



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Colegiado do Curso de Ciências Biológicas



**Ciências
Biológicas**
UEL

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

SUÉLLEN ROSA DE ALMEIDA POLIZELI

**ANÁLISE DE TRANSCRIPTOMAS DE SEMENTES DE SOJA
VISANDO A IDENTIFICAÇÃO DE GENES RELACIONADOS
COM A LONGEVIDADE NO ARMAZENAMENTO**

Londrina – Paraná
2024

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

SUÉLLEN ROSA DE ALMEIDA POLIZELI

ANÁLISE DE TRANSCRIPTOMAS DE SEMENTES DE SOJA VISANDO A IDENTIFICAÇÃO DE GENES RELACIONADOS COM A LONGEVIDADE NO ARMAZENAMENTO

Projeto de monografia apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Profº Dr. Rogério Fernandes de Souza

Co-orientador: Dr. Alexandre Lima Nepomuceno

**Londrina – Paraná
2024**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

S944a Polizeli, Suéllen Rosa de Almeida .
Análise de transcriptomas de sementes de soja visando a identificação de genes relacionados com a longevidade no armazenamento / Suéllen Rosa de Almeida Polizeli. - Londrina, 2024.
39 f. : il.

Orientador: Rogério Fernandes de Souza.
Coorientador: Alexandre Lima Nepomuceno.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, 2024.
Inclui bibliografia.

1. Genética - TCC. 2. Soja - TCC. 3. Bioinformática - TCC. 4. Longevidade - TCC. I. Souza, Rogério Fernandes de. II. Nepomuceno, Alexandre Lima. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU 575.1

SUÉLLEN ROSA DE ALMEIDA POLIZELI

**ANÁLISE DE TRANSCRIPTOMAS DE SEMENTES DE SOJA
VISANDO A IDENTIFICAÇÃO DE GENES RELACIONADOS
COM A LONGEVIDADE NO ARMAZENAMENTO**

COMISSÃO EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Rogério Fernandes de Souza

Prof. Dra. Liliane Marcia Mertz-Henning

Me. João Matheus Kafer

Londrina, 07 de maio de 2024.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão, primeiramente, à minha família. Em especial, aos meus avós (*in memoriam*), Florentina Rosa de Almeida e Dirceu Gonçalves de Oliveira, que cuidaram de mim com imenso carinho por 13 anos e sempre me incentivaram a estudar.

Agradeço também à minha mãe, Alanize, aos meus pais, Marcos e José Carlos, e ao meu irmão, Vinícius, por todo o apoio e amor que me proporcionam. Minha gratidão se estende à minha madrinha, Mércia Teresinha Alcântara Lima, e aos grandes amigos da família, Anísio de Souza e Denise Azevedo, que me apoiaram com muitos conselhos e de forma financeira, tornando esta formação possível. Cada gesto de carinho e cuidado foi essencial.

Agradeço à minha família, Cíntia e Larissa Corrêa, aos meus amigos de Araçatuba, Brenda, Bruna, Da. Angela e Igor Moraes, e aos meus amigos de Londrina, que tanto estimo: João Caetano, Raquel, Yasmin, Gabriele, Paola, Rafaela, Matheus e Mariana. Um agradecimento especial para Gabriela, com quem compartilhei muitas risadas, momentos únicos, além de choros e desabafos. Também sou grata ao meu namorado, Fabrício, que esteve presente nos momentos bons e ruins. Com cada um de vocês, minha graduação e minha vida se tornaram mais leves, empolgantes e significativas.

Agradeço a toda a equipe do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da EMBRAPA, à Prof. Dra. Liliane, e aos meus queridos e inseparáveis amigos, Enya, João e Angela.

Agradeço com um toque especial aos meus novos amigos do Laboratório de Bioinformática: Lorena, Kátia, Prof. Matheus e Juliana. E, é claro, ao Prof. Rogério, cujo apoio foi inestimável. Sua paciência e vasta experiência foram fundamentais, ensinando-me e auxiliando-me em cada etapa deste trabalho.

Por fim, agradeço às instituições: Universidade Estadual de Londrina, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA/SOJA, e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, por todo o suporte estrutural e financeiro ao longo desses cinco anos.

RESUMO

A soja (*Glycine max*) é uma das principais commodities globais, essencial na nutrição humana e animal e na produção de biodiesel. Originária da China, enfrenta desafios devido à expansão das áreas de cultivo, demanda crescente, base genética limitada e, principalmente, adversidades climáticas. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo analisar transcriptomas para identificar vias metabólicas e genes associados à longevidade, como proteção contra a deterioração, de duas cultivares de soja: semente amarela e preta, com diferentes respostas de longevidade durante o armazenamento em duas condições, um ambiente não controlado e outro controlado em câmara fria. Utilizou-se RNA-seq para analisar o transcriptoma das sementes em cada tratamento. Os resultados mostram diferenças significativas na expressão gênica entre as cultivares, identificando genes essenciais para a manutenção do DNA, metabolismo de proteínas e lipídios, fatores de transcrição relacionados ao estresse. O estudo oferece *insights* sobre os aspectos genéticos que afetam a longevidade das sementes de soja, sugerindo alvos para futuras intervenções biotecnológicas.

Palavras-chave: Tegumento preto. Longevidade. Sementes de soja. Transcriptomas.

ABSTRACT

Soybeans (*Glycine max*) are one of the world's major commodities, essential for human and animal nutrition and biodiesel production. Originating from China, they face challenges due to the expansion of cultivation areas, increasing demand, limited genetic base, and, notably, climatic adversities. Given this, the present study aimed to analyze transcriptomes to identify metabolic pathways and genes associated with longevity, such as protection against deterioration, in two soybean cultivars: yellow and black seeds, with different longevity responses during storage in two conditions, an uncontrolled environment and a controlled cold chamber. RNA-seq was used to analyze the seed transcriptome in each treatment. The results show significant differences in gene expression between the cultivars, identifying essential genes for DNA maintenance, protein and lipid metabolism, and stress-related transcription factors. The study provides insights into the genetic aspects affecting soybean seed longevity, suggesting targets for future biotechnological interventions.

Keywords: Black seed coat. Longevity. Soybean seeds. Transcriptomes.

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. OBJETIVO	10
2.1. Objetivos específicos.....	10
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1. A cultura da soja	11
3.2. Características fisiológicas da semente	12
3.3. Longevidade	12
3.4. Armazenamento da soja	13
3.5. Variabilidade genética da soja e estudos de transcriptoma	14
3.6. Coloração do tegumento	15
3.7. A tecnologia de RNA-seq	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1. Preparo do material biológico para coleta de amostras para RNA-seq e RT-Qpcr	18
4.2. Análise do RNA-seq	18
4.3. Análise de bioinformática	19
4.4. Análise dos genes diferencialmente expressos	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5.1. Expressão diferencial	21
5.2. Vias envolvidas	22
5.3. Fatores de transcrição	24
5.4. Metabolismo de proteínas	25
5.5. Metabolismo de lipídeos	26
5.6. Candidatos para validação RT-Qpcr	27
6. CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	33

1. INTRODUÇÃO

A soja, *Glycine max* (L. Merr), é uma das principais commodities agrícolas no cenário global, representando uma fonte significativa de proteínas para o consumo humano e animal (Hartman; West; Herman, 2011; Liu et al., 2020). Originalmente cultivada na China, esta foi amplamente disseminada pelo mundo, tornando-se fundamental para a indústria alimentícia, produção de biodiesel e criação de rações para animais (Bonato e Bonato, 1987; FAO, 2020). Sua importância cresceu ao longo do tempo devido à versatilidade na aplicação e o aumento da demanda por alimentos ricos em proteína (Medic, 2014; Pagano, 2016).

A produção global de soja atingiu níveis recordes em 2022/2023, com o Brasil sendo o maior produtor, contribuindo com 154,6 milhões de toneladas (CONAB, 2023). No entanto, a crescente demanda e a expansão das áreas de cultivo trouxeram desafios significativos, o que é agravado pela base genética limitada dos cultivares atualmente disponíveis. Nesse contexto, questões relacionadas à qualidade e longevidade das sementes emergiram como preocupações críticas, especialmente com relação ao armazenamento e ao impacto das condições climáticas variáveis.

As características fisiológicas da semente de soja são fundamentais para seu desempenho no campo e sua longevidade após a colheita (Krzyzanowski, 2004). Essas características, como germinação, vigor, sanidade e genética, determinam a capacidade da planta em alcançar altos níveis de produção (Matos, 2013; Miranda, 2020). No entanto, fatores ambientais, como alterações climáticas e infecções por fungos, podem afetar negativamente o estado fisiológico da semente, comprometendo sua qualidade (França-Neto, 2018; Turner, 2020; Chang, 2020; Sarkar, 2021). Por outro lado, a longevidade da semente é determinada por uma variedade de compostos protetores, incluindo oligossacarídeos, proteínas de choque térmico e antioxidantes que retardam as reações deteriorativas e mantêm a estabilidade metabólica durante o armazenamento. Na soja, a pigmentação do tegumento está relacionada à expressão dos genes da Chalcona Sintase (CHS), influenciando sua qualidade fisiológica e longevidade (Bellaloui et al., 2012; Huth et al., 2016; Kuchlan et al., 2018; Kafer, 2022). A compreensão desses aspectos é essencial para garantir a produção sustentável e a preservação das sementes de soja (Sattler et al., 2004; Nagei et al., 2015; Debeaujon et al., 2000).

Nesse contexto, é crucial entender os fatores que afetam a qualidade das sementes de soja e a importância da diversidade genética para a resiliência do cultivo. Este estudo aborda essas questões, analisando o transcriptoma de duas cultivares de soja, uma preta (BRS 715A) tolerante ao armazenamento e uma amarela (DM 6563 IPRO), suscetível ao armazenamento, para identificar as vias metabólicas que influenciam sua longevidade durante o armazenamento não controlado e controlado.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

- Prospectar transcritos potencialmente envolvidos com o processo de longevidade em 2 cultivares de soja com respostas diferentes no armazenamento, em câmara fria e ambiente não controlado;

2.2. Objetivos específicos

- Identificar as vias metabólicas relacionadas com a proteção contra deterioração das sementes durante o armazenamento na cultivar tolerante;
- Caracterizar os genes relacionados a tolerância ao armazenamento;
- Selecionar candidatos para a validação de RT- qPCR;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. A cultura da Soja

A soja, *Glycine max* (L. Merr), uma das principais commodities do mundo, com origem na China, vem se tornando cada vez mais notável na produção de proteínas, tanto para consumo humano quanto animal, representando mais de um quarto da oferta total (Hartman; West; Herman, 2011; Liu et al., 2020). Além disso, a versatilidade desta leguminosa também confere vastas aplicações, desde a indústria alimentícia até a fabricação de fibras, biodiesel e cosméticos (FAO, 2020).

