



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ENYA MARIA GOIS DE SOUZA

**Caracterização e expressão dos genes da família NAC sobre
estresse hídrico em *Arabidopsis thaliana* e *Glycine max***

Londrina
2024

ENYA MARIA GOIS DE SOUZA

Caracterização e expressão dos genes da família NAC sobre estresse hídrico em *Arabidopsis thaliana* e *Glycine max*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Liliane Marcia Mertz Henning

Londrina
2024

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

De Souza, Enya Maria Gois .

Caracterização e expressão dos genes da família NAC sobre estresse hídrico em *Arabidopsis thaliana* e *Glycine max* / Enya Maria Gois De Souza. - Londrina, 2024.
59 f.

Orientador: Liliane Marcia Mertz Henning .

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2024.

Inclui bibliografia.

1. Melhoramento genético vegetal - Tese. 2. Tolerância a seca - Tese. 3. Genes NAC - Tese. I. Henning , Liliane Marcia Mertz . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 66

ENYA MARIA GOIS DE SOUZA

Caracterização e expressão dos genes da família NAC sobre estresse hídrico em *Arabidopsis thaliana* e *Glycine max*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Liliane Marcia Mertz Henning
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Daniele Sartori
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dra. Larissa Alexandra Cardoso Moraes
Embrapa Soja

Londrina, 08 de Abril de 2024.

Dedico esse trabalho a Deus por sua infinita
Graça que me trouxe a lugares incríveis!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, desejo expressar minha sincera gratidão a Deus pelas oportunidades e por ter realizado meus sonhos. Depois agradeço imensamente a minha orientadora/professora Liliane Henning. Sua orientação sábia, conselhos perspicazes e disponibilidade constante foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Sua expertise na área e seu comprometimento com a minha formação acadêmica foram fontes de inspiração e motivação ao longo de todo o processo.

Não posso deixar de mencionar minha profunda gratidão à toda minha família e amigos, que me suportaram e foram meus apoios durante esse tempo. Seu apoio incondicional, encorajamento constante e compreensão durante os desafios desta jornada foram verdadeiramente inspiradores. Suas palavras de incentivo e gestos de apoio foram um lembrete constante do poder da comunidade e do amor em tempos de dificuldade.

Além disso, gostaria de expressar minha gratidão a todos os colegas de curso e colaboradores acadêmicos que compartilharam seus conhecimentos, experiências e perspectivas ao longo deste percurso. Suas contribuições enriqueceram imensamente minha compreensão do tema e me incentivaram a buscar constantemente a excelência acadêmica. Por último, mas não menos importante, sou profundamente grata a todas as fontes de financiamento e instituições que tornaram possível a realização deste estudo. Seu investimento em minha educação e pesquisa é uma prova do valor que atribuem ao avanço do conhecimento e da inovação em nossa sociedade.

A todos vocês, meu sincero obrigado por fazerem parte deste importante capítulo da minha jornada acadêmica e profissional. Que nossos caminhos continuem a se cruzar em busca de novos horizontes e descobertas.

RESUMO

SOUZA, Enya Maria Gois de. **Caracterização e expressão dos genes da família NAC sobre estresse hídrico em *Arabidopsis thaliana* e *Glycine max*** :2024.58. Dissertação de mestrado em Biotecnologia – Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

A soja, originária do continente asiático, vem cada vez mais ganhando espaço e importância. Atualmente, o Brasil vem se destacando como o principal produtor global de soja, contudo, a cultura enfrenta desafios substanciais associados a estresses bióticos e abióticos, sendo a seca particularmente proeminente. Para mitigar os efeitos adversos da seca, uma abordagem central é a seleção e desenvolvimento de variedades de soja que apresentem maior tolerância à escassez de água. Essa estratégia requer uma compreensão aprofundada dos mecanismos moleculares subjacentes à resposta das plantas ao estresse hídrico. Estudos recentes identificaram fatores de transcrição NAC, como elementos fundamentais na modulação da tolerância ao estresse hídrico e no desenvolvimento das plantas. Tais fatores exercem influência sobre a expressão gênica e os processos fisiológicos que capacitam as plantas a enfrentarem condições adversas de seca. A elucidação desses mecanismos não apenas amplia o entendimento da soja, mas também abre perspectivas promissoras para o avanço de estratégias biotecnológicas direcionadas à criação de variedades de soja mais robustas e adaptadas às condições de estresse hídrico. Os resultados destacam uma regulação diferencial dos genes NAC, sobressaindo-se o aumento significativo na expressão dos genes ANAC 105/NAC 76.2 e ATAF 1/NAC 2.2 na cultivar BR 16, sensível à seca, além de um incremento aproximado de 16,5% na expressão do gene ANAC 40/NAM na cultivar Embrapa 48, reconhecida pela sua tolerância à escassez hídrica. Tais descobertas conferem importantes subsídios para o delineamento de estratégias de melhoramento genético destinadas a aprimorar a tolerância à seca na soja, potencialmente contribuindo para a garantia da segurança alimentar e a sustentabilidade agrícola.

Palavras-chave: Soja; Seca; Tolerância a seca; Genes NAC.

ABSTRACT

SOUZA, Enya Maria Gois de. **Characterization and expression of NAC family genes under drought stress in *Arabidopsis thaliana* and *Glycine max***: 2024.58. Dissertação de mestrado em Biotecnologia – Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

Soybean, originating from the Asian continent, has been increasingly gaining space and importance. Currently, Brazil has been standing out as the leading global producer of soybean, however, the crop faces substantial challenges associated with biotic and abiotic stresses, with drought being particularly prominent. To mitigate the adverse effects of drought, a central approach is the selection and development of soybean varieties that exhibit greater tolerance to water scarcity. This strategy requires a deep understanding of the molecular mechanisms underlying plants' response to water stress. Recent studies have identified NAC transcription factors as key players in modulating tolerance to water stress and plant development. These factors influence gene expression and physiological processes that enable plants to cope with adverse drought conditions. Elucidating these mechanisms not only enhances understanding of soybean but also opens promising prospects for advancing biotechnological strategies aimed at creating more robust soybean varieties adapted to water stress conditions. The results highlight a differential regulation of NAC genes, with a significant increase in the expression of ANAC 105/NAC 76.2 and ATAF 1/NAC 2.2 genes in the BR 16 cultivar, sensitive to drought, as well as an approximate 16.5% increase in the expression of ANAC 40/NAM gene in the Embrapa 48 cultivar, known for its tolerance to water scarcity. Such findings provide important insights for designing genetic improvement strategies aimed at enhancing drought tolerance in soybean, potentially contributing to ensuring food security and agricultural sustainability.

Keyword: Soybean; Drought; Drought tolerance; NAC.

Sumário

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 17 |
| 2.OBJETIVO GERAL | 19 |
| 2.1. OBJETIVO ESPECIFICOS..... | 19 |
| 3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 20 |
| 3.1 Usos e importância econômica da soja..... | 20 |
| 3.2 Impactos econômicos da seca na soja..... | 23 |
| 3.3 Estratégias para mitigação dos efeitos da seca na cultura da soja..... | 25 |
| 3.4 Os genes NAC e sua relação com a seca..... | 27 |
| 4.REFERÊNCIAS..... | 31 |
| Capítulo 1 | 40 |
| Abstract..... | 41 |
| Introduction..... | 42 |
| Materials and Methods | 43 |
| <i>Selection and Characterization of NAC genes</i> | 43 |
| <i>Water Deficit Experiment</i> | 43 |
| <i>RT-qPCR Analysis</i> | 44 |
| Results | 45 |
| <i>Comparative Phylogenetic and Orthologous Analysis of the NAC Gene Family between Arabidopsis thaliana and Glycine max</i> | 45 |
| <i>Phylogenetic Analysis of the NAC Gene Family in Arabidopsis thaliana and Glycine max</i> | 47 |
| <i>Orthology and Conservation of the ATAF1/NAC2 Gene</i> | 47 |
| <i>Orthology and Conservation of the ANAC19/NAC19 Gene</i> | 48 |
| <i>Orthology and Conservation of the ANAC105/NAC76 Gene</i> | 48 |
| <i>Orthology and Conservation of the VOZ2 Gene</i> | 49 |
| <i>Orthology and Conservation of the ANAC30/NAM Gene</i> | 49 |
| <i>Orthology and Conservation of the ANAC92/NAC100 Gene</i> | 49 |
| <i>Orthology and Conservation of the ANAC062 Gene</i> | 50 |
| <i>Orthology and Conservation of the ANAC40/NAM Gene</i> | 50 |
| <i>Comparative Characterization of Promoter Regions of NAC Family Genes in Glycine max and Arabidopsis thaliana</i> | 50 |
| <i>Protein Domain Analyses</i> | 51 |

| | |
|--|----|
| <i>RT-qPCR analyses</i> | 52 |
| Discussion | 54 |
| <i>Orthologous Analysis of the NAC Gene Family in Arabidopsis thaliana and Glycine max</i> | 54 |
| <i>Promoter Regions of NAC genes and the presence of ABRE and DRE motifs</i> | 55 |
| <i>Conservation and Diversity of NAC Protein Domains in Soybean and Arabidopsis</i> .. | 56 |
| <i>Differential Expression of NAC Genes in Soybean Sensible and Tolerant to Drought</i> | 57 |
| Acknowledgments | 58 |
| References | 58 |

1. INTRODUÇÃO

A soja tem origem no continente asiático, mais precisamente no nordeste da China (DE MARIA *et al.*, 2020; MERRIL *et al.*, 1931). No início a soja era uma planta rasteira, e foi a partir da sua evolução natural que se obteve o cruzamento de duas espécies de soja selvagem, dando origem ao seu processo de domesticação por volta do século 11 a.C. (HYMOWITZ, 1970).

Hoje, o Brasil ocupa a posição de maior produtor mundial de soja, com uma área cultivada que ultrapassa 40 milhões de ha e produção estimada de aproximadamente 154 milhões de toneladas (CONAB, 2023). No entanto, a cultura da soja vem sofrendo com perdas devido a ocorrência de estresses tanto abióticos quanto bióticos (BRZEZINSKI *et al.*, 2015). Os estresses bióticos estão relacionados ao ataque de pragas e doenças (SOARES *et al.*, 2019). Já os estresses abióticos, são aqueles que não são causados por seres vivos, estando relacionados a fatores ambientais, como deficiência ou excesso de nutrientes, salinidade, temperaturas extremas como o frio e o calor e os estresses hídricos, que incluem o encharcamento e a seca, sendo a seca o foco do presente trabalho (JIANING *et al.*, 2022; RODRIGUES *et al.*, 2001).

O Brasil é um país de dimensões continentais, com condições climáticas bastante distintas nas suas diferentes regiões. Durante o cultivo da soja é comum a ocorrência de secas ou mesmo, curtos períodos de déficit hídrico, que prejudicam o desempenho da cultura. Estima-se que o Brasil tenha deixado de ganhar U\$ 14,9 bilhões por perdas de produção da cultura de soja na última safra 2022/2023 (EMBRAPA, 2023). Associado a isso, projeções climatológicas futuras indicam o aumento na incidência de fenômenos climáticos extremos como a seca, em função das mudanças climáticas globais (SHUKLA *et al.*, 2019).

Uma das estratégias que podem contribuir para a mitigação da seca na cultura da soja é o desenvolvimento de genótipos tolerantes. Em condição de déficit hídrico as plantas desencadeiam respostas a nível fisiológico e bioquímico, provocando alterações na regulação de diversos genes (MUHAMMAD *et al.*, 2022; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2006; XU *et al.*, 2023). As vias moleculares mais conhecidas de resposta à seca são divididas em duas principais: dependentes do ácido abscísico (ABA) e independentes de ABA (MUHAMMAD, 2022). Em ambas as rotas, a transdução do sinal de percepção do estresse culmina na ativação de fatores

de transcrição, que induzem a expressão de diversos genes de resposta (LU *et al.*, 2023; SHINOZAKI; VISHWAKARMA *et al.*, 2017 YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2006;).

Vários trabalhos identificaram fatores de transcrição (FT) associados à resposta das plantas à seca (ALVES, 2013; CASAGRANDE *et al.*, 2001; LEITE, 2012; MARINHO *et al.*, 2018; NEPOMUCENO *et al.*, 2011). Entre eles, os fatores NAC (NAM, ATAF e CUC) são essenciais na regulação da tolerância ao estresse hídrico, influenciando desde a expressão genética até o desenvolvimento das plantas (NURUZZAMAN *et al.*, 2013, OLIVEIRA, 2022). Compreender melhor esses fatores não apenas contribuiriam para o avanço do conhecimento acerca dos mecanismos moleculares envolvidos na tolerância à seca em plantas, como também, possibilitaria o desenho de estratégias biotecnológicas que podem resultar no desenvolvimento de variedades mais tolerantes

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo é realizar e analisar a identificação dos membros da super família NAC em *Arabidopsis thaliana*, a fim de determinar os candidatos ortólogos mais promissores para potencial utilização na melhoria da tolerância ao déficit hídrico em *Glycine max*. Tal abordagem visa aprimorar tanto a qualidade quanto a produtividade dessa cultura agrícola, por meio da transferência de informações genéticas de um organismo modelo, *A. thaliana*, para uma cultura economicamente importante, *G. max*, visando potencializar sua resistência às adversidades ambientais.

2.1. OBJETIVO ESPECIFICOS

- Realizar uma análise *in silico* para identificar e caracterizar genes candidatos associados à tolerância à seca em uma base de dados genômica;
- Realizar a análise de expressão gênica utilizando a técnica de RT-qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real) para validar os genes candidatos previamente selecionados como responsivos ao estresse hídrico;
- Comparar o genoma de *Arabidopsis* com o genoma de soja para identificar genes ortólogos associados à tolerância à seca, utilizando ferramentas bioinformáticas;
- Localizar e analisar as regiões promotoras dos genes candidatos selecionados, buscando identificar elementos regulatórios associados à resposta ao estresse hídrico;
- Investigar os domínios proteicos dos genes candidatos para entender melhor sua função e possíveis mecanismos de ação durante a resposta ao estresse hídrico.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Usos e importância econômica da soja

A soja (*Glycine max*) é originária do leste da Ásia, mais precisamente das regiões da China e do Japão. Sua domesticação e cultivo remontam a milhares de anos atrás, com relatos que datam de aproximadamente 5.000 a.C. na China e até mesmo antes, segundo evidências arqueológicas. Inicialmente, a soja era cultivada principalmente como uma cultura de uso local, sendo valorizada por suas propriedades nutricionais, tanto na alimentação humana quanto animal (HYMOWITZ, 1983). Ao longo dos séculos, a soja foi se espalhando para outras regiões da Ásia, como Coreia e países do sudeste asiático, tornando-se uma cultura fundamental na agricultura asiática. A planta era apreciada por seus grãos ricos em proteínas e óleo, além de suas propriedades de fixação de nitrogênio, que beneficiavam o solo (BOERMA *et al.*, 2004; HYMOWITZ, 1983).

