *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110 *ARO*A improves bacterial growth and competitiveness for soybean nodulation in the presence of glyphosate. *Environ Microbiol Rep* 13, 464–469. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12917>
- Raza A, Zahra N, Hafeez MB, Ahmad M, Iqbal S, Shaukat K, Ahmad G (2020).** Nitrogen Fixation of Legumes: Biology and Physiology, in: Hasanuzzaman, M., Araújo, S., Gill, S.S. (Eds.), *The Plant Family Fabaceae*. Springer Singapore, Singapore, pp. 43–74. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4752-2_3
- Semba RD (2016).** The Rise and Fall of Protein Malnutrition in Global Health. *Ann Nutr Metab* 69, 79–88. <https://doi.org/10.1159/000449175>

Szczyglowski K, Shaw RS, Wopereis J, Copeland S, Hamburger D, Kasiborski B, Dazzo FB, De Bruijn FJ (1998). Nodule Organogenesis and Symbiotic Mutants of the Model Legume *Lotus japonicus*. *MPMI* 11, 684–697. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1998.11.7.684>

Webb P, Stordalen GA, Singh S, Wijesinha-Bettoni R, Shetty P, Lartey A (2018). Hunger and malnutrition in the 21st century. *BMJ* k2238. <https://doi.org/10.1136/bmj.k2238>

Zhang W, Dou Z, He P, Ju XT, Powelson D, Chadwick D, Norse D, Lu YL, Zhang Y, Wu L, Chen XP, Cassman KG, Zhang FS (2013). New technologies reduce greenhouse gas emissions from nitrogenous fertilizer in China. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 8375–8380. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210447110>

CAPÍTULO 4: Desenvolvimento de uma população endogâmica consanguínea derivada do cruzamento entre cv. MiniMax e cv. Williams 82

4.1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* [L.] Merr.) é uma importante cultura alimentar e oleaginosa no mundo, e fonte de proteína vegetal de maior expressão (Nadeem *et al.*, 2021). Portanto, o desenvolvimento da indústria da soja tem impulsionado a procura de cultivares mais eficientes. O mercado da soja busca boas variedades com pré-requisitos importantes como alto rendimento. A soja possui muitas características agronômicas que são responsáveis pelo rendimento e qualidade, isso é alvo muito explorado pelos melhoristas de plantas (Reinprecht *et al.*, 2006). O surgimento de seleção assistida por marcadores moleculares e do mapeamento de QTLs (loci de características quantitativas) permitem a obtenção de resultados mais rápidos e precisos (Hasan *et al.*, 2021). O *pool* genético fornece aos melhoristas bases genéticas importantes na piramidação de características agronômicas buscadas em plantas, e no futuro próximo serão possíveis manipulações com maior eficácia e precisão através de técnicas de edição gênica.

As populações de linhagens endogâmicas recombinantes (RILs) são materiais genéticos importantes para pesquisa, que permitem estudar características complexas, incluindo a caracterização de recursos genéticos importantes para o melhoramento de culturas (Schuster e Cruz., 2004). Diversos tipos de populações podem ser utilizados para o mapeamento genético de plantas, variando de acordo com o interesse do pesquisador. Entre os principais tipos de populações para mapeamento genético podemos citar: retrocruzamento, F₂, RILs, NILs e duplo-haplóides. Em geral, essas populações destinadas a cultura da soja visam investigar a base genética de diversas características agronômicas como, por exemplo, tempo de florescimento, tempo de maturidade, período reprodutivo, altura da planta, teor de proteína e óleo da semente, tamanho da semente (Mansur *et al.*, 1996). Cada RIL é uma população de linhagem endogâmica recombinante, derivada de uma única planta F₂, desta forma a variabilidade existente na população F₂ é representada nas RILs.

Para obtenção das RILs, derivadas de uma população F₂ produzida pelo cruzamento de dois materiais de interesse, seguida de autofecundação da F₁, são realizados eventos de autofecundação (6-8 eventos), a partir de plantas individuais

em cada geração, de modo a obter um elevado grau de homozigose (Schuster e Cruz., 2004). Ao longo da história, a soja sofreu uma forte seleção para características de interesse humano, isso gerou uma perda da diversidade genética nas principais cultivares atuais. No entanto, muitos desses genes conferem à planta de soja maior tolerância a fatores bióticos e abióticos, e identificar e caracterizar esses genes tem sido bastante explorado nas últimas duas décadas. Muitos genes que controlam funções nas plantas de modo geral foram investigados em organismos modelos, como a *Arabidopsis*, mas esse conhecimento nem sempre é fácil de extrapolar para outras culturas como a soja, que possui aptidão agrícola e base genética maior.