Sua história data desde os antigos povos chineses, evidenciando sua importância na alimentação humana (Bonato e Bonato, 1987). Devido ao alto teor de óleo e proteína, os grãos de soja têm desempenhado um papel fundamental na nutrição humana e animal ao longo dos séculos (Medic, 2014; Pagano, 2016). Esse processo culminou na adoção de sistemas de cultivo que transformaram a agricultura para atender as demandas humanas (Mazoyer e Roudart, 2010).

Na última década, o aumento da área global de cultivo da soja, reflete a crescente demanda por essa cultura, com o Brasil se destacando como o principal exportador mundial (Moreira, 2014), seguido pelos Estados Unidos e Argentina. Os três países juntos representam 80% de toda produção global (Fao, 2020). Esse crescimento é atribuído, em parte, ao desenvolvimento de variedades adaptadas ao clima tropical, técnicas avançadas de manejo do solo e práticas de cultivo eficientes (Câmara, 2020).

Na safra de 2022/2023, o Brasil alcançou um recorde de produção, estimado em 154,6 milhões de toneladas, representando um aumento significativo de 23% quando comparado à safra anterior (CONAB, 2023). No entanto, as previsões para a safra atual indicam condições climáticas variáveis e prejudiciais, resultando em perdas na produtividade, com uma projeção de queda de 7,6% na produção brasileira de grãos em 2023/24 (CONAB, 2024).

A relevância da soja transcende fronteiras e épocas. Seja na antiguidade, como fonte de alimento, ou nos tempos atuais, como a cultura com maior impacto econômico e social, a soja continua desempenhando um papel vital e, para tanto, é necessário aprimorar características de interesse e usar do melhoramento genético.

Entretanto, o uso frequente, no Brasil, de quatro conjuntos de genótipos (CNS, S-100, Roanoke e Tokyo) no processo de melhoramento genético pode ser considerado um fator importante na perda da diversidade genética (Gwinner et al., 2017). Contudo, existe a possibilidade de, por meio da prospecção de genes, explorar a diversidade genética de cultivares selvagens e espécies próximas.

3.2. Características fisiológicas da semente

A semente de soja, diferentemente do grão, é um organismo vivo, ou seja, capaz de germinar uma nova planta, que é medida pelo seu estado fisiológico e usado no melhoramento genético; já o grão, é avaliado pelas propriedades físico-químicas que atendam ao mercado gastronômico ou a indústria (Matos, 2013; Miranda, 2020). Este estado fisiológico da semente é um conjunto de atributos, sendo eles germinação, vigor, sanidade e genética. Este conjunto determinará o desempenho da planta quando submetida a campo para alcançar altos níveis de produção (Krzyzanowski, 2004).

Como principal fator que afeta esse estado temos as alterações climáticas, que levam à deterioração da semente por fatores relacionados com a umidade e temperatura (Huth, 2010; França-Neto, 2018). Além disso, há outros fatores que agravam essa condição, como infecção por fungos em campo, o processo de secagem que precede o armazenamento, ou ainda problemas que levam a má maturação do grão ainda na planta (França-Neto, 2018; Turner, 2020; Chang, 2020; Sarkar, 2021).

3.3. Longevidade

A longevidade da semente é determinada pela habilidade biológica desta se estabilizar por longos períodos, proporcionado pelo estado vítreo das células, uma matriz que retarda as reações deteriorativas e suspende as atividades metabólicas (Buitink, 2000; Walters, 2005; Vertucci, 2010). Esta característica é determinada por uma variedade de compostos protetores, como oligossacarídeos da família sacarose (Suc) e rafinose (Raf) (Salvi, et al. 2016; Zinsmeister et al., 2016) e um conjunto de proteínas, como as proteínas de choque térmico (chaperonas HSP) e as envolvidas na embriogêneses (LEA)(Carvalho et al., 2015; Ganesan et al., 2017), que atuam em conjunto para evitar a desnaturação de proteínas envolvidas em processos fisiológicos

básicos e a desestabilização da membrana durante e após a secagem. Além disso, é importante ressaltar os mecanismos antioxidantes, como a glutatona e flavonoides, que vão evitar a oxidação de ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (Debeaujon et al., 2000; Sattler et al., 2004; Nagei et al., 2015).

Nas leguminosas, a partir do enchimento das sementes, é adquirida a longevidade progressivamente conforme esta é maturada (Zanakis et al., 1994a; Verdier et al., 2013; Leprince et al., 2017). Porém, na soja, não há consenso sobre essa informação. Por exemplo, alguns trabalhos indicam que tal longevidade pode ser alcançada assim que se atinge o máximo de enchimento das sementes (Marcos-Filho, 2009; Gillen et al., 2012) ou, então, durante a maturação (Zanakis et al., 1994a; Zanakis et al., 1994b). Esse desconhecimento pode acabar levando a um atraso na colheita e a submissão do material a riscos como a rápida deterioração, devido a fatores que afetam a qualidade da semente, como a temperatura e a umidade (Zanakis et al., 1994a; Zanakis et al., 1994b).

Portanto, há uma série de questões não elucidadas que relacionam o vigor e a aquisição da longevidade na maturação tardia (Pereira et al., 2017). Porém, o que se pode inferir é que as características fisiológicas e a longevidade, apesar de serem diferentes, estão intimamente ligadas, se relacionando pela preservação dos metabolismos fisiológicos da semente e por perderem seus elementos sob as mesmas condições, indo de fatores abióticos e bióticos, até o mal manuseio do produto.

3.4. Armazenamento da soja

O armazenamento das sementes de soja é uma estratégia fundamental, tanto por questões logísticas na produção como na comercialização (Smaniotto, 2014). Essa prática é fundamental para preservar a viabilidade e o vigor da semente (Azevedo, 2003), uma vez que o processo de deterioração é inevitável e pode ser apenas retardado dentro das diferentes condições de armazenamento e das características intrínsecas das sementes (Cardoso, 2012).

No Brasil, a maior parte das áreas de produção está localizada em ecossistemas tropicais e subtropicais, onde a germinação e, principalmente, o vigor das sementes são difíceis de alcançar se forem armazenadas em ambientes não controlados. Essas condições ambientais adversas afetam o armazenamento, especialmente a umidade relativa do ar (Zuchi et al., 2013).

Durante a temporada pós-colheita, é crucial que a estocagem seja realizada em condições adequadas de embalagem até a semeadura (Lima, 2014), no intuito de atender a Lei nº 10.711 de agosto de 2003, que, para fins de comercialização, as sementes devem obter uma taxa de germinação acima de 80%. No entanto, não apenas a umidade relativa do ar influencia o armazenamento, mas também problemas como temperatura, trocas gasosas, infestação por fungos e insetos, além de características intrínsecas da semente, como o tegumento e o teor de água (Martins-Filho, 2001; Gonçalves, 2003; Caldwell, 2005; Deschamps, 2006). Estes últimos são fortemente determinados por características genéticas, afetando o nível de germinação, vigor e desenvolvimento das sementes, o que leva à necessidade de estudos em diferentes cultivares para a seleção de genótipos adequados (Martins-Filho, 2001; Gris, 2010; Carvalho, 2014).

Estudos têm demonstrado os danos que a umidade pode causar no potencial fisiológico durante o armazenamento. Em condições de ambiente não controlado (25°C), os efeitos foram mais pronunciados em comparação com as sementes mantidas em câmara fria, com umidade relativa (UR) de 65% e temperatura de 10°C (Vieira, 2010). Após 12 meses de armazenamento, as sementes submetidas a 25°C apresentaram uma significativa queda de vigor, enquanto aquelas mantidas em condições controladas permaneceram estáveis (Vieira, 2013). Assim, é crucial continuar pesquisando e desenvolvendo técnicas de armazenamento para garantir a qualidade das sementes de soja, uma vez que sua produção desempenha um papel vital na produção global.

3.5. Variabilidade genética da soja e estudos de transcriptoma

A expansão do cultivo da soja a partir da China, seu local de origem, para as demais localidades do oriente e do ocidente levou à seleção de várias cultivares com diversas características, considerando as que respondem melhor a condições climáticas e geográficas (Song et al., 2013). Este processo estabeleceu as variedades crioulas, adaptadas a cada região, resultando em um estreitamento histórico da diversidade genética da cultura ao longo dos anos, em função de cruzamentos entre parentais para seleção de algumas características específicas (Song et al., 2013). Posteriormente, isso é agravado pela seleção de linhagens altamente produtivas pelos programas de melhoramento genético modernos (Mikel et al., 2010; Zhou et al., 2015;

Hegstad et al., 2019). Desta forma, a diversidade reduzida afeta o potencial de ganhos genéticos, aumentando a susceptibilidade a estresses bióticos e reduzindo a adaptabilidade a mudanças ambientais (Smith et al. 2015).

Como solução, os programas de melhoramento modernos devem levar em conta não apenas a produtividade, mas também a preservação da diversidade na soja (Gwinner et al., 2017). Para tanto, as plataformas de coleções de germoplasma, que abrangem uma vasta gama de acessos, apresentam desde cultivares primitivas e crioulas até espécies selvagens relacionadas ao material de interesse, além de linhagens recombinantes e híbridos (Kim et al., 2012).

Atualmente, existem cerca de 61.688 acessos de soja e de outras espécies selvagens do gênero *Glycine* registrados em plataformas como Genesys. Ferramentas como esta facilitam a partilha de informações ao nível global (Genesys, 2021). O banco de germoplasma brasileiro, mantido pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN em Brasília - DF/BR, contém aproximadamente 55 mil linhagens do gênero *Glycine*, incluindo materiais nacionais melhorados e cultivares adaptadas a áreas tropicais e subtropicais (Landgraf, 2020).

Apesar da baixa variabilidade genética entre as cultivares de soja disponíveis, ainda é possível encontrar alterações em algumas características, como a cor do tegumento, que pode variar do amarelo ao verde, preto e marrom até bicolor (Canção et al., 2016; Gwinner et al., 2017). Este caráter encontra-se ligado intimamente com a longevidade da semente, pelo fato da coloração preta estar relacionada ao maior teor de lignina, o que reduz danos ocasionados pela umidade, por fungos de armazenamento e danos mecânicos (Bellaloui et al., 2012; Huth et al., 2016; Kuchlan et al., 2018; Kafer, 2022).

