


**MAIANA REIS PIMENTA**

**FUNCTIONAL CHARACTERIZATION AND REGULATION OF ABIOTIC  
STRESS-RESPONSIVE GENES (*GmNAC081* and *SbMATE*) IN PLANTS**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2015

11665 | [Sair](#)[Ficha catalográfica](#) [Autenticar Ficha](#) [Fale conosco](#)[Obter em formato digital.PDF](#)[Obter em formato .MARC](#)

	UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA BIBLIOTECA CENTRAL - CÂMPUS VIÇOSA SEÇÃO DE CATALOGAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO	FICHA CATALOGRÁFICA
---	--	---------------------

**INFORMAÇÕES DA SOLICITAÇÃO**

**PROTOCOLO:** 201505220530049416  
**AUTOR:** Maiana Reis Pimenta  
**TIPO DE DOCUMENTO:** Tese (doutorado)  
**CURSO:** Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal  
**DATA CRIAÇÃO:** 22/05/2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da  
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

P644f  
2015

Pimenta, Maiana Reis, 1981-  
Functional characterization and regulation of abiotic  
stress-responsive genes (gmnac081 and sbmate) in plants /  
Maiana Reis Pimenta. - Viçosa, MG, 2015.  
xi, 122f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Elizabeth Pacheco Batista Fontes.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Soja. 2. Senescência foliar. 3. Melhoramento  
genético. 4. Tolerância ao alumínio. I. Universidade Federal  
de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia  
Molecular. Programa de Pós-graduação em Fisiologia  
Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 633.34

**Voltar**

**MAIANA REIS PIMENTA**

**FUNCTIONAL CHARACTERIZATION AND REGULATION OF ABIOTIC  
STRESS-RESPONSIVE GENES (*GmNAC081* and *SbMATE*) IN PLANTS**

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

APROVADA: 27 de fevereiro de 2015.

---

Marcelo Rogalski

---

Maximiller Dal-Bianco Lamas Costa

---

Gilberto Sachetto Martins

---

Humberto Josué de Oliveira Ramos

---

Elizabeth Pacheco Batista Fontes  
(Orientadora)

## AGRADECIMENTOS

Chego ao final desses cinco anos de doutorado bastante diferente de quando eu entrei. Minha estadia na Universidade Federal de Viçosa contribuiu muito em minha formação não só profissional, mas também pessoal. Tive a oportunidade de contar com a ajuda de muitas pessoas, às quais, gostaria de agradecer verdadeiramente agora.

Agadeço a Deus e à Nossa Senhora por estarem sempre presentes em minha vida.

Aos meus pais Glória Maria Reis Pimenta e Marcos Sales Pimenta por serem minha base, minha força, minha vida. Aos meus irmãos queridos, Maíra e Uirá, sempre presentes, meus verdadeiros amigos, meus amores. Ao Gutenberg, meu namorado, noivo e marido, meu companheiro para todas as horas, na alegria e na tristeza, na saúde e na doença. Ao Pedro que me lembrou o milagre a vida e à Melina. Estas duas pessoinhas nasceram nestes cinco anos que estive aqui e encheram minha vida de alegria, esperança amor. Essa tese de doutorado também é de todos vocês!

Ao Sr Osmar, à Deborah, ao Léo, à Vera e ao Francisco, minha segunda família que sempre torceram por mim e entenderam minha ausência.

Agradeço à professora Beth Fontes por me mostrar o que é a ciência de fato. Com todas as suas frustrações, angústias e dificuldades, mas ao mesmo tempo, curiosa e maravilhosa! Aprendi a ter ainda mais paciência (rs) e muita persistência.

Ao programa de pós graduação em Fisiologia Vegetal da UFV e aos professores Marcelo Loureiro, Raimuno, Fábio DaMatta e Marco Aurélio. Sempre estiveram dispostos a ajudar seja com conhecimentos, equipamentos, reagentes, literatura etc. Aprendi muito com cada um de vocês.

Aos queridos amigos da Fisiologia, que estiveram presentes durante o período de disciplinas e foram muito importantes nos estudos, convivência, discussões e contribuíram muito para minha formação: Daniela Cassol, Marcelo Sekita, Mercel Pires, Giuliana, Wilka, Leandro (Ibiá), Samuel (Samuka).

Ao Laboratório de Biologia Molecular de Plantas onde fiz amigos para toda a vida. Agradeço a Deus por ter colocado em minha vida as pessoas maravilhosas que conheci aqui! No início de tudo, o Humberto Henrique Carvalho e Cristiane Zorzatto me introduziram ao laboratório. Depois vieram o Pedro Augusto Reis e o Murilo Alves, com a biblioteca e as clonagens, depois o João Paulo Machado que me ajudou em todas as

etapas deste trabalho e ao qual quero agradecer especialmente. Na reta final, Priscila Silva e Giselle Mendes que foram indescritíveis, inimagináveis e à Janaína Alves, à qual também agradeço especialmente pela ajuda nas noites, finais de semana e experimentos. Ao Otávio Brustolini e ao José Cleydson (Cleicinho) pela amizade, companheirismo e ajuda na estatística e na bioinformática. Eu realmente não teria conseguido sem vocês.

Agradeço à Anésia Santos pelo apoio e ajuda de sempre e pelo exemplo de persistência, perseverança e força. Ao Michirito Deguti, ao Welison Pereira e ao Gustavo Rosado pela amizade, companheirismo e exemplo de força de vontade no encontro dos objetivos.

À Iara Calil, Lucas Castro, Nívea Euclides, Bianca Gouveia, Virgílio Loriato, Hanna Caetano, Eulálio, Laura e Marco Aurélio pela prontidão em ajudar sempre que fosse preciso, pela amizade, cumplicidade, companheirismo, convívio e pela força.

Ao Rafinha e ao Adriano pela ajuda na casa de vegetação, prontidão e amizade

À Fábria, Mônica, Marlene, Gláucia e Wellington pela retaguarda, bastidores e convivência.

Ao Gilberto Saquetto Martins, Maximiller Dal-Bianco Lamas Costa, Humberto Josué de Oliveira Ramos e ao Marcelo Rogalski, por terem aceitado prontamente o convite para constituírem a banca de defesa e por terem contribuído imensamente na conclusão deste trabalho.

A todos que estiveram presentes em minha vida em Viçosa, não necessariamente diretamente relacionadas à Universidade, mas que foram especiais em momentos distintos João Francisco e Maria Pimenta, meus primos/amigos com os quais, eu sei, sempre pude contar. Foi um prazer estar com vocês!! À Clarissa Zambiasi, Luciana Canossa e à Maria Joana, por tornarem tudo mais suave.

Agradeço finalmente à FAPEMIG, à CAPES e a todo o povo brasileiro pela concessão da bolsa.

Muito obrigada!!!

## **BIOGRAFIA**

MAIANA REIS PIMENTA, filha de Marcos Sales Pimenta e Glória Maria Reis Pimenta, nasceu em 03 de julho de 1981 em Juíz de Fora Minas Gérias. Terminou o ensino médio no Colégio de Aplicação João XXIII, da Universidade Federal de Juíz de Fora (UFJF) em 1998.

Em junho de 2000 iniciou o curso de Ciências Biológicas na UFJF, vindo a graduar-se em fevereiro de 2004. Em março do mesmo ano, iniciou o curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Lavras (UFLA), na cidade de Lavras, Minas Gerais, defendendo a dissertação em março de 2006.

Em agosto de 2007 foi aprovada na seleção para professora substituta no Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFJF, onde permaneceu até julho de 2009. Em fevereiro de 2010 iniciou o curso de Doutorado em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), defendendo tese em fevereiro de 2015.

## ÍNDICE

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
General introduction.....	1
CAPÍTULO 1 - The stress-induced soybean NAC transcriptional factor GmNAC081 plays a role in developmentally programmed leaf senescence. ....	5
Abstract .....	8
Introduction.....	9
Results.....	13
Generation of transgenic lines that ectopically express GmNAC081.....	13
The growth-related phenotypes of Gm0NAC081-overexpressing lines.....	13
GmNAC081-overexpressing lines have an early leaf senescence phenotype .....	14
Alterations in the endogenous hormone levels of the GmNAC081-overexpressing lines...	17
The temporal and organ-specific expression of GmNAC081 .....	18
Downstream events in NRP/DCD-mediated cell death signaling in GmNAC081-overexpressing lines .....	19
Reducing GmNAC081 expression via virus-induced gene silencing (VIGS) delays leaf senescence.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Discussion.....	19
GmNAC081 is involved in natural leaf senescence in Arabidopsis .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
The GmNAC081/VPE regulatory cascade may couple stress-induced and age-dependent leaf senescence.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Materials and Methods .....	25
Plant expression cassettes and soybean transformation .....	25
PCR analysis of transgenic lines .....	25
Plant materials and growth conditions.....	26
Virus-induced silencing (VIGS) of the GmNAC081 gene.....	26
Measurements of photosynthesis .....	27
Chlorophyll content.....	28
Lipid peroxidation .....	28
Determination of ABA, SA and JA content .....	29
Determination of GUS activity .....	29
Location immunohistochemistry in situ GUS in tobacco organs.....	30
RNA Extraction, cDNA Synthesis and qRT-PCR.....	30

Statistical analyses.....	31
Funding.....	31
Disclosures.....	32
Acknowledgements .....	32
References.....	32
CAPÍTULO 2 - Mecanismo de controle transcricional da expressão do gene SbMATE em <i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench.....	62
Resumo.....	63
Introdução .....	64
Revisão de literatura.....	66
O Sorgo .....	66
Fisiologia do estresse por alumínio.....	67
Mecanismo de toxidez por alumínio .....	69
Mecanismos de tolerância ao alumínio .....	71
Regulação da expressão de genes de tolerância ao alumínio.....	76
Material e métodos.....	79
Análise da atividade do promotor SbMATE em plantas de Arabidopsis.....	79
Construção dos diferentes fragmentos do promotor de SbMATE fusionados ao gene repórter GUS .....	79
Transformação e análise histoquímica do padrão de expressão de GUS em plantas de Arabidopsis transgênicas.....	82
Determinação da atividade de GUS em plantas de Arabidopsis transformadas.....	83
Indução de estresses em plântulas transgênicas .....	83
Prospecção de transfatores que se liguem à região promotora de SbMATE .....	83
Obtenção da biblioteca de cDNA de sorgo submetido a tratamento de estresse por Alumínio .....	83
Determinação do título da biblioteca pGADT7-Rec2-cDNA .....	85
Clonagem da região promotora de SbMATE em vetor de expressão em levedura.....	86
Transformação de leveduras.....	87
Determinação da concentração de 3-amino-1,2,4-triazole (3AT) .....	87
Triagens de possíveis cDNAs que codificam fatores de transcrição que se liguem a região promotora de SbMATE a partir do sistema de mono-híbrido de leveduras.....	87
Análise in silico das proteínas candidatas .....	88
Interação de genes candidatos com o promotor de SbMATE da variedade SC283 de <i>Sorghum bicolor</i> .....	89

Resultados e discussão .....	90
Análise in silico do promotor de SbMATE.....	90
Screening da biblioteca de cDNA de raízes de Sorghum bicolor variedade SC566.....	100
Interação de genes candidatos ao promotor de SbMATE .....	104
Conclusões .....	112
Bibliografia .....	115

## RESUMO

PIMENTA, Maiana Reis, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2015. **Caracterização funcional e regulação de genes responsivos a estresses abióticos (*GmNAC081* e *SbMATE*) em plantas.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Coorientador: Marcelo Ehlers Loureiro.

O início da senescência foliar é uma mudança do desenvolvimento altamente regulada, que é controlada por ambos genética e ambiente. A senescência é desencadeada por reprogramação massiva de transcrição, mas informações funcionais sobre os seus mecanismos reguladores subjacentes é limitada. No presente estudo, foi realizada uma análise funcional do fator de transcrição de soja (*Glycine max*) *GmNAC081* induzido por estresse osmótico e do retículo endoplasmático (ER), durante senescência foliar natural, utilizando estudos de superexpressão e genética reversa. Linhagens superexpressando *GmNAC081*- exibiram floração e senescência foliar aceleradas, mas de outra forma se desenvolveram normalmente. A senescência foliar precoce de linhagens superexpressando *GmNAC081* foi associada com maior perda de clorofila, deterioração fotossintética mais rápida e maior expressão de genes de codificação de enzimas hidrolíticas alvo de *GmNAC081*, incluindo a enzima de processamento vacuolar (VPE), uma executora da morte celular programada (PCD) desencadeada no vacúolo. Por outro lado, o silenciamento de *GmNAC081* mediado por VIGS adia a senescência foliar e foi associado com reduções na perda de clorofila, a peroxidação lipídica e a expressão de alvos diretos de *GmNAC081*. Os estudos do promotor-repórter revelaram que o padrão de expressão *GmNAC081* foi associado com a senescência, em folhas de soja. Nossos dados indicam que *GmNAC081* é um regulador positivo da senescência dependente da idade e pode integrar as respostas de MCP induzida por estresse osmótico, do RE e senescência natural, completando o circuito regulamentar o *GmNAC081* / VPE. Além de estressores ambientais, muitas espécies de plantas são sensíveis a concentrações micromolares de Al. Em sorgo, o gene de resistência ao alumínio é *SbMATE*, altamente expresso no ápice da radícula e codifica um transportador de membrana que pertencem à família MATE (*multidrug and toxic compound extrusion family*), que é responsável pelo efluxo citrato ativado por alumínio. Nesta espécie a região codificadora do gene de

tolerância ao alumínio é idêntica entre cultivares tolerantes e sensíveis. Além de um polimorfismo encontrado no segundo íntron, elementos transponíveis do tipo MITE foram detectados na região promotora, sendo o número de repetições MITE positivamente relacionada com a tolerância. Neste trabalho, a análise *in silico* do promotor de SbMATE apresentou sequências típicas de promotores eucarióticos assim como a presença de elementos *cis* regulatórios que conferem tolerância ao alumínio em *Arabidopsis*. A ausência de atividade de promotores inteiros transformados em *Arabidopsis* sugerem a presença de elementos *cis* regulatórios negativos reprimindo a atividade em *Arabidopsis* ou ainda, a presença de silenciamento transcricional por RNA de interferência em *Arabidopsis* que não ocorre em *Sorghum*. Deleções do promotor, mostraram que os repressores estão localizados na sequência do elemento transponível já que na ausência deste elemento, o promotor passa a ser ativo em todas as partes da planta de forma independente da idade. A prospecção por fatores de transcrição que controlam a capacidade de resposta do gene SbMATE de *Sorghum* e a análise da interação entre prováveis fatores com o promotor de SbMATE, foram realizadas através do sistema mono-híbrido em leveduras e evidenciaram a necessidade da obtenção de uma nova biblioteca de cDNA confeccionada por um kit mais adequado à esta planta, além da utilização de diferentes vetores de clonagem para as análises das iterações.

## ABSTRACT

PIMENTA, Maiana Reis, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2015. **Functional characterization and regulation of abiotic stress-responsive genes (*GmNAC081* and *SbMATE*) in plants.** Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-adviser: Marcelo Ehlers Loureiro.

The onset of leaf senescence is a highly regulated developmental change that is controlled by both genetics and the environment. Senescence is triggered by massive transcriptional reprogramming, but functional information about its underlying regulatory mechanisms is limited. In the current investigation, we performed a functional analysis of the soybean (*Glycine max*) osmotic stress- and endoplasmic reticulum (ER) stress-induced NAC transcription factor *GmNAC081* during natural leaf senescence using overexpression studies and reverse genetics. *GmNAC081*-overexpressing lines displayed accelerated flowering and leaf senescence but otherwise developed normally. The precocious leaf senescence of *GmNAC081*-overexpressing lines was associated with greater chlorophyll loss, faster photosynthetic decay and higher expression of hydrolytic enzyme- encoding *GmNAC081* target genes, including the vacuolar processing enzyme (VPE), an executioner of vacuole-triggered programmed cell death (PCD). Conversely, VIGS-mediated silencing of *GmNAC081* delayed leaf senescence and was associated with reductions in chlorophyll loss, lipid peroxidation and the expression of *GmNAC081* direct targets. Promoter-reporter studies revealed that the expression pattern of *GmNAC081* was associated with senescence in soybean leaves. Our data indicate that *GmNAC081* is a positive regulator of age-dependent senescence and may integrate osmotic stress- and ER stress-induced PCD responses with natural leaf senescence through the *GmNAC081*/VPE regulatory circuit. In addition to environmental stressors, many plant species are sensitive to micromolar concentrations of Al. In sorghum, aluminum resistance *SbMATE* gene is highly expressed at the apex of the radicle and encodes a membrane transporter belonging to MATE family (multidrug and toxic Compound Extrusion family), which is responsible for the efflux activated aluminum citrate. In this species the coding region of the aluminum tolerance gene is identical between tolerant

and sensitive cultivars. In a polymorphism is found in the second intron, the MITE type transposable elements were detected in the promoter region, the number of repetitions MITE positively related tolerance. In this work, the analysis in silico showed typical SbMATE promoter sequences of eukaryotic promoters, as well as the presence of cis regulatory elements that confer tolerance in Arabidopsis. The absence of whole promoter activity in transformed Arabidopsis suggesting the presence of negative regulatory cis-elements repressing the activity in Arabidopsis or the presence of transcriptional silencing by RNA interference in Arabidopsis does not occur in sorghum. Deletions promoter showed that the repressors are located in sequence as the transposable element in the absence of this element, the promoter becomes active in every part regardless of the age of plant form. Prospecting for transcription factors that control the responsiveness of SbMATE Sorghum gene and analysis of the interaction between likely transfactores with SbMATE promoter, were performed using mono-hybrid system in yeast and demonstrated the need for obtaining a new cDNA library made for a more appropriate for this plant kit, besides the use of different cloning vectors for analysis of iterations.

## General introduction

As sessile organisms, plants must adapt to a continuously changing environment in order to survive. Upon perceiving stress signals, plants activate signaling pathways to modulate their development and adaptive responses. The responses to environmental cues are complex and to a large extent interconnected with developmental signaling programs to orchestrate the final plant response. This interplay of stress responses with developmentally regulated molecular programs is one of the major topics for molecular physiologists, because the outcome of the integrated response can lead to susceptibility or tolerance of plants to adverse conditions of the environment. Abiotic stresses, such as high temperature, salinity and drought, pose major constraints for the agriculture worldwide and, particularly in the case of Brazil, the soil acidity and aluminum toxicity enhance the list of challenges and restrictions for plant growth, development and productivity.

Genome-wide analyses in different plant species under different stress conditions have uncovered an intense cross-talk among the stress-specific adaptive signaling cascades. It has become apparent that plants transduce environmental signals through integrated networks between different stress-induced adaptive responses. Among other consequences, high temperature, salinity and drought cause an excessive accumulation of reactive oxygen species (ROS) in plant cells and all these environmental stressors commonly induce leaf senescence. As a consequence, it is expected that the responses to prolonged abiotic stresses converge to programmed cell death (PCD) and interact to some extent with developmentally programmed senescence signaling. Nevertheless, knowledge about the integration of a stress-specific response into a leaf senescence developmental program is very limited.