A transformação genética da soja tem sido implementada há mais de duas décadas, no entanto, o processo continua sendo lento e ineficiente, razão pela qual a validação funcional de alguns genes foi realizada em *Arabidopsis* em vez de soja (Zhang *et al.*, 2022). A complexidade diferencial entre o pequeno genoma de *Arabidopsis* (~125 MB) para o genoma de soja (~1,15 GB), sequenciado completamente somente em 2010 (Schmutz *et al.*, 2010), impulsionou uma crescente nos estudos genômicos e seleção de genes de interesse para soja. A soja cv. Williams 82, escolhida como alvo para o sequenciamento do genoma, se tornou o principal modelo biológico para estudos com a soja. Ainda, mesmo antes do primeiro genoma de soja sequenciado, surge uma grande aposta para se tornar um bom modelo biológico para estudos com soja, a cultivar miniatura de soja MiniMax, que possui tamanho compacto, curto tempo entre gerações e boa prolificidade (Matthews *et al.*, 2007). Desde o seu lançamento, MiniMax não foi explorada, apesar de todo o seu potencial promissor.

Populações endogâmicas recombinantes (RILs), podem ajudar a compreender a base genéticas de muitos QTLs de interesse para a soja, e assim, o uso de Williams 82 e MiniMax como parentais podem ser fundamentais para estes achados. Desta forma, neste capítulo descrevemos os primeiros passos de cruzamentos entre os dois materiais (Williams 82 e MiniMax) para obter uma população F_2 , e seguir avançando para outras populações futuras por autofecundação, e assim, a partir de uma população com maior homozigose poder estudar características agrônômicas para soja.

4.2. Uso e aplicações de linhagens endogâmicas recombinantes (RILs) em soja

O desenvolvimento de populações bi-parentais que carregam alelos contrastantes do fundo entre o pais são importantes para o melhoramento genético, e busca-se identificar e selecionar fontes de variabilidade genética com potencial para extrair linhagens promissoras. No entanto, inicialmente se torna extremamente complicado mapear os loci de interesse, em meio a segregação de heterose, assim é necessário que se avance em níveis maior de homozigose por autofecundação para facilitar o mapeamento molecular dos genes segregados. Entre as várias formas de melhoramento genético convencional, as que se tem maior destaque e eficiência são por seleção pedigree e descendência de semente única (SSD). A seleção pedigree é um método bastante trabalhoso e que depende da seleção visual pela aparência de cada geração. O método por SSD é o mais preferido para atingir alta homozigosidade em menos tempo.

Algumas características são atribuídas ao uso de linhagens consanguíneas (RILs) para mapeamento de QTLs em relação aos tradicionais retrocruzamentos e populações F_2 , incluem maior número de alelos, população com variabilidade genética segregante, maior resolução de mapeamento e um menor tempo de pesquisa (Zhang and Gai, 2009). Portanto, está claro que a mineração de novos genes utilizando essas linhagens é algo bastante garantido e preciso. Vários são os estudos que utilizam RILs para estreitar regiões que contenham genes inerentes alguma característica agronomicamente interessante.

Por exemplo, um estudo feito por Ouyang *et al.* (2022), com o objetivo de fazer uma mineração dos principais QTLs envolvidos na resistência a seca em soja, fizeram um mapa genético de ligação a partir de 162 populações de linhagens endogâmicas recombinantes, com um distância total 2737,51 cM e 923.420 marcadores SNP, além disso, dentro dessa região os autores levantaram 9 genes candidatos que podem estar envolvidos na tolerância a seca em soja. Estudos como esse permitem mapear de uma forma precisa a localização de regiões gênicas codificantes de uma resposta de interesse agrônômico. Para a confirmação de locus de característica quantitativa (QTLs), populações consanguíneas são utilizadas para confirmação (Gillenwater *et al.*, 2022). Neste trabalho, os autores utilizaram duas RILs (Pop201 e Pop202) que são consistentemente diferentes para teores de proteínas e óleo nas sementes, e testaram a estabilidade destes QTLs conhecidos em diferentes condições de

crescimento, isso é útil para produção de linhagens estáveis em maior teor de óleo e proteína independente da condição de cultivo.