3.6. Coloração do tegumento

O tegumento, camada externa das sementes, apresenta alguns componentes como a epiderme da testa, formada pelas cutículas e pelas células paliçádicas ou macrosclerídeos; a hipoderme da testa, formada pelas células em ampulheta ou fosteosclerídeos, e as células parenquimatosas, que é a camada externa da semente, originada do óvulo (Mertz-Henning, 2009; Miller et al., 2010; Park et al., 2012). Suas principais funções são proteger o embrião contra danos mecânicos e ataques microbianos, regular as trocas gasosas e de água entre o embrião e o

ambiente externo, bem como proteger durante a absorção de compostos, evitando a ruptura celular (Park et al., 2012). Essas são características intimamente ligadas à qualidade da semente.

A pigmentação do tegumento é um traço moderadamente complexo, controlado por cinco *loci* principais, dos quais três, *I*, *R* e *T*, estão envolvidos em vias de pigmentação baseada em flavonoides (Song et al., 2016). Na soja, quatro alelos do *locus* Inibidor (*I*) determinam a pigmentação do tegumento da semente, produzindo uma cor amarelo pálido, um hilo pigmentado e regiões pigmentadas em forma de “sela”, enquanto o alelo recessivo desse *locus* resulta na pigmentação preta ou marrom (Tuteja et al., 2009; Senda et al., 2012). Este *locus* foi mapeado e revelou regiões codificadoras da enzima Chalcona Sintase (CHS) (Todd; Vodkin, 1996; Tuteja et al., 2004), que atua na via dos fenilpropanoides, responsável pela produção de antocianinas, conferindo à semente de soja a coloração preta (Hernandez-Garcia, 2019).

A expressão dos genes CHS pode ser influenciada pela regulação pós-transcricional através do RNA de interferência (siRNAs), mas sua expressão varia entre as cultivares. Sementes com tegumento amarelo claro (alelo *I*) produzem siRNAs de CHS no tegumento, enquanto sementes de tegumento pigmentado (alelo *i*) não produzem (Tuteja et al., 2009; Hernandez-Garcia, 2019).

As cultivares com tegumento preto apresentam alto teor de lignina e outros metabólitos da via dos fenilpropanoides, como flavonoides e antocianinas, o que também pode estar relacionado à longevidade das sementes (Menezes et al., 2009; Abati et al., 2021). A camada paliçádica e as células em formato de ampulheta são mais espessas nesse genótipo, proporcionando maior rigidez à camada, levando a maior qualidade fisiológica e menor permeabilidade na soja preta (Mertz et al., 2009; Kuchlan et al., 2010; Bahry et al., 2015). Por esta razão, o processo de absorção do tegumento preto é mais lento, minimizando assim a deterioração (Bahry et al., 2017).

3.7. A tecnologia de RNA-seq

A biotecnologia é uma área de pesquisa e desenvolvimento que impacta diversos setores, com destaque para tecnologias moleculares avançadas, tais como a edição de genoma, o sequenciamento de RNA e a análise da expressão e funcionamento de vias metabólicas (Malajovich, 2016). O sequenciamento de RNA,

conhecido como RNA-Seq, é uma ferramenta que permite quantificar a expressão genética, detectar variantes de permuta, como as de nucleotídeos únicos (SNPs) e explorar novos transcritos codificantes e não codificantes (Kratz; Carninci, 2014; Molinari et al., 2021a). Para garantir resultados biológicos precisos com o RNA-Seq, vários aspectos devem ser considerados, como o desenho experimental, o tipo de biblioteca sintetizada (*single-end* ou *paired-end*), o tamanho dos fragmentos gerados e o número de repetições biológicas. Além da disponibilidade dos genomas das espécies, a escolha dos softwares adequados para a montagem dos transcritos e a análise computacional, bem como a profundidade e a cobertura do sequenciamento (Conesa et al., 2016; Molinari et al., 2021a).

De modo geral, os experimentos de RNA-Seq seguem algumas etapas básicas: 1) desenho experimental apropriado e seleção da plataforma de sequenciamento; 2) extração do RNA, que pode ser total ou fracionado; 3) construção das bibliotecas de cDNA; 4) sequenciamento e 5) análises bioinformáticas (Fang et al., 2012; Hrdlickova et al., 2016; Conesa et al., 2016; Molinari et al., 2021a). As análises bioinformáticas incluem verificação de qualidade dos fragmentos, limpeza de dados, montagem dos transcritos no genoma referência ou montagem *de novo* e análise de expressão diferencial, levando em consideração o algoritmo necessário para o número de repetições biológicas do experimento (Conesa et al., 2016; Molinari et al., 2021a).

A etapa final envolve a biologia de sistemas, que visa anotar e identificar as funções biológicas dos genes por meio de diversos softwares (Garg; Jain, 2013; Costa-Silva et al., 2018). Nas plantas, o RNA-Seq tem sido amplamente utilizado para estudar a dinâmica do transcriptoma em vários aspectos do crescimento e desenvolvimento vegetal (Martin et al., 2013). Particularmente na soja, esta ferramenta tem sido aplicada com sucesso para identificar genes diferencialmente expressos em variados tecidos, estágios de desenvolvimento e tratamentos (Severin et al., 2010; Jones; Vodkin, 2012; Marcolino-Gomes et al., 2014; Wang et al., 2014; Liu et al., 2017; Leisner; Yendrek; Ainsworth, 2017; Lima et al., 2017; Reis et al., 2020; Molinari et al., 2021b).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Preparo do material biológico para coleta de amostra para RNA-seq e RT-qPCR

Para coleta dos dados, o experimento foi realizado em casa de vegetação. Primeiro foi utilizado material biológico para a análise de RNA-Seq e, segundo, para as análises de RT-qPCRs. As cultivares escolhidas neste experimento foram previamente caracterizadas quanto aos seus teores de lignina, compostos fenólicos e qualidade fisiológica (Abati et al, 2021, Abati et al., 2022). As duas cultivares foram selecionadas em função da resposta ao comportamento no armazenamento: BRSMG 715A - de tegumento preto, sendo caracterizada como tolerante ao armazenamento e DM 6563 IPRO - de tegumento amarelo, definida como suscetível ao armazenamento.

As sementes foram germinadas em papel para germinação em períodos alternados de luz e escuro em câmara de germinação, por 4 dias, a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e 100% de umidade relativa (UR). Após a germinação, foram transferidas duas plântulas com raiz primária uniforme por vaso (8L). O experimento totalizou 100 vasos. Cada vaso continha uma mistura de substrato 1:1 (solo fertilizado e areia lavada). O experimento foi conduzido em casa de vegetação em condição de dias curtos (10h de luz/ 14h de escuro) a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e condições ótimas de irrigação.

As sementes foram colhidas quando as cultivares atingiram a maturação plena. As sementes foram debulhadas manualmente e na sequência homogeneizadas para compor uma amostra de trabalho de 500g. Para cada cultivar, a amostra foi subdividida em dezoito partes iguais, as quais foram utilizadas para compor os diferentes tratamentos T0 - recém-colhidas contendo três repetições; CF - armazenamento em câmara fria por 6 meses (10°C e umidade relativa 50%), e armazenamento em ambiente não controlado por 6 meses, sendo cada tratamento composto por 2 repetições. As amostras das sementes maduras inteiras foram utilizadas para extração do RNA total.

4.2. Análise do RNA-seq

As amostras de sementes coletadas de ambos os métodos de tratamento foram congeladas em nitrogênio líquido (N_2) e armazenadas a -80°C até a extração do RNA. As amostras foram maceradas em N_2 e o RNA total foi extraído utilizando o kit Concert Plant RNA Reagent (Invitrogen, CA, EUA) de acordo com as

especificações do fabricante. A quantificação do RNA foi realizada utilizando espectrofotômetro NanoDrop de acordo com os seguintes parâmetros de qualidade e pureza: concentração > 600 ng μ L, proporção 260/280 variando de 1,8 a 2,0 e proporção 260/230 \geq 2,0. O RNA foi tratado com o kit Turbo livre de DNA para remover o DNA genômico residual (Invitrogen, CA, EUA). A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em geis de agarose a 1% (p/v) corados com brometo de etídio (1 μ g/ml) (Sambrook et al., 1989).

Amostras de RNA total de alta qualidade foram enviadas à Universidade da Geórgia (*Georgia Genomics Facility* - GGF, EUA) para sequenciamento. As amostras foram avaliadas em um instrumento Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Inc.) antes do sequenciamento, e apenas amostras com um número de integridade de RNA (RIN) \geq 7,00 foram usadas para sintetizar bibliotecas de mRNA-Seq. As bibliotecas foram sintetizadas usando o kit Illumina TruSeq™ SBS v5 Poly-A. Cobertura de pelo menos 1X do genoma na plataforma de sequenciamento de extremidade emparelhada Illumina NextSeq 500 1.9 75bp (Illumina, San Diego, CA, EUA). Cada amostra foi sequenciada em duplicatas biológica, gerando um total de 12 bibliotecas de mRNA (2 réplicas de BRSMG 715A - T0, 2 réplicas de BRSMG 715A - A, 2 réplicas de BRSMG 715A - CF, 2 réplicas de DM 6563 IPRO - T0, 2 réplicas de DM 6563 IPRO - A, 2 réplicas de DM 6563 IPRO - CF).

4.3. Análise de bioinformática

A qualidade bruta dos fragmentos ou *reads* foi avaliada usando o software FastQC v.0.11.5, antes e depois da remoção de adaptadores e de sequências de baixa qualidade (Andrews 2010; Patel & Jain 2012). A limpeza dos fragmentos foi realizada utilizando o software Trimmomatic versão 0.36 (Bolger et al., 2014), com corte normalizado para cada quatro nucleotídeos a partir do final da sequência com índice de qualidade inferior a 30 (índice de qualidade Phred, Q \geq 30).

O alinhamento dos fragmentos foi realizado pelo software HISAT2 v.2.1.0 usando o genoma da soja Wm82.a2.v1 como referência (Goodstein et al., 2011, Kim et al., 2015). Os artefatos de PCR do sequenciamento da Illumina foram então removidos usando o software Samtools v.1.5 (Li et al. 2009). A montagem dos transcritos foi realizada usando o software Stringtie v.1.3.3 (Pertea et al., 2015) e a

expressão relativa foi realizada com o software EdgeR v.3.22.3 (Robinson et al.,2010; Racine, 2012), no RStudio v.3.5.1 (Perteira et al., 2015).