A expansão da soja para outras partes do mundo ocorreu principalmente durante o século XVIII, quando exploradores e comerciantes europeus levaram a planta para outros continentes, introduzindo-a inicialmente na América do Sul, mais especificamente no Paraguai e no Brasil (BOTTO *et al.*, 2021; HYMOWITZ, 1971). Inicialmente, a soja foi cultivada experimentalmente em pequenas áreas no sul do país, especialmente no estado do Rio Grande do Sul, para testar sua adaptação ao clima e solo brasileiro (DIAS *et al.*, 2023; EMBRAPA, 2019).

Países do ocidente expandiram a produção do grão, sendo o maior destaque os EUA, o qual em 1942 passou a ocupar o primeiro lugar na produção mundial (BONATO; BONATO, 1987). Atualmente, Brasil, EUA e Argentina compõe o ranking mundial da produção de soja (SILVA, 2023). O agronegócio é um importante setor da economia mundial, onde a cultura da soja se insere com destaque. Esta *commodity* apresenta uma estável e consolidada estrutura de mercado, no qual o cultivo da soja encontra-se em expansão em vários territórios no mundo, devido principalmente a geração de novas tecnologias, que permitem maior adaptabilidade em diferentes regiões edafoclimáticas (HIRAKURI; LAZZAROTTO, 2014).

No Brasil, a *commodity* possui uma cadeia produtiva bem estruturada e que desempenha papel fundamental para o avanço e desenvolvimento socioeconômico,

principalmente para o estado de maior produção do grão, o Mato Grosso (EMBRAPA, 2019; LOAYZA, 2023). A safra de 2022/2023 teve uma produção de 153.538,2 milhões de toneladas, em uma área de aproximadamente 43 milhões de hectares (Figura,1), tornando a soja a *commodity* agroindustrial mais produzida e exportada no país. (Figura 1) (CONAB, 2023).

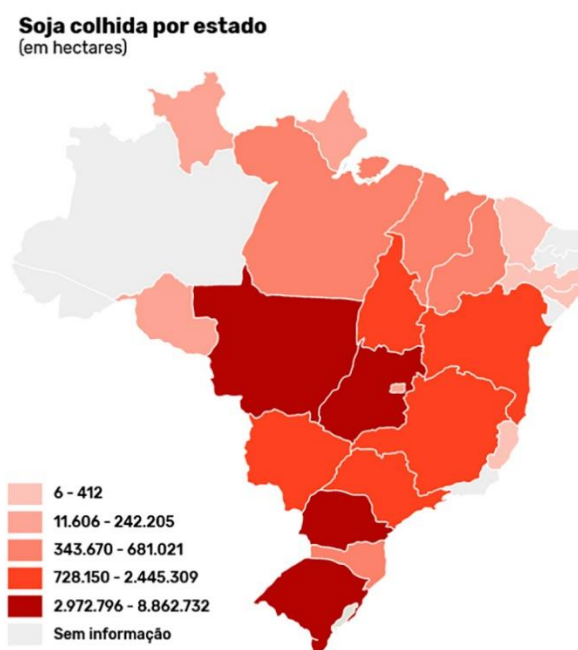


Figura 1: Quantidade de soja colhida (em toneladas) na safra 2022/2023 em cada estado brasileiro. Os tons mais escuros representam os maiores produtores, enquanto os tons mais claros indicam os menores produtores do país (CONAB, 2023).

Grande parte da produção é destinada à alimentação animal, sendo utilizada como fonte de proteína no farelo. Uma parcela também é consumida pela indústria alimentícia humana, especialmente na forma de óleo de soja. Além disso, o país é um dos maiores exportadores mundiais de soja, com destaque para a China e outros países asiáticos como principais destinos. A soja brasileira também é utilizada na produção de biodiesel, contribuindo para o setor de biocombustíveis. Na indústria química brasileira, a soja é matéria-prima para a produção de diversos produtos, como tintas, solventes e lubrificantes (FRANÇA, 2023). Essa versatilidade torna a soja um componente essencial da economia brasileira e global, como vemos na figura 2.

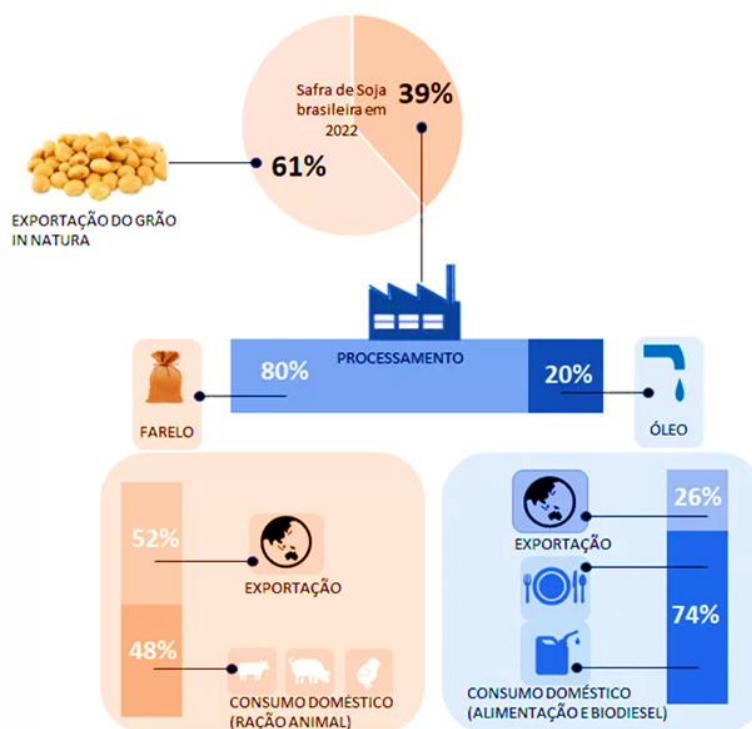


Figura 2: Destino e uso da soja brasileira da safra 2022/2023, onde 61% do grão foi exportado in natura, e outros 39% foi para o processamento, desses 80% foram para a produção de farelo que auxilia outras cadeias produtivas e os 20% para a fabricação de óleo.

Na safra 2022/2023, a soja produzida no Brasil é amplamente utilizada e destinada a diferentes fins. Principalmente, é exportada para países como China e União Europeia, onde é processada para a produção de óleo e farelo de soja. Além disso, uma parte significativa é direcionada à alimentação animal, como ração para aves, suínos e bovinos, fornecendo uma fonte importante de proteína na dieta desses animais. Outra aplicação relevante é na indústria de óleo vegetal, onde a soja é uma fonte essencial para a produção de produtos como óleo de cozinha, margarina e maionese. Uma fração da produção é utilizada na fabricação de biodiesel, contribuindo para os biocombustíveis e a sustentabilidade energética. Por fim, em menor escala, parte da soja é destinada ao consumo humano, sendo utilizada na produção de alimentos como óleo de soja, tofu e leite de soja. Esses diferentes usos destacam a importância e versatilidade da soja brasileira nos mercados nacional e internacional (LU *et al.*, 2023; SAKAI; KOGISO, 2008).

O grão de soja é consumido *in natura* ou processado. Em países orientais o consumo *in natura* é muito apreciado, porém, a forma processada é a mais utilizada

mundialmente, dando origem a diversos produtos como leite de soja, molho shoyo, tofu entre outros. O farelo e o óleo são produtos que recebem destaque. O óleo de soja é muito utilizado na produção de margarina, óleo comestível, e também empregado para o setor industrial, sendo usado como matéria-prima na produção de vários produtos como: sabonetes, tintas, vernizes, biodiesel entre outros. O farelo é utilizado na alimentação animal, sendo a principal fonte de proteína vegetal na composição de rações, principalmente para a aves, suínos, peixes e bovinos (MELLO; BRUM, 2020).

O ciclo da soja no sul do país estende-se do início da primavera até o final do verão. Durante este período a soja está sujeita à diversos fatores naturais, que alteraram o crescimento e desenvolvimento, e conseqüentemente, o ciclo da planta. Apesar de, atualmente, o Brasil se destacar como maior produtor de soja, do mundo tem sido registrada perdas devido aos fatores climáticos adversos como seca, pois são determinantes para o rendimento da cultura, uma vez que diretamente sobre o crescimento e a floração. (PEIXOTO; SILVA, 2023).

3.2 Impactos econômicos da seca na soja

A soja, uma cultura agrícola amplamente cultivada em diferentes partes do mundo, é extremamente sensível à escassez de água, o que afeta sua produção de maneira significativa. A falta de água durante o ciclo de crescimento da soja resulta em estresse hídrico, impactando negativamente seu crescimento, desenvolvimento, produtividade e qualidade dos grãos (FAROOQ *et al.*, 2012).

A disponibilidade limitada de água no solo reduz a capacidade das raízes em absorver água e nutrientes essenciais, o que leva a um crescimento mais lento das plantas. As folhas da soja também podem apresentar redução em seu tamanho e área foliar devido à seca, afetando a capacidade da planta de realizar a fotossíntese e, conseqüentemente, a produção de carboidratos (SOUZA, 2023). Além disso, a seca interfere no desenvolvimento reprodutivo da soja. A floração da planta pode ser comprometida, levando à queda de flores e à formação inadequada de vagens. Mesmo que as vagens se formem, a falta de água pode resultar na redução do número

de grãos por vagem e afetar o enchimento dos grãos, diminuindo a produção total de grãos por hectare (FAROOQ *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2018; SILVA, 2023).

O estresse hídrico também desencadeia respostas fisiológicas nas plantas de soja. Para conservar água, as plantas fecham os estômatos, diminuindo a transpiração, mas limitando a absorção de dióxido de carbono necessário para a fotossíntese (DA SILVA, 2021). Isso afeta o metabolismo da planta, podendo comprometer ainda mais seu crescimento e desenvolvimento (BASSO, 2022; FAROOQ *et al.*, 2012).

Os fatores climáticos são determinantes para o sucesso das lavouras, climas adversos resultam em perdas de produção e qualidade. Entre as condições ambientais adversas, a seca é a que mais interfere na produção de soja, causando perdas de até 80% (FARIAS *et al.*, 2011). Dados coletados entre as safras de 1976/77 a 2013/14, mostraram que aproximadamente US\$ 79,62 bilhões foram perdidos na produção do grão devido a eventos de seca (FERREIRA, 2016). Porém apenas na última safra houve uma perda de 14,9 bilhões de dólares, em comparação aos últimos anos, mostra o quanto a seca vem crescendo e se intensificando (EMBRAPA, 2023).

A perda econômica para a soja nos últimos anos, gerada por fatores bióticos e abióticos totalizou R\$ 19,3 bilhões, podendo ser ressaltado as expressivas perdas nas safras 2015/2016 e 2019/2020, e a perda moderada na safra de 2018/2019 (HIRAKURI, 2021). Devido a estas adversidades, os estados do sul do Brasil alcançaram uma perda de quase 5 milhões de toneladas do grão, resultado em um prejuízo de US\$ 8 bilhões (KIST *et al.*, 2021). O Paraná que é o segundo maior estado produtor do grão, apresentou recordes de perdas na safra de 2021/2022, tendo a lavoura prejudicada pela falta de chuvas e altas temperaturas, entre janeiro e fevereiro, período importante para desenvolvimento da soja (CONAB, 2023; SEAB, 2021).

A seca é um problema global, a qual tem origem atribuída ao aumento da concentração de gases do efeito estufa na atmosfera, o que resulta no aumento da temperatura média global, e consequentemente em mudanças climáticas por todo o planeta (LUCON *et al.*, 2022). Sendo assim, a expectativa é que para os próximos anos ocorra uma expansão com agravamento do déficit hídrico em áreas que atualmente sofrem com as secas (ASSAD; PINTO, 2008; FARIAS, 2011; JAGGARD *et al.*, 2010).

A capacidade vegetal de tolerar condições ambientais adversas envolve a participação de diversos mecanismos de defesa, que vão desde o nível molecular e celular, até respostas fisiológicas da planta como um todo (FANG; XIONG, 2014). Assim, estratégias que visem diminuir os prejuízos decorrentes do déficit hídrico são relevantes para garantir a estabilidade produtiva.

3.3 Estratégias para mitigação dos efeitos da seca na cultura da soja

A produção agrícola enfrenta desafios significativos devido à frequente ocorrência de secas, afetando culturas como a soja (MATOCHECK *et al.*, 2023). Para diminuir esses impactos, várias estratégias têm sido adotadas. O desenvolvimento de variedades de soja mais tolerantes à seca por meio do melhoramento genético é uma delas. Além disso, técnicas de manejo da água, e práticas que conservam a umidade do solo, desempenham um papel crucial na redução dos efeitos da seca (ZANDALINAS *et al.*, 2016).

Estratégias como o zoneamento climático é uma ferramenta importante para o planejamento ao dividir uma região em diferentes zonas climáticas, os planejadores podem tomar decisões mais informadas sobre quais culturas são mais adequadas para o cultivo em determinadas áreas, quais práticas de conservação são mais eficazes em cada zona. Quando se trata de tolerância à seca, o zoneamento climático desempenha um papel crucial ao identificar áreas que são naturalmente mais propensas a secas frequentes ou prolongadas. Com essa informação, medidas de adaptação e mitigação podem ser implementadas para ajudar as comunidades a lidar com os desafios associados à escassez de água e à seca.

Outra estratégia é o plantio direto e a rotação de culturas que são adotadas para conservar o solo, melhorar sua estrutura e capacidade de reter água (REGINATTO *et al.*, 2023). O uso de bioestimulantes e condicionadores do solo auxilia no desenvolvimento das plantas, aumentando sua resistência à seca (BEGUELINE *et al.*, 2021). O manejo nutricional adequado também é essencial para fortalecer as plantas e prepará-las para enfrentar condições de estresse hídrico (RENGASAMY, 2010).

A previsão meteorológica e o monitoramento climático ajudam os agricultores a se antecipar em períodos de seca, com medidas como ajuste do manejo da cultura

conforme necessário (BEZERRA *et al.*, 2022). Estratégias de plantio e escolha das épocas de semeadura são cuidadosamente consideradas para minimizar os impactos da seca. Educação agrícola e treinamento sobre práticas sustentáveis também são fundamentais para capacitar os agricultores a lidar com a seca de maneira eficaz. A diversificação de culturas, envolvendo rotação de culturas e sistemas agrícolas, pode oferecer estabilidade ao sistema agrícola diante de condições climáticas imprevisíveis, incluindo períodos de seca (TOLFO *et al.*, 2022). A combinação dessas estratégias junto a genética desempenha um papel crucial na tolerância à seca, garantindo uma produção mais sustentável e adaptada às condições climáticas variáveis, como tolerância à seca em plantas (PRETTY *et al.*, 2006).

Os avanços na genética permitem identificar e estudar genes específicos envolvidos na resposta das plantas à seca. Esses genes desempenham um papel fundamental na ativação de vias metabólicas, regulação hormonal, controle do fechamento dos estômatos e na síntese de proteínas ou moléculas que protegem as células vegetais durante períodos de escassez de água (NAKASHIMA *et al.*, 2014; SANTILIANO *et al.*, 2023).