Um refinamento no constituinte de sementes é bastante explorado, muito embora as vezes se destaca mais para teores de óleo e proteína, porém, açúcares (sacarose, rafinose, estaquiose, galactose, frutose, ramnose e amido) é alvo de melhoramento genético, em função da importância alimentar humana e animal. Assim, estudos que utilizam linhagens consanguíneas biparentais para mapeamento de QTLs que estão envolvidos com síntese açúcares em semente de soja é uma prática bastante aplicada (Knizia *et al.*, 2021).

Alguns estudos utilizando RILs buscam elucidar bases genéticas relacionada a características morfológicas que ainda são inexploradas por melhoristas de plantas. A heterofilia é a presença de diferentes formatos e tamanhos em folhas, inclusive de soja e segue pouco esclarecida (Chen *et al.*, 2022). Mecanismos vegetais relacionados a uma maior tolerância sob condições de déficit hídrico podem ser melhor explicadas ou entendidas usando RILs para mapear QTLs que regulam a transpiração limitada (TR_{lim}), isso tem uma grande aplicação impacto grande na construção de cultivares que tenham o rendimento menos comprometido sob seca (Sarkar *et al.*, 2022). Além disso, outras características específicas tem sido buscada para acessos de plantas, principalmente no que se refere ao armazenamento. A produtividade da soja no mundo todo é drasticamente reduzida antes mesmo de germinar, isso porque ao longo do tempo de armazenamento ocorre uma perda das enzimas antioxidantes (SOD; POD e CAT) que são responsáveis pela homeostase contra espécies reativas de oxigênio, assim, populações RILs tem sido utilizados para mapear QTLs que são fundamentais para mitigar tal efeito, que possui um impacto econômico com grande magnitude (Jiamtae *et al.*, 2023).

Características estruturais como por exemplo, a dureza na semente de soja é pouco explorada e sua base genética ainda não está clara. Um trabalho de (Ren *et al.*, 2024) explorou análises genéticas e relatou quatro genes (*Glyma.02G307000*; *Glyma.02G31300*; *Glyma.02G311400*; *Glyma.02G311800*), que estão intimamente envolvidos com a dureza das sementes de soja, através de um mapeamento fino utilizando RILs, em que os parentais continham características estruturais de sementes bastante enrijecidas e outra com textura menos enrijecida.

Algumas abordagens com uso de RILs são pouco vistas, por exemplo, o desenvolvimento de linhagens que tenham diferentes ciclos, e muito raramente que sejam anãs. Nosso grupo de pesquisa, conseguiu superar as dificuldades em obter cruzamentos de um doador de ciclo longo (Williams 82) para um receptor (MiniMax) de ciclo curto, além de toda a sua estrutura ser pequena, inclusive as flores. Produzir populações segregantes com essas características totalmente distintas, abre infinitas possibilidades para a piramidação de genes (QTLs) que controlam diversas estruturas da planta de uma forma isolada. A utilização de uma RILs oriunda do fundo de MiniMax e Williams 82, nos permitirá uma seleção de loci que são pouco elucidados na literatura, incluem florescimento, controle da arquitetura e constituintes na semente.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais (20°45”S, 42°51”W). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, em vasos com capacidade de 2L, acrescido com solo + substrato comercial Tropstrato HT® na proporção 3:1, pH do solo corrigido com 5g de calcário dolomítico, acrescido com 5,43 g de N-P-K (04-14-08), 1 g de cloreto de potássio e 5,43 g de superfosfato simples, para a correção da fertilidade em cada vaso. A irrigação e o controle de doenças foram realizados de acordo com a necessidade. Para criação de uma população endogâmica recombinantes (RILs) realizamos cruzamentos entre Williams 82 e MiniMax, descrito com maior detalhe abaixo.

4.3.1 Desenvolvimento populacional

Do cruzamento recíproco entre MiniMax (PI643148) e Williams 82, que foram denominadas como MW e WM, respectivamente. Foram obtidas 18 linhagens MW e 34 linhagens WM. As linhagens foram confirmadas para polimorfismo entre os parentais utilizando um marcador microssatélite (BARCSOYSSR_01_1648), com as seguintes sequências de primers, forward 5' ACCCACCGTGATCATGAAG 3' e reverse 5' CGGTAAACAAGGAGGGTGA 3'. Os detalhes sobre a confirmação de polimorfismo estão detalhados na imagem do gel de poliacrilamida (Figura 3).