Recently, an integrative pathway that converge the endoplasmic reticulum stress and osmotic stress signals into a PCD response was uncovered in soybean (Isrigler *et al.*, 2007, Costa *et al.*, 2008, Reis *et al.*, 2011, Reis and Fontes, 2012). The ER stress- and osmotic stress-integrated pathway initiates with the up-regulation of the transcription factor GmERD15-like, which in turn binds to the NRP/DCD promoter to induce the expression of the NRP/DCD gene (Alves *et al.*, 2011). Up-regulation of NRP/DCD mediates the up-regulation of two NAC transcription factors, GmNAC081 and GmNAC039, which interact to each other to full transactivate the expression of the VPE

gene, an executioner of the stress-induced cell death program (Faria *et al.*, 2011, Hara-Nishimura *et al.*, 2011, Mendes *et al.*, 2013). The components of the NRP-mediated cell death response, which include GmERD15, NRP-A, NRP-B and GmNAC081, are coordinately induced by several biotic and abiotic stimuli (Pinheiro *et al.*, 2009, Faria *et al.*, 2011). It is likely that the NRP-mediated cell death signaling pathway represents a common response of plant cells to a variety of different stimuli. NRP-B, GmNAC081 and VPE, are also up-regulated during natural leaf senescence (Carvalho *et al.*, 2014), but the involvement of this signaling cascade in age-dependent leaf senescence remains to be determined.

In addition to environmental stressors, many plant species are sensitive to micromolar concentrations of Al. Since solubilization of Al from ligand-bound Al and aluminosilicates is enhanced by low pH, Al toxicity is a major factor limiting plant production on acid soils. As a major soil constraint to biomass production, a considerable effort has been invested on the study of Al tolerance in major crops (Kochian *et al.*, 2015). In sorghum, the inheritance of Al tolerance was investigated in a F2:3 segregating population derived from crosses between the tolerant SC283 line and the susceptible BR007 line (Magalhães *et al.*, 2004). Subsequently the Al resistant gene SbMATE was isolated by positional cloning (Magalhães *et al.*, 2007). SbMATE is highly expressed in the radicle apex and encodes a membrane transporter belonging to the MATE (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion family*) family, which is responsible for the Al-activated citrate efflux. In the tolerant line, the levels of SbMATE expression are increased with the duration of Al exposition. The citrate released in response to Al forms an insoluble and stable complex with Al ions preventing Al uptake by the roots (Magalhães *et al.*, 2007). Despite the potential relevance of the SbMATE gene, the regulatory mechanisms that control tissue-specific expression and induction by Al remain elusive.

Given that both soybean and sorghum represent economically relevant crops to the Brazilian agribusiness, in this investigation we attempted to conduct functional and regulatory analysis of the genes GmNAC081 from soybean and SbMATE from sorghum, which represent relevant traits towards the development of superior crops. The first one referred to the proposal to investigate the GmNAC081 function.

The chapter I describes a functional characterization of the stress-responsive GmNAC081 gene from soybean under normal growth conditions. GmNAC081 was first identified as a downstream component of the stress-induced DCD/NRP-mediated signaling, which transduces a cell death signal into a programmed cell death (PCR) event

as an adaptive plant response to multiple stresses. Here, we showed that GmNAC081 also plays a relevant role in developmentally programmed leaf senescence and may integrate developmental senescence signals and environmental cues into a shared PCD response through the vacuolar processing enzyme, VPE, an executioner of vacuole collapse-mediated PCD. The chapter II describes the prospection of transcriptional factors controlling the aluminum responsiveness of the *SbMATE* gene from sorghum and an analysis of the *SbMATE* promoter activity in Arabidopsis.

- Alves, M.S., Reis, P.A., Dadalto, S.P., Faria, J.A., Fontes, E.P.B., and Fietto, L.G.** (2011). A novel transcription factor, ERD15 (Early Responsive to Dehydration 15), connects endoplasmic reticulum stress with an osmotic stress-induced cell death signal. *J. Biol. Chem.* **286**, 20020-20030.
- Carvalho H.H., Silva P.A., Mendes G.C., Brustolini O.J.B., Pimenta M.R., Gouveia B.C., Valente M.A.S., Ramos H.J.O., Soares-Ramos J.R.L., Fontes E.P.B.** (2014) The Endoplasmic Reticulum Binding Protein BiP Displays Dual Function in Modulating Cell Death Events. *Plant Physiol.* **164**, 654-670.
- Costa, M.D., Reis, P.A., Valente, M.A., Irsigler, A.S., Carvalho, C.M., Loureiro, M.E., Aragao, F.J., Boston, R.S., Fietto, L.G., and Fontes, E.P.B.** (2008). A new branch of endoplasmic reticulum stress signaling and the osmotic signal converge on plant-specific asparagine-rich proteins to promote cell death. *J. Biol. Chem.* **283**, 20209-20219.
- Faria, J.A., Reis, P.A., Reis, M.T., Rosado, G.L., Pinheiro, G.L., Mendes, G.C., and Fontes, E.P.B.** (2011). The NAC domain-containing protein, GmNAC6, is a downstream component of the ER stress- and osmotic stress-induced NRP-mediated cell-death signaling pathway. *BMC Plant Biol.* **11**, 129.
- Hara-Nishimura, I., Hatsugai, N., Nakaune, S., Kuroyanagi, M., and Nishimura, M.** (2011). Vacuolar processing enzyme: an executor of plant cell death. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 404-408.
- Irsigler, A.S., Costa, M.D., Zhang, P., Reis, P.A., Dewey, R.E., Boston, R.S., and Fontes, E.P.B.** (2007). Expression profiling on soybean leaves reveals integration of ER- and osmotic-stress pathways. *BMC genomics* **8**, 431.
- Magalhães, J.V., Garvin, D.F., Wang, Y., Sorrells, M.E., Klein, P.E., Schaffert, R.E., Li, L., Kochian, L.V.** (2004). Comparative mapping of a major aluminum

- tolerance gene in sorghum and other species in the *Poaceae*. *Genetics* **167**: 1905-1914.
- Magalhães, J.V., Liu, J., Guimarães, C.T., Lana, U.G.P., Alves, V.M.C., Wang, Y.-H., Schaffert, R.E., Hoekenga, O.A., Piñeros, M.A., Shaff, J.E., Klein, P.E., Carneiro, N.P., Coelho, C.M., Trick, H.N., Kochian, L.V.** (2007). A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. *Nature Genetics* **39**, 1156-1161.
- Mendes G.C., Reis P.A.B., Calil I.P., Carvalho H.H., Aragão F.J.L., Fontes E.P.B.** (2013) GmNAC30 and GmNAC81 integrate the endoplasmic reticulum stress- and osmotic stress-induced cell death responses through a vacuolar processing enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 19627-19632.
- Pinheiro, G.L., Marques, C.S., Costa, M.D., Reis, P.A., Alves, M.S., Carvalho, C.M., Fietto, L.G., Fontes, E.P.** (2009). Complete inventory of soybean NAC transcription factors: sequence conservation and expression analysis uncover their distinct roles in stress response. *Gene* **444**, 10-23.
- Reis, P.A., Fontes, E.P.B.** (2012). N-rich protein (NRP)-mediated cell death signaling: a new branch of the ER stress response with implications for plant biotechnology. *Plant Sig. Behav.* **7**, 628-632.
- Reis, P.A., Rosado, G.L., Silva, L.A., Oliveira, L.C., Oliveira, L.B., Costa, M.D., Alvim, F.C., Fontes, E.P.B.** (2011). The binding protein BiP attenuates stress-induced cell death in soybean via modulation of the N-rich protein-mediated signaling pathway. *Plant Physiol.* **157**, 1853-1865.
- Kochian L.V., Piñeros M.A., Liu J., Magalhaes JV.** (2015) Plant Adaptation to Acid Soils: The Molecular Basis for Crop Aluminum Resistance. *Annu. Rev. Plant Biol.* **66**, 23.1–23.28.

## CAPÍTULO 1

**The stress-induced soybean NAC transcriptional factor GmNAC081 plays a role in developmentally programmed leaf senescence.**

Maiana Reis Pimenta, Priscila Alves da Silva, Giselle Camargo Mendes, Janaína Roberta Alves, Hanna Durso Neves Caetano, Joao Paulo Batista Machado, Otavio José Bernardes Brustolini, Maximiller Dal-Bianco Lamas Costa, Edgard Augusto de Toledo Picoli, Francisco José Lima Aragão, Humberto Josué de Oliveira Ramos, Elizabeth Pacheco Batista Fontes. The stress-induced soybean NAC transcriptional factor GmNAC081 plays a role in developmentally programmed leaf senescence. *Plant & Cell Physiology, in preparation.*

**The stress-induced soybean NAC transcription factor GmNAC081 plays a positive role in developmentally programmed leaf senescence**

**Running Head: Control of leaf senescence by GmNAC081**

Corresponding author: Dr E. P. B. Fontes

National Institute of Science and Technology in Plant-Pest

Interactions, Departamento de Bioquímica e Biologia

Molecular/Bioagro Universidade Federal de Viçosa,

36570.000, Viçosa, MG, Brazil

Phone: +55 31 3899 2949, Fax: +55 31 3899 2864, E-mail address: [bbfontes@ufv.br](mailto:bbfontes@ufv.br)

Subject area: growth and development

Number of black and white figures: 4

Colour figures: 6

Number of supplementary material: 1

**The stress-induced soybean NAC transcription factor GmNAC081 plays a positive role in developmentally programmed leaf senescence**

Maiana Reis Pimenta<sup>1,3</sup>, Priscila Alves Silva<sup>1</sup>, Giselle Camargo Mendes<sup>1</sup>, Janaína Roberta Alves<sup>1,2</sup>, Hanna Durso Neves Caetano<sup>1,2</sup>, Joao Paulo Batista Machado<sup>1,2</sup>, Otavio José Bernardes Brustolini<sup>1,2</sup>, Maximillir Dal-Bianco Lamas Costa<sup>1,2</sup>, Edgard Augusto Toledo Picoli<sup>3</sup>, Francisco José Lima Aragao<sup>4</sup>, Humberto Josué Oliveira Ramos<sup>1,2</sup>, Elizabeth Pacheco Batista Fontes<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>National Institute of Science and Technology in Plant-Pest Interactions,

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/Bioagro, and

<sup>3</sup>Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, 36570.000, Viçosa, MG, Brazil

<sup>4</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB W5 Norte, 70770-900, Brasília, DF, Brazil

Abbreviations: SAG, senescence-associated genes; TF, transcription factor; PCD, programmed cell death; NRP/DCD, developmental cell death (DCD) domain-containing N-rich protein (NRP); GmERD15, Glycine max early responsive to dehydration 15; VPE, vacuolar processing enzyme; NAC, no apical meristem (NAM), Arabidopsis ATAF1/2, and cup-shaped cotyledon (CUC); ABA, abscisic acid; SA, salicylic acid; MeJA, methyl jasmonate.

## Abstract

The onset of leaf senescence is a highly regulated developmental change that is controlled by both genetics and the environment. Senescence is triggered by massive transcriptional reprogramming, but functional information about its underlying regulatory mechanisms is limited. In the current investigation, we performed a functional analysis of the soybean (*Glycine max*) osmotic stress- and endoplasmic reticulum (ER) stress-induced NAC transcription factor GmNAC081 during natural leaf senescence using overexpression studies and reverse genetics. *GmNAC081*-overexpressing lines displayed accelerated flowering and leaf senescence but otherwise developed normally. The precocious leaf senescence of *GmNAC081*-overexpressing lines was associated with greater chlorophyll loss, faster photosynthetic decay and higher expression of hydrolytic enzyme- encoding GmNAC081 target genes, including the vacuolar processing enzyme (VPE), an executioner of vacuole-triggered programmed cell death (PCD). Conversely, VIGS-mediated silencing of *GmNAC081* delayed leaf senescence and was associated with reductions in chlorophyll loss, lipid peroxidation and the expression of GmNAC081 direct targets. Promoter-reporter studies revealed that the expression pattern of *GmNAC081* was associated with senescence in soybean leaves. Our data indicate that GmNAC081 is a positive regulator of age-dependent senescence and may integrate osmotic stress- and ER stress-induced PCD responses with natural leaf senescence through the GmNAC081/VPE regulatory circuit.

Keywords: GmNAC081, transcription factor, leaf senescence, regulatory circuit, soybean, *Glycine max*, NAC family, developmental regulation.

## Introduction

Leaf senescence is a developmental process that begins with the transition of a photosynthetic leaf organ to an actively degenerating, nutrient-recycling leaf tissue. Senescence ensures the recycling of resources from senescent leaves to other plant organs to support growth and reproduction, and it becomes visible via leaf yellowing due to chlorophyll loss. Leaf senescence is genetically linked to aging and involves the regulated expression of senescence-associated genes (SAG; Yoshida, 2003; Lim *et al.*, 2007). Several SAGs also respond to environmental stressors and may integrate stress-induced regulatory cascades with developmental signals (Balazadeh *et al.*, 2010). The massive changes in gene expression that accompany the onset of leaf senescence are likely controlled by a subset of senescence-associated transcription factors (TFs), but their potential functions and the regulatory cascades that they control are largely unknown. Recently, high-resolution temporal expression profiles revealed that a large fraction of NAC [for *no apical meristem* (*NAM*), Arabidopsis *ATAF1/2*, and *cup-shaped cotyledon* (*CUC*)] TFs are differentially expressed during several stages of natural leaf senescence in Arabidopsis (Breeze *et al.*, 2011), suggesting that they play a crucial role in the regulation of senescence; however, functional information is available for only a few family members (Guo and Gan, 2006; Kim *et al.*, 2009; Balazadeh *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012).

The NAC domain-containing TFs make up a large family of plant-specific TFs that are involved in development and stress responses (Xie *et al.*, 2000; Fujita *et al.*, 2004; Olsen *et al.*, 2005; Guo and Gan, 2006; Kim *et al.*, 2009). The *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana* genomes contain 151 and 126 annotated NAC family members, respectively (<http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de>). In soybean, the NAC family is represented by at least 152 members (Pinheiro *et al.*, 2009; Nuruzzaman *et al.*, 2010; Le *et al.*, 2011). NAC TFs share a conserved domain at the N-terminus, designated the NAC domain, which is responsible for their DNA binding activity. The NAC domain is formed by two exons comprising 150 amino acid residues and can be further divided into five conserved sub-domains named A through E. The C-terminal region is more divergent in sequence and size and contains a potential transcriptional regulatory (TR) domain that has either activator or repressor functions (Ren *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2000; Duval *et al.*, 2002; Ooka *et al.*, 2003; Nakashima *et al.*, 2012); it may

sometimes possess protein binding activity and an additional transmembrane domain (Seo *et al.*, 2010; Tran *et al.*, 2009). Although the majority of the NAC domain-containing proteins localize in the nucleus, a subset of NAC proteins are inserted into the plasma membrane (Kim *et al.*, 2007; Seo *et al.*, 2010). Activation of these membrane-tethered NAC proteins results in their regulated proteolysis, release from the plasma membrane and translocation to the nucleus (Yang *et al.*, 2014a; 2014b; Lee *et al.*, 2014).

The NAC TFs have emerged as relevant players in the control of plant defenses against environmental aggressors (Hegedus *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2005; Nakashima *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2007). Genome-wide expression profiling in Arabidopsis, rice and soybean has revealed that each of these TFs is induced by at least one type of abiotic stress, such as salt, drought, and cold, as well as by the hormone abscisic acid (ABA) (Fujita *et al.*, 2004; Kawaura *et al.*, 2008; Fang *et al.*, 2008, Nuruzzaman *et al.*, 2010; Le *et al.*, 2011). Global expression analysis using 22K and 44K microarrays has uncovered 45 abiotic stress-responsive NAC genes and 26 biotic stress-induced NAC genes in rice (Nuruzzaman *et al.*, 2010). The majority of the NAC genes have been shown to respond to salt and high temperature (Jensen *et al.*, 2010; Zeller *et al.*, 2009). Such studies have demonstrated that NACs can be regulated either in an ABA-dependent or ABA-independent manner depending on the cis-regulatory elements present in their promoters. These transcription factors also play relevant roles in the regulation of plant defense against pathogens, in response to mechanical injuries, and in response to salicylic acid (SA). An increase in the expression of NAC genes has also been observed in response to viral, fungal and bacterial attack (Xia *et al.*, 2010a; Xia *et al.*, 2010b; Hegedus *et al.*, 2003; Ren *et al.*, 2000; Collinge and Boller, 2001; Selth *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2007; Mysore *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2009a, Wang *et al.*, 2009b; Jeong *et al.*, 2008; Oh *et al.*, 2005).

Although the NAC proteins represent a large fraction of the senescence-regulated TFs in several plants, biological functions have been assigned to only a few senescence-regulated NACs (Andersson *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2004; Lin and Wu, 2004; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Gregersen and Holm, 2007; Balazadeh *et al.*, 2008). In Arabidopsis, the *AtNAP* (*ANAC029*) gene, encoding a NAC domain-containing TF, is up-regulated during leaf senescence (Guo and Gan, 2006). Leaf senescence occurs early in *AtNAP*-overexpressing plants, whereas the loss of *NAP*

function delays its onset. The downstream targets of AtNAP include SAG113, a phosphatase 2C- encoding gene, which regulates ABA-mediated stomatal movement and water loss during leaf senescence (Zhang *et al.*, 2012; Zhang and Gan, 2012). *NAP* genes from rice and kidney bean, *OsNAP* and *PvNAP*, respectively, have been shown to restore the delayed leaf senescence caused by *atnap* null alleles, suggesting that the *AtNAP* gene may be a universal transcriptional factor in the regulation of leaf senescence (Guo and Gan, 2006). Therefore, the manipulation of *AtNAP* expression levels may be a novel strategy to control leaf senescence in economically relevant crops. The NAC family member *ANAC092/AtNAC2/ORE1* has also been identified as a positive regulator of leaf senescence-induced cell death in *Arabidopsis* (Kim *et al.*, 2009; Balazadeh *et al.*, 2010; Balazadeh *et al.*, 2011). Microarray hybridizations identified 218 genes that are differentially expressed during senescence and are potential targets of ANAC092 (Balazadeh *et al.*, 2010). Similarly, the ABA-responsive NAC gene *VND-INTERACTING2 (VNI2, ANAC083)* can integrate ABA-mediated abiotic stress signals into leaf aging by regulating a subset of *COR* (cold-regulated) and *RD* (responsive to dehydration) genes (Yang *et al.*, 2011). In addition, the NAC transcription factor NTL4 plays a role in promoting drought-induced senescence in *Arabidopsis* (Lee *et al.*, 2012), whereas JUNGBRUNNEN1 (JUB1), a reactive oxygen species-responsive NAC TF, negatively regulates longevity in *Arabidopsis* (Wu *et al.*, 2012). In rice, the NAC transcription factor OsNAC5 has been associated with natural senescence (Sperotto *et al.*, 2009), and in soybean, at least two NAC genes, *GmNAC081* and *GmNAC030*, have been shown to be involved in stress-induced leaf senescence (Pinheiro *et al.*, 2009, Faria *et al.*, 2011, Reis *et al.*, 2011, Mendes *et al.*, 2013).

The soybean NAC transcription factors GmNAC081 (previously designated GmNAC6; Faria *et al.*, 2011) and GmNAC030 integrate signals from osmotic stress and endoplasmic reticulum stress into a programmed cell death (PCR) response. The stress-induced cell death pathway initiates signaling by inducing the transcription factor *Glycine max* early responsive to dehydration 15 (GmERD15), which, in turn, activates the expression of the developmental cell death (DCD) domain-containing N-rich protein (NRP) by binding to its promoter. NRP/DCD proteins activate a signaling cascade that leads to the induction of *GmNAC081* and *GmNAC030*. When ectopically expressed in soybean protoplasts and in *Nicotiana benthamiana* leaves, the osmotic stress- and ER stress-induced GmNAC081 and GmNAC030 proteins induce a cell death

response bearing the hallmarks of leaf senescence and programmed cell death (PCD), such as the induction of caspase 1-like activity, DNA fragmentation, chlorophyll loss, protein degradation, enhanced lipid peroxidation and the induction of senescence-associated marker genes (Costa *et al.*, 2008; Faria *et al.*, 2011, Reis *et al.*, 2011; Mendes *et al.*, 2013).