Por meio de técnicas como a seleção genômica e o melhoramento genético, é possível identificar e incorporar genes associados à tolerância à seca em variedades de plantas de interesse agrônômico. Isso permite o desenvolvimento de plantas mais tolerantes, capazes de manter um bom desempenho e produtividade mesmo sob condições de estresse hídrico (MELO *et al.*, 2022; RIBAUT; RAGOT, 2006). Além disso, o melhoramento oferece a oportunidade de compreender as interações complexas entre os diferentes genes e fatores ambientais que influenciam a resposta das plantas à seca. Essa compreensão mais profunda dos mecanismos genéticos subjacentes à tolerância à seca possibilita estratégias mais direcionadas e eficazes no desenvolvimento de cultivos mais resilientes a essas condições adversas (NAKASHIMA *et al.*, 2014).

A transgenia revolucionou a agricultura, oferecendo soluções inovadoras para aprimorar características de interesse agrícola em diversas culturas. Essa tecnologia permite a introdução de genes de maneira precisa, impulsionando o desenvolvimento de plantas mais adaptadas a condições adversas (OLIVEIRA *et al.*, 2020). Através da transgenia, genes de resistência à seca de outras espécies podem ser inseridos na soja, conferindo-lhe características de tolerância à escassez de água (RAUF *et al.*, 2016).

3.4 Os genes NAC e sua relação com a seca

A família de genes NAC compreende fatores de transcrição presentes em plantas. Os fatores de transcrição são proteínas vitais que coordenam a expressão gênica atuando na transcrição do DNA em RNA mensageiro (mRNA) (MOHANTA *et al.*, 2020). Sua função primordial reside na regulação da atividade dos genes, controlando o momento, local e quantidade em que os genes são ativados dentro das células ou organismos (TAN: WILKINSON, 2022). Esses genes específicos da família NAC exercem um papel significativo na governança do desenvolvimento vegetal, na resposta a condições de estresse e na modulação do crescimento das plantas (SAIMI *et al.*, 2023).

A sigla "NAC" é derivada dos primeiros genes identificados na família de fatores de transcrição: NAM (No Apical Meristema), ATAF1/2 (Transcription activator factor in Arabidopsis 1 and 2) e CUC2 (Cup Shaped Cotyledon). O gene NAM (No Apical Meristem), está associado ao desenvolvimento das plantas, mais especificamente ao crescimento do meristema apical, envolvidos em vários processos de desenvolvimento, incluindo resposta ao estresse, regulação do crescimento e desenvolvimento de órgãos. Eles são altamente conservados e desempenham funções essenciais em várias etapas do ciclo de vida das plantas. Foi o primeiro a ser identificado, encontrado inicialmente em *Arabidopsis thaliana*, uma planta modelo usada frequentemente em pesquisas botânicas (XU, 2023).

Posteriormente, os genes ATAF1 e ATAF2 foram descobertos como membros dessa mesma família, reconhecidos por seu papel como ativadores de transcriptase em *Arabidopsis*. Os fatores de transcrição ATAF têm sido implicados em uma variedade de processos biológicos em plantas, incluindo regulação do desenvolvimento, resposta ao estresse e defesa contra patógenos. Eles desempenham papéis importantes na regulação da expressão gênica em resposta a vários estímulos ambientais, como estresse hídrico, salinidade, temperatura e patógenos, entender como as plantas respondem ao estresse ambiental pode ajudar a desenvolver culturas mais tolerantes e adaptadas a condições adversas (ROSSI, 2022).

Por fim, o gene CUC2 foi o terceiro a ser identificado nessa família de fatores de transcrição, atribuído pelo seu envolvimento no controle do desenvolvimento do meristema e na formação de estruturas florais em plantas. O gene significa "Cup-shaped Cotyledon 2" (cotilédon em formato de copo 2) (FERREIRA, 2021).

O gene CUC2 desempenha um papel crucial no desenvolvimento da planta, especialmente na formação de órgãos, como cotilédones e folhas. Ele regula a morfogênese dos órgãos durante a embriogênese e o desenvolvimento pós-embriogênico, influenciando a diferenciação celular e o padrão de crescimento. Além disso, o gene CUC2 também está envolvido na regulação do meristema apical, que é responsável pelo crescimento e desenvolvimento contínuos da planta. Mutantes do gene CUC2 em *Arabidopsis* exibem características fenotípicas anormais, como cotilédones em formato de copo e folhas irregulares, o que destaca a importância desse gene para o desenvolvimento normal das plantas. A descoberta desses genes pioneiros na família NAC desempenhou um papel crucial na compreensão inicial das funções e características dos fatores de transcrição presentes nessas plantas (LI *et al.*, 2021).

Os genes pertencentes à família NAC são responsáveis pela codificação de fatores de transcrição que apresentam uma estrutura molecular altamente conservada. Essa estrutura é caracterizada por um domínio altamente preservado localizado na região N-terminal, conhecido como domínio NAC, e por uma região C-terminal variável, que desempenha um papel crucial na determinação das características funcionais específicas do gene. A região N-terminal, em geral, está associada à capacidade de ligação ao DNA e interações entre proteínas, enquanto a região C-terminal é notável por sua variabilidade estrutural, conferindo especificidade funcional aos fatores de transcrição (PODZIMSKA-SROKA *et al.*, 2015; TRAN *et al.*, 2007).

Na figura 3 se tem um esquema em nível molecular de como os genes da família NAC são desencadeados após a planta receber um sinal de estresses desempenham funções cruciais na ativação de respostas adaptativas para lidar com essa condição desafiadora. Eles operam regulando a expressão gênica, tanto ativando quanto reprimindo genes envolvidos na resposta ao estresse hídrico. Além disso, os genes NAC podem iniciar vias de sinalização que levam à produção de hormônios do estresse, como o ácido abscísico, que é fundamental para induzir respostas adaptativas, como o fechamento dos estômatos para reduzir a perda de

água. Eles também influenciam nas características morfológicas e fisiológicas, como o crescimento de raízes mais profundas e a acumulação de solutos osmoprotetores. Além disso, os genes NAC podem regular a expressão de enzimas antioxidantes, protegendo a planta contra danos oxidativos associados ao estresse hídrico. Em conjunto, esses mecanismos coordenados pelos genes NAC ajudam as plantas a enfrentar e superar o estresse hídrico, mantendo sua sobrevivência e adaptação em condições ambientais adversas (DAVID, 2023).

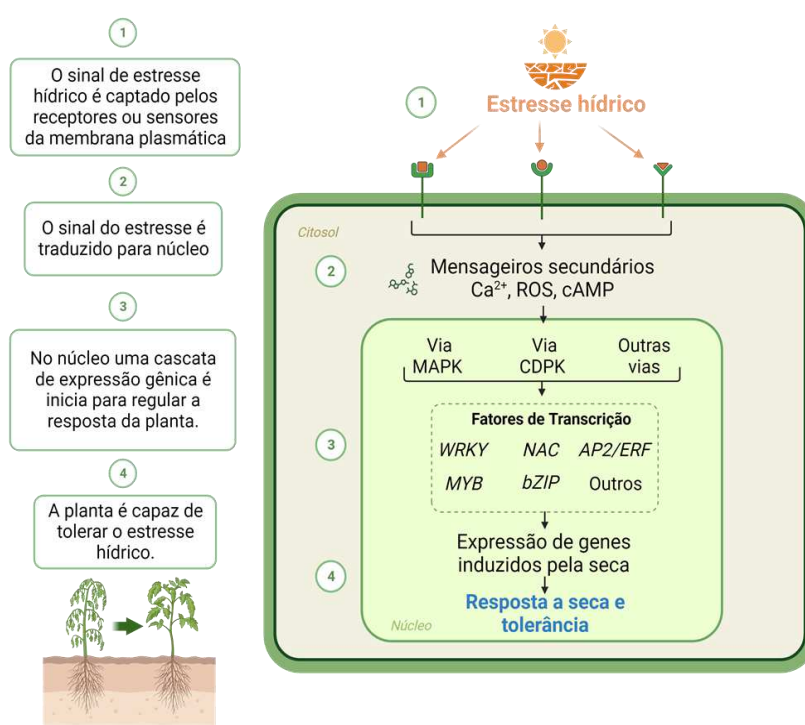


Figura 3: Esquema ilustrativo destacando o papel dos genes da família NAC (NAM, ATAF e CUC) na resposta das plantas a estresses ambientais. Quando exposta a estresses, a planta ativa os genes da como parte de sua resposta adaptativa, onde 1 o sinal de estresses é captado, 2 o sinal vai ser traduzido para o núcleo com auxílio de mensageiros secundários, 3 no núcleo vai liberar uma serie de fatores de transcrição entre eles os genes da família NAC, e 4 a planta assim consegue tolerar mais o estresse.

Os genes pertencentes à família NAC exercem um papel crucial no desenvolvimento morfológico das plantas, impactando diretamente a formação e crescimento de estruturas como raízes, folhas, flores e frutos. Além disso, desempenham um papel fundamental na regulação do crescimento de diferentes órgãos e na criação dos vasos condutores, contribuindo assim para a arquitetura e o

desenvolvimento saudável das plantas. Adicionalmente, esses fatores de transcrição desempenham um papel significativo na defesa contra patógenos ao regular a expressão de genes que conferem resistência a doenças, desempenhando um papel crucial na resposta das plantas a estresses bióticos (LIU *et al.*, 2018). No contexto da resposta ao estresse, os genes NAC têm uma influência significativa na adaptação das plantas a estresses abióticos, tais como seca, salinidade, temperaturas extremas e escassez de nutrientes. Eles modulam a expressão de genes associados à tolerância a esses estresses, conferindo às plantas a capacidade de enfrentar condições adversas (LI *et al.*, 2018).

Os genes da família NAC, desempenham um papel crucial na resposta das plantas ao déficit hídrico. Esses genes exercem controle direto sobre a expressão de vários genes envolvidos na adaptação das plantas às condições de escassez de água. Através de sua ação reguladora, os genes NAC influenciam a expressão de genes associados a funções vitais durante a seca, como enzimas antioxidantes e proteínas de sinalização, permitindo assim uma resposta adaptativa. Em períodos de seca, os fatores de transcrição NAC também desempenham um papel na ativação de vias de sinalização intracelular, incluindo as vias mediadas por fitormônios como o ácido abscísico (ABA), um importante mediador da resposta ao estresse hídrico (SILVA, 2021). Essa ativação promove uma reorganização genética que favorece a sobrevivência das plantas em condições de escassez de água (HU *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2013).

O ABA é reconhecido como um dos principais fitormônios envolvidos na modulação do crescimento e desenvolvimento das plantas, especialmente diante de situações de estresse ambiental, como a seca (OLIVEIRA, 2022). Esses genes dependentes de ABA têm sua atividade gênica controlada em resposta aos níveis de ácido abscísico no organismo vegetal. Por outro lado, os genes independentes de ABA não são diretamente regulados pela presença ou ausência desse hormônio, sendo ativados ou inibidos por outros sinais ou estímulos ambientais não relacionados aos níveis de ABA na planta (CUTLER *et al.*, 2010; VISHWARKARMA *et al.*, 2017).

Em situações de escassez de água, os níveis de ácido abscísico aumentam, estimulando tanto os genes dependentes quanto os independentes de ABA. Esse aumento de ABA desencadeia respostas adaptativas que auxiliam as plantas a enfrentar e sobreviver em condições de estresse hídrico, permitindo uma melhor adaptação e sobrevivência diante da falta de água (VISHWAKARMA *et al.*, 2017).

Outro ponto relevante é a influência dos genes NAC no desenvolvimento de estruturas adaptativas, como o crescimento de raízes mais profundas e densas, o que aumenta a capacidade das plantas de explorar uma área maior do solo em busca de água e nutrientes. Os fatores de transcrição NAC desempenham um papel significativo na regulação da tolerância à desidratação, contribuindo para a manutenção da integridade das membranas celulares e, conseqüentemente, para a sobrevivência das plantas em condições de estresse hídrico (CHEN *et al.*, 2015; NAKASHIMA *et al.*, 2009; NURUZZAMAN *et al.*, 2013; SANTILIANO *et al.*, 2023).

Em síntese, os genes pertencentes à família NAC desempenham um papel crucial e diversificado na adaptação das plantas à seca. Eles coordenam uma ampla gama de respostas moleculares, bioquímicas e fisiológicas, conferindo às plantas a capacidade não apenas de sobreviver, mas também de se recuperar diante de condições desfavoráveis de escassez de água. Compreender detalhadamente esses mecanismos pode ser de grande importância para o desenvolvimento de estratégias voltadas ao cultivo de plantas mais resilientes à seca, o que, por sua vez, pode contribuir significativamente para garantir a segurança alimentar em áreas afetadas por condições ambientais adversas.

4. REFERÊNCIAS

ALVES, M. S. Caracterização bioquímica e funcional de fatores de transcrição envolvidos na resposta a estresses biótico e abiótico em soja. 2013. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2013.

ASSAD, Eduardo D.; PINTO, H. Silveira. Aquecimento global e cenários futuros da agricultura brasileira. **São Paulo: Embrapa/Unicamp**, 2008.

BASSO, Claudir José; PINTO, Marlo Adriano Bison. DESSECAÇÃO E ANTECIPAÇÃO NA COLHEITA DA SOJA: IMPACTO SOBRE A PRODUTIVIDADE E A QUALIDADE FISIOLÓGICA DA SEMENTE. **Tecnologias Aplicadas para o Manejo Rentável e Eficiente da Cultura da Soja**, p. 215, 2022.

BEGUELINE, Maria Clara Lelles Moreira. Fertilizantes com bioestimulantes no crescimento de grama Esmeralda sob duas condições de déficit hídrico. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2021.

BEZERRA, Filomena Nádia Rodrigues. Avaliação da agricultura de baixa emissão de carbono e inteligente ao clima no Brasil. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2022.

BOERMA, H. Roger et al. Soybeans: improvement, production and uses. **American Society of Agronomy**, 2004.

BONATO, Emidio Rizzo; BONATO, Ana Lidia Variani. A soja no Brasil: história e estatística. 1987.

BOTTO, Ruth Olivier Moreira Manus. A (re) internacionalização do direito do trabalho através do comércio externo. 2021.

BRZEZINSKI, C.R.; HENNING, A.A.; ABATI, J.; HENNING, F.A.; FRANÇA-NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; ZUCARELI, C. Tempos de tratamento de sementes no estabelecimento e desempenho produtivo da cultura da soja. **Journal of Seed Science**, v.37, n.2, p.147-153, 2015.

CASAGRANDE, ELAINE CRISTINA *et al.* Expressão gênica diferencial durante déficit hídrico em soja. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2, p. 168-184, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0103-31312001000200006>. Acesso em: 18 fev. 2024.

CHEN, Xu *et al.* OsNAC2 encoding a NAC transcription factor that affects plant height through mediating the gibberellic acid pathway in rice. **The Plant Journal**, v. 82, n. 2, p. 302-314, abr. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/tbj.12819>. Acesso em: 18 fev. 2024.