4.3.2 Extração de DNA e PCR

Folhas trifolioladas totalmente expandidas de 55 plantas F2 e duas plantas parentais foram colocadas em tubos de 2 ml e congeladas imediatamente usando nitrogênio líquido. As folhas moídas até um pó fino usando TissueLyzer II (Qiagen, Valencia, CA, EUA). O DNA genômico foi extraído de 100 mg de material moído usando o DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). A qualidade e a concentração do DNA genômico foram determinadas usando o espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

4.3.3 Instalação do experimento e cruzamento

Para realizar os cruzamentos os dois materiais com ciclos diferentes, foi necessário realizar um escalonamento para coincidir o florescimento de MiniMax com Williams 82. Em seguida, será detalhado em duas etapas e respectivos procedimentos para o cruzamento.

Etapa 1: Durante duas semanas e diariamente foram semeadas sementes de Minimax, duas por vaso, num total de dois vasos por dia. Após isso, foi semeado da mesma forma em conjunto com sementes de Williams 82. Esse plantio teve continuidade até se ter uma quantidade de plantas de ambas as cultivares suficiente para realizar todos os cruzamentos.

Etapa 2: Os cruzamentos foram feitos em novembro de 2023 no momento mais quente do dia (10:30 á 12:00 horas). Esta etapa consistiu de uma sequência de três procedimentos.

Procedimento 1: As flores selecionadas para receber pólen do doador se encontravam fechadas, para garantir que não houvesse autofecundação, em seguida, estas flores passaram pelo processo de emasculação, com o auxílio de uma pinça de ponta fina retirou-se as sépalas, pétalas e os filetes contendo os grãos de pólen da flor selecionada, deixando exposto apenas o aparelho reprodutor feminino para em seguida ser fertilizada.

Procedimento 2: Na planta doadora, as flores escolhidas foram aquelas com as sépalas abertas, porém as pétalas fechadas, para garantir que não tivesse havido autofecundação na flor doadora e que os grãos de pólen se encontrassem conservados nas anteras, com o auxílio da pinça foi destacado este botão floral.

Procedimento 3: Foi feita a transferência de pólen de uma planta para outra de forma

recíproca, ou seja, utilizando MiniMax e Williams 82 como parentais masculinos e femininos. Assim, com o auxílio de uma pinça foi fixada a flor doadora, em seguida, friccionada com a flor que se encontra apenas as peças florais femininas, de modo que houvesse a hibridação entre as plantas. Posteriormente, as flores que receberam pólen foram marcadas com fitilhos coloridos, de modo a facilitar a seleção e coleta das vagens contendo as sementes oriundas do cruzamento. Mais adiante, estas sementes serão plantadas para autofecundação da geração F_1 de modo a obter uma população segregante F_2 .

4.4 RESULTADOS E PERSPECTIVAS

O objetivo de obter uma população F_2 oriunda do cruzamento (MiniMax \times Williams 82) e (Williams 82 \times MiniMax) teve êxito. As manipulações para o escalonamento entre os dois materiais com ciclos diferentes foram eficientes. As plantas de MiniMax possuem inúmeras vantagens para sua utilização em bioensaios, no entanto, existe uma grande dificuldade em realizar cruzamentos com outros materiais de soja, isso porque o tamanho reduzido das suas flores diminui as taxas de pegamento (Fig.4.1, b; d), fazendo necessária bastante prática na manipulação dos órgãos reprodutivos da planta. Este possivelmente é um problema que pretendemos resolver no futuro, existindo a possibilidade de selecionar plantas de porte pequeno com flores grandes. Os cruzamentos foram feitos entre ambos os materiais (Fig.4.1, e; g), o principal problema encontrado foi a quantidade de flores disponíveis para retirada de pólen de MiniMax em comparação com Williams 82 que oferece um número maior de flores. Sem dúvidas o êxito nesta etapa para o desenvolvimento de RILS será determinante nas próximas etapas de autofecundação.