4.4. Análise dos genes diferencialmente expressos

Em cada tratamento (T0; A; CF), comparou-se cultivares de tegumento preto (BRSMG 715A) e amarelo (DM 6563 IPR0) para identificar os genes diferencialmente expressos. Genes com valores de mudança de dobra Log₂ (Log₂FC) ≤ -1 e $\geq +1$, com probabilidade ajustada de p ($p_{adj} \leq 0,05$) para a redução da taxa de falsos positivos (FDR) e logCPM positivo foram considerados diferencialmente expressos (Molinari et al., 2021a). A anotação genética foi realizada utilizando a ferramenta Phytomine (Goodstein et al., 2011).

Após a identificação dos genes diferencialmente expressos, estes foram submetidos ao Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov>), usado a versão Glycine max Wm82.a4.v1, para a análise individual. De forma manual foi anotado de cada um dos genes, de acordo com as informações disponíveis no site, sendo obtidos o seu GO (Gene Ontology), o identificador KEGG, a sua função e, na ausência de uma das duas primeiras informações, foi registrado o número Pfam. O enriquecimento genético e a análise de ontologia genética foram realizados usando o software ShinyGO V0.77 com base em informações do banco de dados KEGG (Kanehisa & Goto, 2000). Os genes que não continham essas informações, foram descartados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Expressão diferencial

Os transcriptomas foram submetidos a uma seleção e, em cada tratamento, genes sem anotação foram retirados da análise. As cultivares BRS MG 715A e DM 6563 IPRO, resultaram em 427 e 468 transcritos totais, respectivamente. No tratamento Ambiente (A), foram observados 192 transcritos totais para a BRS MG 715A e destes 138 foram expressos diferencialmente e exclusivos nessa condição, sendo 53 regulados positivamente (BRS MG A+) e 85 negativamente (BRS MG A-). Para a DM 6563 IPRO, foram identificados 161 transcritos totais, sendo 80 apontados como diferencialmente expressos e exclusivos, com 19 regulados positivamente (DM 6563 A+) e 61 regulados negativamente (DM 6563 A-), representado na Figura 1, realizada no site ClustVis (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>).

Para o tratamento de Câmara Fria (CF), foram identificados 106 genes totais para a BRS MG 715A com 58 expressos diferencialmente e únicos nessa condição, sendo 15 regulados positivamente (BRS MG CF+) e 38 regulados negativamente (BRS MG CF-). Para DM 6563 IPRO, foram analisados 186 genes totais e 110 expressos diferencialmente e específicos desse tratamento, com 19 regulados positivamente (DM 6563 CF+) e 91(DM 6563 CF-) regulados negativamente.

Na cultivar BRS MG 715A, 22 genes foram encontrados tanto em CF+ quanto A+. Esta última condição, A+, ainda compartilha 2 genes diferentes com CF-; e A- e CF- apresentam 10 genes compartilhados. Por outro lado, na cultivar DM 6563 IPRO o compartilhamento de genes entre A- e CF- são de 69, o tratamento A- apresenta 2 genes em comum com CF+ e CF- compartilha 5 com A+.

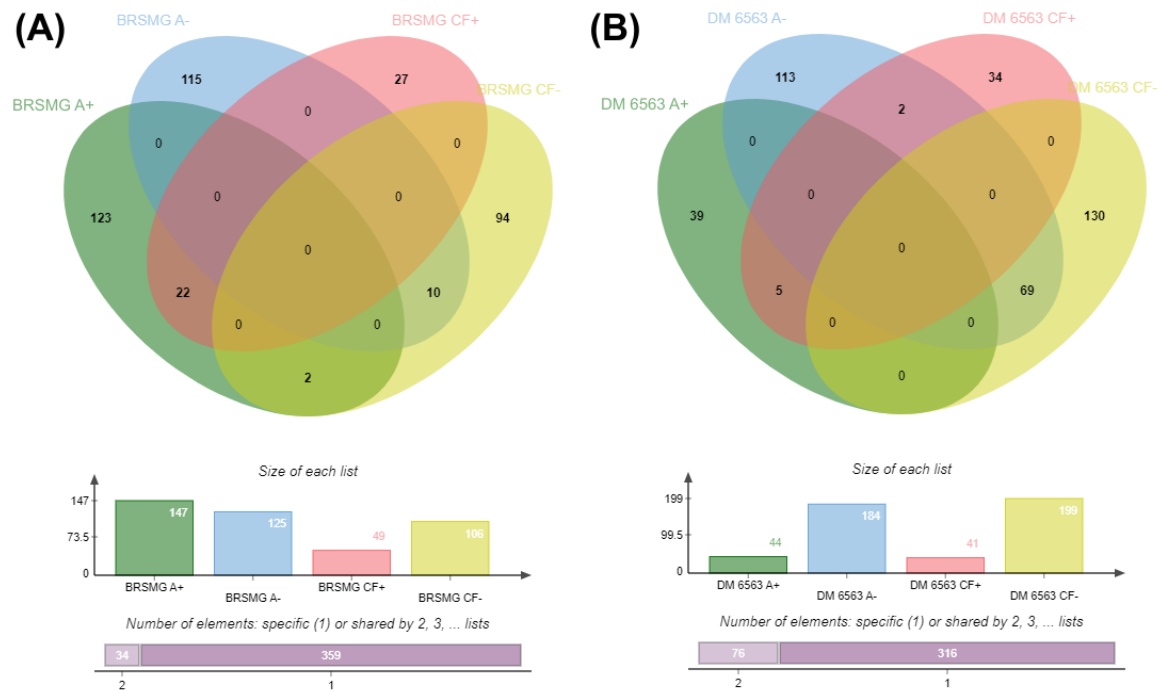


Figura 1. Gráfico de *Venn* para os transcritos totais anotados nas cultivares BRS MG 715A (A) e DM 6563 IPRO (B), após a limpeza, nas diferentes condições experimentais (CF-, *down regulated*, CF+, *up regulated*) (A -, *down regulated*, A+ *up regulated*).

5.2. Vias metabólicas envolvidas

Após a seleção dos transcritos exclusivos e a realização das suas anotações, estes foram organizados em classes de envolvimento celular dentro de cada tratamento, sendo elas: manutenção do DNA, com 36 transcritos; fatores de transcrição, 60; metabolismo de proteínas, 96; metabolismo de carboidratos, 33; metabolismo de lipídeos, 17; fotossíntese, 10; interação planta-patógeno, 13; transporte celular, 43; chaperonas, 16; e outros, 39. Estes últimos foram difíceis de relacionar a alguma dessas vias, como, por exemplo, o gene Glyma.13G042200 (Log2FC 1,09) (DM 6563 A+) descrito como envolvido na tolerância ao sal (Zeng et al. 2017); bem como outros que não apresentaram uma função na bibliografia, como é o caso de alguns *motifs* e *transposons* (Glyma.19G190000 - Log2FC -2,85 e Glyma.03G189600- Log2FC -3,09 em BRS MG CF-). A distribuição desses genes em cada tratamento é mostrada na Figura 2 e 3, para BRS MG 715 A e DM 6563 IPRO, respectivamente, que foram feitas no programa do Excel.

Figura 2. Gráfico em barras para o total de transcritos de cada tratamento, associados às diferentes vias metabólicas na cultivar BRS MG 71A.

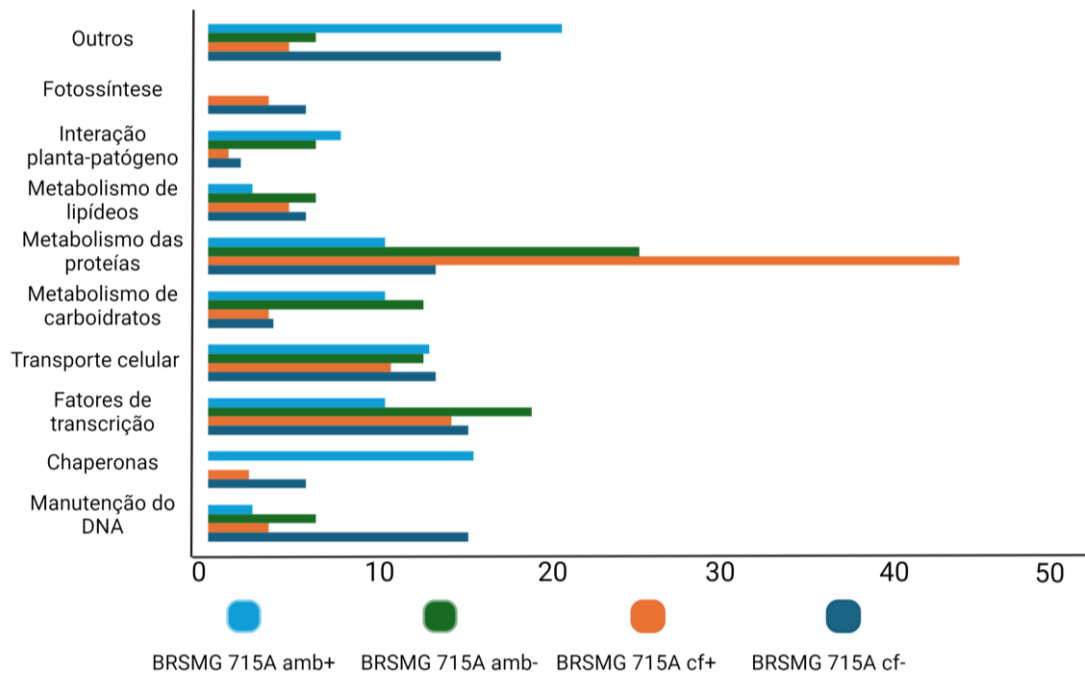
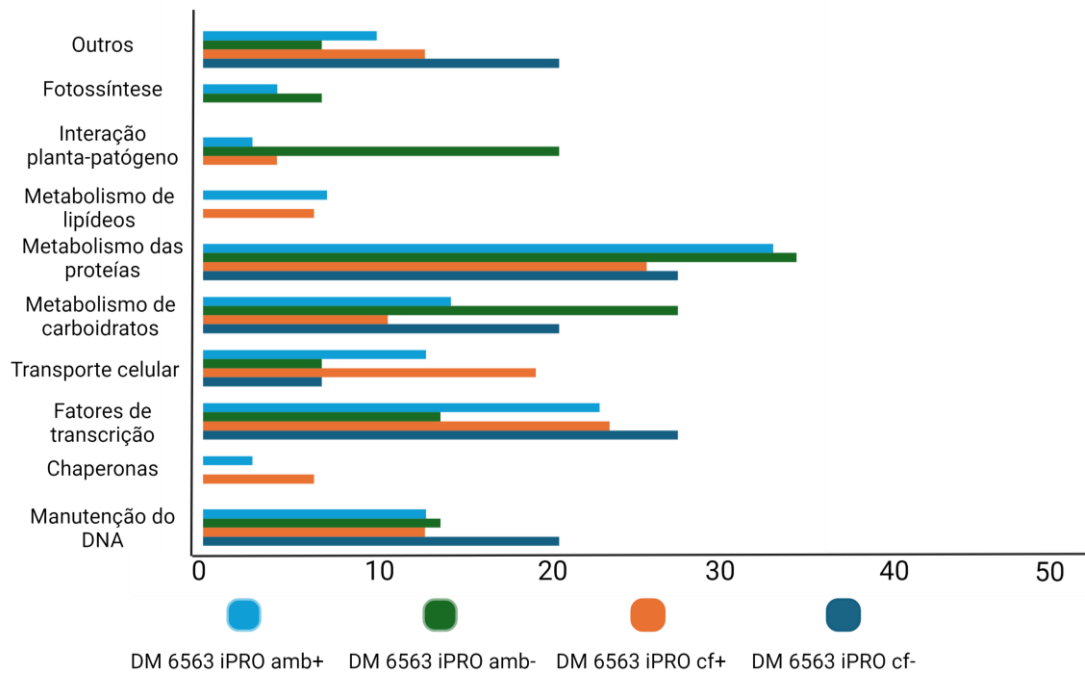