CONAB-Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em:<<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>>. Acessado em: 14 jan. 2023.

CUTLER, Sean R. *et al.* Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 651-679, 2 jun. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112122>. Acesso em: 18 fev. 2024.

De Maria, M., Robinson, E. J. Z., Kangile, J. R., Kadigi, R., Dreoni, I., Couto, M., Howai, N., Peci, J., Fiennes, S. (2020): *Global Soybean Trade. The Geopolitics of a Bean*. UK Research and Innovation Global Challenges Research Fund (UKRI GCRF) Trade, Development and the Environment Hub. DOI: <https://doi.org/10.34892/7yn1-k494>.

DAVID, Grace Queiroz. Mecanismos de biocontrole e promoção de crescimento de cepas de Trichoderma na cultura da soja. 2023.

DIAS, Gustavo Francesco de Moraes et al. Agro não é tudo: a expansão da monocultura da soja sobre os territórios quilombolas na Amazônia Oriental. 2023.

Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/soja-transgenica>>. Acesso em: 14 de Dez de 2023.

Embrapa Soja. (2019). Soja: do plantio à colheita. Londrina: Embrapa Soja. Disponível em:<<https://www.embrapa.br/soja/publicacoes>>

FAHAD, Shah et al. Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review. **Plant Growth Regulation**, v. 75, n. 2, p. 391-404, 24 dez. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10725-014-0013-y>. Acesso em: 18 fev. 2024.

FANG, Yujie; XIONG, Lizhong. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 72, n. 4, p. 673-689, 22 out. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1767-0>. Acesso em: 18 fev. 2024.

FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N. Ecofisiologia da Soja. **Circular Técnica**, Embrapa, p. 1-9, 2011.

FAROOQ, M. et al. Drought stress in plants: an overview. *Plant responses to drought stress: From morphological to molecular features*, p. 1-33, 2012.

FERREIRA, Rodrigo Cornacini. **Quantificação das perdas por seca na cultura da soja no Brasil**. 2016. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia, [s. l.], 2016. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.uel.br/document/?code=vtls000211814>. Acesso em: 18 fev. 2024.

FERREIRA, Pedro Boscarol. SCII e NtCDKG; 2 atuam no ciclo celular, no processamento de RNAs e no desenvolvimento floral em *Nicotiana tabacum*. 2021. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

FRANÇA, Fabio Christino. Avaliação econômica de uma usina de biodiesel sob a égide do programa RenovaBio: estudo de caso focado na substituição de óleo de soja por sebo bovino. 2023. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

FUJITA, Yasunari *et al.* ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. **Journal of Plant Research**, v. 124, n. 4, p. 509-525, 18 mar. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10265-011-0412-3>. Acesso em: 18 fev. 2024.

HIRAKURI, M. H. Perdas econômicas geradas por estresses bióticos e abióticos na produção brasileira de soja no período 2016-2020. **Embrapa Soja-Circular Técnica** (INFOTECA-E), 2021.

HIRAKURI, M. H.; LAZZAROTTO, J. J. O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro. **Embrapa Soja-Documentos** (INFOTECA-E), 2014.

HU, Wei et al. Genome-Wide Identification and Expression Analysis of the NAC Transcription Factor Family in Cassava. *PLOS ONE*, v. 10, n. 8, p. e0136993, 28 ago. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136993>. Acesso em: 18 fev. 2024.

HYMOWITZ, T.; HARLAN, J. R. Introduction of soybean to North America by Samuel Bowen in 1765. *Economic Botany*, v. 37, n. 4, p. 371-379, out. 1983. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/bf02904196>. Acesso em: 18 fev. 2024.

HYMOWITZ, T. Collection and evaluation of tropical and subtropical Brazilian legumes, *Tropical Agriculture*, v.48, n.4, p.309-315, 1971.

HYMOWITZ, T. On the domestication of the soybean. **Economic Botany**, v. 24, n. 4, p. 408-421, out. 1970. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/bf02860745>. Acesso em: 18 fev. 2024.

JAGGARD, Keith W.; QI, Aiming; OBER, Eric S. Possible changes to arable crop yields by 2050. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1554, p. 2835-2851, 27 set. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0153>. Acesso em: 18 fev. 2024.

JIANING, Guan *et al.* Improvement of heat stress tolerance in soybean (*Glycine max L.*), by using conventional and molecular tools. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 26 set. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.993189>. Acesso em: 18 fev. 2024.

JICA –Japan International Cooperation Agency. Disponível em: <<http://www.jica.go.jp/brazil/portuguese/office/articles/110223.html>> Acesso em: 14 jan. 2023.

KAUR, G.; ASTHIR, B. Molecular responses to drought stress in plants. **Biologia plantarum**, v. 61, n. 2, p. 201-209, 1 jun. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10535-016-0700-9>. Acesso em: 18 fev. 2024.

KIST, B. B. et al. Anuário brasileiro da soja 2021. Santa Cruz do sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2021. Disponível em: https://www.editoragazeta.com.br/sitewp/wp-content/uploads/2021/11/SOJA_2021-1.pdf. Acesso em: 14 jan. 2023.

LEITE, Juliana Paula [UNESP]. **Obtenção de plantas transgênicas de soja com a forma constitutiva do fator de transcrição AREB1**. 2012. Universidade Estadual Paulista (UNESP), [s. l.], 2012. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/92642>. Acesso em: 18 fev. 2024.

LI, Jian-Feng *et al.* Multiplex and homologous recombination–mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 688-691, ago. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nbt.2654>. Acesso em: 18 fev. 2024.

LI, Lin *et al.* Two soybean bHLH factors regulate response to iron deficiency. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 60, n. 7, p. 608-622, 5 jun. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jipb.12651>. Acesso em: 18 fev. 2024.

LI, Wenhui *et al.* Genome-wide identification and comprehensive analysis of the NAC transcription factor family in sunflower during salt and drought stress. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 6 out. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98107-4>. Acesso em: 18 fev. 2024.

LIU, Xingwang *et al.* Comprehensive analysis of NAC transcription factors and their expression during fruit spine development in cucumber (*Cucumis sativus L.*). **Horticulture Research**, v. 5, n. 1, 1 jun. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41438-018-0036-z>. Acesso em: 18 fev. 2024.

LOAYZA, Ana Cecília Vasconcelos et al. Evolução dos indicadores da produção de soja no Matopiba. **OBSERVATÓRIO DE LA ECONOMÍA LATINOAMERICANA**, v. 21, n. 12, p. 27824-27845, 2023..

LU, Jinting *et al.* Effect of germination on nutritional quality of soybean. **Food Science and Technology**, v. 43, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/fst.008323>. Acesso em: 18 fev. 2024.

LUCON, Oswaldo. Mudanças Climáticas: Roteiro de Estudos. 2022.

MARINHO, J. P. **Caracterização molecular, metabólica, fisiológica e agrônômica de plantas de soja geneticamente modificadas com os fatores de transcrição GmDREB2AFL e GmDREB2ACA sob condição de déficit hídrico.** 2018.

MAZOYER, M.; ROUDART, L. **História das agriculturas do mundo: do neolítico à crise contemporânea.** São Paulo: Editora UNESP; Brasília: NEAD, 2010.

MATTOCHECK, Túlio Augusto. Comportamento de *Dalbulus maidis* e *Spodoptera frugiperda* na cultura do milho associado ou não a pulverização de inseticidas+ enxofre e verificação da ocorrência do complexo de enfezamento. 2023.

MELLO, Eliane Spacil de; BRUM, Argemiro Luís. A CADEIA PRODUTIVA DA SOJA E ALGUNS REFLEXOS NO DESENVOLVIMENTO REGIONAL DO RIO GRANDE DO SUL / THE SOYBEAN PRODUCTIVE CHAIN AND SOME REFLECTIONS IN THE REGIONAL DEVELOPMENT OF RIO GRANDE DO SUL. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 74734-74750, 2020.

Disponível em: <https://doi.org/10.34117/bjdv6n10-049>. Acesso em: 18 fev. 2024.

MELO, Thais Stradioto *et al.* DÉFICIT HÍDRICO E RECUPERAÇÃO PÓS-ESTRESSE DO METABOLISMO FISIOLÓGICO EM ARROZ-EVIDÊNCIA DO EFEITO PRIMING. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 9, n. 1, p. 91-107, 2022.

MERRILL, E. D. **A Fitogeografia de Plantas Cultivadas em Relação aos Supostos Contatos Eurasiano-Americanos Pré-colombianos.** *American Anthropologist*, v. 33, n. 3, p. 375-382, 1931.

MOHANTA, Tapan Kumar *et al.* Genomics, molecular and evolutionary perspective of NAC transcription factors. **PLOS ONE**, v. 15, n. 4, p. e0231425, 10 abr. 2020.

Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231425>. Acesso em: 18 fev. 2024.

MORRAN, Sarah *et al.* Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of DREB/CBF factors. **Plant Biotechnology Journal**, v. 9, n. 2, p. 230-249, 6 jan. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00547.x>. Acesso em: 18 fev. 2024

MUHAMMAD ASLAM, Mehtab *et al.* Mechanisms of Abscisic Acid-Mediated Drought Stress Responses in Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1084, 19 jan. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms23031084>. Acesso em: 18 fev. 2024.

NAKASHIMA, Kazuo; ITO, Yusuke; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, Kazuko. Transcriptional Regulatory Networks in Response to Abiotic Stresses in *Arabidopsis* and Grasses: Figure

1. **Plant Physiology**, v. 149, n. 1, p. 88-95, jan. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.108.129791>. Acesso em: 18 fev. 2024.

NAKASHIMA, Kazuo; SUENAGA, Kazuhiro. Toward the Genetic Improvement of Drought Tolerance in Crops. **Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ**, v. 51, n. 1, p. 1-10, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.6090/jarq.51.1>. Acesso em: 18 fev. 2024.

NAKASHIMA, Kazuo; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, Kazuko; SHINOZAKI, Kazuo. The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, 16 maio 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00170>. Acesso em: 18 fev. 2024.

LIMA NEPOMUCENO, Alexandre; FUGANTI, Renata; KANAMORI, Norihito, *et al.*, ESTRATÉGIAS DE ENGENHARIA GENÉTICA PARA TOLERÂNCIA À SECA EM PLANTAS ATRAVÉS DA EXPRESSÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO. **Simpósio sobre Tolerância à Deficiência Hídrica em Plantas**, p. 103 - 109, 2011.

NURUZZAMAN, Mohammed; SHARONI, Akhter M.; KIKUCHI, Shoshi. Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00248>. Acesso em: 18 fev. 2024.

OLIVEIRA, Álvaro Sérgio de. Biodiversidade venômica e suas aplicações na agricultura. 2020. Tese (Doutorado em Agricultura Sustentável) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2020.

OLIVEIRA, Guilherme Henrique Moss Barreto Corrêa de. Prospecção de genes e moléculas visando a resistência a *Pseudocercospora musae* e tolerância ao déficit hídrico em *Musa* spp. 2022. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2022.

PEIXOTO, N.; DA SILVA BERTI, M. P. LEGUMINOSAS: fontes seguras de proteína vegetal. **Editora CRV**, 2023.

PODZIMSKA-SROKA, Dagmara *et al.* NAC Transcription Factors in Senescence: From Molecular Structure to Function in Crops. **Plants**, v. 4, n. 3, p. 412-448, 13 jul. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants4030412>. Acesso em: 18 fev. 2024.

PRETTY, J. N. *et al.* Resource-Conserving Agriculture Increases Yields in Developing Countries. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 4, p. 1114-1119, fev. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/es051670d>. Acesso em: 18 fev. 2024.

RAUF, Saeed *et al.* **Advances in Plant Breeding Strategies: Agronomic, Abiotic and Biotic Stress Traits**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 397-445. ISBN 9783319225173. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-319-22518-0_11. Acesso em: 18 fev. 2024.

REGINATTO, Maicon *et al.* Sistema plantio direto orgânico: rotações de cultura e controle mecânico de plantas espontâneas no sudoeste do Paraná. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel,

2023.

RENGASAMY, Pichu. Soil processes affecting crop production in salt-affected soils. **Functional Plant Biology**, v. 37, n. 7, p. 613, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/fp09249>. Acesso em: 18 fev. 2024.

RIBAUT, J. M.; RAGOT, M. Marker-assisted selection to improve drought adaptation in maize: the backcross approach, perspectives, limitations, and alternatives. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 2, p. 351-360, 6 nov. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jxb/erl214>. Acesso em: 18 fev. 2024.

RODRIGUES, O. et al. **Quantitative response of soybean flowering to temperature and photoperiod**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 3, n. 36, p. 431-437, 2001.

ROSNAY, Joel De. A Sinfonia da Vida - Como a genética pode levar cada um a reger seus destinos. [S. l.]: PLANETA, 2019. ISBN 9788542218640.

ROSSI, Verusca Semmler. Identificação e análise de co-expressão in sílico de genes codificadores de proteínas associadas a transcrição e de enzimas associadas ao metabolismo de carboidratos em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) da cultivar SP80-3280. 2022. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SAIMI, Gulisitan *et al.* The Functions of an NAC Transcription Factor, GhNAC2-A06, in Cotton Response to Drought Stress. **Plants**, v. 12, n. 21, p. 3755, 2 nov. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants12213755>. Acesso em: 18 fev. 2024.

SAKAI, Tohru; KOGISO, Mari. Soy isoflavones and immunity. **The Journal of Medical Investigation**, v. 55, n. 3,4, p. 167-173, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.2152/jmi.55.167>. Acesso em: 18 fev. 2024.

SANTILIANO, Fabiano Costa. Expressão gênica e características bioquímicas de genótipos de *Coffea canephora* submetidos a diferentes condições hídricas. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2023.

SEAB- Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento, Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/soja_2013_14.pdf>. Acesso em: 14 jan. 2021.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 2, p. 221-227, 6 nov. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jxb/erl164>. Acesso em: 18 fev. 2024.

SHUKLA, P. R. et al. **Mudanças Climáticas e Terra: um relatório especial do IPCC sobre mudança climática, desertificação, degradação da terra, manejo sustentável da terra, segurança alimentar e fluxos de gases de efeito estufa em ecossistemas terrestres**. 2019.

SILVA, Andrielly Augusta Da. A contribuição do comércio internacional na economia goiana: análise das exportações da soja no período de 2012 a 2022. **Pontifícia Universidade Católica de Goiás**, 2023.

SILVA, F. et al. **Soja: do plantio à colheita**. 2.ed. São Paulo: Oficina de textos, 2023.

Disponível em: [https://books.google.com.br/books?hl=pt-](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=azOAEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT7&dq=o+que+%C3%A9+a+soja+&ots=O4WioWPihd&sig=TQm2AOTAeMP0Qv3lcDgKSbkhokg)

[BR&lr=&id=azOAEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT7&dq=o+que+%C3%A9+a+soja+&ots=O4WioWPihd&sig=TQm2AOTAeMP0Qv3lcDgKSbkhokg](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=azOAEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT7&dq=o+que+%C3%A9+a+soja+&ots=O4WioWPihd&sig=TQm2AOTAeMP0Qv3lcDgKSbkhokg). Acesso em: 14 jan. 2023.