No momento da elaboração desta dissertação obtemos sementes da população F_1 (Fig. 4.2). Importante ressaltar, que o uso de MiniMax para estudos dessa natureza é inédito, e podemos concluir que MiniMax pode ser utilizada por melhoristas em técnicas convencionais como essa no melhoramento vegetal de soja. As bases genéticas do nanismo poderão ser desvendadas pelo estudo da população F_1 (Fig.4.2). Essa população e as linhagens dela derivada serão também muito importantes no futuro para a descoberta de QTLs que controlam a altura das plantas. Além disso, como a autofecundação nas próximas fases de RILs pode expressar

fenotipicamente novas características agronômicas, evidenciando essas duas cultivares como um excelente pool genético em novas descobertas para a cultura da soja.

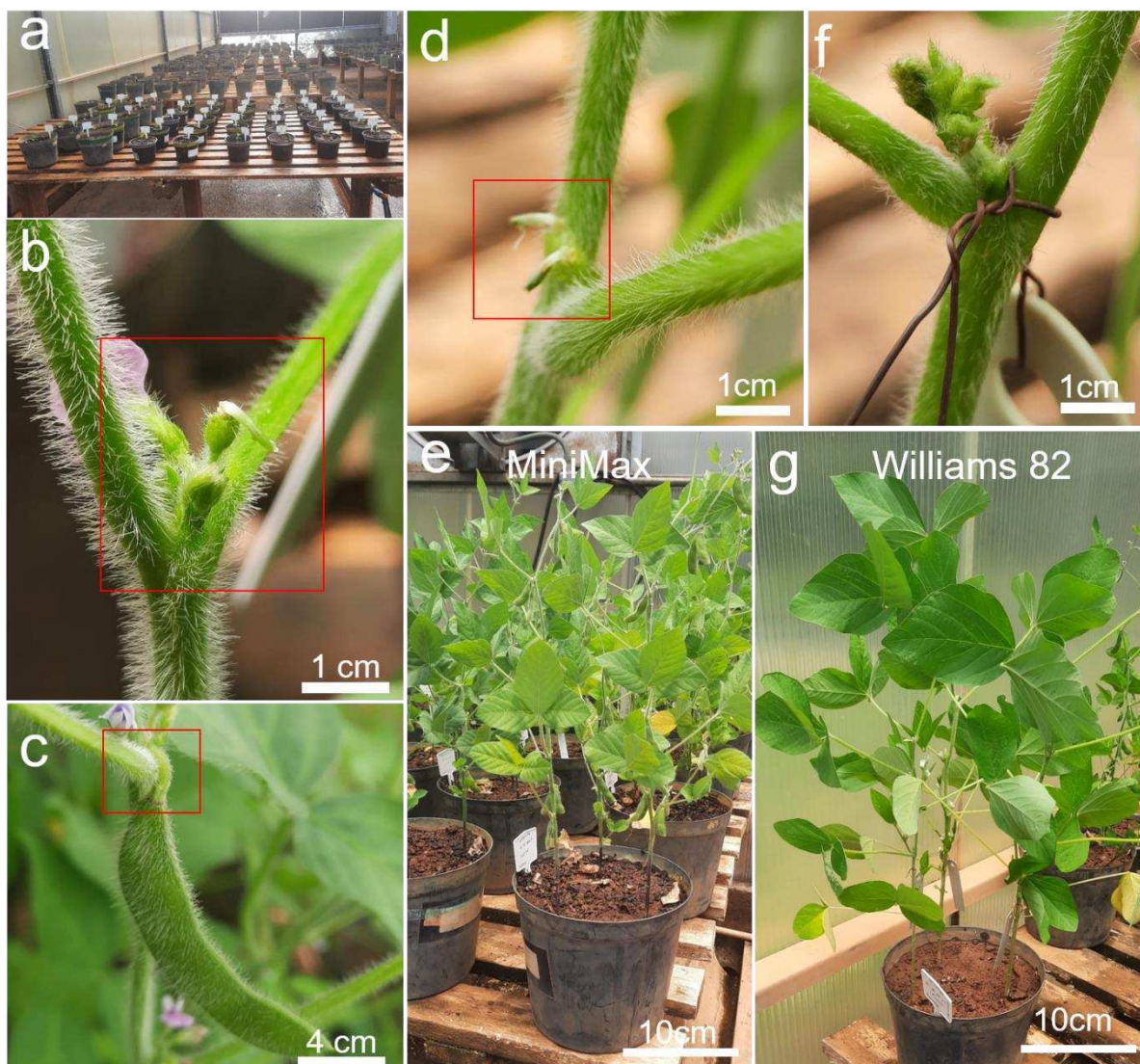


Figura 4.1 Imagens do cruzamento entre os genótipos *G. max* cv. MiniMax e *G. max* cv. Williams 82 para criação de população segregante.