GmNAC081 is nuclear-localized, and GmNAC030 was identified because of its capacity to interact with GmNAC081 in the nuclei of stressed cells (Mendes *et al.*, 2013). Consistent with having a role in PCD, GmNAC081 and GmNAC030 bind to and coordinately transactivate the promoters of hydrolytic enzymes in soybean protoplasts. One such direct downstream target gene, the vacuolar processing enzyme (VPE), exhibits caspase 1-like activity and is the executioner of vacuolar collapse-mediated cell death, a type of plant-specific PCD that is triggered by the vacuole and is induced during pathogenesis and plant development (Kinoshita *et al.*, 1999; Hatsugai *et al.*, 2004; Yamada *et al.*, 2004, Hara-Nishimura *et al.*, 2011). GmNAC030 is stress-induced and works together with GmNAC081 to activate PCD by inducing VPE. Therefore, GmNAC081, GmNAC030 and VPE constitute a regulatory cascade that controls stress-induced senescence.

However, the expression of the components of this stress-induced senescence signaling pathway, such as GmNAC081, its partner GmNAC030 and the upstream regulator NRP/DCD, has also been associated with the onset and progression of natural leaf senescence (Carvalho *et al.*, 2014). Likewise, the downstream target *VPE* is highly expressed during leaf senescence and has also been linked to developmental PCD (Carvalho *et al.*, 2014; Nakaune *et al.*, 2005), raising the possibility that the NRP-GmNAC081-VPE module might function in age-dependent leaf senescence, as well. In the present investigation, we examined the possible role of GmNAC081 in natural leaf senescence through overexpression studies and reverse genetics. Our data indicate that GmNAC081 is a positive regulator of age-dependent leaf senescence and may connect the integrative PCD response to osmotic and ER stress with natural leaf senescence in soybean.

## Results

### Generation of transgenic lines that ectopically express GmNAC081

To examine the possible function of GmNAC081 in senescence under normal growth conditions, we generated several independent transgenic lines that expressed *GmNAC081* under the control of the 35S cauliflower mosaic virus promoter and the polyadenylation signal of the nopaline synthase (*nos*) gene. The incorporation of the transgene was verified in the subsequent generations by PCR and segregation analysis; and the expression levels of the transgene were analyzed by qRT-PCR. The independently transformed lines 35S::GmNAC81.1, 35S::GmNAC81.2 and 35S::GmNAC81.3 (Figure S1A), which were homozygous, accumulated higher levels of *GmNAC081* mRNA (Figure S1B) than the wild-type control, BR16, and were selected for further analysis. The selected transgenic lines expressed higher levels of *GmNAC081* transcripts throughout development, although to different extents (Figure S1B).

### The growth-related phenotypes of GmNAC081-overexpressing lines

The developmental stages of the plants were scored using the Fehr and Caviness (1977) classification for the vegetative (V1-V11) and reproductive (R1-R8) phases. The wild-type and *GmNAC081*-overexpressing lines were grown in randomized blocks to compare phenotypic changes in growth and development. In general, the life cycle of the *GmNAC081*-overexpressing BR16 transgenic lines was accelerated, with a length in the range of 117-120 days, compared with the 122-125-day life cycle of the untransformed BR16 control (Figure S2). Apart from transgenic line 35S::GmNAC81-3, which had a similar number of nodes as the wild-type, the other two *GmNAC081* overexpressors, 35S::GmNAC81-1 and 35S::GmNAC81-2, had significantly more nodes throughout development (Figure 1A). This difference in the number of nodes did not alter growth; the height of the the transgenic lines did not differ significantly from that of the wild-type control (Figure 1B), although there was a clear bias for a positive relationship between the number of nodes and size. During the vegetative

phase, the growth parameters among the genotypes were indistinguishable; they displayed determinate stem growth with a desacceleration in the height increase rate and in quantity of nodes between the beginning bloom (R1) and stem termination (ST) stages. Although growth apparently ceased after flowering, the shoot and root biomass of wild-type and *GmNAC081*-overexpressing lines continued to increase, reaching a plateau at 96 days after germination (DAG), when the seeds were full (R6) and maturation had begun (R7; Figure 1C and 1D). The shoot and root biomass of the transgenic lines did not differ significantly from the wild-type control until 96 DAG, when the root biomass of wild-type became significantly greater than that of the transgenic lines. Similarly, pod number, seed number and seed weight were comparable between the genotypes (Figure 2). By contrast, the *GmNAC081*-overexpressing lines flowered earlier and progressed more quickly towards the stages of soybean reproductive development (R1-R8) than the wild-type control (Figure 3). Although the beginning bloom (R1) stage could not be precisely distinguished from full bloom (R2), they started at 47 for transgenic lines 35S::GmNAC81.2 and 35S::GmNAC81.3; at 53DAG for wild-type; and at an intermediate point for the 35S::GmNAC81.1 line (Figure 3). The acceleration of the early reproductive stages in the transgenic lines led to a faster progression to the subsequent R3 (beginning pod) and R4 (full pod) developmental stages compared with wild-type. Likewise, all the subsequent reproductive stages, from R5 (beginning seed), R6 (full seed), and R7 (beginning maturity) to full maturation (R8) occurred sooner in the *GmNAC081*-overexpressing lines, although to different extents. The reproductive phase of the 35S::GmNAC81-3 and 35S::GmNAC81-3 lines was more highly accelerated than that of 35S::GmNAC81-1.

### **GmNAC081-overexpressing lines have an early leaf senescence phenotype**

Our results showed that at early stages of growth and development, the *GmNAC081*-overexpressing lines appeared normal (Supplemental Figures S2 and 1), but leaf senescence was remarkably precocious, as judged by the progression of leaf yellowing in *GmNAC081*-overexpressing lines compared with the wild-type control (Supplemental Figure S2). Leaf yellowing occurred more quickly and was more severe in the GmNAC81-2 and GmNAC81-3 lines (Figure 4A and 4B), which correlated with the levels of *GmNAC081* transcripts in the transgenic lines (Figure S1B). This

premature leaf senescence phenotype also correlated fairly well with the chlorophyll content (Figure 4C). Chlorophyll loss occurred earlier and was significantly more severe in *GmNAC081*-overexpressing lines compared with the wild-type parental BR16 plants, and slight differences were observed among the overexpressing lines. The leaf senescence phenotype was further examined by assessing senescence-associated lipid peroxidation via measuring the accumulation of thiobarbituric acid (TBA)-reactive compounds such as malondialdehyde (MDA) (Figure 4D). Compared with the untransformed BR16 line, the concentration of thiobarbituric acid (TBA)-reactive compounds increased more rapidly in the transgenic lines and reached a significantly greater content at 103 DAG.

As a complementary hallmark for leaf senescence, we also monitored photosynthetic activity throughout development. During the vegetative phase and until the R4 (full pod) stage, the rate of photosynthesis did not differ significantly between the wild-type and *GmNAC081*-overexpressing lines (Figure 4E). However, during the R5 stage (between days 75 and 82), photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation reached a plateau and was significantly higher in the *GmNAC081*-overexpressing lines than in the wild-type control. Nevertheless, after 82 days, during the progression of leaf senescence, CO<sub>2</sub> assimilation declined more drastically in the *GmNAC081*-overexpressing lines than in the wild-type control, and at 103 days, it was significantly lower in the GmNAC81-2 and GmNAC81-3 lines than in the wild-type. The transpiration rate (E) and stomatal conductance (gs) displayed the same trend as the photosynthetic rate (Figure S3A and S3B).

The evidence for an earlier reduction in photosynthesis in the overexpression lines was further supported by regression analysis of the data (Figure S4). Quadratic models were the best fit for the developmental timeline of all genotypes (BR16  $R^2=0.85$ , 35S::GmNAC81.1  $R^2=0.849$ , 35S::GmNAC81.2  $R^2=0.92$ , 35S::GmNAC81-3  $R^2=0.88$ ) (Figure S4A). The confidence limits of both the maximum peak values and the areas under the curves revealed no differences in the photosynthetic rate among the genotypes (Figure S4B and S4C). However, when the analysis was restricted to the data on photosynthesis during later developmental stages (senescence), linear models were the best fit (BR16  $R^2 = 0.8741$ , 35S::NAC81.1  $R^2 = 0.9356$ , 35S::NAC81.2  $R^2 = 0.9178$ , 35S::NAC81.3  $R^2 = 0.9034$ ), and these linear functions uncovered significant differences between BR16 and the

*GmNAC081*-overexpressing lines (Figure S4D). The confidence limits of the slopes indicated that the 35S::*GmNAC81* lines clearly had a greater decay rate than BR16, i.e., the 35S::*GmNAC81* genotypes may senesce earlier than BR16.

We also observed that the respiration rate in the wild-type and the *GmNAC081*-overexpressing lines paralleled the developmental timeline of the reproductive phase (Figure 4F). The respiration rate reached a plateau at 89 days in the transgenic lines, but it declined more rapidly in the *GmNAC081*-overexpressing lines than in wild-type untransformed BR16 control (Figure 4F). The premature leaf senescence phenotype of the *GmNAC081*-overexpressing lines was also supported by late-stage changes in the maximum photochemical efficiency of PSII in the dark-adapted state ( $F_v/F_m$ ; Figure 4G). A senescing leaf often loses its photosynthetic activity, as reflected by a decline in the  $F_v/F_m$  ratio. The  $F_v/F_m$  ratio started to decline at 96 days, and at 110 days, the *GmNAC081*-overexpressing lines had significantly lower  $F_v/F_m$  ratios than did the wild-type.

During gas exchange analyses, the  $CO_2$  concentration was kept constant, such that the variations in  $C_i/C_a$  ratio reflected variations in the internal  $CO_2$  concentration ( $C_i$ ). During all developmental stages, the  $C_i/C_a$  ratio of the *GmNAC081*-overexpressing lines was similar to that of wild-type (Figure 4H). Nevertheless, at later stages of development, the  $C_i/C_a$  ratio was slightly higher in the *GmNAC081*-overexpressing lines than in the wild-type, indicating less  $CO_2$  fixation in the transgenic lines. However, at 117 days, the  $C_i/C_a$  ratio fell significantly in the *GmNAC081*-overexpressing lines. This drastic reduction of  $C_i/C_a$  in the transgenic lines at 117 days was due to the faster abscission of their leaves, which was consistent with the premature leaf senescence phenotype of the lines.

The photosynthetic activity of the soybean lines was also evaluated by measuring chlorophyll fluorescence parameters including the electron transport rate (ETR), non-photochemical quenching (qN) and photochemical quenching (qP) (Figure S5). Photochemical processes, as measured by qP and ETR, progressively declined during development, whereas the energy dissipation, qN, did not change.

We further investigated the expression of senescence-associated marker genes such as *NRP-B* (Carvalho *et al.*, 2014) and *GmCysP* (for Cys protease 1; Valente *et al.*, 2009) at 82 days, when the rate of photosynthesis and the chlorophyll content started to decline in the *GmNAC081*-overexpressing leaves, marking the onset of

senescence. As shown in Figure 4I and 4J, the accumulation of senescence-associated marker gene transcripts was significantly higher in the *GmNAC081*-overexpressing lines than in the BR16 wild-type control. These data confirmed the precocious leaf senescence phenotype of the transgenic plants at the molecular level.

### **Alterations in the endogenous hormone levels of the *GmNAC081*-overexpressing lines**

Although leaf senescence is genetically programmed in an age-dependent manner, it can be triggered by environmental cues and is also positively and negatively regulated by various plant hormones. The phytohormones ABA, jasmonic acid (JA) and SA are positive regulators of senescence, and their endogenous levels increase during the senescence process (Zhang and Zhou, 2013). We analyzed the expression of *GmNAC081* in response to these three hormones and to stress conditions that are known to trigger leaf senescence. We also included the *GmNAC081* partner *GmNAC030* in the expression assay (Mendes *et al.*, 2013). The profile of NAC gene expression in response to stress has been used to determine the functional divergence among the members of the NAC superfamily in a given plant species (Pinheiro *et al.*, 2009). The hormones abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA) and methyl jasmonate (MeJA), as well as stress treatments including drought, NaCl and cold, induced both *GmNAC030* and *GmNAC081* to different extents (Figure 5). *GmNAC035* (previously designated *GmNAC002*), which is closely related to *GmNAC030* but is not involved in leaf senescence, was also included in the assay as a control for stress-induced NAC gene expression (Le *et al.*, 2011; Pinheiro *et al.*, 2009). As an *ATAF1* homolog, *GmNAC035* is strongly induced by drought and moderately induced by NaCl, SA and MeJA, and it is quickly induced in response to cold (Figure 5; Pinheiro *et al.*, 2009). The drought-induced expression of *GmNAC035* occurred with delayed kinetics (full induction occurred 12 h post-treatment) in an ABA-independent manner, which contrasted with the ABA-dependent up-regulation of *GmNAC081* and *GmNAC030*, which was rapid and reached full induction by 1 h post-treatment (Figure 5A and 5B). These results demonstrate that the expression patterns of stress-induced NAC genes are functionally diverse. Accordingly, as downstream functional partners in NRP/DCD-mediated cell death signaling, *GmNAC081* and *GmNAC030* are coordinately up-

regulated by exposure to different abiotic stresses and are induced by ABA, SA and Me-JA, which are all inducers of leaf senescence.

To examine the relationship between *GmNAC081* overexpression and hormone inducers of senescence, we examined the endogenous levels of ABA, JA and SA in *GmNAC081*-overexpressing lines at the onset of leaf senescence (82 days under normal growth conditions). Although the JA levels in the *GmNAC081*-overexpressing lines did not differ from those in the wild-type (Figure 6C), the transgenic lines had significantly higher ABA levels and significantly lower SA levels than the wild-type, untransformed control lines (Figure 6A and 6B). In the GmNAC81-1, GmNAC81-2 and GmNAC81-3 transgenic lines, the extent of the increase in ABA levels and the decline in SA levels closely paralleled the levels of *GmNAC081* transcripts (compare Figure 6 with Figure S1B), suggesting that GmNAC081 may act as a positive regulator of ABA synthesis and a negative feedback regulator of SA synthesis.

### **The temporal and organ-specific expression of GmNAC081**

Quantitative RT-PCR analysis of leaves at different developmental stages revealed that *GmNAC081* is expressed at low levels in the V4 vegetative stage (29 DAG) and is induced during the reproductive phase and in senescing leaves (Figure 7A). To examine the transcriptional expression of *GmNAC081*, we performed promoter-GUS ( $\beta$ -glucuronidase) assays in transgenic tobacco lines (Figure 7B). The activity of the *GmNAC081* promoter was barely detectable in seedlings and in young, non-senescing leaves but was highly expressed in senescing leaves. GUS activity was not detected in the leaves and seedlings of wild-type, non-transformed lines or in plants transformed with pCambia1381Z, a promoterless vector. Likewise, no GUS activity was detected in wild-type plants recovered from the segregating populations of pNAC081-GUS-transformed lines (WT\*).

Transgenic plants expressing the *GmNAC081-GUS* fusion gene were examined for tissue-specific GUS activity. In senescing leaf discs (LDs), GUS staining was dispersed in the mesophyll, and in leaf transverse sectors (LTS), GUS activity was often observed within the trichomes, mesophyll and vascular tissue (Figure 7D). Conversely, in non-senescing young leaves, GUS activity was not detected in leaf transverse sectors and was barely detectable in leaf discs (Figure 7C). The GUS

staining in the border of the leaf disc is probably due to the wounding-mediated activation of *GmNAC081* promoter (Faria *et al.*, 2011). In control assays, GUS activity was not detected in leaf discs or transverse sectors of senescing leaves from WT, WT\* and control plants harboring a promoterless *GUS* gene (pCAMBIA; Figure 7C and 7D). Collectively, these results indicate that *GmNAC081* up-regulation in senescing leaves is under transcriptional control, and they argue favorably for a developmentally programmed function of GmNAC081.

### **Downstream events in NRP/DCD-mediated cell death signaling in GmNAC081-overexpressing lines**

GmNAC081 has been characterized as a downstream component of stress-induced, NRP/DCD-dependent cell death signaling. The stress-induced expression of NRP/DCDs leads to the induction of *GmNAC081*, which works with GmNAC030 to activate PCD by inducing the cell death executioner caspase1-like *VPE* (Mendes *et al.*, 2013). *VPE* has been shown to trigger vacuolar collapse-mediated PCD during pathogenesis and development (Hatsugai *et al.*, 2004; Nakaune *et al.*, 2005). To examine if *VPE* could be a molecular link for the GmNAC081-mediated induction of leaf senescence, we assayed *VPE* expression in the *GmNAC081*-overexpressing lines at the onset of senescence (Figure 8A and 8B). In addition to *VPE*, we selected other GmNAC081 direct target genes, such as the predicted hydrolytic enzyme gene endo-1,3-beta-glucanase, a dual specificity protein phosphatase, and D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase (Mendes *et al.*, 2013) for study. We monitored the expression of these genes in *GmNAC081*-overexpressing lines with quantitative RT-PCR, using both helicase and 18S rRNA as endogenous controls (Figure 8C and 8D). As a direct target of the GmNAC081 TF, the expression of *VPE* was higher in the *GmNAC081*-overexpressing lines than in the wild-type, suggesting an underlying molecular mechanism for the GmNAC081-mediated induction of leaf senescence. Similarly, the transgenic lines accumulated higher levels of the other GmNAC081 target genes, confirming the functionality of the ectopically expressed GmNAC081 protein.

### **Reducing *GmNAC081* expression via virus-induced gene silencing (VIGS) delays leaf senescence**

In addition to precocious leaf senescence, the *GmNAC081*-overexpressing lines flowered earlier and progressed more quickly through the reproductive phase. Therefore, we could not determine whether their premature leaf senescence was due to a direct role for the *GmNAC081* gene in senescence or a consequence of accelerated reproduction, which could have resulted from pleiotropic effects of ectopically expressing *GmNAC081* with a constitutive promoter. To examine these possibilities, we used a VIGS vector derived from a soybean-infecting geminivirus, *Soybean chlorotic spot virus* (SoCSV, Coco et al., 2013), to silence the endogenous *GmNAC081* gene. Soybean radicles were inoculated via biolistic with pSoCSV-*GmNAC081*, which harbors the N-terminal portion of *GmNAC081* as the silencing target, or with the empty VIGS vector pSoCSV as a control. Viral DNA accumulation in the inoculated leaves was detected via PCR at 28 days post-inoculation (DPI, Figure 9A). The silencing efficiency of the vector was monitored by qRT-PCR in three plants that had been independently inoculated with pSoCSV-*GmNAC081*, all of which accumulated viral DNA at 28 DPI (Figure 9B). During leaf senescence (at 105 days, R7 stage), compared with plants infected with the empty VIGS vector, *GmNAC081* expression was reduced by 82-86% in pSoCSV-NAC81-1 and pSoCSV-NAC81-2 plants and by 99% in pSoCSV-NAC81-3 leaves. The silencing of the *GmNAC081* gene led to the proportional repression of the hydrolytic enzyme-encoding target genes in the silenced lines (Figure 9C). Both silenced and non-silenced plants appeared normal during the vegetative phase, and they flowered simultaneously. However, the silenced plants displayed a delayed leaf senescence phenotype (Figure 10). In fact, during senescence, at the R7 stage, the leaves of the silenced plants remained green, whereas leaf yellowing proceeded normally in the control, non-silenced plants (Figure 10A); this yellowing was associated with the loss of chlorophyll content (Figure 10B). The delayed leaf senescence phenotype was further examined by measuring lipid peroxidation, which was lower in the silenced leaves than in non-silenced leaves that had been inoculated with the empty vector (Figure 10C). In the VIGS-NAC081-3 plant, which was the most efficiently silenced, total inactivation of the *GmNAC081* gene led to the drastic repression of *VPE* (Figure 10D), indicating that the *GmNAC081/VPE* regulatory cascade might at least partially underlie the molecular mechanism of *GmNAC081* function in leaf senescence.