SILVA, Izac Martins da et al. Experimentação remota e simulações 3D aplicadas ao estudo da propagação das ondas eletromagnéticas por meio da aprendizagem baseada em projetos. 2023. Monografia (Graduação em Engenharia Elétrica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2023.

SILVA, J. B. et al. A crise hídrica global e as propostas do Banco Mundial e da ONU para seu enfrentamento. **Revista do Programa de Pós-Graduação em Ciências da UFRN**, v.11,n.2,2011. Disponível em: <https://periodicos.ufrn.br/cronos/article/view/2159/pdf>. Acesso em: 14 jan. 2023.

SILVA, Valquíria da. Expressão de genes das vias de sinalização por fitohormônios em feijão-caupi sob estresse de desidratação radicular. 2021. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2021.

SOARES, Cristiane Moi *et al.* Seed quality and crop performance of soybeans submitted to different forms of treatment and seed size. **Journal of Seed Science**, v. 41, n. 1, p. 69-75, jan. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/2317-1545v41n1210486>. Acesso em: 18 fev. 2024.

SOUZA, Renan Luiz Barros de et al. Produto baseado em mananoligossacarídeo na indução de tolerância ao déficit hídrico e desenvolvimento vegetativo da soja. 2023.

TAN, Kun; WILKINSON, Miles F. Regulation of both transcription and RNA turnover contribute to germline specification. **Nucleic Acids Research**, 1 jul. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac542>. Acesso em: 18 fev. 2024.

TOLFO, Erivelto Folhato et al. **Composição e diversidade da fauna edáfica sob sistema de sucessão e rotação de culturas associadas ao uso de plantas de cobertura**. 2022. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

TRAN, L. S. P. *et al.* Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 51, p. 20623-20628, 12 dez. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0706547105>. Acesso em: 18 fev. 2024.

VISHWAKARMA, Kanchan et al. Abscisic Acid Signaling and Abiotic Stress Tolerance in Plants: A Review on Current Knowledge and Future Prospects. **Frontiers in Plant Science**, v. 08, 20 fev. 2017a. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00161>. Acesso em: 18 fev. 2024.

XU, Yuwen *et al.* Physiological responses and transcriptome analysis of soybean under gradual water deficit. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, 26 out. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1269884>. Acesso em: 18 fev. 2024.

XU, Tongyao et al. The regulatory role of MdNAC14-Like in anthocyanin synthesis and proanthocyanidin accumulation in red-fleshed apples. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 204, p. 108068, 2023.

ZANDALINAS, Sara I. *et al.* ABA is required for the accumulation of APX1 and MBF1c during a combination of water deficit and heat stress. ***Journal of Experimental Botany***, v. 67, n. 18, p. 5381-5390, 6 ago. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jxb/erw299>. Acesso em: 18 fev. 2024.

Capítulo 1

Comparative evolutionary analysis of NAC Genes in *Arabidopsis thaliana* and *Glycine max*: unveiling differential expression patterns in soybean under water deficit

Artigo a ser submetido à revista **Plant Molecular Biology Reporter**

Comparative evolutionary analysis of NAC genes in *Arabidopsis thaliana* and *Glycine max*: unveiling differential expression patterns in soybean under water deficit

Enya Maria Gois de Souza^{1,2}; Mayla Daiane Correa Molinari^{3,4}; João Matheus Kafer^{1,2}; Renata Fuganti-Pagliarini⁵; Suellen Rosa de Almeida Polizelli^{1,2}; Daniel Rockenbach Marin^{1,2}; Silvana Rockenbach Marin⁶; Alexandre Lima Nepomuceno⁶; Liliane Marcia Mertz Henning^{2,6}

¹Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Embrapa Soja, Londrina, Brazil

²Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brazil

³Arthur Bernardes Foundation, Viçosa, MG, Brazil

⁴Sempre AgriTech, São Paulo, SP, Brazil

⁵ Piccola Scientific Consulting, Saskatoon, Canada

⁶Embrapa Soja, Londrina, PR, Brazil

Abstract

This study addressed the NAC gene family in *Arabidopsis thaliana* and *Glycine max*, focusing on differential gene expression under water deficit conditions and the evolution of these genes. Employing bioinformatics techniques, we unveiled complex orthologous patterns, including 1-M (One-to-Many) and M-M (Many-to-Many) relationships, reflecting a diverse evolutionary history with gene duplication events in *Glycine max*. Phylogenetic analysis revealed remarkable conservation of NAC protein domains in the N-terminal portion in both plant species, suggesting an essential and conserved function. Longer promoters without overlap in adjacent genes in soybean NAC genes were also observed. Furthermore, gene expression analyses by RT-qPCR were conducted on two soybean cultivars, BR 16 and Embrapa 48, under water deficit. A general trend increase in the expression of all NAC genes in the leaves of both cultivars was identified, with *ANAC 105/NAC 76.2* and *ATAF 1/NAC 2.2* showing a 50% increase in expression in the drought-sensitive cultivar BR 16. In the roots, these genes also exhibited higher expression in BR 16, with level increases of 8% and 28%, respectively, while the *ANAC 40/NAM* gene increased by 16.5% in the drought-tolerant Embrapa 48. The results highlighted the complexity of the genetic responses of soybean cultivars to water deficit and the importance of NAC genes in the response to abiotic stresses. The conservation of protein domains and differential regulation of NAC genes suggest evolutionary strategies for adaptation to environmental stressful conditions in plants.

Keywords: NAC Gene Family, Drought Tolerance, Gene Evolution, Abiotic Stress, Soybean Adaptation, Gene Expression Analysis.

Introduction

Soybean (*Glycine max*) is a crucial component of global food security and in the agricultural economy of Brazil, encompassing a cultivation area of 44.080,1 hectares and yielding an annual harvest of 154.609,5 million tons, according to National Supply Company (CONAB) (2023). Despite its substantial economic importance, soybean cultivation in Brazil is increasingly vulnerable to environmental challenges, particularly drought, which led to a significant loss of 7.3 million tons in the 2020/2021 crop season (Grãos, 2020). This challenge is further amplified by global climate changes and rising temperatures, as highlighted by the "Intergovernmental Panel on Climate Change" IPCC (2019).

In this context, genetic research on drought tolerance in plants like soybean becomes critical. A particular focus of the study is the of the no apical meristem (NAM), *Arabidopsis thaliana* transcription activation factor (ATAF1,2), cup-shaped cotyledon2 (*CUC2*) or *NAC* gene family, known for its key role in plant response to water deficit. These genes belong to both ABA (abscisic acid) dependent and independent pathways, participating in distinct genetic and regulatory responses to water deficit. These pathways are crucial in modulating the expression of genes that confer drought tolerance, involving the action of transcription factors such as *AREBs* from the ABA-dependent pathway and *DREBs*, part of the ABA-independent pathway (Barbosa et al., 2013; Becerra et al., 2017; Fuganti-Pagliarini et al., 2017; Leite et al., 2014; Molinari et al., 2023).

Considering the actual and upcoming world scenarios, with increasing population and food demand, the development of soybean cultivars capable of withstanding increasingly frequent and severe drought conditions, a critical demand in agriculture in the face of global climate changes, is essential to ensure food security. This study aimed to conduct a comparative evolutionary analysis of the *NAC* gene family in *Arabidopsis thaliana* and *Glycine max*, focusing on their differential expression under water deficit conditions. Evaluating both drought-tolerant and drought-sensitive soybean cultivars is essential to understanding the genetic variations in plants' tolerance to drought. Ultimately, this knowledge will add to current research focusing on obtaining soybean cultivars more drought-tolerant aiming to minimize losses while maintaining yield.

Materials and Methods

Selection and Characterization of NAC genes

This study investigated the genetic basis of drought tolerance in soybean (*Glycine max*), focusing on the *NAC* gene family, which is known for its role in plant stress responses. Specific *NAC* genes from *Arabidopsis thaliana* - AT1G01720, AT1G52890, AT5G66300, AT2G42400, AT1G71930, AT5G39610, AT3G49530, and AT2G27300, were selected based on the work of Jensen et al. (2010). For comparative analysis, the soybean genome references from versions Wm82.a2.v1 (Schmutz et al., 2010) and Wm82.a4.v1 (Lawrence-Dill, 2019) were retrieved from the Phytozome V13 database (available at: <https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>).

Protein characterization involved analyzing conserved domains using the NCBI Conserved Domain Database (available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>). Promoter regions were characterized using the RSAT Plant tool (available at: <http://rsat.eead.csic.es/plants/>), focusing on cis-regulatory elements ABRE (Abscisic Acid Response Element, ACGT; Hobo et al., 1999; Narusaka et al., 2003) and DRE (Dehydration Response Element, consensus sequence CCGAC; Dubouzet et al., 2003; Narusaka et al., 2003). This analysis employed custom shell scripts.

Protein homology were evaluated using GenomeBrowser Persephone (Available at: <https://persephonesoft.com/>). Protein sequence alignments were conducted with Muscle (Available at: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). Using these alignments, a dendrogram was constructed via iTOL (Available at: <https://itol.embl.de/>) to compare *Arabidopsis* and soybean protein sequences, facilitating the visualization of phylogenetic relationships and conservation of *NAC* genes potentially involved in drought response.

Water Deficit Experiment

To evaluate *GmNAC* genes expression in two conventional soybean cultivars, BR 16 (drought-sensitive) and Embrapa 48 (drought-tolerant) (Oya et al., 2004) an experiment was conducted in greenhouse conditions. The experiment was performed in a randomized complete block design (RCBD) with three block replicates and nine biological replicates. BR 16 and Embrapa 48 soybean cultivars were submitted to

control - C and water deficit – WD treatments.

For germination, seeds of both soybean cultivars were placed on Germitest paper, adhering to seed analysis guidelines. Uniform radicle-emerged seedlings underwent treatment with *Bradyrhizobium japonicum* inoculant (Atmo[®]) at a concentration of $5.0 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$ and were then transplanted into five-litre pots containing sterilized, dried, and sieved soil in a 1:1 soil/sand ratio. Irrigation was maintained until the V4 developmental stage. After that, plants were submitted to WD by withholding irrigation for seven days. Plants were considered under water deficit conditions when stomatal conductance (g_s) was lower than $0.2 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$, as defined by Flexas et al. (2004) and Salinet (2009). Measurements were conducted using a portable photosynthesis analyzer, model LCpro-SD (ADC BioScientific). Plants under control conditions were kept irrigated.

On the seventh day of the experiment, leaf and root samples from soybean plants under both treatments were collected and immediately immersed in liquid nitrogen for molecular analyses. Nine individual samples from each soybean cultivar were collected and subsequently bulked into three samples, each containing three plants. The samples were stored at -80°C until RNA extraction.

RT-qPCR Analysis

Total RNA extraction was performed using the Trizol[®] reagent, following the manufacturer's recommendations (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). After extraction, any residual DNA was removed using the DNase I kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). To confirm the absence of genomic DNA, a PCR was conducted using intron-specific primers for β -actin, and the products were visualized on a 1% (v/v) agarose gel. cDNA synthesis from purified total RNA was carried out using the Super Script[®] III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), utilizing an aliquot of 1.5 μg .

To analyze the expression of drought response-related genes, a real-time quantitative PCR with reverse transcription (RT-qPCR) was performed. Specific primer sets for each gene were designed: *NAC 2.1* (Glyma.14G152700—primer F 5'GACGAGAAGCCGGAGATTC3'/ primer R 5'GTCGGAAGCCTCGAAGTACA3'), *NAC 2.2* (Glyma.13G030900—primer F 5'GTGAAGCCGGAGTATACGG3 ' /primer R 5'CACCTGCTCCGAACAGCT3'), *NAC 76.1* (Glyma.11G075400—primer F 5'

TGTTGGAGTACTCTCATCAAGC3' / primer R 5' CGCATATCCCATTGTACAG3'), *NAC 76.2* (Glyma.01G167900—primer F 5'GTAATGGAGTACCCTCAAGC3' /primer R 5'GAAATGGGCTCAACCTGTTC3'), and *NAM* (Glyma.13G314600—primer F 5'ACTGGCAAAGAGCGAAATGT3' /primer R 5'TAGGTGCACGCCCTAAGTG3'). Sequences were obtained from Phytozome v13 and primers were designed using Primer3Plus software (Software Primer3Plus, 2022). Primer dimerization was checked using Multiple Primer Analyze software (Software Multiple Primer Analyze, 2022).

RT-qPCR reactions were prepared with 0.2 μ M of each F and R primers, and 1 \times Platinum[®] SYBR Green[®] qPCR SuperMix UDG reaction buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA). Relative gene expression quantification was carried out in three biological replicates and three technical replicates (n=9). The reactions were performed on a Real-Time 7900HT thermal cycler (Applied Biosystems). Cycling conditions were as follows: denaturation at 95°C for 10 min, 40 cycles of 95°C for 15 sec, 60°C for 1 min, and a melting curve cycle of 95°C for 15 sec, 60°C for 15 sec, and 95°C for 15 sec. Reference genes *NUDIX* (Glyma.15G050200—primer F 5'TGAGTGTTAGAAGGGCTACTGG3' /primer R 5'AACTTTGCCAACGGCATC3') and *Fyve* (Glyma.13G114700—primer F 5'TTCTGTCTTCTGCAAGTGGTG3' /primer R 5'GATCCCTCCATACATTTTCAG3') were used as normalizers, as described by Marcolino-Gomes et al. (2015). Relative expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formula, adjusted for primer efficiencies (Livak and Schmittgen, 2001).

Results

Comparative Phylogenetic and Orthologous Analysis of the NAC Gene Family between Arabidopsis thaliana and Glycine max

The comparative analyses of the *NAC* gene family between *Arabidopsis thaliana* and *Glycine max* are illustrated in Figure 1. Figure 1A visually displays the phylogenetic relationships, while Figure 1B provides a detailed orthologous summary. In the following subsections, data from Figure 1B will be detailed to elucidate the dynamics of gene conservation and diversification between the species. Emphasis was placed on analyzing orthologous relationships, and the functional depth of these evolutionary connections.