Figura 3. Gráfico em barras para o total de transcritos de cada tratamento, associados às diferentes vias metabólicas na cultivar DM 6563 IPRO.



5.3. Fatores de Transcrição

Os fatores de transcrição (FT) constituíram a classe com o segundo maior número de dados em todos os tratamentos, perdendo apenas para o metabolismo de proteínas. Diversos genes dessa classe estão associados à germinação e crescimento, como o homólogo do *WRKY* (Glyma.16G031900 Log2FC -2,37) em DM 6563 A-. Esse gene atua como regulador positivo na sinalização do ácido abscísico durante a germinação e o início do desenvolvimento de mudas em *Arabidopsis* (Huang et al., 2016) e é envolvido na senescência e estresses (Yin et al., 2019). Além disso, foi identificado um gene, *EREBP-like factor*, (Glyma.03G112400 Log2FC 7,92) no tratamento BRS MG A+, relacionado à regulação de processos como desenvolvimento, açúcar, sinalização hormonal e redox em resposta a estresses abióticos (Dietz et al., 2010), corroborado pelo trabalho de Jones e Vodkin, 2013.

Também foram identificados fatores de transcrição envolvidos na resistência a doenças. Em BRS MG A-, destacaram-se os genes Glyma.06G300800 (Log2FC -1,29) e Glyma.04G088800 (Log2FC -1,03), enquanto em DM 6563 A-, os genes Glyma.05G124000 (Log2FC -,8,58) e Glyma.16G156100 (Log2FC -7,78) e, em DM 6563 CF-, o gene Glyma.01G025600 (Log2FC -1,11). Todos esses genes são anotados como receptores de *Leucine rich repeats* (LRR), essenciais para o reconhecimento de sinais de desenvolvimento, patógenos e fitorreguladores vegetais (Belkhadir et al., 2014).

Outra classe de fatores de transcrição encontrada foi a família *Leucine zipper* (bZIP) em diferentes tratamentos. Em BRS MG A+, destaca-se o gene Glyma.09G184300 (Log2FC 1,05); em BRS MG CF-, o gene Glyma.17G096700 (Log2FC -1,23); em DM 6563 A-, os genes Glyma.01G207300 (Log2FC -1,13) e Glyma.13G260300 (Log2FC -10,44). Esses genes estão associados à regulação da expressão gênica durante a maturação das sementes (Vicente-Carbajosa e Carbonero, 2005; Schallau et al., 2008) e estão diretamente envolvidos na expressão de genes SSP - proteínas de armazenamento de sementes (Weltmeier et al., 2006).

5.4. Metabolismo de proteínas

Em relação ao metabolismo de proteínas, foram identificados genes relacionados ao metabolismo de cisteína e metionina em diferentes tratamentos. No tratamento BRS MG A-, destacam-se os genes Glyma.18G278800 (Log2FC -2,10), Glyma.13G028400 (Log2FC -1,06) e Glyma.05G193200 (Log2FC -3,07). Em relação aos tratamentos DM 6563 CF+ e CF-, foram observados os genes Glyma.08G029200 (Log2FC 1,19) e Glyma.07G186000 (Log2FC -2,40), respectivamente. Esses aminoácidos sulfurados são considerados essenciais, pois não podem ser sintetizados pelo organismo e, portanto, sua presença celular depende da absorção. Eles desempenham papéis fundamentais na biossíntese de diversas moléculas essenciais para o funcionamento adequado dos organismos, incluindo a creatina, carnitina, poliaminas, epinefrina, colina e melatonina (Singer et al., 2019; Malle et al., 2020).

Além disso, um dos produtos do metabolismo desses aminoácidos, a S-adenosylmethionine, é um precursor importante na formação de lignina por meio da metilação de molignóis (Bai et al., 2018), processo crucial para o fortalecimento da parede celular e a resistência das plantas a diversos estresses ambientais.

Outro gene importante, Glyma.07G265700 (Log2FC -1,49) presente em BRS MG A-, foi anotado como *E3 ubiquitin ligase*. Outros, relacionados com a *E3 ubiquitin* foram encontrados em BRS MG CF+ (Glyma.12G116500 Log2FC 7,56) e mais dois em BRS MG A- (Glyma.11G107500 Log2FC -1,02 / Glyma.14G050200 Log2FC -1,01). O produto proteico desses genes está associado à ubiquitinação, que tem como alvo proteínas relacionadas com a degradação (Yu et al., 2016). Essas proteínas são fundamentais para o desenvolvimento das plantas e, principalmente, para a resposta a estresses ambientais (Lim et al., 2013; Park et al., 2015; Ding et al., 2015).

Outra família de genes também envolvida nesse processo é a E2 ubiquitina ou enzimas conjugadoras de ubiquitina, encontrada em BRS MG A+ (Glyma.18G016800 Log2FC 7,20), BRS MG A- (Glyma.13G239100 Log2FC -1,34), BRS MG CF+ (Glyma.17G034400 Log2FC 2,91) e DM 6563 CF- (Glyma.07G069300

Log2FC -1,24), que por sua vez, são encarregados de determinar a especificidade da ligação da ubiquitina pelo reconhecimento do substrato (Kornitzer et al., 1994).

Por fim, deve-se destacar o metabolismo dos flavonoides, envolvendo os genes Glyma.07G021600 (Log2FC -1,27) no tratamento BRS MG A- , Glyma.16G149300 (Log2FC -1,39) em BRS MG CF-; Glyma.13G042200 (Log2FC 1,09) em DM 6563 A+ e Glyma.02G136300 (Log2FC -4,70) em DM 6563 A- . Estes estão envolvidos em proteção contra estresse oxidativo, pois o grupo hidroxila nos flavonoides são capazes de eliminar espécies reativas de oxigênio e radicais hidroxilas, atuando então como antioxidantes (Trembl & Smejkal, 2016). Vale ressaltar, que este composto químico também está envolvido no processo de teor de lignina nas sementes, que em altos níveis impacta na absorção de água pelo tegumento, que a longo prazo se torna um fator de longevidade evitando a deterioração da semente em armazenamento não controlado (Abati et al., 2022).

5.5. Metabolismo de lipídeos

Nesta classe, foram identificados muitos genes relacionados aos hormônios vegetais, como etileno, giberelinas, ácido abscísico, auxina e brassinosteroides. Com relação ao etileno, foram encontrados dois genes associados, ambos na BRS MG 715A: Glyma.02G215300 (Log2FC -1,25) no tratamento A- e Glyma.20G202200 (Log2FC -2,16) em CF-. Este hormônio afeta o crescimento, o desenvolvimento e a resposta da planta a estresses bióticos e abióticos (Pattyn et al., 2021). Além disso, promove a germinação, e sua superexpressão induz o crescimento da radícula e reduz o crescimento da plântula (Ishibashi et al., 2013), além de realizar a formação, manutenção e alongação do gancho pulmonar e do hipocótilo (Ahammed et al., 2020).

Com relação às giberelinas (GA), foram identificados transcritos do gene Glyma.09G238300 (Log2FC 1,03) em DM 6563 A+ e Glyma.14G0872 (Log2FC -1,29) / Glyma.05G034500 (Log2FC -1,31) em DM 6563 CF-. Este fitohormônio está envolvido com a quebra da dormência e na germinação das sementes, além de interferir na ativação da atividade de hidrolase endógena das sementes que leva a promover clivagens de substâncias de armazenamento (Rajjou et al., 2012). Outro

hormônio envolvido com a dormência e germinação das sementes é o Ácido abscísico (ABA). No entanto, de maneira contrária, o acúmulo de ABA resulta na dormência da semente (Vishwakarma et al., 2017). Este foi encontrado associado apenas a um gene o Glyma.12G014800 (Log2FC 2) presente no tratamento BRS MG CF+.

As auxinas (AIA), importantes reguladores hormonais, foram identificadas em BRS MG A- (Glyma.07G130400 Log2FC -1,21) e BRS MG CF- (Glyma.02G125600 Log2FC -2,93). O AIA interfere na biossíntese de ABA, aumentando-a e reprimindo a de GA. Estudos de indução de auxina exógena evidenciaram que o AIA atua na via de sinalização do ácido abscísico, regulando positivamente sua transcrição (Shuai et al., 2017).

Por fim, mas não menos importante, os brassinosteroides foram identificados em BRS MG CF- (Glyma.01G178000 Log2FC -1,22). Semelhantemente às GA, promovem a germinação e a alongação de epicótilo e hipocótilo, além de atuarem na senescência foliar, indução de genes associados a auxinas, supressão de FT WRKY e indução da modificação da parede celular, como o aumento de lignina, com regulação positiva na biossíntese de fenilpropanoides (Li et al., 2016; Yin et al., 2019; Fan et al., 2020).