A) Visão geral das plantas em escalonamento. B) Emasculação nas flores de MiniMax. C) Evidenciando a formação de vagem em MiniMax após receber grão de pólen de Williams 82. D) Emasculação em flores de Williams 82. E) *G. max* cv. MiniMax. F) Aglomerado de botões florais fechados de MiniMax. G) *G. max* cv. Williams 82.

O cruzamento Williams 82 × MiniMax vai oferecer um avanço muito acelerado nas próximas populações (F_2 , F_3 , F_4 e F_5) (Fig.4.2), isso é algo muito buscado pelos melhoristas de soja, que encontram dificuldades em métodos de melhoramento como este. No avanço das próximas etapas futuras será mais perceptível o impacto da

cultura MiniMax em relação a Williams 82 como modelo biológico para o melhoramento da soja.

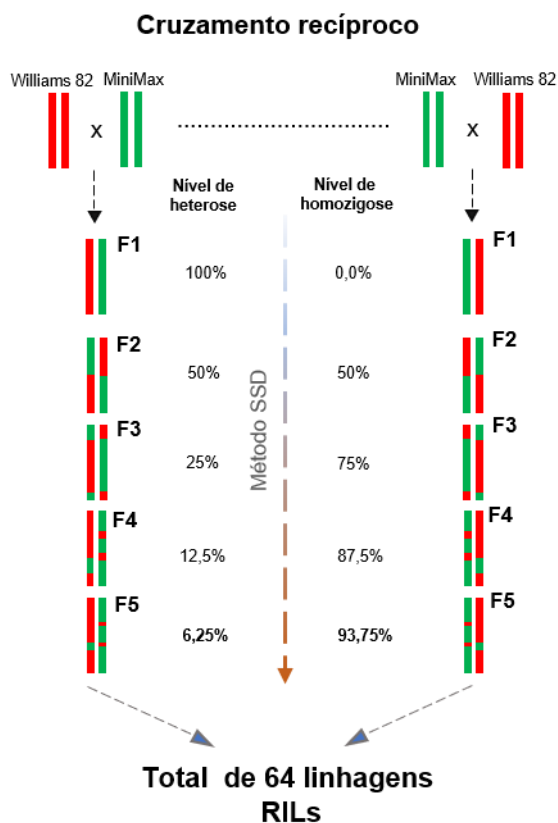


Figura 4.2 Representação esquemática do método SSD para avanço nas populações oriundas do cruzamento recíproco entre *G. max* cv. MiniMax e *G. max* cv. Williams 82.

Na confirmação de indivíduos heterozigotos através dos marcadores microssatélites (SSR), verificamos 54 plantas altamente polimórficas em contraste com os parentais (Figura 4.3.3). A F₂ confirmada para polimorfismo pode ser avançada pelo método de seleção (SSD) de modo a aumentar a endogamia e homozigose. Para avançar cada vez mais rápido até a RILs (a partir da F₅) serão cultivadas apenas uma semente de cada indivíduo em bandejas do tipo do tubete. Na população F₅ é esperado uma média de heterose (6,25%). Isso vai permitir fazer mapeamento de QTLs que foram segregados e fixado no fundo genético dessa população imortal.

Além disso, o desenvolvimento de uma população imortal de forma recíproca, carregando o fundo genético entre os dois materiais utilizados (Williams 82 e

MiniMax), isso é uma ótima estratégia para construção de mapas de ligação, e arraste de alelos (loci) entre os possíveis cromossomos que venha se fixar.