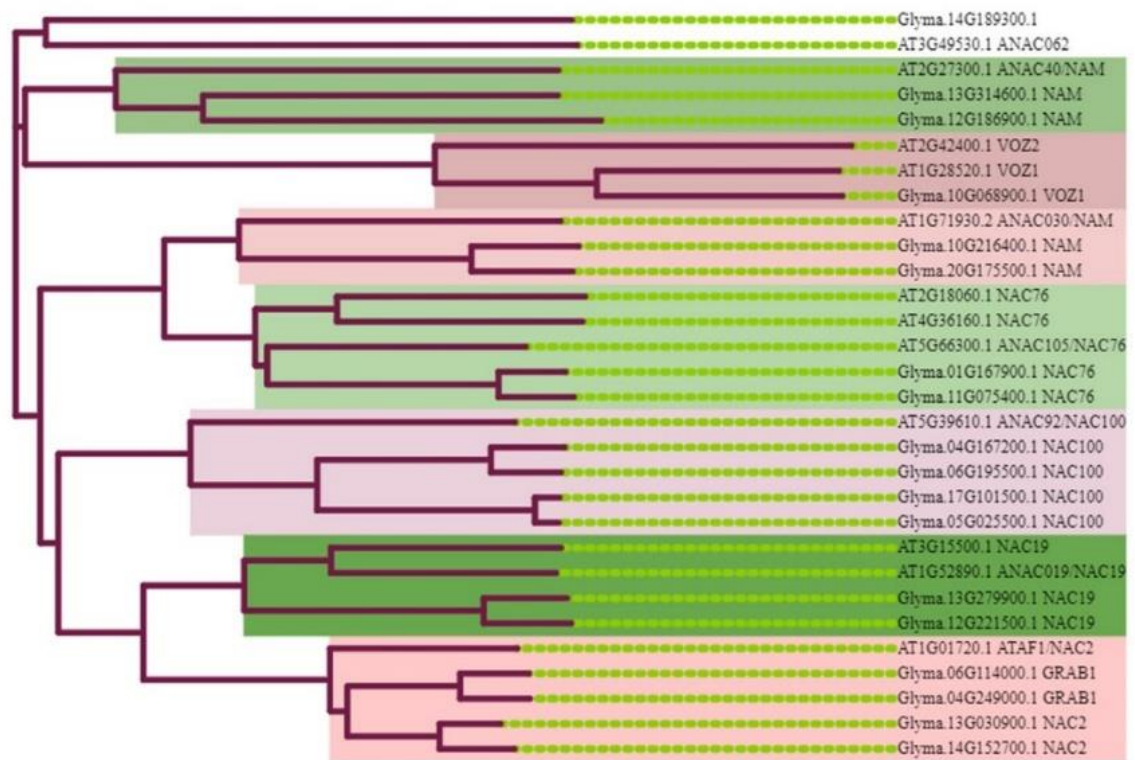


Figure 1. Phylogenetic tree and orthologous profile of ANAC/NAC transcription factors in *Arabidopsis thaliana* and *Glycine max*. In (A), neighbor-joining phylogenetic tree with distance corrections, generated using MUSCLE software and visualized via iTOL, highlighting the orthologous relationships among NAC transcription factors, with colored clades indicative of different transcription factors. Genes in green were subjected to quantitative gene expression analysis by RT-qPCR. Branch lengths are represented in cladogram format, indicating kinship relationships without real proportions of evolutionary distance.

Phylogenetic Analysis of the NAC Gene Family in Arabidopsis thaliana and Glycine max

The conducted phylogenetic analysis revealed that the majority of NAC family clades in *Arabidopsis thaliana* and *Glycine max* follow an expected pattern of orthology. However, a notable exception was identified in the clade including the ANAC105/NAC76 gene. In this specific clade, the *Arabidopsis* gene AT5G66300.1 (ANAC 105/NAC 76) exhibited higher similarity with the sequences of *Glycine max* genes Glyma.11G075400.1 (NAC 76) and Glyma.01G167900.1 (NAC 76) than with its own species' orthologous counterparts, which are the genes AT4G36160.1 and AT2G18060.1 (Figure 1A).

| Transcript Name | Ortho | Score | Similarity | Define |
|--------------------------|------------|------------|------------|---|
| AT1G01720.1 | 1.1 | 607 | 100 | ATAF 1/ NAC 2 |
| Glyma.04G249000.1 | 1.M | 411 | 84.9 | GRAB1-LIKE PROTEIN |
| Glyma.06G114000.1 | 1.M | 407 | 84.9 | GRAB1-LIKE PROTEIN |
| Glyma.14G152700.1 | Best hit | 418 | 83.5 | NAC DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 2 |
| Glyma.13G030900.1 | Best hit | 402 | 78.9 | NAC DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 2 |
| AT1G52890.1 | 1.1 | 669 | 100 | ANAC 19/NAC 19 |
| Glyma.12G221500.1 | M.M | 345 | 81.8 | NAC DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 19-RELATED |
| Glyma.13G279900.1 | M.M | 341 | 71.8 | NAC DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 19-RELATED |
| AT3G15500.1 | TO | | | NAC DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 19-RELATED |
| AT5G66300.1 | 1.1 | 616 | 100 | ANAC 105/NAC 76 |
| Glyma.11G075400.1 | Best hit | 344 | 80.6 | NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 76-RELATED |
| Glyma.01G167900.1 | Best hit | 343 | 80.2 | NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 76-RELATED |
| AT4G36160.1/ AT2G18060.1 | TO | | | NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 76-RELATED |
| AT2G42400.1 | 1.1 | 939 | 100 | VOZ 2 |
| Glyma.10G068900.1 | Best hit | 392 | 75.6 | TRANSCRIPTION FACTOR VOZ1 |
| AT1G28520.2 | TO | | | TRANSCRIPTION FACTOR VOZ1 |
| AT1G71930.2 | 1.1 | 688 | 100 | ANAC 30/NAM |
| Glyma.20G175500.1 | 1.M | 343 | 72.8 | No apical meristem (NAM) protein (NAM) |
| Glyma.10G216400.1 | 1.M | 340 | 72.8 | No apical meristem (NAM) protein (NAM) |
| AT5G39610.1 | 1.1 | 601 | 100 | ANAC 92/ NAC 100 |
| Glyma.05G025500.1 | Best hit | 309 | 82 | NAC DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 100-RELATED |
| Glyma.17G101500.1 | Best hit | 308 | 83.5 | NAC DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 100-RELATED |
| Glyma.06G195500.1 | Best hit | 305 | 84.5 | NAC DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 100-RELATED |
| Glyma.04G167200.1 | Best hit | 302 | 84.5 | NAC DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 100-RELATED |
| AT3G49530.1 | 1.1 | 981 | 100 | ANAC 062 |
| Glyma.14G189300.1 | Best hit | 295 | 70.2 | N.A. |
| AT2G27300.1 | 1.1 | 706 | 100 | ANAC 40/ NAM |
| Glyma.12G186900.1 | 1.M | 296 | 64.5 | No apical meristem (NAM) protein (NAM) |
| Glyma.13G314600.1 | 1.M | 294 | 66.3 | No apical meristem (NAM) protein (NAM) |

Figure 2: a table consolidating orthologous relationships, with alignment scores and sequence similarities, based on the soybean reference genomes Wm82.a2.v1 and Wm82.a4.v1 from Phytozome v13. Annotations include: "(oo)" for 'other orthologous', "12" indicating a 'one-to-two' relationship, and "2-2" for 'two-to-two'.

Orthology and Conservation of the ATAF1/NAC2 Gene

The gene AT1G01720.1 encodes the transcription factor ATAF1/NAC2. In Arabidopsis, this gene is represented by a single ortholog, suggesting an essential and highly conserved function in this species. In contrast, in soybean, two true orthologs were identified: Glyma.04G249000.1 and Glyma.06G114000.1, both displaying high protein (aminoacidos) similarity of 84.9% to Arabidopsis' ATAF1, with alignment scores ranging from 407 pb (trocar as bp) to 411pb. These genes in *G. max* are annotated as GRAB 1-like protein. Additionally, two genes in soybean were identified as 'best hits' in relation to AT1G01720.1: Glyma.14G152700.1 and Glyma.13G030900.1, with sequence similarities of 83.5% and 78.9%, respectively, and alignment scores of 418

pb and 402 pb. These genes are annotated as *NAC2* and do not have other orthologs in Arabidopsis. The orthologous relationship identified was of the 1-M (one-to-many) type, indicating one ortholog in Arabidopsis and multiple in soybean. This suggested the occurrence of gene duplications in soybean, leading to the formation of two additional *NAC2* paralogs, exemplifying gene diversification post-duplication.

Orthology and Conservation of the ANAC19/NAC19 Gene

| AT1G52890.1 | 1.1 | 669 | 100 | ANAC 19/NAC 19 |
|--------------------|------------|------------|------------|--|
| Glyma.12G221500.1 | M.M | 345 | 81.8 | NAC DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 19-RELATED |
| Glyma.13G279900.1 | M.M | 341 | 71.8 | NAC DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 19-RELATED |
| AT3G15500.1 | TO | | | NAC DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 19-RELATED |

The gene AT1G52890.1 encodes the transcription factor ANAC19/NAC19. In Arabidopsis, this gene has an additional ortholog, AT3G15500.1, and both share the same functional annotation, indicating conservation of gene function. In soybean, two true orthologs, Glyma.12G221500.1 and Glyma.13G279900.1, were identified. These orthologs exhibit protein similarities of 81.8% and 71.8% to the Arabidopsis ANAC19/NAC19 gene, respectively, with alignment scores of 345 pb and 341 pb. Like Arabidopsis, these genes in soybean retain the NAC19 annotation. The orthologous relationship between the NAC19 genes of Arabidopsis and soybean follows an M-M (2-to-2) pattern, indicating a symmetrical correspondence between the two species, suggesting a bilateral pattern of gene conservation between species.

Orthology and Conservation of the ANAC105/NAC76 Gene

| AT5G66300.1 | 1.1 | 616 | 100 | ANAC 105/NAC 76 |
|--------------------------|------------|------------|------------|--|
| Glyma.11G075400.1 | Best hit | 344 | 80.6 | NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 76-RELATED |
| Glyma.01G167900.1 | Best hit | 343 | 80.2 | NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 76-RELATED |
| AT4G36160.1/ AT2G18060.1 | TO | | | NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 76-RELATED |

The gene AT5G66300.1 encodes the transcription factor ANAC105/NAC76. In soybean, this Arabidopsis gene did not show direct orthologs. However, two 'best hits' were identified: Glyma.11G075400.1 and Glyma.01G167900.1, exhibiting protein similarities of 80.6% and 80.2%, and alignment scores of 344 pb and 343 pb, respectively. These soybean 'best hits' are considered true orthologs of the genes AT4G36160.1 and AT2G18060.1 in Arabidopsis, both annotated as NAC76, suggesting a balanced orthologous relationship of 2:2 between the two species.

Orthology and Conservation of the VOZ2 Gene

| AT2G42400.1 | 1.1 | 939 | 100 | VOZ2 |
|-------------------|----------|-----|------|---------------------------|
| Glyma.10G068900.1 | Best hit | 392 | 75.6 | TRANSCRIPTION FACTOR VOZ1 |
| AT1G28520.2 | TO | | | TRANSCRIPTION FACTOR VOZ1 |

The gene AT2G42400.1 encodes the transcription factor VOZ 2. In soybean, a direct ortholog for this gene was not identified. However, a 'best hit', Glyma.10G068900.1, was identified, showing a protein similarity of 75.6% and an alignment score of 392 pb and being functionally annotated as VOZ 1. This soybean 'best hit' has true orthology with another Arabidopsis gene, AT1G28520.2, which is also annotated as VOZ 1. For the AT1G28520.2 gene, the orthology ratio between species was 1:4, based on the soybean reference genome versions Wm82.a2.v1 and Wm82.a4.v1.

Orthology and Conservation of the ANAC30/NAM Gene

| AT1G71930.2 | 1.1 | 688 | 100 | ANAC 30/NAM |
|-------------------|-----|-----|------|--|
| Glyma.20G175500.1 | 1.M | 343 | 72.8 | No apical meristem (NAM) protein (NAM) |
| Glyma.10G216400.1 | 1.M | 340 | 72.8 | No apical meristem (NAM) protein (NAM) |

The gene AT1G71930.2 encodes the transcription factor ANAC30/NAM. In soybean, two corresponding orthologs were identified: Glyma.20G175500.1 and Glyma.10G216400.1. These genes exhibit protein similarities of 72.8%, with alignment scores of 343 pb and 340 pb, respectively. Both are functionally annotated as NAM, like the annotations observed in Arabidopsis. The orthologous relationship observed between species for this gene is 1:2, indicating the presence of two orthologs in soybean for one ortholog in Arabidopsis.

Orthology and Conservation of the ANAC92/NAC100 Gene

| AT5G39610.1 | 1.1 | 601 | 100 | ANAC 92/ NAC 100 |
|-------------------|----------|-----|------|---|
| Glyma.05G025500.1 | Best hit | 309 | 82 | NAC DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 100-RELATED |
| Glyma.17G101500.1 | Best hit | 308 | 83.5 | NAC DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 100-RELATED |
| Glyma.06G195500.1 | Best hit | 305 | 84.5 | NAC DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 100-RELATED |
| Glyma.04G167200.1 | Best hit | 302 | 84.5 | NAC DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 100-RELATED |

The gene AT5G39610.1 encodes the transcription factor ANAC92/NAC100. In soybean, no direct orthologs for this gene were identified. However, four genes were recognized as 'best hits', functionally equivalent to NAC100: Glyma.05G025500.1,

Glyma.17G101500.1, Glyma.06G195500.1, and Glyma.04G167200.1. These genes exhibit protein similarities of around 84%, with alignment scores near 306 pb. Despite sharing the same functional annotation as the Arabidopsis AT5G39610.1 gene, these soybean 'best hits' have other orthologs in Arabidopsis.

Orthology and Conservation of the ANAC062 Gene

| AT3G49530.1 | 1.1 | 981 | 100 | ANAC 062 |
|-------------------|----------|-----|------|----------|
| Glyma.14G189300.1 | Best hit | 295 | 70.2 | N.A. |

The gene AT3G49530.1, cataloged by Jensen et al. in 2010, encodes the transcription factor ANAC062. In soybean, no direct ortholog for this Arabidopsis gene was identified. However, a 'best hit' was discovered: Glyma.14G189300.1, exhibiting a protein similarity of 70.2% and an alignment score of 295 pb. This gene in soybean lacks a specific functional annotation and it is identified as the ortholog of another gene in Arabidopsis.

Orthology and Conservation of the ANAC40/NAM Gene

| AT2G27300.1 | 1.1 | 706 | 100 | ANAC 40/ NAM |
|-------------------|-----|-----|------|--|
| Glyma.12G186900.1 | 1.M | 296 | 64.5 | No apical meristem (NAM) protein (NAM) |
| Glyma.13G314600.1 | 1.M | 294 | 66.3 | No apical meristem (NAM) protein (NAM) |

The gene AT2G27300.1, described by Jensen et al. in 2010, encodes the transcription factor ANAC40/NAM. In soybean, two orthologs with the same functional annotation as in Arabidopsis were identified: Glyma.12G186900.1 and Glyma.13G314600.1. These genes display protein similarities of 64.5% and 66.3%, with alignment scores of 296 pb and 294 pb, respectively. For the ANAC40/NAM gene, a 1:2 orthology ratio between Arabidopsis and soybean was observed.