5.6. Candidatos para a validação RT- qPCR

A longevidade das sementes está diretamente associada à síntese de *Heat Shock Proteins* (HSPs) e de diversos co-chaperones envolvidos nas interações proteína-proteína e no processo de enovelamento das proteínas (Pereira et al. 2017). Nos diferentes tratamentos, observaram-se expressões específicas de genes relacionados a essas proteínas, Figuras 4 e 5, organizado com o auxílio da ferramenta ClustVis (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>) .

Figura 4. *Heatmap* dos candidatos para a validação de RT que estão presentes na cultivar BRS MG 715A de acordo com cada tratamento. Com seu Log2FC expresso em barra, em vermelho os valores dos regulados negativamente e em azul regulados positivamente.

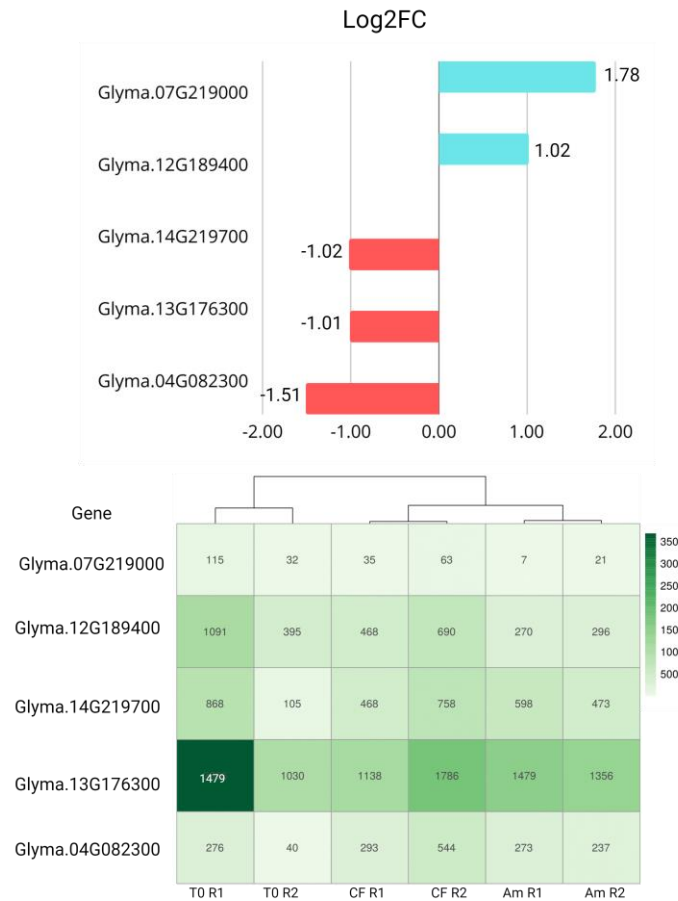


Figura 5. *Heatmap* dos candidatos para a validação de RT que estão presentes na cultivar DM 6563 IPRO de acordo com cada tratamento. Com seu Log2FC expresso em gráfico de barras, em vermelho os valores dos regulados negativamente e em azul regulados positivamente.



No tratamento DM 6563 CF-, destacaram-se os genes Glyma.20G015900 (Log2FC -1,08) e Glyma.02G244300 (Log2FC -1,30); em DM 6563 A-, o gene Glyma.17G053700 (Log2FC -1,12); em BRS MG A-, o gene Glyma.14G219700 (Log2FC -1,02) e, no tratamento BRS MG CF-, encontrou-se o maior número de genes relacionados a essas proteínas, como Glyma.11G025700 (Log2FC -1,20), Glyma.13G176300 (Log2FC -1,01), Glyma.04G054400 (Log2FC -1,24), Glyma.03G157300 (Log2FC -1,27) e Glyma.04G052000 (Log2FC -1,81). Essas proteínas desempenham um papel crucial no estabelecimento de condições de dobramento adequadas durante o estresse abiótico (Aguas, 2013) e na proteção contra o estresse oxidativo durante o armazenamento (Rao, 2015), contribuindo assim para a prolongação da vida das sementes.

Além das HSPs, outra família de chaperonas importantes são as proteínas DNAJ, que regulam a homeostase proteica em conjunto com as HSP70 (Pulido & Leister, 2017). Essas proteínas foram identificadas nos tratamentos DM 6563 A- (Glyma.07G110200 Log2FC -1,22 e Glyma.01G245700 Log2FC -1,30), BRS MG CF- (Glyma.12G117900 Log2FC -1,33) e BRS MG A+ (Glyma.12G189400 Log2FC 1,02 e Glyma.13G312400 Log2FC 1,16).

É amplamente reconhecido que a maioria das proteínas celulares requer a assistência de co-chaperonas moleculares em vários estágios de suas vidas. Essas chaperonas desempenham papéis cruciais, desde o dobramento de proteínas nascentes nos ribossomos até o redobramento após exposição a diferentes situações de estresse. Além disso, trabalham em conjunto com proteases para degradar proteínas mal dobradas e prevenir danos celulares. A interação sinérgica entre chaperonas e proteases permite o controle de qualidade proteica (Bukau et al., 2006). Com base nessas informações, oito dos genes selecionados para validação por RT são chaperonas, evidenciando sua importância nos processos celulares e no prolongamento da vida das sementes.

Outros genes encontrados em BRS MGA- (Glyma.04G082300 Log2FC -1,51) e DM 6563 CF- (Glyma.20G184600 Log2FC -1,22) foram classificados como genes envolvidos no metabolismo proteico. Glyma.04G082300 (Log2FC -1,51) é conhecido por estar envolvido na síntese de tocoferol e é membro da família da vitamina E, mas está incluído nesta categoria devido ao seu papel na proteção de proteínas contra danos oxidativos (Kamal-Eldin, 2006). Além disso, os tocoferóis também protegem o óleo de soja da oxidação das ligações duplas, uma vez que as sementes de soja são ricas em ácidos graxos insaturados (Ohlrogge e Browse, 1995; Sattler et al., 2004; Fang et al., 2017).

Também foi observada uma correlação positiva entre o tocoferol e o teor de ácidos graxos totais em diferentes cultivares (Chu et al., 2023). A prevenção da oxidação lipídica evita a produção de radicais livres e peróxidos que causam danos a proteínas, DNA, estruturas de membranas, consequentemente, a tecidos que induziram a perda de vigor nas sementes (Chen et al., 2010; Zhou et al. 2019).

Quanto a Glyma.20G184600 (Log2FC -1,22), sabe-se que pertence à

proteína *AWPM-19*, uma proteína da membrana plasmática que desempenha um papel negativo na regulação da germinação de sementes de arroz (Li et al. 2020), apesar de não se tratar de uma leguminosa, é o estudo mais recente sobre tal proteína.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados da análise do transcriptoma das cultivares de soja BRS 715A (tegumento preto) e DM 6563 IPRO (tegumento amarelo), observamos diferenças na expressão gênica em diferentes condições de armazenamento. A BRS 715A teve menos genes expressos diferencialmente, indicando possível diferença na regulação gênica sob estresse de armazenamento.

Analisando as vias metabólicas em cada estágio de armazenamento, encontramos genes envolvidos em funções essenciais, mostrando que cada cultivar ativa diferentes vias metabólicas para garantir sua sobrevivência e longevidade.

Identificamos fatores de transcrição associados à germinação, crescimento, resistência a doenças e regulação hormonal, sendo *down-regulated* em tratamentos não controlados.

Identificamos também genes relacionados ao metabolismo de proteínas e lipídios, incluindo síntese de aminoácidos sulfurados. Destacamos genes de ubiquitinação de proteínas na BRS MG 715A e genes ligados à dormência celular, como o ABA.

Sendo assim, os genes candidatos para validação incluem aqueles relacionados à síntese de proteínas de choque térmico, co-chaperonas, enzimas antioxidantes e proteínas da membrana plasmática. Essa validação pode confirmar os resultados deste estudo sobre os mecanismos moleculares da resposta ao estresse de armazenamento.

REFERÊNCIAS

- ABATI, J.; ZUCARELI, C.; BRZEZINSKI, C.R.; LOPES, I.D.O.N.; KRZYZANOWSKI, F.C.; MORAES, L.A.C.; HENNING, F.A. Water absorption and storage tolerance of soybean seeds with contrasting seed coat characteristics. *Acta Sci. Agron.* 2022, 44.
- ABATI, J.; ZUCARELI, C.; BRZEZINSKI, C.R.; KRZYZANOWSKI, F.C.; FRANÇA-NETO, J.D.B.; HENNING, F.A. Metabolites of the phenylpropanoid pathway and physiological quality of soybean seeds in storage. *J. Seed Sci.* 2021, 43.
- AGUIRRE, M.; KIEGLE, E.; LEO, G.; EZQUER, I. Carbohydrate reserves and seed development: An overview. *Plant Reprod.* 2018, 31, 263–290.
- AHAMMED, G. J. et al. Role of ethylene crosstalk in seed germination and early seedling development: A review. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 151, p. 124–131, 1 jun. 2020.
- AZEVEDO, M. R. de Q. A.; GOUVEIA, J. P. G. de; TROVÃO, D. M. M.; QUEIROGA, V. de P. Influência das embalagens e condições de armazenamento no vigor de sementes de gergelim. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.7, p.519-524, 2003.
- BONATO, E.R., BONATO, A.L.V. A soja no Brasil: história e estatística. Londrina: EMBRAPA- CNPSo, 1987. 61p. (Documentos, 21.)
- BAHRY, C. A., ACUNHA, T. dos S.; FERNANDO, J. A.; CHAVES, F.C.; NARDINO, M.; & ZIMMER, P. D. Chemical composition and structural characterization of contrasting colors of soybean seed coats. *Semina:Ciencias Agrarias*, v. 36, n. 3, p. 1913–1926, 2015.
- BAHRY, C. A.; PERBONI, A. T.; NARDINO, M.; ZIMMER, P.D. Physiological quality and imbibitions of soybean seeds with contrasting coats. *Revista Ciencia Agronomica*, v. 48, n. 1, p. 125–133, 2017.
- BAI, Z. et al. Alteration of S-adenosylhomocysteine levels affects lignin biosynthesis in switchgrass. *Plant Biotechnology Journal*, v. 16, n. 12, p. 2016–2026, 1 dez. 2018.
- BELKHADIR, Y. et al. The growth–defense pivot: crisis management in plants mediated by LRR-RK surface receptors. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 39, n. 10, p. 447– 456, 1 out. 2014.
- BRASIL. Lei nº 10.711, de agosto de 2003. Direito Agrário. Direito Rural. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento- MAPA. Brasília- DF. D.O.U de 06/08/2003, pág. nº 1.
- BUITINK, J.; HEMMINGA, M. A.; HOEKSTRA, F.A. Is There a Role for Oligosaccharides in Seed Longevity? An Assessment of Intracellular Glass Stability, *Plant Physiology*, Volume 122, Issue 4, April 2000, Pages 1217–1224, <https://doi.org/10.1104/pp.122.4.1217>
- CALDWELL, C. R.; BRITZ, S. J.; MIRECKI, R.M. Effect of Temperature, Elevated Carbon Dioxide, and Drought during Seed Development on the Isoflavone Content of Dwarf Soybean [Glycine max (L.) Merrill] Grown in Controlled Environments. *Journal of agricultural and food chemistry*. v. 53, n. 04, p. 1125-1129, 2005.
- CANÇÃO, J.; LIU, Z.; HONG, H.; PODERIA.; TIAN, L.; LI, X.; LI, Y.-H.; GUAN, R.; GUO, Y.; QIU, L.-J. Identificação e validação de loci que governam a cor do tegumento da semente combinando mapeamento de associação e análise de segregação em massa em soja. *PLoS ONE* 2016, 11, e0159064.
- CARDOSO, R. B.; BINOTTI, F. F. da S.; CARDOSO, E. D. Potencial fisiológico de sementes de crame em função de embalagens e armazenamento. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v.42, p.272-278, 2012.
- CARVALHO, E.R.; OLIVEIRA, J.A.; VON PINHO, É.V. de R.; COSTA NETO, J. Enzyme activity in soybean seeds produced under foliar application of manganese. *Ciência e Agrotecnologia*, v.38, p.317-