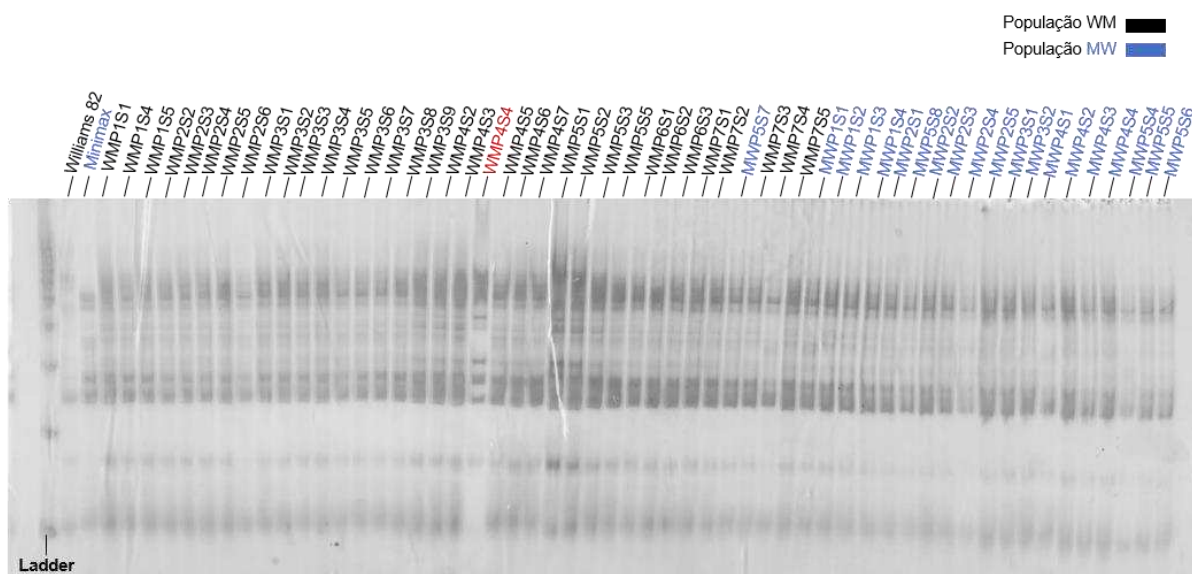


Figura 4.3 Varredura de indivíduos polimórficos entre os parentais utilizando marcador microssatélite. Siglas com letra de cor (preta) se referem aos indivíduos oriundos do cruzamento entre Williams 82 (doador) e MiniMax (receptor). Siglas de cor (azul) se referem aos indivíduos oriundos do cruzamento entre MiniMax (doador) e Williams 82 (receptor). Siglas de cor (vermelha) se refere ao material homocigoto.

Com base nos fenótipos que são expressos, esperamos refinar bases genéticas que controlam arquitetura da planta, rendimento de sementes, precocidade e genes relacionados a tolerância a estresses bióticos e abióticos. Além disso, esperamos a partir destas linhagens contendo fundo contrastante entender melhor base genética do nanismo, algo pouco elucidado na literatura. Em suma, esperamos no futuro estabelecer a população imortal para identificação de genes a partir destas linhagens que estão em avanço. Ainda, surge novas perspectivas de aumentar e refinar ferramentas moleculares para uso no genótipo MiniMax, afim de conferir a importância deste material pouco explorado para a pesquisa com leguminosas de modo geral.

4.5 CONCLUSÃO

A cultivar MiniMax foi eficiente em cruzamento com plantas de ciclos de vida diferente. Ainda, obtivemos com sucesso populações F_2 de ambos os cruzamentos para prosseguir na criação linhagens endogâmicas recombinantes. Nossos resultados vão permitir a identificação de características agronômicas de interesse para a cultura da soja, por meio do mapeamento genético nas populações futuras. Além disso, trazemos aqui o relato inédito do potencial modelo biológico *G. max* cv. MiniMax usado em técnicas de melhoramento vegetal. Importante ressaltar, que ainda existem algumas dificuldades para realizar cruzamentos com genótipos de ciclo longo, mas demonstrou ser passível de corrigir. Isso são evidências importantes da versatilidade do uso de MiniMax em estudos experimentais de extrema relevância para a cultura da soja.