Comparative Characterization of Promoter Regions of NAC Family Genes in Glycine max and Arabidopsis thaliana

Aiming to identify genes involved in both abscisic acid (ABA)-dependent and independent drought response pathways, an emphasis was placed on quantifying ABRE (ACGT) and DRE (CCGAC) binding motifs in the promoter regions of selected genes. It was observed that soybean genes had longer promoters, showing on average

1.947 base pairs (bp), in contrast to *Arabidopsis thaliana* genes, which showed shorter promoters, averaging 1.142 bp (Figure 2). Additionally, promoter analysis revealed an average of 0.41 DRE and 4.6 ABRE motif- elements in the promoters of soybean genes, while in Arabidopsis, the averages were 0.16 DRE and 3.6 ABRE. In the NAC family genes, a predominance of ABRE motifs over DRE was noted in both species. Of the 18 soybean genes analyzed, 6 exhibited at least one DRE motif, and among the 12 Arabidopsis genes studied, 2 displayed at least one DRE motif. Regarding ABRE motifs, 15 of the 18 soybean genes investigated had at least 2 ABRE, and among the 12 Arabidopsis genes, 9 contained at least 2 ABRE.

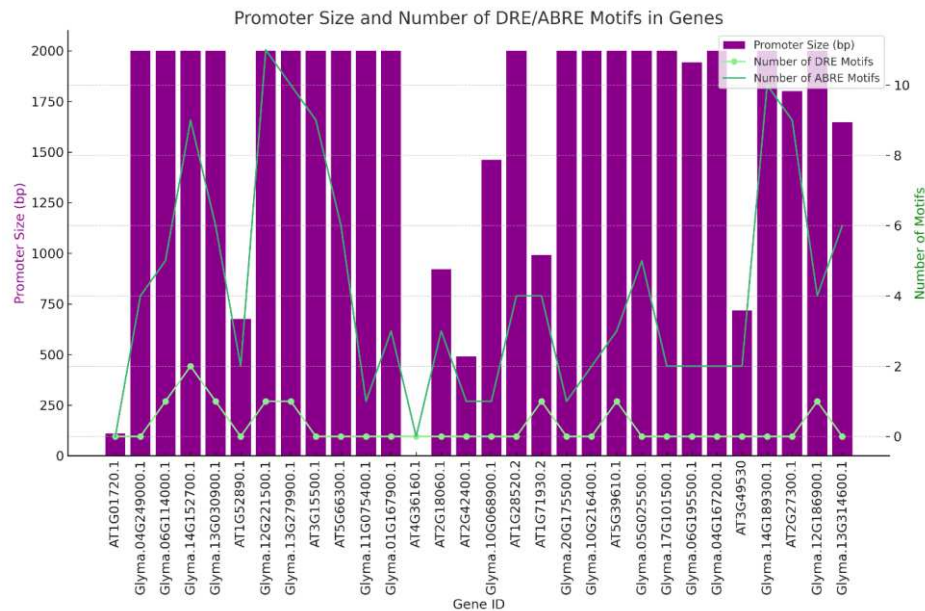


Figure 2. Size of promoters and quantity of DRE and ABRE motifs in NAC family genes in soybean and arabidopsis. Magenta bars represent the size of the promoters (in base pairs) for each NAC family gene in soybean (Glyma) and Arabidopsis (AT). Green lines, with circle and cross markers, represent respectively, the number of ABRE (ACGT) and DRE (CCGAC) motifs present in each promoter.

Protein Domain Analyses

The analysis of protein domains demonstrated a high conservation of the PFAM domain pfam02365 across both species, indicative of the functional preservation of these genes throughout evolution. The proteins encoded by the evaluated NAC genes predominantly varied in size between 200 and 400 amino acids (Figure 3). A notable feature was the high conservation of the NAC domain intervals, reflecting the structural importance of these for the protein's function, mainly concentrated between positions

9-139 in the N-terminal portion of the proteins. The e-value results obtained in the correspondence analysis with the PFAM domain pfam02365 were remarkably low, ranging between $1.06e-59$ and $8.99e-62$, which reinforced the reliability of classifying these proteins within this family of transcription factors.

Interestingly, the analysis also identified genes that did not clearly correspond with the PFAM domain pfam02365, specifically AT2G42400.1 (VOZ 2), Glyma.10G068900.1 (Transcription Factor Voz1), and AT1G28520.2 (Transcription Factor Voz1) genes. This discovery suggested the presence of proteins with domains and functions not yet characterized in the literature, paving the way for future investigations into the functional diversity and evolution of NAC proteins in plants.

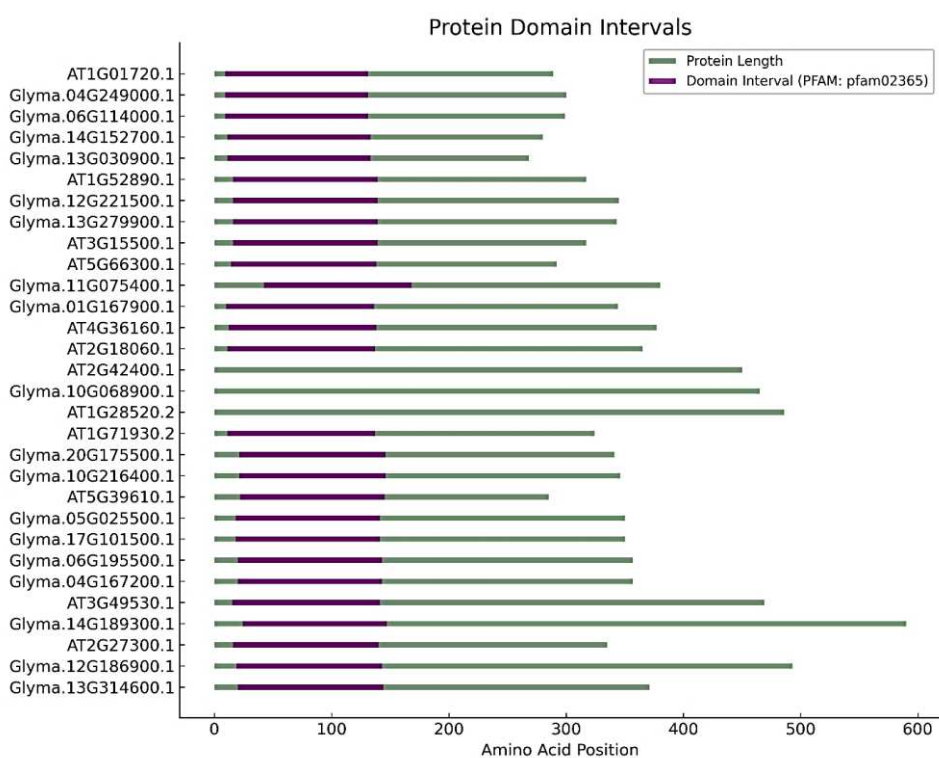


Figure 3. Distribution of protein domain intervals associated with PFAM pfam02365. Each horizontal line represents an individual protein, identified by its Gene ID. The total length of the line in green corresponds to the full size of the protein (in amino acids). The segments in magenta highlight the location of the pfam02365 protein domain within each protein.

RT-qPCR analyses

In this study, we examined the expression of five NAC genes in two soybean cultivars, BR 16 and Embrapa 48, considered sensitive and tolerant to drought, respectively, under water deficit conditions. In the leaves, a consistent upregulation trend across all five genes in both cultivars was identified under water deficit treatment

compared to the irrigated control. Notably, nearly all the genes analyzed in the leaves did not show significant statistical differences between the cultivars, except for two genes. Glyma.13G030900.1 (ATAF 1/NAC 2.2) showed approximately 50% increased expression in BR 16 (1.8X) compared to Embrapa 48 (1.2X). Similarly, Glyma.01G167900.1 (ANAC 105/NAC 76.2) exhibited 50% higher expression in the sensitive cultivar (3.3X in BR 16 vs. 2.2X in Embrapa 48). (Figure 4).

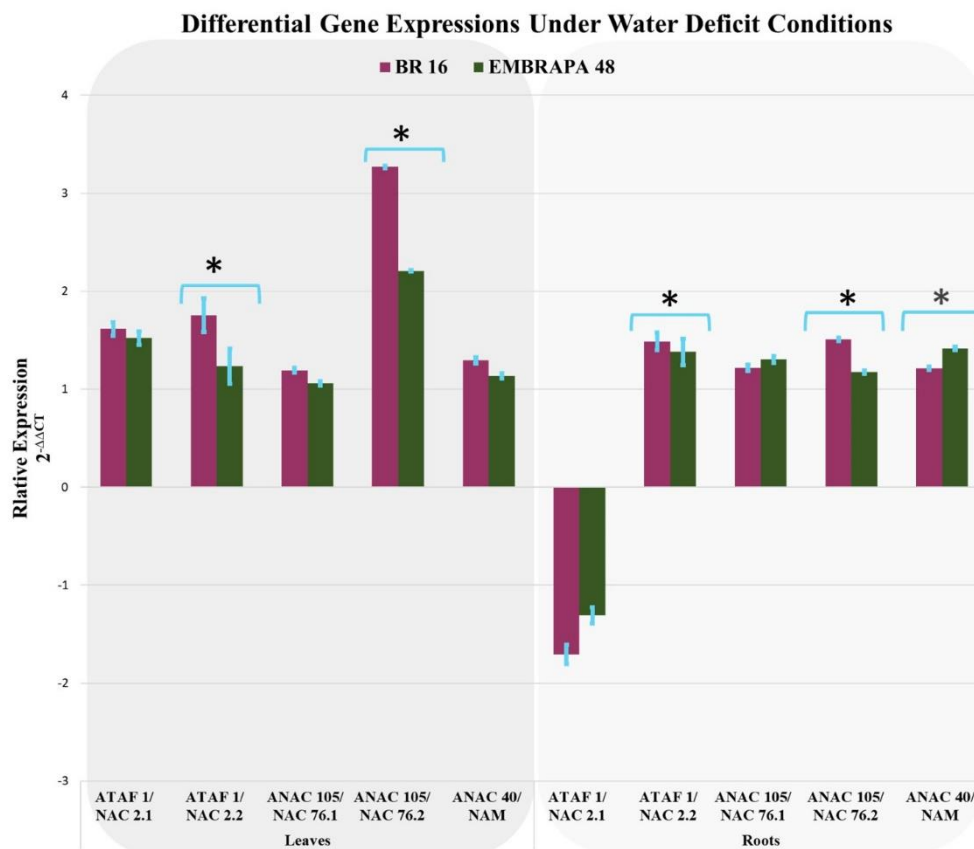


Figure 4. Relative gene expression of NAC family genes in *Glycine max* leaves and roots under water deficit treatment. This figure presents the relative expression of the genes *ATAF1.1/NAC 2.1* (Glyma.14G152700.1), *ATAF1.2/NAC 2.2* (Glyma.13G030900.1), *ANAC105.1/NAC 76.1* (Glyma.11G075400.1), *ANAC105.2/NAC 76.2* (Glyma.01G167900.1), and *ANAC 40/NAM* (Glyma.13G314600.1) in the leaves and roots of *Glycine max* (soybean). The maximum (positive) and minimum (negative) expression values correspond to the average of biological triplicates for the BR 16 cultivar in comparison to the Embrapa 48 cultivar. Error bars indicate the standard error of the biological triplicates. A two-tailed Student's t-test was used with * $P < 0.10$ for statistical significance. Bars positioned above the x-axis indicate upregulated genes, while those below indicate downregulated genes.

In the roots, a different pattern was observed. Most genes continued the trend of upregulation in both cultivars under water deficit. However, Glyma.14G152700.1

was an exception, showing downregulation in both cultivars (with expressions of -1.7X in BR 16 and -1.3X in Embrapa 48), without significant statistical differences between them. Additionally, in the roots, Glyma.01G167900.1 and Glyma.13G030900 also exhibited significant statistical differences between the cultivars, with smaller variations than those observed in the leaves, being 8% (1.5 in BR 16 vs. 1.2 in Embrapa 48) and 28% (1.5 in BR 16 vs. 1.4 in Embrapa 48) respectively for BR 16. Only in the roots, the gene Glyma.13G314600 (ANAC 40/NAM) showed a significant increase of approximately 16.5% (1.2X in BR 16 vs. 1.4X in Embrapa 48) in expression in the drought-tolerant Embrapa 48 cultivar compared to the sensitive BR 16. This study highlights the complexity of the genetic responses of soybean cultivars to water stress, demonstrating significant variations both between tissues (leaves and roots) and between cultivars with different levels of drought tolerance.

Discussion

Orthologous Analysis of the NAC Gene Family in Arabidopsis thaliana and Glycine max

This study addressed the orthologous analysis of the NAC gene family in *Arabidopsis thaliana* and *Glycine max*. Orthologs are genes that share a common ancestor between different species, usually maintaining similar functions. In *Glycine max*, the absence of direct orthologs in clades such as ANAC105/NAC76, VOZ2, ANAC92/NAC100, and ANAC062 suggested events of genetic loss or functional divergence. Concurrently, the presence of genes with similar functions ('best hits') in *Glycine max*, which are not direct orthologs of genes in *Arabidopsis thaliana*, indicated functional convergence, where unrelated genes independently evolve similar functions, often as a response to environmental pressures (Chen et al., 2022 Xu et al., 2020).

Furthermore, the study revealed that in *Glycine max*, clades such as ANAC30/NAM, ANAC40/NAM, and ATAF1/NAC2 exhibit an orthologous relationship of 1:2 compared to *Arabidopsis*, while ANAC19/NAC19 shows a 2:2 relationship. These patterns suggested that gene duplication in *Glycine max* may have led to functional diversification (neofunctionalization) and the conservation of genetic functions (subfunctionalization). Neofunctionalization occurs when a duplicated gene

evolves new functions, while subfunctionalization involves the division of original functions among duplicated genes (Liu et al., 2020, Schmutz et al., 2010).

The comparison of the genomic configurations highlighted significant differences in the *NAC* gene family between the two species, attributed to the complexity of the soybean genome, marked by multiple gene duplications. These duplications result in the formation of paralogs, genes that arise by duplication within the same organism and can develop new functions or subfunctions. The absence of direct orthologs for some evaluated *NAC* genes reflects the evolutionary dynamics of this gene family, suggesting changes or redundancies in important functions in a common ancestor. Alternatively, the acquisition of new functions by genes without direct orthologs contributes to phenotypic and adaptive diversity among species (Liu et al., 2020, Schmutz et al., 2010).

Regarding this analysis, this study showed that gene duplication events distinctively impact the genomes of species. In *Glycine max*, the presence of multiple orthologs in certain genes suggests functional diversification, potentially offering adaptive advantages, such as more refined responses to environmental stresses or differentiated regulation in plant development.