## Discussion

## **GmNAC081 is involved in natural leaf senescence in Soybean**

Many reports have shown that leaf senescence is a highly regulated process that is accompanied by the massive reprogramming of gene expression via the action of transcriptional regulators (Guo et al., 2004; Buchanan-Wollaston et al., 2005). A few TFs belonging to the WRKY family and the NAC family have been assigned direct regulatory functions in developmental leaf senescence; these TFs include *WRKY53b* in Arabidopsis and soybean; *ORE1 (ANAC092)*, *ORS1*, *AtNAP (ANAC029)* and *NAC016* in Arabidopsis; *OsNAC5* in rice; wheat *NAM-B1*; and bamboo *BeNAC1* (Guo and Gan, 2006; Uauy et al., 2006; Kim et al., 2009; 2013; Sperotto et al., 2009; Balazadeh et al., 2011; Chen et al., 2011; Meng et al., 2013), as well as the senescence-inhibiting regulators *NAC042/JUB1* and *NAC083/VNI2* of Arabidopsis (Yang et al. 2011, Wu et al. 2012). In addition to being developmentally regulated, leaf senescence is also regulated by environmental factors and stress signals. Despite longstanding interest in how developmental and environmental signals are integrated to control leaf senescence, the interplay between stress-induced and developmentally induced regulatory cascades remains poorly understood. In soybean, the only regulatory cascade known to integrate an environmental signal (light) into a natural leaf senescence program involves CRY2a, CIB1 and WRKY53b (Meng et al., 2013). Photoexcited CRY2a interacts with CIB1 to suppress its binding to *WRKY53b*, thereby antagonizing the pro-senescence function of CIB1. Here, we demonstrated that the soybean NAC transcription factor GmNAC081 is involved in age-dependent leaf senescence and, as discussed below, may integrate the osmotic stress- and ER stress-induced PCD response with a natural leaf senescence program thorough the GmNAC081/VPE regulatory module.

We have previously shown that GmNAC081 is a downstream component of the NRP/DCD-mediated cell death signaling pathway that promotes PCD and leaf senescence in response to ER stress and osmotic stress (Faria et al., 2011; Reis et al., 2011). Here, we show that the promoter activity and expression of *GmNAC081* are up-regulated during leaf senescence, suggesting that the function of GmNAC081 is closely correlated with the age-dependent leaf senescence process, as well. To substantiate this hypothesis, we provided several lines of evidence establishing that GmNAC081 plays a positive role in natural leaf senescence. First, we showed that overexpression of *GmNAC081* using the 35S promoter accelerates leaf senescence, which was monitored by measuring hallmarks of leaf senescence such as yellowing, chlorophyll loss, malondialdehyde production, the rate of photosynthesis, the Fv/Fm ratio and the expression of senescence-associated

marker genes. In fact, increased expression of *GmNAC081* accelerated and intensified leaf yellowing, chlorophyll loss and malondialdehyde production. These phenotypes were associated with a larger, faster decline in the rate of photosynthesis, a greater Fv/Fm ratio at later stages of development and increased expression of the senescence marker genes *NRP-B* and *GmCysP* in the transgenic lines. Second, to some extent, the precocious senescence phenotype and transcriptional activity of *GmNAC081* in the transgenic lines correlated with the expression level of *GmNAC081*. In the *GmNAC81-2* and *GmNAC81-3* lines, which accumulated higher transcript levels during senescence, senescence progressed more quickly and with more intense leaf yellowing, which was associated with lower chlorophyll content, higher malondialdehyde production and faster photosynthetic decay (82 days). These changes led to a significantly lower rate of photosynthesis at later stages (103 DAG) in addition to higher expression of senescence-associated marker genes in the transgenic lines. Furthermore, the expression level of *GmNAC081* in the transgenic lines was also proportional to the up-regulation of its direct target genes, the predicted endo-1,3-beta-glucanase, the dual specificity protein phosphatase and D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase. Finally, we showed that VIGS-mediated inactivation of *GmNAC081* causes delayed leaf senescence. The degree of *GmNAC081* silencing was negatively correlated with the expression of its direct target genes. During the R7 stage of development, we observed intense yellowing of the wild-type leaves, whereas the silenced leaves remained green. The delayed leaf senescence observed in the silenced leaves was associated with higher chlorophyll content, lower lipid peroxidation and lower expression of senescence-associated marker genes than in the wild-type, non-silenced leaves.

The *GmNAC081*-overexpressing lines also had shorter life cycles, which was very likely due to their earlier induction of flowering, leading to a more rapid progression through the reproductive phase. In the *GmNAC81-2* and *GmNAC81-3* lines, this phenotype clearly correlated with the increased accumulation of *GmNAC081* transcripts prior to flowering. In the *GmNAC81-1* line, which flowered normally, the *GmNAC081* transcript levels were only slightly increased or were even repressed at the stages prior to flowering. Nevertheless, despite the precocious flowering phenotype of the *GmNAC81-2* and *GmNAC81-3* lines and the natural up-regulation of *GmNAC081* during the vegetative-to-reproductive phase transition (Figure 7), our data do not allow us to assign a flowering function to the *GmNAC081* gene; because silencing *GmNAC081* did not delay flowering, as would be expected for a non-redundant gene with a direct role in flowering

induction, The early flowering phenotype exhibited by the *GmNAC081*-overexpressing lines may instead reflect a pleiotropic effect of the ectopic expression of *GmNAC081*. The *GmNAC081*-silenced plants displayed delayed leaf senescence but otherwise exhibited normal development.

### **The *GmNAC081*/VPE regulatory cascade may couple stress-induced and age-dependent leaf senescence**

The *GmNAC081* gene is a downstream component of the stress-induced, NRP/DCD-mediated cell death signaling pathway. Prolonged ER stress and osmotic stress induce the expression of the transcriptional activator GmERD15, which targets the NRP/DCD promoter (Alves et al., 2011). Up-regulation of NRP/DCD leads to the induction of *GmNAC081* and *GmNAC030*, which work together to activate the expression of *VPE*, the executioner of the stress-induced PCD program (Hara-Nishimura et al., 2011; Mendes et al., 2013). Therefore, *GmNAC081*- and *GmNAC030*-mediated activation of *VPE* expression links the activation of the stress-induced NRP/DCD-mediated signaling pathway to the programmed cell death response. *VPE* has been shown to trigger vacuolar collapse-mediated PCD during pathogenesis and development (Hara-Nishimura et al., 2011). Here, we show that *GmNAC081* overexpression in transgenic lines causes premature leaf senescence and up-regulation of *VPE*, whereas silencing of the *GmNAC081* gene delays leaf senescence and down-regulates *VPE* expression, suggesting an underlying mechanism for the execution of the leaf senescence program. Collectively, these results suggest that *GmNAC081* and *VPE* constitute a shared regulatory cascade for both stress-induced and natural leaf senescence in soybean. As further evidence for this hypothesis, our previous and current data show that during both age-dependent and environmentally induced leaf senescence, *VPE* and *GmNAC081* are coordinately up-regulated (Carvalho et al., 2004; Figure 5).

In the *GmNAC081*-overexpressing lines, the expression level of the transgene was associated with the precocious senescence phenotype but was not proportionally correlated with *VPE* induction. In fact, compared with the other transgenic lines, the greater accumulation of *GmNAC081* transcripts in the *GmNAC081*-3 line did not result in increased *VPE* expression. Likewise, knocking down *GmNAC081* expression did not suppress *VPE* expression in the pSoCSV-NAC81-1 and pSoCSV-NAC81-2 VIGS plants but still delayed leaf senescence. Suppressed *VPE* expression was only observed in the

pSoCSV-NAC81-3 VIGS plant, in which *GmNAC081* expression was completely abolished. These results have at least two implications. First, *VPE* may be controlled by additional transcriptional regulators and/or regulatory cascades that are not altered in the silenced plants or the transgenic lines. In line with this hypothesis, we have previously shown that GmNAC030 works with GmNAC081 to fully activate the *VPE* promoter (Mendes et al., 2013). The optimal stoichiometry of these two transcriptional regulators is likely a prerequisite for the maximal induction of the *VPE* promoter. Second, GmNAC081-mediated leaf senescence may be only partially controlled by the GmNAC081/*VPE* regulatory cascade. The increased accumulation of ABA in the overexpressing lines may be an additional factor that contributes to the precocious leaf senescence phenotype. During leaf senescence, genes associated with ABA synthesis and signaling are up-regulated, and the endogenous ABA level increases (Zhang and Zhou, 2013). The increased ABA level during the progression of leaf senescence induces a series of SAG genes, including SAG113, a Golgi-localized protein phosphatase of the PP2C family, which is a direct target of the senescence-promoting AtNAP transcription factor (Zhang and Gan, 2012). The ABA-AtNAP-SAG113 regulatory module controls stomatal movement and water loss specifically in senescing leaves.

*GmNAC081* overexpression also decreased SA levels during leaf senescence. Because *GmNAC081* itself is induced by SA, this observation suggests that GmNAC081 may regulate SA synthesis or accumulation via negative feedback. Consistent with this hypothesis, we have previously shown that overexpression of the ER-resident molecular chaperone BiP inhibits the expression and cell death activity of GmNAC081, causing an increase in SA level in senescing leaves (Reis et al., 2011; Carvalho et al., 2014). BiP also represses the expression of the upstream component NRP/DCD, thereby inhibiting the transduction of programmed cell death signals derived from multiple types of stress (Reis et al., 2011) and from developmental triggers to regulate leaf senescence (Carvalho et al., 2014). Therefore, although the negative regulation of NRP/DCD and *GmNAC081* expression and activity induces SA accumulation, increased *GmNAC081* expression decreases SA levels. Collectively, these data suggest that the NRP/DCD-GmNAC081 signaling module may be a negative feedback regulator of SA synthesis or accumulation.

## Materials and Methods

### Plant expression cassettes and soybean transformation

The full-length *GmNAC081* ORF (GenBank accession number AY974354) was amplified from leaf cDNA with primers NAC6XBAF (5'-ATCTCTAGACAACCATGGAAGACATG-3') and NAC6KPNR (5'-CGCGGTACCTCAGTAGAAGTTTAG-3'), which contained XbaI and KpnI restriction sites, respectively (underlined). The amplified fragment was digested with XbaI and KpnI and cloned into the corresponding sites of pUC19-35SAMVnos (Dias *et al.*, 2006). The resulting vector, p35SNAC6, contained the full-length *GmNAC081* coding region under control of a tandem cauliflower mosaic virus 35S promoter and an enhancer region from the alfalfa mosaic virus, as well as the polyadenylation signal of the *nos* gene. Then, the *GmNAC081* expression cassette was released from p35SNAC6 and cloned into pAC321 (Rech *et al.*, 2008) to yield pNAC6ahas, which harbors the *GmNAC081* expression cassette and the *ahas* gene, which confers tolerance to the herbicide imazapyr. Soybean (*Glycine max* cv. BR16) was transformed with pNAC6ahas as previously described by Aragão *et al.* (2000). Primary transformants were selected by PCR. Segregation analyses of independently transformed soybean lines (35S:GmNAC81-1, 35S:GmNAC81-2, and 35S:GmNAC81-3) were performed using PCR.

### PCR analysis of transgenic lines

Total DNA was isolated from 7-day-old leaves of transformed and untransformed soybean cv. BR16 using extraction buffer containing 2% CTAB, 1.4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA and 0.2%  $\beta$ -mercaptoethanol as previously described by Doyle and Doyle (1987). PCR was carried out on 50 ng of genomic DNA using primers GmNAC6 Forward 5'-AAAAAGCAGGCTTCACAATGGCAACCATGGAA-3', and GmNAC6 Reverse 5'-AGAAAGCTGGGTCTTTCAGTAGAAGTTTAGAAT-3' (0.5 nM each) and 0,25 U of *GoTaq*® DNA Polymerase (Promega) in a final volume of 50  $\mu$ L. The

mixture was heated at 94°C for 3 min, and 35 cycles of PCR were conducted (45 s at 94°C, 45 s at 53°C and 60 s at 72°C) with a final extension at 72°C for 10 min. The reactions were performed using a PCR System 9700 (Life Technologies). The GmNAC081-specific primers amplify an 850-bp sequence from the GmNAC081 cDNA and span an intronic region (1000 bp) in the genomic GmNAC081 sequence.

### **Plant materials and growth conditions**

Seeds of the wild-type (*Glycine max* cv. BR16) and transgenic soybean lines (35S::GmNAC81-1, 35S::GmNAC81-2 and 35S::GmNAC81-3) were germinated in organic soil (Bioplant), transferred to 3.0 - l pots containing a mixture of organic soil and soil (3:1 by volume) and grown in a greenhouse under natural light, relative humidity (65–85%) and temperature (15–35°C) conditions with approximately equal day and night length. The genotypes were grown side-by-side in randomized blocks and were observed throughout their life cycles.

All physiological parameters were measured in the third trifoliolate leaf. Analyses of gas exchange and pigment content were initiated 40 days after germination, when the leaves had fully expanded and were photosynthetically active, and terminated with leaf abscission at 117 days. IRGA (*Infrared Gas Analyser*) analyses were performed weekly until senescence. Rulers were used to measure the heights of the stems on each of three days, when the plants were photographed, the number of nodes was examined and the developmental stage was scored. To measure biomass, the roots were separated from the shoots, weighed and kept in an incubator with forced ventilation at 60°C until they reached a constant weight.

### **Virus-induced silencing (VIGS) of the GmNAC081 gene**

Total RNA was extracted from soybean leaves using TRIzol (Life Technologies) and treated with RNase-free DNase (Life Technologies). cDNA synthesis was performed using 3 µg of total RNA, oligo-dT(18) and M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. Approximately 1 µl of the cDNA was used to PCR-amplify a cDNA fragment of *GmNAC081* encoding the carboxy terminus, delimited by positions 486 to 889, using 0.2 mM dNTPs, the primers

at concentrations of 0,4  $\mu$ M each (gmNac6BglIIFwd, 5'-aaaagatctAACTTCGTTGAAAGTGCTGGAG-3' and gmNac6BglIIRvs, 5'-aaaagatctAGAAGTTTAGAATATTGGTGGGAG-3' both carrying a BglIII site [underlined]), 5  $\mu$ l of 10X High Fidelity Platinum Taq buffer (Promega) and 0.2 U of High Fidelity Platinum Taq (Promega) in a final volume of 50  $\mu$ l. The amplification reaction was conducted with an initial denaturation step at 94°C for 3 min; followed by 35 cycles of 94°C for 45 s, 54°C for 45 s, and 68°C for 45 s; and a final extension at 68°C for 10 min. The amplified product was analyzed by electrophoresis on a 1% agarose gel stained with 0.1  $\mu$ g/mL ethidium bromide, purified using a QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) and cloned into vector pCR2.1 (Life Technologies) using a TA Cloning® Kit according to the manufacturer's recommendations. The resulting clone pUFV2435 harbors the fragment encoding the GmNAC081 carboxy terminus flanked by BglIII restriction sites. The GmNAC081 fragment was released from pUFV2435 by digesting with BglIII, purified from the agarose gel and inserted into the multiple cloning site of the VIGS vector pUFV1713, which is also called pSoCSV because it was derived from the soybean-infecting geminivirus *Soybean chlorotic spot virus*, SoCSV (Coco *et al.*, 2013). The resulting clone, pSoCSV-NAC81, is an infectious derivative of SoCSV DNA-A that harbors a 403-bp GmNAC081 fragment in place of the SoCSV coat protein gene. It and the rest of the SoCSV DNA-A sequence are located between two viral replication origins. Soybean radicles were inoculated via biolistic with 4  $\mu$ g of pSoCSV-NAC081 or pSoCSV in combination with 4  $\mu$ g of SoCSV DNA-B infectious clones to mediate the systemic movement of the VIGS vector as previously described (Santos *et al.*, 2008). The accumulation of viral DNA was monitored by PCR, and the silencing of the *GmNAC081* gene was monitored by qRT-PCR.

### **Measurements of photosynthesis**

Leaf gas exchange parameters and chlorophyll (Chl) *a* fluorescence were measured simultaneously using the aforementioned gas exchange system equipped with an integrated fluorescence chamber head (LI-6400-40, LI-COR Inc.). The net CO<sub>2</sub> assimilation rate (*A*), stomatal conductance to water vapor (*g<sub>s</sub>*) and internal CO<sub>2</sub>

concentration ( $C_i$ ) were measured on attached leaves under artificial PAR, *i.e.*, 1,000  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  at the leaf level and 400  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  air. All measurements were performed under naturally fluctuating temperature and vapor pressure deficit conditions.

After measuring the gas exchange parameters, the steady-state fluorescence yield ( $F_s$ ) was measured, after which a saturating white light pulse (8,000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ; 0.8 s) was applied to determine the dark-adapted maximum fluorescence ( $F_m$ ). The actinic light was then turned off and far-red illumination (2  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) was used to measure the dark-adapted initial fluorescence ( $F_0$ ). Using these parameters, the photochemical quenching coefficient ( $q_p$ ) and the capture efficiency of excitation energy by open photosystem (PS) II reaction centers ( $F_v/F_m$ ) were estimated. The electron transport rate (ETR) and the nocturnal respiration ( $R_d$ ) were also calculated.

### **Chlorophyll content**

Total chlorophyll content was determined as described by Wellburn (1994). Three 0.7-cm leaf discs were incubated with 2.5 mL of  $\text{CaCO}_3$ -saturated dimethylsulfoxide (DMSO). Chl a and b absorb within a narrow region (maxima) in the blue (near 428 and 453 nm) and red (near 661 and 642 nm) spectral ranges. Isolated yellow carotenoids have broad absorption, with three maxima or shoulders in the blue spectral range between 400 and 500 nm. Therefore, after 16 h at room temperature, the absorbance of the extracts was determined spectrophotometrically at 480, 649.1, and 665.1 nm and is expressed as  $\mu\text{g cm}^{-2}$ .

### **Lipid peroxidation**

The extent of leaf lipid peroxidation was estimated by measuring the malondialdehyde content as described by Cakmak and Horst (1991). Approximately 0.150 g of leaves were homogenized in 2 mL of 0.1% (v/v) trichloroacetic acid and then centrifuged at 12,000 g for 15 min. All steps were performed at 4°C. An aliquot of the supernatant (0.5 mL) was added to 1.5 mL 0.5% (v/v) thiobarbituric acid in

20% (v/v) trichloroacetic acid, and the samples were incubated at 90°C for 20 min. The reaction was stopped by incubation on ice followed by centrifugation at 13,000 g for 4 min. The absorbance of the supernatant was measured at 532 nm and subtracted from the nonspecific A<sub>600</sub> value. The malondialdehyde concentration was calculated using the molar absorption coefficient of 155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Heath and Packer, 1968).