REFERÊNCIAS

- Chen Q, Liu B, Ai L, Yan L, Lin J, Shi X, Zhao H, Wei Y, Feng Y, Liu C, Yang C, Zhang M (2022).** QTL and candidate genes for heterophylly in soybean based on two populations of recombinant inbred lines. *Front. Plant Sci.* 13, 961619. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.961619>
- Gillenwater JH, McNeece BT, Taliercio E, Mian MAR (2022).** QTL mapping of seed protein and oil traits in two recombinant inbred line soybean populations. *Journal of Crop Improvement* 36, 539–554. <https://doi.org/10.1080/15427528.2021.1985028>
- Hasan N, Choudhary S, Naaz N, Sharma N, Laskar RA (2021).** Recent advancements in molecular marker-assisted selection and applications in plant breeding programmes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 19, 128. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00231-1>
- Jiamtae P, Hashiguchi T, Pongpiyapaiboon S, Lelapiyamit I, Tanaka H, Hashiguchi M, Akashi R (2023).** Biochemical changes in recombinant inbred lines of soybean (*Glycine max* L. Merr.) under storage-related stresses. *J. Crop Sci. Biotechnol.* 26, 467–488. <https://doi.org/10.1007/s12892-023-00192-6>
- Knizia D, Yuan J, Bellaloui N, Vuong T, Usovsky M, Song Q, Betts F, Register T, Williams E, Lakhssassi N, Mazouz H, Nguyen HT, Meksem K, Mengistu A, Kassem MA (2021).** The Soybean High Density ‘Forrest’ by ‘Williams 82’ SNP-Based Genetic Linkage Map Identifies QTL and Candidate Genes for Seed Isoflavone Content. *Plants* 10, 2029. <https://doi.org/10.3390/plants10102029>
- Mansur LM, Orf JH, Chase K, Jarvik T, Cregan PB, Lark KG (1996).** Genetic Mapping of Agronomic Traits Using Recombinant Inbred Lines of Soybean. *Crop Science* 36, 1327–1336. <https://doi.org/10.2135/cropsci1996.0011183X003600050042x>
- Matthews BF, MacDonald MH, Song QJ, Cregan PB, Lewers KS (2007).** Registration of ‘MiniMax’ Soybean. *J of Plant Registrations* 1, 97–98. <https://doi.org/10.3198/jpr2006.10.0653crc>

- Nadeem M, Chen A, Hong H, Li D, Li J, Zhao D, Wang W, Wang X, Qiu L (2021).** *GmMs1* encodes a kinesin-like protein essential for male fertility in soybean (*Glycine max* L.). JIPB 63, 1054–1064. <https://doi.org/10.1111/jipb.13110>
- Ouyang W, Chen L, Ma J, Liu X, Chen H, Yang H, Guo W, Shan Z, Yang Z, Chen S, Zhan Y, Zhang H, Cao D, Zhou X (2022).** Identification of Quantitative Trait Locus and Candidate Genes for Drought Tolerance in a Soybean Recombinant Inbred Line Population. IJMS 23, 10828. <https://doi.org/10.3390/ijms231810828>
- Reinprecht Y, Poysa VW, Yu K Rajcan I, Ablett GR, Pauls KP (2006).** Seed and agronomic QTL in low linolenic acid, lipoxygenase-free soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) germplasm. Genome 49, 1510–1527. <https://doi.org/10.1139/g06-112>
- Ren H, Zhao K, Zhang C, LamLom SF, Liu X, Wang X, Zhang F, Yuan R, Gao Y, Cao B, Zhang B (2024).** Genetic analysis and QTL mapping of seed hardness trait in a soybean (*Glycine max*) recombinant inbred line (RIL) population. Gene 905, 148238. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2024.148238>
- Sarkar S, Shekoofa A, McClure A, Gillman JD (2022).** Phenotyping and Quantitative Trait Locus Analysis for the Limited Transpiration Trait in an Upper-Mid South Soybean Recombinant Inbred Line Population (“Jackson” × “KS4895”): High Throughput Aquaporin Inhibitor Screening. Front. Plant Sci. 12, 779834. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.779834>
- Schmutz, J. et al (2010).** Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. Nature 463, 178–183. <https://doi.org/10.1038/nature08670>
- Zhang M, Liu S, Wang Z, Yuan Y, Zhang Z, Liang Q, Yang X, Duan Z, Liu Y, Kong F, Liu B, Ren B, Tian Z (2022).** Progress in soybean functional genomics over the past decade. Plant Biotechnology Journal 20, 256–282. <https://doi.org/10.1111/pbi.13682>
- Zhang YM, Gai J (2009).** Methodologies for segregation analysis and QTL mapping in plants. Genetica 136, 311–318. <https://doi.org/10.1007/s10709-008-9313-3>