327, 2014. DOI: 10.1590/S1413-70542014000400001.» <https://doi.org/10.1590/S1413-70542014000400001>

CARVALHO, E.R.; OLIVEIRA, J.A.; REIS, L.V.; FERREIRA, T.F. Foliar manganese in the health and lignin quality of conventional and glyphosateresistant soybean seeds. *Rev. Ciênc. Agron.* 2015, 46, 135–143.

CHANG, X.; LI, H.; NAEEM, M.; WU, X.; YONG, T.; SONG, C.; LIU, T.; CHEN, W.; YANG, W. Diversity of the Seedborne Fungi and Pathogenicity of *Fusarium* Species Associated with Intercropped Soybean. *Pathogens* 2020, Vol. 9, Page 531, v. 9, n. 7, p. 531, 1 jul. 2020.

CONAB- Acompanhamento da Safra brasileira de grãos. v.11 – safra 2023/24, nº6 – Sexto levantamento. Março 2024. ISSN: 2318-6852 Disponível em: https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos/item/download/52225_79be7813e39c3746ab9121250bbfb5c5

CONAB- Acompanhamento da Safra brasileira de grãos. v.10 – safra 2022/23, nº12– Décimo segundo levantamento. setembro 2023. ISSN: 2318-6852 Disponível em: https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos/item/download/49098_b2d232d2b5f4da1a15d9e457cde081

CONESA, A.; MADRIGAL, P.; TARAZONA, S.; GOMEZ-CABRERO, D.; CERVERA, A.; MCPHERSON, A.; SZCZESNIAK, M. W.; GAFFNEY, D. J.; ELO, L. L.; ZHANG, X.; MORTAZAVI, A. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biology* 2016 17:1, v. 17, n. 1, p. 1–19, 26 jan. 2016.

COSTA-SILVA, J.; DOMINGUES, D.; LOPES, F. M. RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool. *PLOS ONE*, v. 12, n. 12, p. e0190152, 1 dez. 2017.

DESCHAMPS, L. H. Qualidade da semente de soja e de seu repasse beneficiados em mesa de gravidade. 2006. 46 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de sementes). - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

DIETZ, K.J.; VOGEL, M. O.; VIEHHAUSER, A. AP2/EREBP transcription factors are part of gene regulatory networks and integrate metabolic, hormonal and environmental signals in stress acclimation and retrograde signaling. *Protoplasma* 2010; 245:3–14. <https://doi.org/10.1007/s00709-010-0142-8> PMID: 20411284

FANG, Z.; MARTIN, J.; WANG, Z. Statistical methods for identifying differentially expressed genes in RNA-Seq experiments. *Cell and Bioscience*, v. 2, n. 1, p. 1–8, 31 jul. 2012.

FAOSTAT. Available online: https://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity (accessed on 24 March 2024).

FAOSTAT. Disponível em: [FAOSTAT](https://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity). Acesso em: 27 de março de 2024

FRANÇA-NETO, J. DE B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A.; PADUA, G. P. de; LORINI, I.; HENNING, F. A. Documentos 380 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Soja Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2016.

GANESAN, K.; XU, B. A critical review on polyphenols and health benefits of black soybeans. *Nutrients* 2017, 9, 455.

GARG, R.; JAIN, M. Legume Genomics. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), v. 1069, p. 43–58, 2013.

GONÇALVES, R. A.; SANTOS, J. P.; CHANDRA, P. K.; GERMANI, R. Controle de *Rhizopertha dominica* pela atmosfera controlada com CO₂ em trigo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 35, n. 01, p. 01-09, 2003.

GRIS, C.F.; VON PINHO, E.V. de R.; ANDRADE, T.; BALDONI, A.; CARVALHO, M.L. de M. Qualidade fisiológica e teor de lignina no tegumento de sementes de soja convencional e transgênica RR submetidas a diferentes épocas de colheita. *Ciência e Agrotecnologia*, v.34, p.374-381, 2010. DOI: 10.1590/S1413-70542010000200015. » <https://doi.org/10.1590/S1413-70542010000200015>

GWINNER, R.; SETOTAW, T. A.; PASQUAL, M.; SANTOS, J. B. dos; ZUFFO, A. M.; ZAMBIAZZI, E. V.; BRUZI, A. T. Genetic diversity in Brazilian soybean germplasm. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 17, n. 4, p. 373–381, 2017.

HARTMAN, G. L.; WEST, E. D.; HERMAN, T. K. Crops that feed the World 2. Soybean-worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. *Food Security*, v. 3, n. 1, p. 5–17, 2011.

HEGSTAD, J. M.; NELSON, R. L.; RENNY-BYFIELD, S.; FENG, L.; CHAKY, J. M. Introgression of novel genetic diversity to improve soybean yield. *Theoretical and Applied Genetics* 2019 132:9, v. 132, n. 9, p. 2541–2552, 17 jun. 2019.

HRDLICKOVA, R.; TOLOUE, M.; TIAN, B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, v. 8, n. 1, p. e1364, 1 jan. 2017.

HUANG, Y.; FENG, C.Z.; WU, W.H.; CHEN, Y.F. Arabidopsis WRKY6 transcription factor acts as a positive regulator of abscisic acid signaling during seed germination and early seedling development. *PLoS Genet.* 2016; 2:e1005833. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005833> PMID: 26829043

HUTH, C.; MERTZ-HENNING, L. M.; LOPES, S. J.; TABALDI, L. A.; ROSSATO, L. V.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, F. A. Susceptibility to weathering damage and oxidative stress on soybean seeds with different lignin contents in the seed coat 1. *Journal of Seed Science*, p. 296– 304, 2016.

ISHIBASHI, Y. et al. Regulation of soybean seed germination through ethylene production in response to reactive oxygen species. *Annals of Botany*, v. 111, n. 1, p. 95– 102, 1 jan. 2013.

JONES, S. I.; VODKIN, L. O. Using RNA-Seq to Profile Soybean Seed Development from Fertilization to Maturity. *PLoS ONE*, v. 8, n. 3, 2013.

KIM, M. Y.; VAN, K.; KANG, Y. J.; KIM, K. H.; LEE, S. Tracing soybean domestication history: From nucleotide to genome. *Breeding Science*, v. 61, n. 5, p. 445–452, 2012.

KORNITZER, D., RABOY, B., KULKA, R G., FINK, G. R. Regulated degradation of the transcription factor Gcn4, *EMBO* 1. 1994. 13:6021-6030.

KAFER, J. M. Perfil transcricional de sementes de soja com coloração de tegumento contrastante. 2022. 80 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022

KRATZ, A.; CARNINCI, P. The devil in the details of RNA-seq. *Nature Biotechnology*, v. 32, n. 9, p. 882–884, 2014

KRZYZANOWSKI, F. C. Desafios tecnológicos para produção de semente de soja na região tropical brasileira. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 7.; INTERNATIONAL SOYBEAN PROCESSING AND UTILIZATION CONFERENCE, 4.; CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 3., 2004, Foz do Iguaçu. Proceedings... Londrina: Embrapa Soybean, 2004. p. 1324-1335.

KRZYZANOWSKI, F. C.; FRANÇA-NETO, J. DE B.; HENNING, A. A. A alta qualidade da semente de soja: fator importante para a produção da cultura. *Circular Técnica* 136, v. 1, n. Londrina PR, p. 24, 2018.

KUCHLAN, M. K.; DADLANI, M.; SAMUEL, D. V. K. Seed coat properties and longevity of soybean seeds. *Journal of New Seeds*, v. 11, n. 3, p. 239–249, 2010.

LANDGRAF. New black soybeans have more protein than beans and approved taste - Portal Embrapa. 2020b.

LEE, J.H.; CHO, K.M. Changes occurring in compositional components of black soybeans maintained at room temperature for different storage periods. *Food Chem.* 2012, 131, 161–169.

LEISNER, C. P.; YENDREK, C. R.; AINSWORTH, E. A. Physiological and transcriptomic responses in the seed coat of field-grown soybean (*Glycine max* L. Merr.) 71 to abiotic stress. *BMC Plant Biology*, v. 17, n. 1, p. 1–11, 12 dez. 2017

LI, H. et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* (Oxford, England), v. 25, n. 16, p. 2078–2079, ago. 2009. LI, H. et al. BpMADS12 gene role in lignin biosynthesis of *Betula platyphylla* Suk by transcriptome analysis. *Journal of Forestry Research*, v. 27, n. 5, p. 1111–1120, 1 out. 2016.