### **Determination of ABA, SA and JA content**

Six leaf discs were crushed in 200 µL of 10% (v/v) methanol and 1% (v/v) acetic acid using tungsten beads (25 Hz for 8 min). The plant extract was sonicated in a water bath for 1 h and then for 5 more additional pulses with a hand sonicator (ultrasonic homogenizer 4610 series, Cole-Parmer Instrument, Vernon Hills, USA) at 30% power for 20 sec on ice. The extract was purified by centrifugation for 10 min, and 5 mL of the supernatant was injected into an LC-MS system (ultra performance liquid chromatography – model 1200 infinity series coupled to a quadrupole sequential mass spectrometer - model 6430, Agilent, Santa Clara, CA, USA). The mobile phase was water with 0.1% (v/v) formic acid (A) and acetonitrile with 0.1% (v/v) formic acid (B) using a time gradient of 0/5, 11/60, 13/95, 17/95, 19/5 and 20/5. Hormone analyses were performed in the MRM (multiple reaction monitoring) mode, and the mass of the precursor ion (fragments established upon testing the fragmentation of each molecule) was determined for ABA (263/153), SA (137/93), and JA (209/59). The absolute quantity of each hormone was determined based on the calibration curves of their respective standards. The data were analyzed using the MassHunter package (Agilent, Santa Clara, CA, USA) to obtain the area under the peaks and the retention time of each hormone in each sample. A defined peak for each analyzed hormone was obtained from soybean leaf extracts.

### **Determination of GUS activity**

The fluorimetric assay to evaluate the activity of β-glucuronidase was performed according to the protocol of Jefferson *et al.*, (1987), using methylumbelliferone (MU) as standard. Samples of three independent transformants and their controls, were crushed

and homogenized in 500  $\mu$ l of GUS buffer [pH 7.0  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 100mM, 10mM EDTA, 0.1% sarcosyl (w/v) Triton X-100 0.1% (v/v)]. For the enzyme activity of reaction, 50  $\mu$ L of extract were added to 50  $\mu$ L GUS as a substrate buffer containing 2 mM 4-methylumbelliferil- $\beta$ -D-glucuronide (MUG). The mixture was then incubated at 37 ° C for 30 minutes and GUS activity measured using the Multi-Modal Lector Microplate Synergy HT (BioTek). The total protein concentration was determined by the Bradford method (Bradford, 1976).

### **Location immunohistochemistry in situ GUS in tobacco organs**

Plants transformed with constructs pNAC081 :: GUS :: GUS pCambia plants and wild types (WT) were used for immunohistochemical analysis as described in McCabe *et al.* (1988), to assess the tissue-specific expression of GmNAC081 promoter senescent and not in senescent leaves. For histochemical analyzes three independent transformants were used, and plants transformed with the construction pCambia :: GUS plants and untransformed (wild types) were used as negative control.

Leaf discs and histological sections of the apical leaf were analyzed (cross-section) for the realization of which was used microtome LPC table (Rolemberg & Bhering Trade and Import Ltda). The sections were immediately soaked in the enzyme GUS assay buffer [ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  100 mM (pH 7,0),  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0,5 mM,  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  10 mM, Triton X-100 0,1% (v/v)] containing 1 mM substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-glucuronide (X-gluc) and incubated at 37 ° C for 4 hours, under protection from light. The leaf pigments stained tissues were removed by several washes with a solution of methanol: acetone (3:1). The clarified tissues were stored in 50% glycerol solution (v/v) and fixed on slides for photo documentation. Digital images were obtained on an Olympus AX-70 microscope coupled to a digital camera of the same brand.

### **RNA Extraction, cDNA Synthesis and qRT-PCR**

Total RNA was extracted from leaves at different developmental stages (V4-V5; R1-R7) using TRIzol (Life Technologies) and was treated with 2 units of RNase-free DNase (Life Technologies). The total RNA was quantified with a spectrophotometer (Evolution 60, Thermo Scientific) and examined by electrophoresis on a 1,5% (w/v) denaturing agarose gel stained with ethidium bromide. cDNA

synthesis was performed using 3 µg of total RNA, 5 µM oligo-dT(18), 0.5 mM dNTPs and 1 U of M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations.

All of the real-time PCR procedures, including tests, validations, and experiments, were conducted according to the recommendations of Life Technologies. Real-time RT-PCR reactions were performed on an ABI 7500 instrument (Life Technologies) using cDNA from different developmental stages, gene-specific primers (Supplemental Table 1), and SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies). The amplification reactions were performed as follows: 10 min at 95°C followed by 40 cycles of 94°C for 15 s and 60°C for 1 min. The soybean RNA helicase gene (Irsigler *et al.*, 2007) and 18S rRNA were used as endogenous controls to normalize the real-time RT-PCR values. Gene expression was quantified using the  $2^{-\Delta C_t}$  (absolute quantification) method.

### **Statistical analyses**

All statistical analysis was performed using R software with the ExpDes package (Ferreira *et al.*, 2013). A split-plot ANOVA with a completely randomized design was used for the IRGA and developmental data experiments. The main plot was the genotype and the sub-plot was the time (DAG). A Tukey test with p-value < 0.1 considered significant was used to compare multiple means. Regression analysis was performed for the photosynthesis data. Linear, quadratic and cubic models were tested for the best fit for  $R^2$ . The limits of the 95% confidence intervals of the regression coefficients were calculated with the *t*-values of the formulas of the linear models and were presented as the class stats in R. For the yield data, one-way ANOVA with Tukey test was performed with a p-value < 0.05 considered significant.

### **Funding**

This work was supported by the following grants from Brazilian government agencies: CNPq grants 573600/2008-2 and 447578/2014-6 (to E.P.B.F.) and FAPEMIG grant CBB-APQ-00070-09 (to E.P.B.F.). M.R.P. was supported by a graduate fellowship from Fapemig; P.A.S. and J.P.B.M. were supported by graduate fellowships from CNPq;

J.R.A is a recipient of a CAPES graduate fellowship; G.M.C. and O.J.B.B. are CNPq post-doctoral fellows; and H.D.N.C is the recipient of a science initiation scholarship from CNPq.

## **Disclosures**

The authors have no conflicts of interest to declare.

## **Acknowledgements**

We are grateful to the Biomolecules Analyses Core of the Universidade Federal de Vicosa for providing the facilities for the mass-spec experiments. We also thank Professor Gilberto Sachetto from the Universidade Federal do Rio de Janeiro and Professor Marcelo Rogalski from Universidade Federal de Viçosa for critical reading of the manuscript.

## **References**

- Alves, M.S., Reis, P.A., Dadalto, S.P., Faria, J.A., Fontes, E.P.B., Fietto, L.G. (2011). A novel transcription factor, ERD15 (Early Responsive to Dehydration 15), connects endoplasmic reticulum stress with an osmotic stress-induced cell death signal. *J. Biol. Chem.* 286: 20020-20030.
- Andersson, A., Keskitalo, J., Sjödin, A., Bhalerao, R., Sterky, F., Wissel, K., Tandre, K., Aspeborg, H., Moyle, R., Ohmiya, Y., Bhalerao, R., Brunner, A., Gustafsson, P., Karlsson, J., Lundeberg, J., Nilsson, O., Sandberg, G., Strauss, S., Sundberg, B., Uhlen, M., Jansson, S., Nilsson, P. (2004). A transcriptional timetable of autumn senescence. *Genome Biol.* 5: R24.
- Aragão, F.J.L., Sarokin, L., Vianna, G.R., Rech, E.L. (2000). Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) plants at high frequency. *Theor. Appl. Genet.* 101: 1-6.
- Balazadeh, S., Riaño-Pachón, D.M., Mueller-Roeber, B. (2008) Transcription factors regulating leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol.* 10: 63–75.

- Balazadeh, S., Siddiqui, H., Allu, A.D., Matallana-Ramirez, L.P., Caldana, C., Mehrnia, M., Zanol, M.-I., Kohler, B., Mueller-Roeber, B. (2010). A gene regulatory network controlled by the NAC transcription factor ANAC092/AtNAC2/ORE1 during salt-promoted senescence. *Plant J.* 62:250–264.
- Balazadeh, S., Kwasniewski, M., Caldana, C., Mehrnia, M., Zanol, M.I., Xue, G.-P., Mueller-Roeber, B. (2011). ORS1, an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Responsive NAC Transcription Factor, Controls Senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant.* 4: 346–360.
- Bradford M (1976) Photometric methods for protein determination. *Procedures and analysis. Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Breeze, E., Harrison, E., McHattie, S., Hughes, L., Hickman, R., Hill, C., Kiddle, S., Kim, Y., Penfold, C.A., Jenkins, D., Zhang, C., Morris, K., Jenner, C., Jackson, S., Thomas, B., Tabrett, A., Legaie, R., Moore, J.D., Wild, D.L., Ott, S., Rand, D., Beynon, J., Denby, K., Mead, A., Buchanan-Wollaston, V. (2011). High-resolution temporal profiling of transcripts during *Arabidopsis* leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. *Plant Cell.* 23:873–894.
- Buchanan-Wollaston, V., Page, T., Harrison, E., Breeze, E., Lim, P.O., Nam, H.G., Lin, J.F., Wu, S.H., Swidzinski, J., Ishizaki, K., Leaver, C.J. (2005). Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant J.* 42: 567–585.
- Cardmark, I., Horst, J.H. (1991). Effects of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plant.* 83: 463-468.
- Carvalho, H.H., Silva, P.A., Mendes, G.C., Brustolini, O.J.B., Pimenta, M.R., Gouveia, B.C., Valente, M.A.S., Ramos, H.J.O., Soares-Ramos, J.R.L., Fontes, E.P.B. (2014). The Endoplasmic Reticulum Binding Protein BiP Displays Dual Function in Modulating Cell Death Events. *Plant Physiol.* 164: 654-670.
- Chen, Y., Qiu, K., Kuai, B., Ding, Y. (2011). Identification of an NAP-like transcription factor BeNAC1 regulating leaf senescence in bamboo (*Bambusaemeiensis* ‘Viridiflavus’) *Physiol. Plant.* 42: 361– 371.

- Coco, D., Calil, I.P., Brustolini, O.J.B., Santos, A.A., Inoue-Nagata, A.K., Fontes, E.P.B. (2013). Soybean chlorotic spot virus, a novel begomovirus infecting soybean in Brazil. *Arch. Virol.* 158: 457-462.
- Collinge, M., Boller, T. (2001). Differential induction of two potato genes, *Stprx2* and *StNAC*, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding. *Plant Mol. Biol.* 46:521-529.
- Costa, M.D., Reis, P.A., Valente, M.A., Irsigler, A.S., Carvalho, C.M., Loureiro, M.E., Aragao, F.J.L., Boston, R.S., Fietto, L.G., Fontes, E.P.B. (2008). A new branch of endoplasmic reticulum stress signaling and the osmotic signal converge on plant specific asparagine-rich proteins to promote cell death. *J. Biol. Chem.* 283: 20209-20219.
- Dias, B.B.A., Cunha, W.G., Moarais, L.S., Rech, E L., Capdeville, G., Aragão, F. J. L. (2006). Expression of an oxalate decarboxylase gene from *Flammulina* sp. in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) plants and resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathol.* 55: 187–193.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bulletin.* 19:11-15.
- Duval, M., Hsieh, T.F., Kim, S.Y., Thomas, T. L. (2002). Molecular characterization of *AtNAM*: a member of the Arabidopsis NAC domain super family. *Plant Mol. Biol.* 50: 237–248.
- Fang, Y., You, J., Xie, K., Xie, W., Xiong, L. (2008). Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice. *Mol. Genet. Genomics* 280: 535–546.
- Faria, J.A., Reis, P.A., Reis, M.T., Rosado, G.L., Pinheiro, G.L., Mendes, G.C., Fontes, E.P.B. (2011). The NAC domain-containing protein, *GmNAC6*, is a downstream component of the ER stress- and osmotic stress-induced NRP-mediated cell-death signaling pathway. *BMC Plant Biol.* 11: 129.
- Fehr, W.R., Caviness, C.E. (1977). Stages of soybean development. Ames: Iowa State University of Science and Technology (Special Report, 80) 11p.
- Ferreira, E.B., Cavalcanti, P.P., Nogueira, D.A. (2013). *ExpDes*: Experimental Design Package. R Package version 1.1.2.
- Fujita, M., Fujita, Y., Maruyama, K., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Tran, L.P., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2004). A dehydration-induced

- NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *Plant J.* 39: 863-876.
- Gregersen, P.L., Holm, P.B. (2007). Transcriptome analysis of senescence in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biotechnol. J.* 5: 192–206.
- Guo, Y., Cai, Z., Gan, S. (2004). Transcriptome of Arabidopsis leaf senescence. *Plant Cell Environ.* 27: 521–549.
- Guo, Y., Gan, S. (2006). AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *Plant J.* 46: 601–612.
- Hara-Nishimura, I., Hatsugai, N., Nakaune, S., Kuroyanagi, M., Nishimura, M. (2011). Vacuolar processing enzyme: an executor of plant cell death. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 404-408.
- Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Yamada, K., Meshi, T., Tsuda, S., Kondo, M., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. (2004). A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science* 305: 855–858.
- Heath, R.L., Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125: 189-198.
- Hegedus, D., Yu, M., Baldwin, D., Gruber, M., Sharpe, A., Parkin, I., Whitwill, S., Lydiate, D. (2003). Molecular characterization of Brassica napus NAC domain transcriptional activators induced in response to biotic and abiotic stress. *Plant Mol. Biol.* 53: 383-397.
- Irsigler, A.S., Costa, M.D., Zhang, P., Reis, P.A., Dewey, R.E., Boston, R.S., and Fontes, E.P. (2007). Expression profiling on soybean leaves reveals integration of ER - and osmotic-stress pathways. *BMC genomics* 8, 431.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., & Bevan, M. W. (1987). GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase. *The EMBO Journal*, 6(13), 3901–3907.
- 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 signalling. *Biochem. J.* 426: 183–196.
- Jeong, R.D., Chandra-Shekara, A.C., Kachroo, A., Klessig, D.F., Kachroo, P. (2008). HRT-mediated hypersensitive response and resistance to Turnip crinkle virus in

- Arabidopsis does not require the function of TIP, the presumed guard protein. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21: 1316–1324.
- Kawaura, K., Mochida, K., Ogihara, Y. (2008). Genome-wide analysis for identification of salt-responsive genes in common wheat. *Funct. Integr. Genomics* 8: 277–286.
- Kim, J.H., Woo, H.R., Kim, J., Lim, P.O., Lee, I.C., Choi, S.H., Hwang, D., Nam, H.G. (2009). trifurcate feed-forward regulation of age-dependent cell death involving miR164 in Arabidopsis. *Science* 323: 1053 – 1057.
- Kim, S.Y., Kim, S.G., Kim, Y.S., Seo, P.J., Bae, M., Yoon, H.K., Park, C.M. (2007). Exploring membrane-associated NAC transcription factors in Arabidopsis: implications for membrane biology in genome regulation. *Nucleic Acids Res.* 35: 203–213.
- Kim, Y.S., Sakuraba, Y., Han, S.H., Yoo, S.C., Paek, N.C. (2013). Mutation of the Arabidopsis NAC016 transcription factor delays leaf senescence. *Plant Cell Physiol.* 54: 1660-1672.
- Kinoshita, T., Yamada, K., Hiraiwa, N., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. (1999). Vacuolar processing enzyme is up-regulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stressed conditions. *Plant J.* 19: 43–53.
- Lim, P.O., Kim, H.J., Nam, H.G. (2007). Leaf senescence. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58: 115 – 136. Lin, J.F., Wu, S.H. (2004). Molecular events in senescing Arabidopsis leaves. *Plant J.* 39: 612–628. Lin, R., Zhao, W., Meng, X., Wang, M., Peng, Y. (2007). Rice gene OsNAC19 encodes a novel NAC-domain transcription factor and responds to infection by *Magnaporthe grisea*. *Plant Sci.* 172: 120-130.
- Lee, S., Seo, P.J., Lee, H.J., Park, C.M. (2012). A NAC transcription factor NTL4 promotes reactive oxygen species production during drought-induced leaf senescence in Arabidopsis. *Plant J.* 70: 831-44
- Lee, S., Lee, H.J., Huh, S.U., Paek, K.H., Ha, J.H., Park, C.M. (2014). The Arabidopsis NAC transcription factor NTL4 participates in a positive feedback loop that induces programmed cell death under heat stress conditions. *Plant Sci.* 227:76-83.
- Le, D.T., Nishiyama, R., Watanabe, Y., Mochida, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Tran, L.,-S.P. (2011). Genome-Wide Survey and Expression Analysis

- of the Plant-Specific NAC Transcription Factor Family in Soybean During Development and Dehydration Stress. *DNA Res.* 18: 263–276.
- Mccabe DE, Swain WF, Martinell BJ, Christou P (1988) Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle bombardment. *Biotechnology*, 6: 923-926.
- Mendes, G.C., Reis, P.A.B., Calil, I.P., Carvalho, H.H., Aragão, F.J.L., Fontes, E.P.B. (2013). GmNAC30 and GmNAC81 integrate the endoplasmic reticulum stress- and osmotic stress- induced cell death responses through a vacuolar processing enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 19627-19632.
- Meng, Y., Li, H., Wang, Q., Liu, B., Lin, C. (2013). Blue light-dependent interaction between cryptochrome2 and CIB1 regulates transcription and leaf senescence in soybean. *Plant Cell* 25:4405-4420.
- Mysore, K.S., Crasta, O.R., Tuori, R.P., Folkerts, O., Swirsky, P.B., Martin, G.B. (2002). Comprehensive transcript profiling of Pto and Prf mediated host defense responses to infection by *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Plant J.* 32: 299–315.
- Nakashima, K., Tran, L.P., Nguyen, D.V., Fujita, M., Maruyama, K., Todaka, D., Ito, Y., Hayashi, N., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007) Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stressresponsive gene expression in rice. *Plant J.* 51: 617-630.
- Nakashima, K., Takasaki, H., Mizoi, J., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012). NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochem. Biophys. Acta* 1819: 97-103.
- Nakaune, S., Yamada, K., Kondo, M., Kato, T., Tabata, S., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. (2005). A vacuolar processing enzyme, delta VPE, is involved in seed coat formation at the early stage of seed development. *Plant Cell* 17: 876-887.
- Nuruzzaman, M., Manimekalai, R., Sharoni, A.M., Satoh, K., Kondoh, H., Ooka, H., Kikuchi, S. (2010). Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice. *Gene* 465: 30-44.
- Oh, S.K., Lee, S., Yu, S.H., Choi, D. (2005). Expression of a novel NAC domain-containing transcription factor (CaNAC1) is preferentially associated with incompatible interactions between chili pepper and pathogens. *Planta* 222: 876-887.
- Olsen, A.N., Ernst, H.A., Leggio, L.L., Skriver, K. (2005). NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends Plant Sci.* 10: 79-87.