Promoter Regions of NAC genes and the presence of ABRE and DRE motifs

In this study, the analysis of ABRE and DRE binding motifs in the promoters of soybean and Arabidopsis genes provides a profound understanding of gene regulation in response to environmental stresses. These elements are fundamental in activating the transcription of stress responsive genes, playing a crucial role in the adaptation of plants to adverse conditions. Among the most important pathways of plant adaptability to drought is the response to ABA dependent - pathway (Aslam et al., 2022; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Yoshida et al., 2014). This phytohormone is responsible for triggering the first defense mechanisms and controlling responses at different molecular, physiological, and metabolic levels under drought conditions (Bulgakov et al., 2019; Munemasa et al., 2015; Pizzio, 2022). ABA-responsive genes can be identified by containing at least two conserved sequences called ABRE motifs (ACGT core) in their promoter region, which are necessary for gene transcription, generally located within -1 to -2000 bp upstream of the transcription start site (TSS)

(Duarte et al., 2019; Hobo et al., 1999; Liu et al., 2020; Maruyama et al., 2012; Uno et al., 2000).

The research by Molinari et al. (2023) complements this analysis by revealing that, in soybean cultivars submitted to water deficit, a significant proportion of genes are ABA-responsive, indicating the presence of multiple ABRE elements in their promoters. The variation in the presence of these motifs between soybean and *Arabidopsis* reflects the specific adaptive needs of each species, suggesting distinct stress response mechanisms. The more extensive promoters and greater number of ABRE motifs in soybean genes may indicate an evolutionary adaptation to cope with more severe or frequent environmental stresses, such as drought.

The comparison between the two species revealed significant differences in the sizes of the promoters without overlaps with adjacent genes and in the abundance of ABRE and DRE motifs. While soybean, an agriculturally important crop, may have developed more complex stress response mechanisms; *Arabidopsis*, often used as a model in plant biology studies, exhibits shorter promoters and fewer of these regulatory elements. The overlap of sequences is a phenomenon observed in various genomes, manifesting in different ways. In this context, the type of overlap observed is often determined by the promoter's access to a coding region of an adjacent gene (Ho et al., 2012; Kumar, 2009; Molinari et al., 2020; Wright et al., 2022). Additionally, the predominance of ABRE motifs compared to DRE in the NAC family genes, observed both in soybean and *Arabidopsis*, highlighted the significant role of these genes in ABA-mediated stress response, opening new possibilities for genetic engineering and plant breeding (Maruyama et al., 2012; Molinari et al., 2023).

Conservation and Diversity of NAC Protein Domains in Soybean and Arabidopsis

In analyzing the proteins coded by NAC genes in soybean and *Arabidopsis*, a high conservation of the PFAM domain pfam02365, was observed as well as the NAM (No Apical Meristem) domain. This conservation suggested the functional preservation of these genes throughout evolution in both species. It is important to note that NAC proteins are genes that encode a polypeptide containing a highly conserved N-terminal domain (Aida et al., 1997; Jahan et al., 2019), as observed in the present study. This domain is fundamental to the function of NAC proteins and is involved in gene

regulation, including stress responses such as drought and in the regulation of gene expression induced by abscisic acid (ABA) (Fujita et al., 2004). Besides the conservation of the domain, variations in the size of the NAC proteins were noted, predominantly between 200 and 400 amino acids. This variation suggested a functional diversity within the NAC protein family, possibly reflecting specific adaptations to different environmental contexts or regulatory functions. Understanding how these size variations influence the activity of NAC proteins is crucial for elucidating the underlying molecular mechanisms of their regulatory function and stress responsiveness.

Intriguingly, some NAC genes that did not clearly correspond to the PFAM domain pfam02365 were identified. This observation opened new perspectives for the investigation of the functional and evolutionary diversity of NAC proteins in plants, suggesting the existence of variants with domains and functions potentially distinct from those characterized to date. These atypical genes may represent new regulatory mechanisms in response to environmental stresses, contributing to a more comprehensive understanding of plant adaptation to different environmental conditions.

Differential Expression of NAC Genes in Soybean Sensible and Tolerant to Drought

In this study, the expression of five *NAC* family genes in two soybean cultivars, BR 16 and EMBRAPA 48, under water deficit conditions was examined (Figure 4). In the leaves, we observed a consistent increase in the expression of these genes under water stress in both cultivars was observed. The increased expression observed for *ANAC 105/NAC 76.2* and *ATAF 1/NAC 2.2* genes in the drought-sensitive cultivar BR 16, suggested a correlation with increased stress sensitivity, aligned with findings by Jin et al. (2013) in tobacco. In the roots, most genes continued the trend of increased expression level, except for *ATAF1/NAC2.1* gene, which showed a pattern of downregulation in both cultivars, indicating a differentiated response between leaves and roots. Moreover, *ANAC 105/NAC 76.2* and *ATAF 1/NAC 2.2* displayed smaller variations in expression between the cultivars in the roots compared to the leaves, being 8% and 28%, respectively. Additionally, the gene *ANAC 40/NAM* showed an approximate 16.5% increase in expression in the drought-tolerant cultivar Embrapa 48.

This study revealed the complexity of the genetic responses of soybean cultivars to water deficit conditions, with significant variations between tissues and among cultivars with different levels of drought tolerance. These results highlighted the complex and differentiated regulation of *NAC* genes, providing valuable insights for the development of genetic improvement strategies focused on drought tolerance in soybean.

Based on the analyses conducted, it can be inferred that, of the eight genes initially investigated, three have shown notable relevance for drought tolerance, namely, *NAC 2*, *NAC 76*, and *NAM*. Thus, these genes emerge as the most promising candidates for potential utilization in future genetic improvement strategies aimed at enhancing plant tolerance to water scarcity.

Acknowledgments

Funding This research was funded by CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel), CNPq (National Council for Scientific and Technological Development), Embrapa (Brazilian Agricultural Research Corporation) and UEL (State University of Londrina).

References

Aida, M., Ishida, T., Fukaki, H., Fujisawa, H., & Tasaka, M. (1997). Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: Analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell*, 9, 841–857. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.6.841>.

Aslam, M. M., Waseem, M., Jakada, B. H., Okal, E. J., Lei, Z., Saqib, H. S. A., Yuan, W., Xu, W., & Zhang, Q. (2022). Mechanisms of abscisic acid-mediated drought stress responses in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1084. <https://doi.org/10.3390/ijms23031084>.

Barbosa, E. G. G., et al. (2013). Overexpression of the ABA-dependent AREB1 transcription factor from *Arabidopsis thaliana* improves soybean tolerance to water deficit. *Plant Molecular Biology Reporter*, 31, 719-730. <https://doi.org/10.1007/s11105-012-0541-4>.

Becerra, B. J., et al. (2017). Identificação de elementos cis reguladores relacionados ao déficit hídrico e estresse de baixa temperatura no promotor de *Citrus sinensis* APETALA1. *Citrus Research & Technology*, 37(2), 138-146.

Bulgakov, V. P., Wu, H. C., & Jinn, T. L. (2019). Coordination of ABA and chaperone signaling in plant stress responses. *Trends in Plant Science*, 24(7), 636–651.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.04.004>.

Canal Rural. (2020, [05/12]). Grãos: safra já caiu mais de 7 milhões de toneladas por causa da seca. Recuperado de
<https://www.canalrural.com.br/noticias/agricultura/graos-safra-seca/>

Chen, et al. (2022). Convergent selection of a WD40 protein that enhances grain yield in maize and rice. *Science*, 375, eabg7985.
<https://doi.org/10.1126/science.abg7985>.

Conab. (2023). Série Histórica das Safras. <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras/itemlist/category/911-soja>

Duarte, K. E., de Souza, W. R., Santiago, T. R., Sampaio, B. L., Ribeiro, A. P., Cotta, M. G., & Molinari, H. B. C. (2019). Identification and characterization of core abscisic acid (ABA) signaling components and their gene expression profile in response to abiotic stresses in *Setaria viridis*. *Scientific Reports*, 9(1), 402.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-40623-5>.

Dubouzet, J. G., et al. (2003). OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *The Plant Journal*, 33, 751-763. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01661.x>.

Flexas, J., et al. (2004). Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant Biology*, 6, 269–279.
<https://doi.org/10.1055/s-2004-820867>

Fuganti-Pagliarini, R., Ferreira, L. C., Rodrigues, F. A., Molinari, H. B. C., Marin, S. R. R., Molinari, M. D. C., Marcolino-Gomes, J., Mertz-Henning, L. M., Farias, J. R. B., de Oliveira, M. C. N., Neumaier, N., Kanamori, N., Fujita, Y., Mizoi, J., Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Nepomuceno, A. L. (2017). Characterization of soybean genetically modified for drought tolerance in field conditions. *Frontiers in Plant Science*, 8, 448. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00448>

Fujita, M., Fujita, Y., Maruyama, K., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., ... & Shinozaki, K. (2004). A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *The Plant Journal*, 39(6), 863-876. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2004.02171.x>

Ho, M. R., Tsai, K. W., & Lin, W. C. (2012). A unified framework of overlapping genes: Towards the origination and endogenic regulation. *Genomics*, 100(4), 231-239. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2012.06.011>

Hobo, T., Tanaka, H., & Koga, K. (1999). ACGT-containing abscisic acid response element (ABRE) and coupling element 3 (CE3) are functionally equivalent. *The Plant Journal*, 19(6), 679-689. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1999.00565.x>

IPCC. (2019). Summary for Policymakers. In: *Climate Change and Land: an IPCC special report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems*.

Jahan, M. A., Harris, B., Lowery, M., Coburn, K., Infante, A. M., Percifield, R. J., & Kovicich, N. (2019). The NAC family transcription factor GmNAC42–1 regulates biosynthesis of the anticancer and neuroprotective glyceollins in soybean. *BMC Genomics*, 20(1), 1-21. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5524-5>

Jensen, M. K., Kjaersgaard, T., Nielsen, M. M., Galberg, P., Petersen, K., O'Shea, C., Skriver, K. (2010). The *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factor family: structure–function relationships and determinants of ANAC019 stress signaling. *Biochemical Journal*, 426(2), 183-196. <https://doi.org/10.1042/bj20091234>

Jin, H., Zhao, Q., Wu, Y., Li, Y., Tang, Y., & Pang, Y. (2013). Overexpression of the GmNAC2 gene, an NAC transcription factor, reduces abiotic stress tolerance in tobacco. *Plant Molecular Biology Reporter*, 31, 435-442.

<https://doi.org/10.1007/s11105-012-0514-7>

Kumar, A. (2009). An overview of nested genes in eukaryotic genomes. *Eukaryotic Cell*, 8(9), 1321-1329. <https://doi.org/10.1128/ec.00143-09>

Lawrence-Dill, C. (2019). GOMAP Soybean JGI-Wm82.a4.v1. 1.0. CyVerse Data Commons. DOI: 10.25739/59ec-1719.

https://datacommons.cyverse.org/browse/iplant/home/shared/commons_repo/curated/Carolyn_Lawrence_Dill_GOMAP_Soybean_JGI-Wm82.a4.v1_April_2019.r1

Leite, J. P., Santos, M. C., Auler, P. A., Souza, L. D., & Braga, D. P. (2014). Overexpression of the activated form of the AtAREB1 gene (AtAREB1 Delta QT) improves soybean responses to water deficit. *Genetics and Molecular Research*, 13(3), 6272-6286. <https://doi.org/10.4238/2014.august.15.10>

Liu, W., Zhang, Y., Li, W., Lin, Y., Wang, C., Xu, R., & Zhang, L. (2020). Genome-wide characterization and expression analysis of soybean trihelix gene family. *PeerJ*, 8, e8753. <https://doi.org/10.7717/peerj.8753>

Liu, Y., Du, H., Li, P., Shen, Y., Peng, H., Liu, S., ... & Tian, Z. (2020). Pan-genome of wild and cultivated soybeans. *Cell*, 182(1), 162-176.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.023>

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *Methods*, 25(4), 402-408.

Marcolino-Gomes, J., Rodrigues, F. A., Fuganti-Pagliarini, R., Nakayama, T. J., Ribeiro Reis, R., Bouças Farias, J. R., ... & Nepomuceno, A. (2015). Transcriptome-wide identification of reference genes for expression analysis of soybean responses to drought stress along the day. *PLoS ONE*, 10(9), e0139051.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139051>

Maruyama, K., Todaka, D., Mizoi, J., Yoshida, T., Kidokoro, S., Matsukura, S., ... & Kojima, M. (2012). Identification of cis-acting promoter elements in cold- and dehydration-responsive transcriptional pathways in Arabidopsis, rice, and soybean. *DNA Research*, 19(1), 37–49. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsr040>

Molinari, H. B. C., Vieira, L. R., Silva, N., Prado, G. S., Lopes Filho, et al. (2020). Tecnologia CRISPR na edição genômica de plantas: biotecnologia aplicada à agricultura.

Molinari, M. D. C., [et al.]. (2023). Comparative ABA-Responsive Transcriptome in Soybean Cultivars Submitted to Different Levels of Drought. *Plant Molecular Biology Reporter*, 41(2), 260-276. <https://doi.org/10.1007/s11105-022-01364-4>

Molinari, M. D. C., et al. (2020). Overexpression of AtNCED3 gene improved drought tolerance in soybean in greenhouse and field conditions. *Genetics and Molecular Biology*, 43. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2019-0292>

Munemasa, S., Hauser, F., Park, J., Waadt, R., Brandt, B., & Schroeder, J. I. (2015). Mechanisms of abscisic acid-mediated control of stomatal aperture. *Current Opinion in Plant Biology*, 28, 154–162. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.10.010>

Narusaka, Y., Narusaka, M., Seki, M., Umezawa, T., Ishida, J., Nakajima, M., ... & Shinozaki, K. (2003). Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of Arabidopsis rd29A gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *The Plant Journal*, 34(2), 137-148. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01708.x>

Oya, T., et al. (2004). Drought tolerance characteristics of Brazilian soybean cultivars - evaluation and characterization of drought tolerance of various Brazilian soybean cultivars in the field. *Plant Production Science*, 7. <https://doi.org/10.1626/pps.7.129>

Pizzio, G. A. (2022). Abscisic acid machinery is under circadian clock regulation at multiple levels. *Stresses*, 2(1), 65–78. <https://doi.org/10.3390/stresses2010006>

Salinet, L. H. (2009). Avaliação fisiológica e agrônômica de soja geneticamente modificada para maior tolerância à seca. Universidade de São Paulo. Recuperado de <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11144/tde-10032009-142320/>

Schmutz, J., et al. (2010). Genome sequence of the paleopolyploid soybean. *Nature*, 463(7278), 178-183.

Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58, 221–227.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erl164>

Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(21), 11632–11637.
<https://doi.org/10.1073/pnas.190309197>

Wright, B. W., Molloy, M. P., & Jaschke, P. R. (2022). Overlapping genes in natural and engineered genomes. *Nature Reviews Genetics*, 23(3), 154-168.
<https://doi.org/10.1038/s41576-021-00417-w>

Xu, S., Wang, J., Guo, Z., He, Z., & Shi, S. (2020). Genomic convergence in the adaptation to extreme environments. *Plant Communications*.
<https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100117>

Yoshida T, Mogami J, Yamaguchi-Shinozaki K (2014) ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. *Curr Opin Biotechnol* 21:133–139.