LIMA, D. de C.; DUTRA, A.S.; PONTES, F.M.; BEZERRA, F.T.C. Storage of sunflower seeds. *Revista Ciência Agronômica*, v.45, p.361-369, 2014. DOI: 10.1590/S1806-66902014000200018. » <https://doi.org/10.1590/S1806-66902014000200018>

LIMA, J. J. P.; BUITINK, J.; LALANNE, D.; ROSSI, R. F.; PELLETIER, S.; SILVA, E. A. A. da; LEPRINCE, O. Molecular characterization of the acquisition of longevity during seed maturation in soybean. *PLOS ONE*, v. 12, n. 7, p. e0180282, 1 jul. 2017.

LIU, J.; QIN, W.-T.; WU, H.-J.; YANG, C.-Q.; DENG, J.-C.; IQBAL, N.; LIU, W.-G.; DU, J.-B.; SHU, K.; YANG, F.; et al. Metabolism variation and better storability of dark- versus light-coloured soybean (*Glycine max* L. Merr.) seeds. *Food Chem.* 2017, 223, 104–113.

LIU, G.; YANG, W.; ZHANG, X.; PENG, T.; ZOU, Y.; ZHANG, T.; WANG, H.; LIU, X.; TAO, L. Cystathionine beta-lyase is crucial for embryo patterning and the maintenance of root stem cell niche in *Arabidopsis*. 2019.

MALLE, S. et al. Genome-wide association identifies several QTLs controlling cysteine and methionine content in soybean seed including some promising candidate genes. *Scientific Reports* 2020 10:1, v. 10, n. 1, p. 1–14, 11 dez. 2020.

MARCOLINO-GOMES, J.; RODRIGUES, F. A. et al. Diurnal oscillations of soybean circadian clock and drought responsive genes. *PLoS ONE*, v. 9, n. 1, 2014.

MARTIN, L. B. B. et al. Catalyzing plant science research with RNA-seq *Frontiers in Plant Science* Frontiers Research Foundation, , 1 abr. 2013. Disponível em: 72 . Acesso em: 17 ago. 2020
MARTINS-FILHO, S.; LOPES, J.C.; RANGEL, O.J.P.; TAGLIAFERRE, C. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja armazenadas em condições de ambiente natural em Alegre-ES. *Revista Brasileira de Sementes*, v.23, p.201-208, 2001.

MATOS, P. C. T. Sementes comestíveis. USP ESALQ – ASSESSORIA DE COMUNICAÇÃO. 2013. Disponível em: http://www.agrolink.com.br/noticias/sementes-comestiveis_166170.html

MEDIC, J.; ATKINSON, C.; HURBURGH, C. R. Current knowledge in soybean composition. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 91, n. 3, p. 363–384, 2014.

MENEZES, M. DE et al. Aspectos químicos e estruturais da qualidade fisiológica de sementes de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 44, n. 12, p. 1716–1723, 2009.

MERTZ, L. M. et al. Structural differences between soybean seeds coat with contrasting permeability. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 31, n. 1, p. 23–29, 2009

MERTZ-HENNING, L.M.; NAGASHIMA, A.I.; KRZYZANOWSKI, F.C.; BINNECK, E.; HENNING, F.A. Relative quantification of gene expression levels associated with lignin biosynthesis in soybean seed coat. *Seed Sci. Technol.* 2015, 43, 445–455.

MILLER, S. S. et al. Hourglass cell development in the soybean seed coat. *Annals of Botany*, v. 106, n. 2, p. 235–242, 1 ago. 2010.

MIKEL, M. A. et al. Genetic Diversity and Agronomic Improvement of North American Soybean Germplasm. *Crop Science*, v. 50, n. 4, p. 1219–1229, 1 jul. 2010.

MIRANDA, E. E. de. Qual a diferença entre grãos e sementes? Terra Viva: o canal de quem planta e cria. 2020 Disponível em: <https://tvterraviva.band.uol.com.br/colunistas/evaristo-de-miranda/100000983965/qual-a-diferenca-entre-graos-e-sementes.html>

MOLINARI, M. et al. Transcriptome analysis using RNA-Seq from experiments with and without biological replicates : a review. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 64, p. 1– 13, 2021.

MOREIRA-VILAR, F. C. et al. The Acetyl Bromide Method Is Faster, Simpler and Presents Best Recovery of Lignin in Different Herbaceous Tissues than Klason and Thioglycolic Acid Methods. *PLOS ONE*, v. 9, n. 10, p. e110000, 16 out. 2014

PAGANO, M.C. and MIRANSARI, M. The importance of soybean production worldwide, in: *Abiotic Biot. Stress. Soybean Prod. Soybean Prod.*, vol. 1, Elsevier, 2016, pp. 1–26, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801536-0.00001-3>.

PATTYN, J.; VAUGHAN-HIRSCH, J.; VAN DE POEL, B. The regulation of ethylene biosynthesis: a complex multilevel control circuitry. *New Phytologist*, v. 229, n. 2, p. 770–782, 1 jan. 2021.

PULIDO, P. and LEISTER, D. Novel DNAJ-related proteins in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*. 2017

SARKAR, S. et al. Abiotic Stresses: Alteration of Composition and Grain Quality in Food Legumes. *Agronomy* 2021, Vol. 11, Page 2238, v. 11, n. 11, p. 2238, 4 nov. 2021.

SENDA, M. et al. Accumulation of proanthocyanidins and/or lignin deposition in buff[1]pigmented soybean seed coats may lead to frequent defective cracking. *Planta*, v. 245, n. 3, p. 659–670, 1 mar. 2017.

SEVERIN, A. J. et al. RNA-Seq Atlas of *Glycine max*: A guide to the soybean transcriptome. *BMC Plant Biology*, v. 10, n. 1, p. 1–16, 5 ago. 2010.

SMITH, S. et al. Genetic Diversity and Modern Plant Breeding. p. 55–88, 2015.

SONG, J. Y. et al. Evaluation of Genetic Diversity and Comparison of Biochemical Traits of Soybean (*Glycine max* L.) Germplasm Collections. *Plant Breeding and Biotechnology*, v. 1, n. 4, p. 374–384, 30 dez. 2013.

SONG, J. et al. Identification and validation of loci governing seed coat color by combining association mapping and bulk segregation analysis in soybean. *PLoS ONE*, v. 11, n. 7, p. 1–19, 2016.

Radix Astadi, I.; Paice, A.G. Black Soybean (*Glycine max* L: Merrill) Seeds' Antioxidant Capacity. In *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2011; pp. 229–236.

REESE, P. F.; BOERMA, H. R. Additional genes for green seed coat in soybean. *Journal of Heredity*, v. 80, n. 1, p. 86–88, 1989.

SINGER, W. M. et al. Soybean Amino Acids in Health, Genetics, and Evaluation. *Soybean for Human Consumption and Animal Feed*, 7 out. 2019. SM Journal of Nutrition and Metabolism Gr up SM. [s.d.].

Smaniotto, T. A. S.; Resende, O.; Marçal, K. A. F.; Oliveira, D. E.C.; Simon, G.A. Qualidade fisiológica das sementes de soja armazenadas em diferentes condições. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 18 (4) • Abr 2014 • <https://doi.org/10.1590/S1415-43662014000400013>

- TODD, J. J.; VODKIN, L. O. Duplications that suppress and deletions that restore expression from a chalcone synthase multigene family. *Plant Cell*, v. 8, n. 4, p. 687–699, 1996.
- TREML, J., SMEJKAL, K. Flavonoids as potent scavengers of hydroxyl radicals. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2016;15:720- 38.
- TURNER, R. E. et al. Effects of Purple Seed Stain on Seed Quality and Composition in Soybean. *Plants* 2020, Vol. 9, Page 993, v. 9, n. 8, p. 993, 5 ago. 2020.
- TUTEJA, J. H. et al. Tissue-specific gene silencing mediated by a naturally occurring chalcone synthase gene cluster in *Glycine max*. *Plant Cell*, v. 16, n. 4, p. 819–835, 2004.
- TUTEJA, J.H.; ZABALA, G.; VARALA, K.; HUDSON, M.; VODKIN, L.O. Endogenous, tissue-specific short interfering RNAs silence the chalcone synthase gene family in *glycine max* seed coatsWOA. *Plant Cell* 2009, 21, 3063–3077.
- VICENTE-CARBAJOSA, J., and CARBONERO, P. (2005). Seed maturation: Developing an intrusive phase to accomplish a quiescent state. *Int. J. Dev. Biol.* 49: 645–651
- VIEIRA, B.G.T.L.; BARBOSA, R.M.; TREVISOLI, S.H.U.; MAURO, A.O. di; VIEIRA, R.D. Biochemical alterations in soybean seeds with harvesting time and storage temperature. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, v.11, p.887-891, 2013b.
- WALTERS, C., BALLESTEROS, D; VERTUCCI, V.A. Structural mechanics of seed deterioration: Standing the test of time. *Plant Science. Volume 179, Issue 6*, December 2010, Pages 565-573 <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.06.016>
- WALTERS C, WHEELER LM, GROTENHUIS JM. Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics. *Seed Science Research*. 2005;15(1):1-20. doi:10.1079/SSR2004195
- WANG, L. et al. RNA-seq analyses of multiple meristems of soybean: Novel and alternative transcripts, evolutionary and functional implications. *BMC Plant Biology*, v. 14, n. 1, p. 1–19, 17 jun. 2014a.
- WU, T.; GUO, X.; ZHANG, M.; YANG, L.; LIU, R.; YIN, J. Anthocyanins in black rice, soybean and purple corn increase fecal butyric acid and prevent liver inflammation in high fat diet-induced obese mice. *Food Funct.* 2017, 8, 3178–3186.
- YIN, W. et al. Brassinosteroid-regulated plant growth and development and gene expression in soybean. *Crop Journal*, v. 7, n. 3, p. 411–418, 2019.
- ZENG, A.; CHEN, P.; KORTH, K.L.; PING, J.; THOMAS, J.; WU, C.; SRIVASTAVA, S.; PEREIRA, A.; HANCOCK, F.; BRYE, K.; MA, J. RNA sequencing analysis of salt tolerance in soybean (*Glycine max*). *Genomics*, Volume 111, Issue 4, 2019. Pages 629-635. ISSN 0888-7543. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2018.03.020>.
- ZHOU, Z. et al. Resequencing 302 wild and cultivated accessions identifies genes related to domestication and improvement in soybean. *Nature Biotechnology* 2015 33:4, v. 33, n. 4, p. 408–414, 2 fev. 2015.