- Ooka, H., Satoh, K., Doi, K., Nagata, T., Otomo, Y., Murakami, K., Matsubara, K., Osato, N., Kawai, J., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Suzuki, K., Kojima, K., Takahara, Y., Yamamoto, K., Kikuchi, S. (2003). Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res.* 10: 239-247.
- Pinheiro, G.L., Marques, C.S., Costa, M.D., Reis, P.A.B., Alves, M.S., Carvalho, C.M., Fietto, L.G., Fontes, E.P.B. (2009). Complete inventory of soybean NAC transcription factors: sequence conservation and expression analysis uncover their distinct roles in stress response. *Gene* 444: 10-23.
- Rech, E.L., Vianna, G.R., Aragão, F.J.L. (2008). High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. *Nat. Protoc.* 3: 410-448.
- Ren, T., Qu, F., Morris, T.J. (2000). HRT gene function requires interaction between a NAC protein and viral protein to confer resistance to turnip crinkle virus. *Plant Cell* 12: 1917-1926.
- Reis, P.A.B., Rosado, G.L., Silva, L.A., Oliveira, L.C., Oliveira, L.B., Costa, M.D., Alvim, F.C., Fontes, E.P.B. (2011). The binding protein BiP attenuates stress induced cell death in soybean via modulation of the N-rich protein-mediated signaling pathway. *Plant Physiol.* 157:1853–1865.
- Santos, A.A., Florentino, L.H., Pires, A.B.L., Fontes, E.P.B. (2008). Geminivirus: biolistic inoculation and molecular diagnosis. *Methods Mol. Biol.* 451:563-579.
- Schroder, M., Kaufman, R.J. (2005). ER stress and the unfolded protein response. *Mutat. Res.* 569:29-63.
- Seo, P.J., Kim, M.J., Park, J.Y., Kim, S.Y., Jeon, J., Lee, Y.H., Kim, J., Park, C.M. (2010). Cold activation of a plasma membrane-tethered NAC transcription factor induces a pathogen resistance response in *Arabidopsis*. *Plant J.* 61: 661-671.
- Selth, L.A., Dogra, S.C., Rasheed, M.S., Healy, H., Randles, J.W., Rezaian, M.A. (2005). A NAC domain protein interacts with tomato leaf curl virus replication accessory protein and enhances viral replication. *Plant Cell* 17:311-325.
- Sperotto, R.A., Ricachenevsky, F.K., Duarte, G.L., Boff, T., Lopes, K.L., Sperb, E.R., Grusak, M.A., Fett, J.P. (2009). Identification of up-regulated genes in flag leaves

- during rice grain filling and characterization of OsNAC5, a new ABA-dependent transcription factor. *Planta*. 230: 985-1002.
- Tran, L.-S., Quach, T.N., Guttikonda, S.K., Aldrich, D.L., Kumar, R., Neelakandan, A., Valliyodan, B., Nguyen, H. (2009). Molecular characterization of stress-inducible GmNAC genes in soybean. *Mol. Genet. Genomics* 281: 647-664.
- Uauy, C., Distelfeld, A., Fahima, T., Blechl, A., Dubcovsky, J. (2006). A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. *Science* 314: 1298–1301.
- Valente, M.A.S., Faria, J.A.Q.A., Soares-Ramos, J.R., Reis, P.A.B., Pinheiro, G.L., Piovesan, N.D., Morais, A.T., Menezes, C.C., Cano, M.A.O., Fietto, L.G., Loureiro, M.E., Aragão, F.J.L., Fontes, E.P.B. (2009). The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco. *J. Exp. Bot.* 60: 533–546.
- Wang, X., Basnayake, B.M.S., Zhang, H., Li, G., Li, W., Virk, N., Mengiste, T., Song, F. (2009a). The Arabidopsis ATAF1, a NAC transcription factor, is a negative regulator of defense responses against necrotrophic fungal and bacterial pathogens. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22: 1227– 1238. Wang, X., Goregaoker, S.P., Culver, J.N. (2009b). Interaction of the Tobacco Mosaic Virus replicase protein with a NAC domain transcription factor is associated with the suppression of systemic host defenses. *J. Virol.* 83: 9720–9730.
- Wellburn, A.R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* 144: 307-313.
- Wu, A., Allu, A.D., Garapati, P., Siddiqui, H., Dortay, H., Zanon, M.I., Asensi-Fabado, M.A., Munné-Bosch, S., Antonio, C., Tohge, T., Fernie, A.R., Kaufmann, K., Xue, G.P., Mueller-Roeber, B., Balazadeh, S. (2012) JUNGBRUNNEN1, a reactive oxygen species-responsive NAC transcription factor, regulates longevity in Arabidopsis. *Plant Cell* 24:482-506.
- Xia, N., Zhang, G., Liu, X., Deng, L.K., Cai, G., Zhang, Y., Wang, X., Zhao, J., Huang, L., Kang Z.-S. (2010a). TaNAC8, a novel NAC transcription factor gene in wheat, responds to stripe rust pathogen infection and abiotic stresses. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 74: 394–402.

- Xia, N., Zhang, G., Liu, X., Deng, L., Cai, G., Zhang, Y., Wang, X., Zhao, J., Huang, L., Kang, Z.S. (2010b). Characterization of a novel wheat NAC transcription factor gene involved in defense response against stripe rust pathogen infection and abiotic stresses. *Mol. Biol. Rep.* 37:3703– 3712.
- Xie, Q., Frugis, G., Colgan, D., Chua, N.H. (2000) Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev.* 14: 3024-3036.
- Yang, Z.T., Lu, S.J., Wang, M.J., Bi, D.L., Sun, L., Zhou, S.F., Song, Z.T., Liu, J.X. (2014a). A plasma membrane-tethered transcription factor, NAC062/ANAC062/NTL6, mediates the unfolded protein response in Arabidopsis. *Plant J.* 79: 1033-1043.
- Yang, Z.T., Wang, M.J., Sun, L., Lu, S.J., Bi, D.L., Sun, L., Song, Z.T., Zhang, S.S., Zhou, S.F., Liu, J.X. (2014b). The membrane-associated transcription factor NAC089 controls ER-stress-induced programmed cell death in plants. *PLoS Genet.* 10: e1004243.
- Yang, S.D., Seo, P.J., Yoon, H.K., Park, C.M. (2011). The Arabidopsis NAC transcription factor VNI2 integrates abscisic acid signals into leaf senescence via the COR/RD genes. *Plant Cell* 23: 2155-2168.
- Yamada, K., Shimada, T., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. (2004), A VPE family supporting various vacuolar functions in plants. *Physiol. Plant* 123: 369– 375.
- Yoshida, S. (2003). Molecular regulation of leaf senescence. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6: 79-84.
- Zeller, G., Henz, S.H., Widmer, C.K., Sachsenberg, T., Rättsch, G., Weigel, D., Laubinger, S. (2009). Stress-induced changes in the Arabidopsis thaliana transcriptome analyzed using whole-genome tiling arrays. *Plant J.* 58: 1068–1082.
- Zhang, K., Gan, S.S. (2012). An abscisic acid-AtNAP transcription factor-SAG113 protein phosphatase 2C regulatory chain for controlling dehydration in senescing Arabidopsis leaves. *Plant Physiol.* 158: 961-969.
- Zhang, K., Xia, X., Zhang, Y., Gan, S.-S. (2012). An ABA-regulated and Golgi-localized protein phosphatase controls water loss during leaf senescence in Arabidopsis. *Plant J.* 69: 667–678. Zhang, H., Zhou, C. (2013). Signal transduction in leaf senescence. *Plant Mol. Biol.* 82: 539-545.

## Figure legends

**Figure 1.** Growth-related parameters of the transgenic lines and the wild-type cv. BR16 throughout development. The values at the indicated DAG represent the mean  $\pm$  S.D. of five biological replicates. Asterisks indicate means that are significantly different from that of BR16 by Tukey's HSD ( $p < 0.1$ )

**Figure 2.** Yields of *GmNAC081*-overexpressing soybean lines. Different letters indicate statistically significant differences between the means according to Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

**Figure 3.** The reproductive stages of BR16 and the transgenic lines. The dots represent the day after germination (DAG) required for the first plant of a given genotype ( $n=5$ ) to reach the indicated reproductive event.

**Figure 4.** *GmNAC081* overexpression accelerates leaf senescence in soybean. A, B Developmental performance of representative plants from the 35S::*GmNAC81.1*, 35S::*GmNAC81.2* and 35S::*GmNAC81.3* lines at 96 DAG and 103 DAG. C. Chlorophyll loss during the progression of leaf senescence. The total chlorophyll content was measured over time in the leaves of the wild-type and the 35S::*GmNAC81* lines during senescence. D. Lipid peroxidation in wild-type and 35S::*GmNAC81* leaves. Lipid peroxidation in the leaves was monitored by determining the level of thiobarbituric acid (TBA)-reactive compounds and is expressed as the malondialdehyde content. E, F, G, H. Physiological measurements of *GmNAC081*-overexpressing lines throughout development. CO<sub>2</sub> assimilation (C), respiration (D), the Fv/Fm ratio (E) and the Ci/Ca ratio of the third fully expanded trifoliolate leaves of the WT and the 35S::*GmNAC81* lines were measured with a LI-6400 infrared (IR) gas analyzer during the experimental period. For C, D, E, F, G and H, asterisks indicate means that are significantly different from that of BR16 by a Tukey test ( $p < 0.1$ ,  $n=5$ ) on the same DAG. I and J. The expression of senescence-associated genes. Total RNA was isolated from the leaves of senescing wild-type (BR16) and 35S::*GmNAC81* leaves, and the transcript levels of selected genes (as indicated) were quantified by real-

time PCR using gene-specific primers. Gene expression was calculated using the  $2^{-\Delta\text{CT}}$  method, and RNA helicase served as an endogenous control. The error bars indicate 95% confidence intervals based on t-tests ( $p < 0,05$ ,  $n=3$ ).

**Figure 5.** The expression profiles of *GmNAC081* and *GmNAC030* after exposure to different environmental stimuli. A time course of *GmNAC030*, *GmNAC081* and *GmNAC035* induction after exposing soybean plants at the VC developmental stage to drought (A), abscisic acid (ABA) (B), NaCl (C), cold (D), salicylic acid (SA) (E) and methyl jasmonate (MeJa) (F) for the indicated length of time. The fold variation in gene expression (relative to the control treatments) was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  method with helicase as an endogenous control. The error bars represent the confidence interval ( $\alpha = 0.05$ ) of three biological replicates.

**Figure 6.** The relative abundance of phytohormones in wild-type and 35S::GmNAC81 transgenic plants. A, B, C. The relative contents of abscisic acid (A), salicylic acid (B) and jasmonic acid (C) were determined from extracts of the third trifoliolate leaves at 82 DAG. The values represent the means  $\pm$  SD of three replicates. Different letters indicate significantly different means between the genotypes (Tukey's test,  $p < 0.1$ ).

**Figure 7.** The temporal and organ-specific expression of *GmNAC081*. A. The accumulation of *GmNAC081* transcripts at different developmental stages. Total RNA was isolated from wild-type leaves at the indicated DAG, and the transcript levels of the indicated genes were determined via quantitative RT-PCR. Gene expression was calculated using the  $2^{-\Delta\text{CT}}$  method, and 18S rRNA served as an endogenous control. The error bars indicate the 95% confidence interval based on a t-test ( $p < 0,05$ ,  $n=3$ ). B. The transcriptional activity of the *GmNAC081* promoter at different developmental phases in transgenic tobacco plants expressing the pNAC81-GUS fusion gene. Specific GUS activity was determined via fluorometric assays of total extracts from seedlings, non-senescent leaves and senescent leaves. The error bars indicate the 95% confidence interval based on a t-test ( $p < 0,05$ ,  $n=3$ ). WT is the untransformed control and WT\* is an additional control in which the pNAC81-GUS fusion gene had segregated out, leading to a WT genotype. "Control" represents plants transformed with the promoter-less binary vector (empty vector). Asterisks indicate significant

differences from the respective controls by Tukey's HSD ( $p < 0.05$ ). C and D. Histochemical analysis of GUS staining in leaf discs (LDs) and leaf transverse sections (LTSs) of WT, WT\* and tobacco leaves transformed with the empty vector (pCAMBIA) or with pGmNAC081-GUS.

**Figure 8.** Direct target genes of GmNAC081 are induced by *GmNAC081* overexpression. A, B, C. Total RNA was isolated from wild-type and senescing leaves from independently transformed transgenic lines (35S::*GmNAC081.1*, 35S::*GmNAC081.2* and 35S::*GmNAC081.3*), and the transcript levels of the indicated genes were determined by quantitative RT-PCR. Gene expression was calculated using the  $2^{-\Delta CT}$  method, and 18S rRNA (A, B, D) or RNA helicase (C) were used as endogenous controls. The error bars indicate 95% confidence intervals based on t-tests ( $p < 0.05$ ,  $n=3$ ). A. The abundance of *GmNAC081* mRNA in 35S::*GmNAC081* lines at 82 DAG. B. The induction of VPE by *GmNAC081* overexpression. C and D. The expression of GmNAC081 direct target genes in *GmNAC081*-overexpressing lines.

**Figure 9.** Virus-induced gene silencing of *GmNAC081*. A. Detection of viral DNA in infected plants. Total DNA was isolated from uninfected leaves (lanes 1 and 2), from leaves inoculated with the empty VIGS vector + pSoCSV-DNAB (pSoCSV, lanes 7-12) and from leaves inoculated with pSoCSN-NAC81 + pSoCSV-DNAB (lanes 8-13) at 28 DPI as detected with viral DNA-specific primers. M indicates DNA markers (kb). B. Reduced expression of *GmNAC081* in the infected leaves of plants that had been independently inoculated with pSoCSV-NAC81. Total RNA from the infected leaves was isolated, and the transcript levels of *GmNAC081* were determined by quantitative RT-PCR. Gene expression was calculated using the  $2^{-\Delta CT}$  method, and RNA helicase was used as an endogenous control. The error bars indicate a 95% confidence interval based on a t-test ( $p < 0.05$ ,  $n=3$ ). C. mRNA abundance of GmNAC081 direct target genes in silenced leaves. The expression of the indicated genes was monitored by quantitative RT-PCR as described in B.

**Figure 10.** Inactivation of *GmNAC081* function delays leaf senescence. A. Representative images of plants at the R7 reproductive stage that had been infected with pSoCSV or pSoCSV-NAC81 in combination with pSoCSV-DNAB. B. Lipid peroxidation in leaves infected with the indicated VIGS vector. Lipid peroxidation in leaves was monitored by determining the level of thiobarbituric acid (TBA)-reactive compounds and is expressed as the malondialdehyde content. The error bars indicate the 95% confidence interval based on a t-test ( $p < 0,05$ ,  $n=3$ ). C. The mRNA abundance of VPE in *GmNAC081*-silenced leaves. The expression of VPE was monitored by quantitative RT-PCR. Gene expression was calculated using the  $2^{-\Delta CT}$  method, and RNA helicase was used as an endogenous control. The error bars indicate the 95% confidence interval based on a t-test ( $p < 0,05$ ,  $n=3$ ).

**Figure S1.** Ectopic expression of GmNAC081 in transgenic lines. A. Molecular diagnose of homozygous transgenic lines. PCR was performed on total DNA from transgenic seedlings using primers, which amplify a 850-bp fragment from the GmNAC081 cDNA (transgene) and 1800-bp from GmNAC081 genomic sequence (endogenous gene). The lane 1 corresponds to a positive control; lane 3, to a negative control; lanes 4-8, wilt type seedlings; lanes 9-13, individual seedlings of 35S::GmNAC81-1; lanes 14-18, 35S::GmNAC81-2 and lanes 19-23, 35S::GmNAC81-3. M indicates DNA markers in kb. B. Enhanced accumulation of GmNAC081 transcripts in overexpressing lines. Total RNA was isolated from wild-type leaves and independently transformed soybean lines (35S::GmNAC81.1, 35S::GmNAC81.2 and 35S::GmNAC81.3) at the indicated days after germination (DAG) and GmNAC081 transcript levels were determined by quantitative RT-PCR, using GmNAC081-specific primers. Relative quantitation of expression was calculated using  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method and 18SrRNA as endogenous control. Values are relative to the control treatment (wild type) and error bars indicate 95% confidence interval based on the t test ( $p < 0,05$ ,  $n=3$ ).

**Figure S2.** Developmental performance of representative plants of the 35S::GmNAC81.1; 35S::GmNAC81.2; 35S::GmNAC81.3 lines. Wild-type (WT) and transgenic soybean lines were grown in greenhouse under normal growth conditions,

examined weekly and photographed at the days after germination indicated in the figure. First plant is wild type, second, 35S::GmNAC81.1 line, third, 35S::GmNAC81.2 line and forth, 35S::GmNAC81.3 line.

**Figure S3.** Gas exchange analysis of wild type (BR16) and 35S::GmNAC081 lines along 110 DAG of normal development. A, B. Stomatal conductance (A), and transpiration rate (E) of the third fully expanded leaf of WT and transgenic lines (as indicated) were measured by the LI-6400 infrared (IR) gas analyser. Asterisks indicate statistically different means from BR16 by the Tukey test ( $p < 0.1$ ,  $n=5$ ) on the same DAG.

**Figure S4.** Regression analysis of photosynthesis data among BR16, 35S::GmNAC81.1, 35S::GmNAC81.2 and 35S::GmNAC81.3. A. The quadratic models were the best fitted (BR16  $R^2 = 0.85$ , 35S::GmNAC81.1  $R^2 = 0.849$ , 35S::GmNAC81.2  $R^2 = 0.92$ , 35S::GmNAC81.3  $R^2 = 0.88$ ) for all genotypes. B and C. The Maximum peak of (B) and the area under (C) the fitted curves of the genotypes were calculated using the confidence intervals of 95% for each coefficient of the quadratic function. D. Decay rate of the photosynthesis data corresponding to late developmental stages (senescence), when the linear models resulted in best fitted curve lines for all genotypes (BR16  $R^2 = 0.8741$ , 35S::NAC81.1  $R^2 = 0.9356$ , 35S::NAC81.2  $R^2 = 0.9178$ , 35S::NAC81.3  $R^2 = 0.9034$ ).

**Figure S5.** Photochemical process and energy dissipation of wild type (BR16) and 35S::GmNAC081 lines. A, B, C. Electron transport rate (ETR; A), non-photochemical quenching (qN; B), and photochemical quenching (qP, C) of chlorophyll fluorescence parameters were measured as assessment of photosynthetic activity of the indicated genotypes.

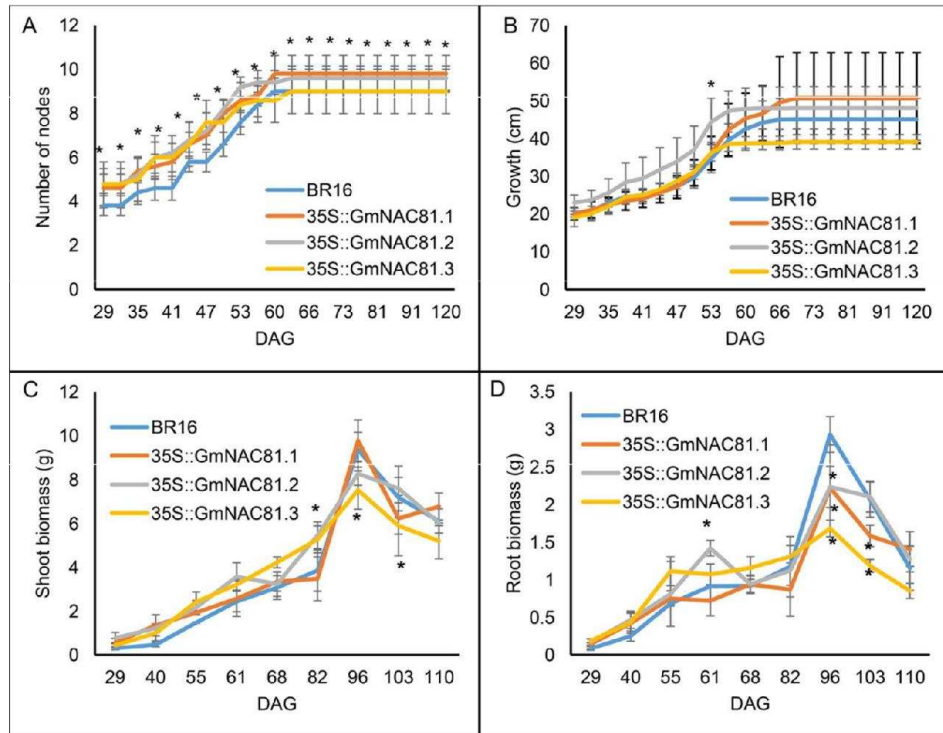


Figure 1.  
Growth-related parameters of the transgenic lines and the wild-type cv. BR16 throughout development.

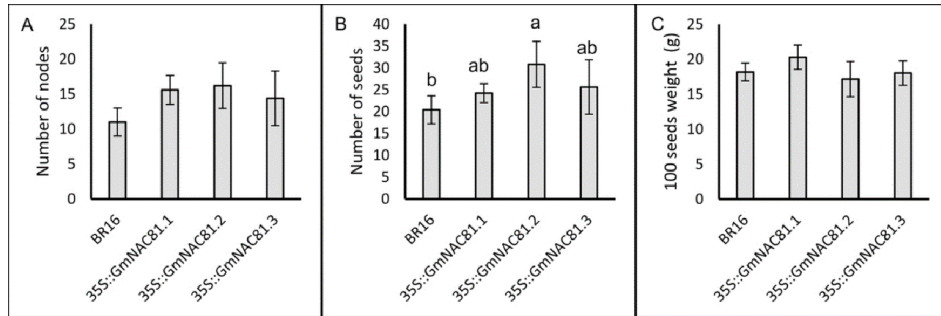


Figure 2.  
Yields of GmNAC081-overexpressing soybean lines.

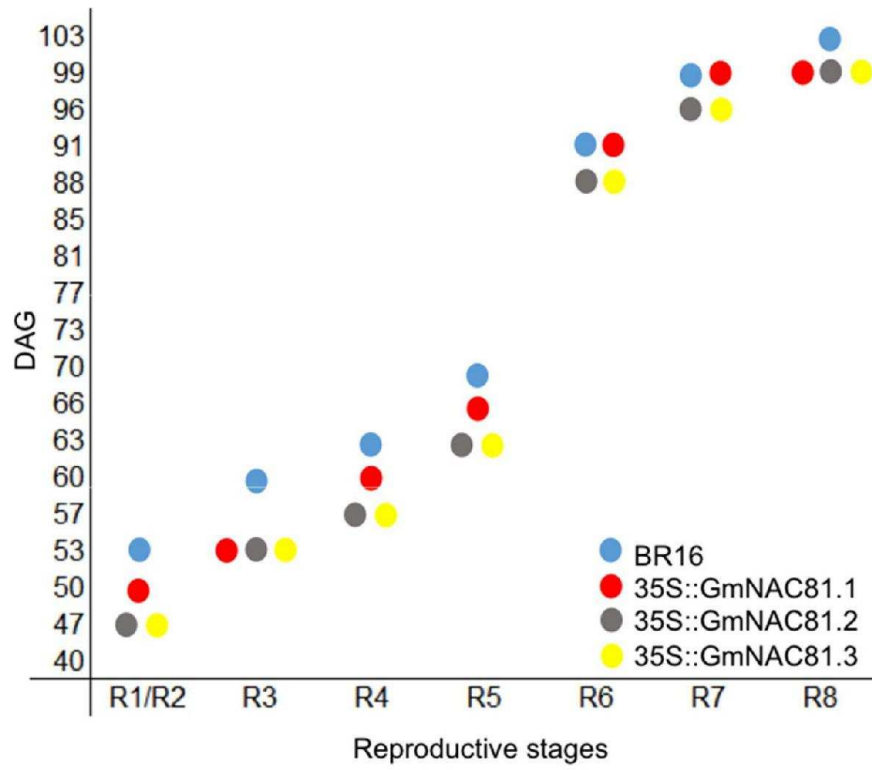


Figure 3.  
The reproductive stages of BR16 and the transgenic lines.

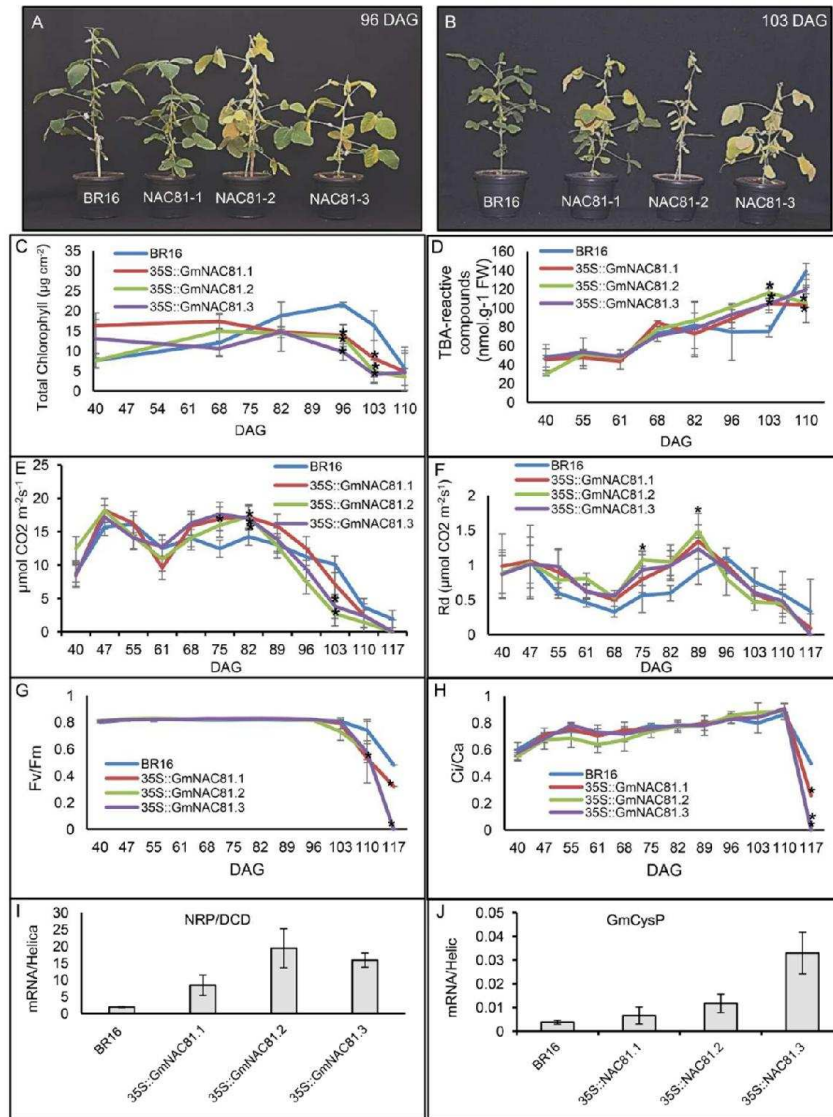


Figure 4. GmNAC081 overexpression accelerates leaf senescence in soybean.

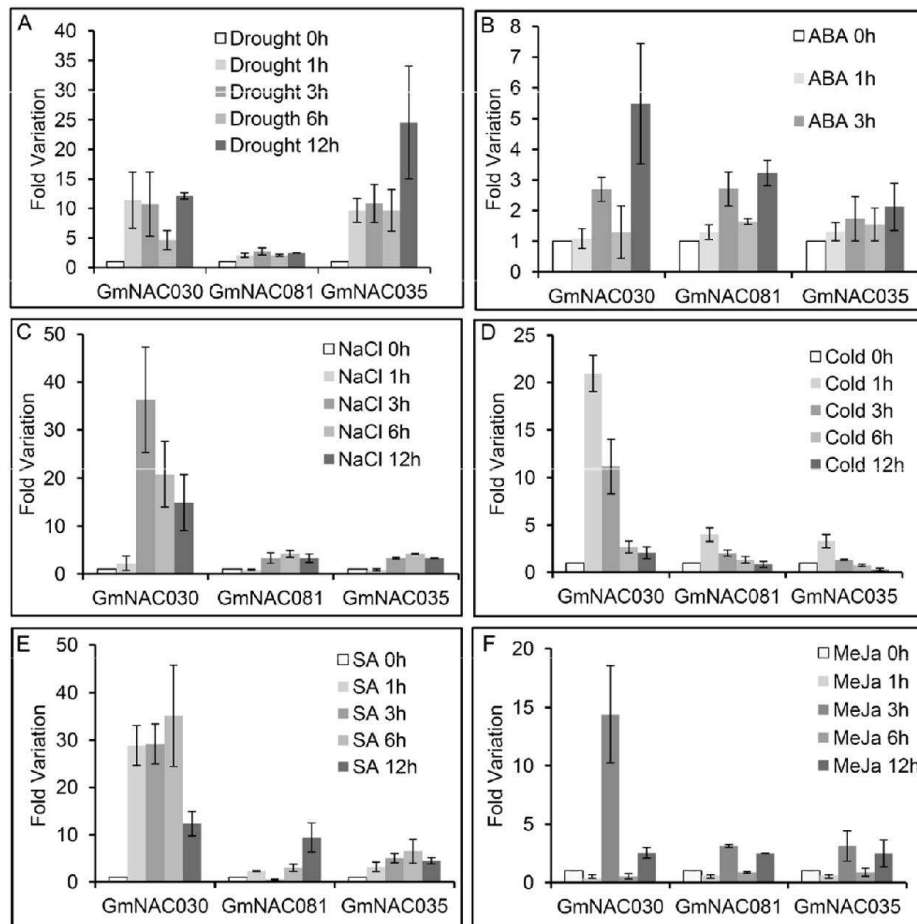


Figure 5.  
The expression profiles of GmNAC081 and GmNAC030 after exposure to different environmental stimuli.

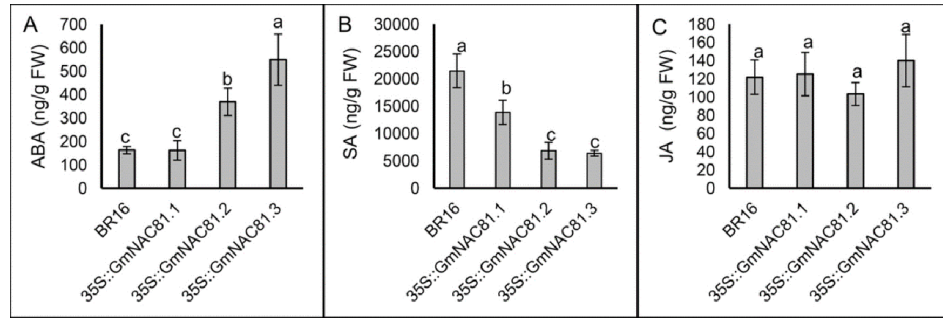


Figure 6.  
The relative abundance of phytohormones in wild-type and 35S::GmNAC81 transgenic plants.

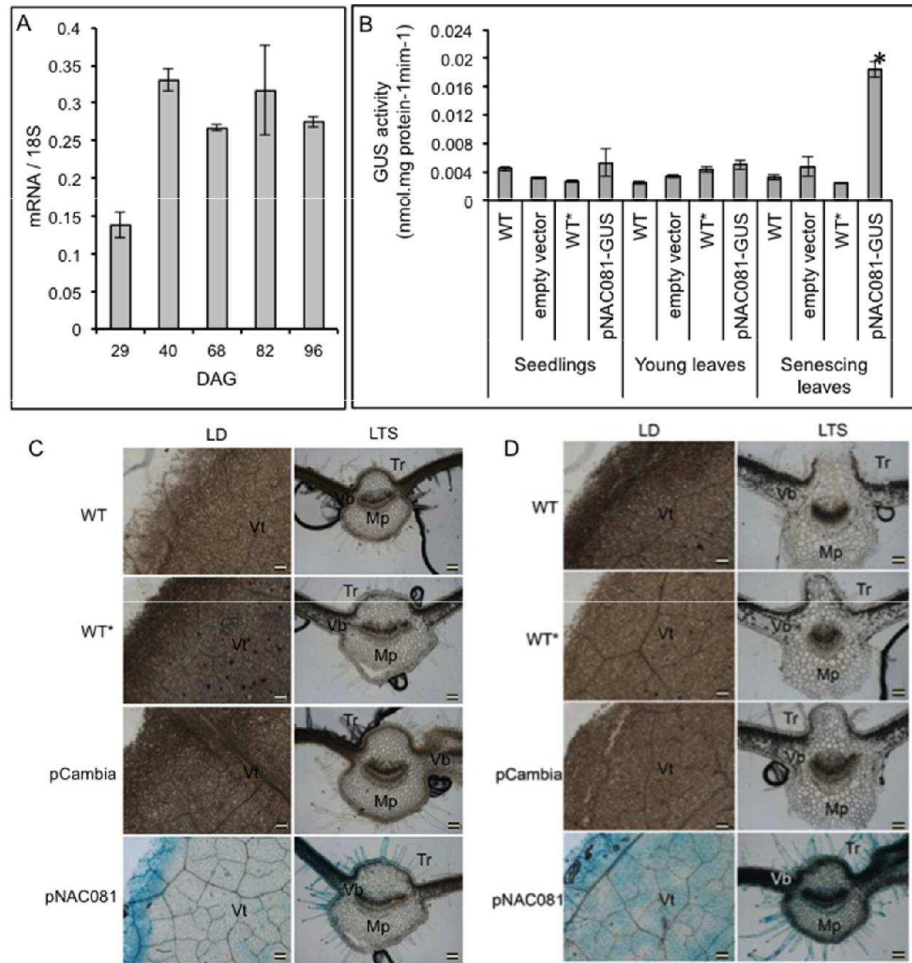


Figure 7.  
The temporal and organ-specific expression of GmNAC081.

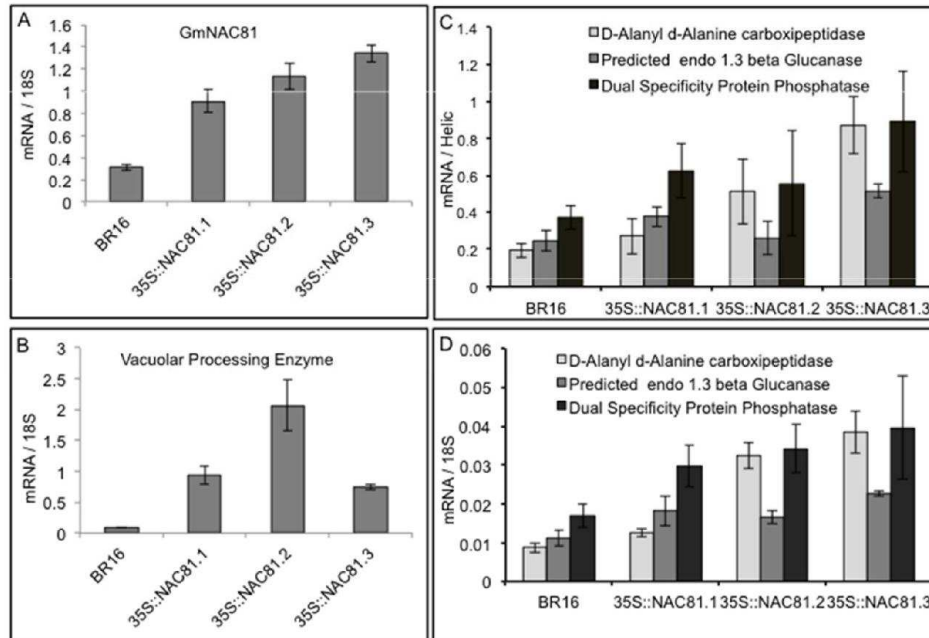


Figure 8.  
Direct target genes of GmNAC081 are induced by GmNAC081 overexpression.

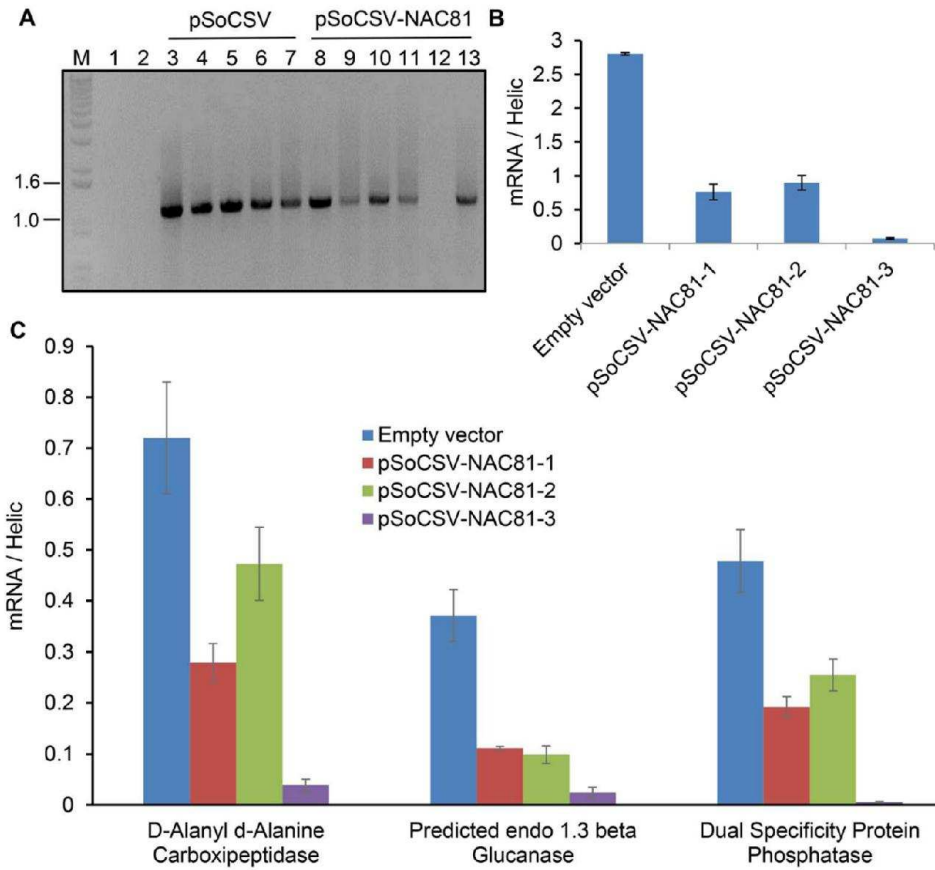


Figure 9.  
Virus-induced gene silencing of GmNAC81.

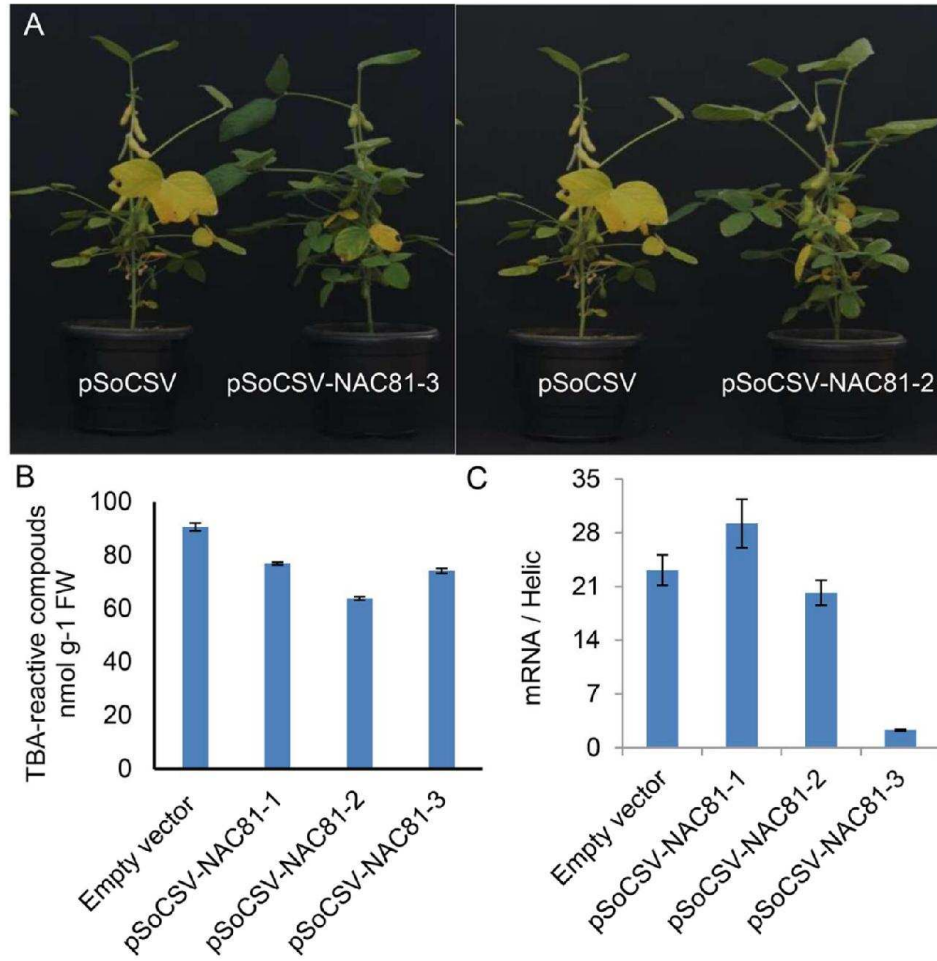


Figure 10.  
Inactivation of GmNAC81 function delays leaf senescence.

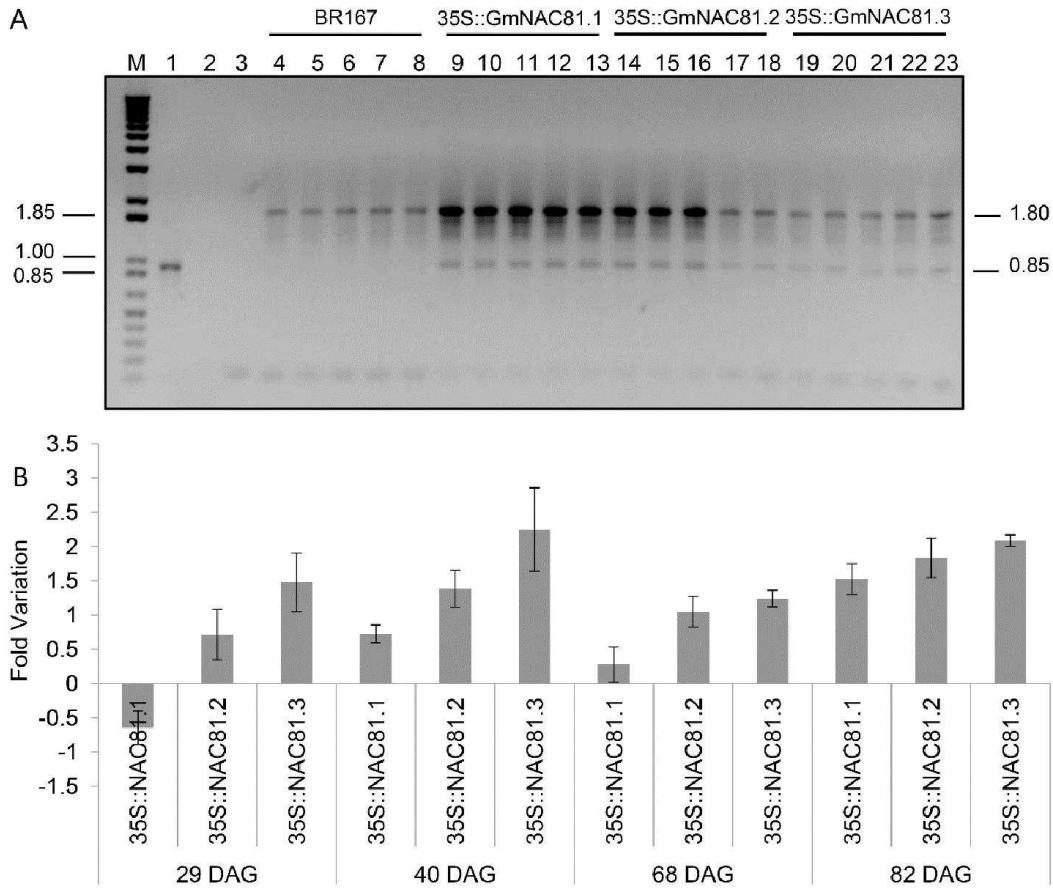


Figure S1.  
Ectopic expression of GmNAC081 in transgenic lines.



Figure S2.  
 Developmental performance of representative plants of the 35S::GmNAC81.1;  
 35S::GmNAC81.2; 35S::GmNAC81.3 lines.

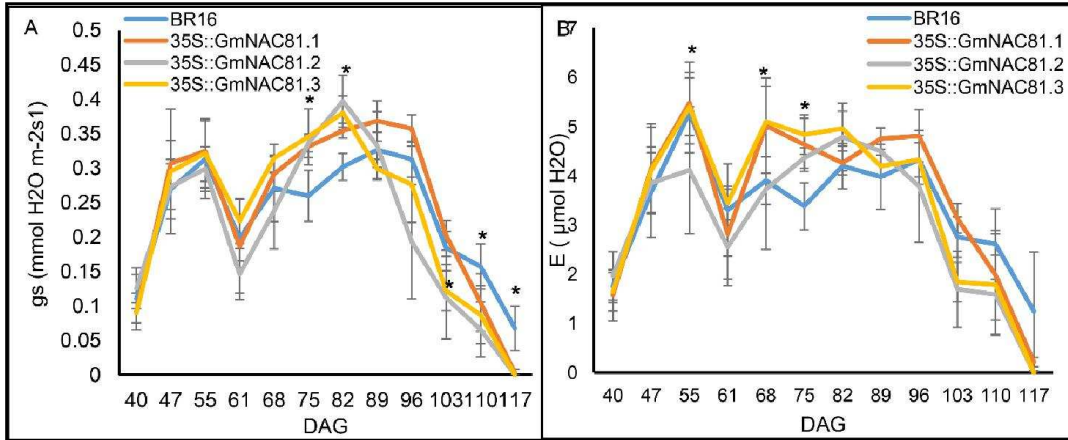


Figure S3.  
Gas exchange analysis of wild type (BR16) and 35S::GmNAC081 lines along 110 DAG of normal development.

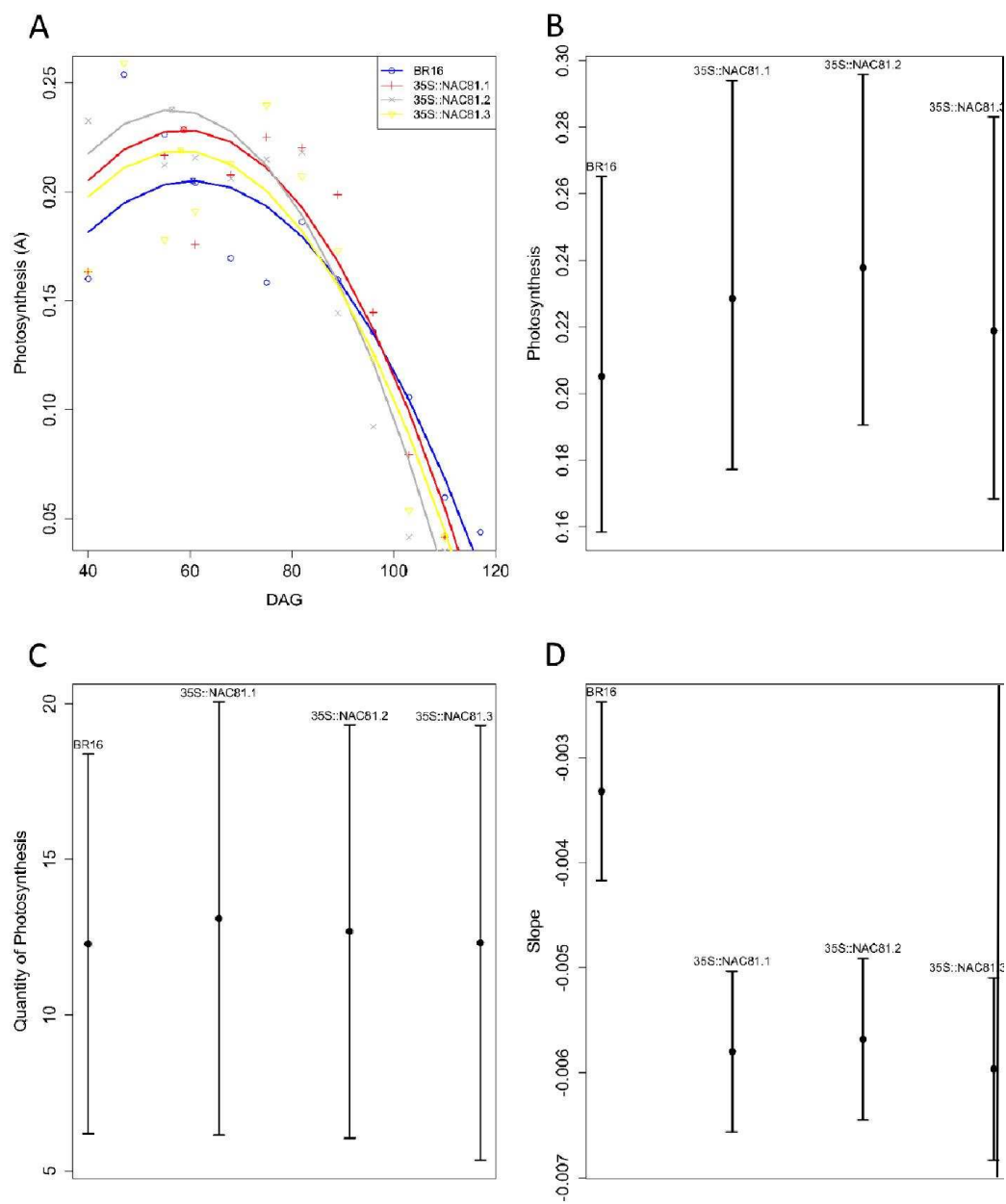


Figure S4.  
Regression analysis of photosynthesis data among BR16, 35S::GmNAC81.1, 35S::GmNAC81.2 and 35S::GmNAC81.3.

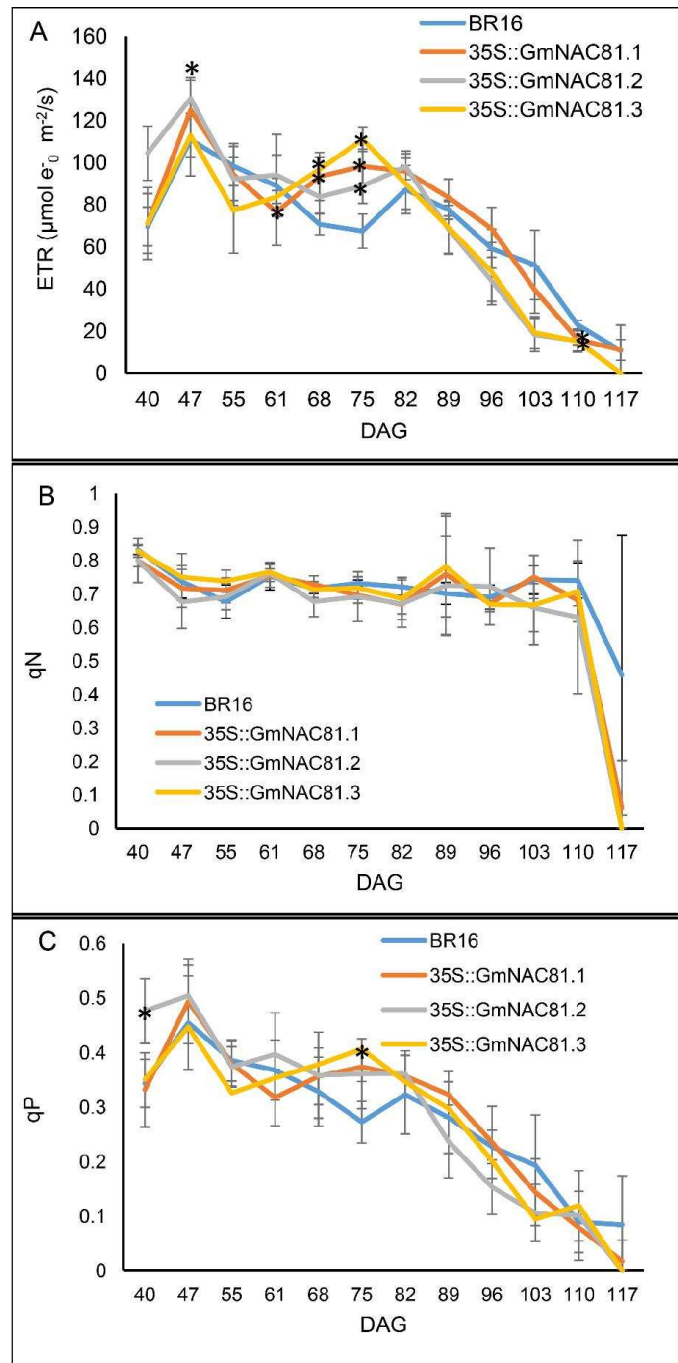


Figure S5.  
Photochemical process and energy dissipation of wild type (BR16) and 35S::GmNAC81 lines.

Supplemental Table 1. Primers used for expression analysis by quantitative real time RT-PCR (qRT-PCR).

Oligonucleotide	Sequence (5'-3')	Gene
Nac6 Fwd	CCAACAAAAGCACTTGTGGCA	NAC6 (NAC81)
Nac6 Rvs	GGACTATTCAACTGAGCCCAAAAG	
NAC030 fwd	TGCCGGAAGCGGGTACT	NAC30
NAC030 rvs	CGGATTTCCGATCGGTTTG	
NAC2 Fwd	GGGTGCTTTGCCGATTTACAA	NAC2 (NAC35)
NAC2 Rvs	CTCCTCCGCTTTTCAGAATCTC	
HELIC Fwd	TAACCCTAGCCCC TTCGCCT	HELICASE
HELIC Rvs	GCCTTGTCGTCTTCCTCCTCG	
18S Fwd	CCTTCAATGGATCCATCGTTA	18S
18S Rvs	AAACGGCTACCACATCCAAG	
Nrich fwd	TACAGGCATCCAATTTGGCGAACC	NRP-B
Nrich Rvs	TGACTTGAAAGAGTTGATCTCACCCC	
GmCYSTP Fwd	TGGAAAGCAACTCAATCATGGT	CystP
GmCYSTP Rvs	CCCCATGAGTTCTTCACAATCC	
Glyma18g02260 Fwd	GGATCCATGGTCCCCTTCTC	D-alanyl-d alanine carboxipeptidase
Glyma18g02260 Rvs	TCCATGCCTTGCTGACGTT	
Glyma18g50180 Fwd	TTGGTGGGTCTTGCATATGGT	Predicted endo 1,3 beta glucanase
Glyma18g50180 Rvs	TGTGCGGCTAGAATTTCCAAT	
Glyma06g15000 Fwd	AGGAACCCTTATGAGTATCACCATGA	Dual specificity protein phosphatase
Glyma06g15000 Rvs	GGTTGAGAGCCCACAATCAAG	
GmVPE Fwd	GTTGGGGAACATATTGCC	Vacuolar Processing Enzyme VPE
GmVPE Rvs	TCTTCCATCCAAGCAAACT	

## CAPÍTULO 2

### **Mecanismo de controle transcricional da expressão do gene SbMATE em *Sorghum bicolor* (L.) Moench**

## Resumo

Muitas espécies de plantas são sensíveis a concentrações micromolares de Al. Em sorgo, o gene de resistência ao alumínio é SbMATE, que é altamente expresso no ápice da radícula e codifica um transportador de membrana que pertence à família MATE (*multidrug and toxic compound extrusion family*) que é responsável pelo efluxo citrato ativado por alumínio. Nesta espécie a região codificadora do gene de tolerância ao alumínio é idêntica entre cultivares tolerantes e sensíveis. Além de um polimorfismo encontrado no segundo íntron, elementos transponíveis do tipo MITE foram detectados na região promotora, sendo o número de repetições MITE positivamente relacionada com a tolerância. Neste trabalho, a análise *in silico* do promotor de SbMATE apresentou sequências típicas de promotores eucarióticos assim como a presença de elementos cis regulatórios que conferem tolerância ao alumínio em *Arabidopsis*. A ausência de atividade de promotores inteiros transformados em *Arabidopsis* sugerem a presença de elementos cis regulatórios negativos reprimindo a atividade em *Arabidopsis* ou ainda, a presença de silenciamento transcricional por RNA de interferência em *Arabidopsis* que não ocorre em *Sorghum*. Deleções do promotor, mostraram que os repressores estão localizados na sequência do elemento transponível já que na ausência deste elemento, o promotor passa a ser ativo em todas as partes da planta de forma independente da idade. A prospecção por fatores de transcrição que controlam a capacidade de resposta do gene SbMATE de *Sorghum* e a análise da interação entre prováveis transfatores com o promotor de SbMATE, foram realizadas através do sistema mono-híbrido em leveduras e evidenciaram a necessidade da obtenção de uma nova biblioteca de cDNA confeccionada por um kit mais adequado à esta planta, além da utilização de diferentes vetores de clonagem para as análises das interações.

## **Introdução**

Plantas são constantemente expostas a condições ambientais adversas, tais como: variações de temperatura, seca, salinidade e acidez. Esses fatores restringem significativamente, tanto o crescimento vegetal, quanto sua produtividade agrícola, o que limita a disponibilidade geográfica de áreas cultiváveis. Estresses abióticos constituem a principal causa de prejuízos na agricultura em todo o mundo, diminuindo a média de lucros para os principais cultivares em mais da metade e acarretando numa perda de milhões de dólares a cada ano (Buchanan et al, 2000) Dentre os diversos estresses abióticos, a acidez destaca-se como um tipo de estresse importante, uma vez que afeta 40% das terras aráveis. Estresse por acidez de solo é especialmente comum em regiões tropicais e subtropicais, devido à maior pluviosidade (Von Uexkull and Mutert, 1995) O Cerrado brasileiro, por exemplo, ocupa 205 milhões de hectares do território nacional e, apesar de apresentar excelentes qualidades no que se refere à topografia, luminosidade, temperatura e estrutura física do solo, se caracteriza por possuir baixa fertilidade, pH ácido e elevada saturação de alumínio (Al; Embrapa/CNPAC, 2000).

O alumínio é o metal mais abundante e o terceiro elemento mais comum na crosta terrestre. Em valores de pH levemente ácido ou neutro, o alumínio se encontra principalmente na forma de aluminos silicatos insolúveis ou óxidos. No entanto, devido a acidez dos solos, formas fitotóxicas de Al são liberadas na solução do solo em níveis que afetam o crescimento da raiz (Kochian, 1995). Plantas intoxicadas por Al apresentam uma rápida inibição do crescimento radicular, o que resulta em um sistema radicular pouco desenvolvido, incapaz de explorar camadas mais profundas de solo (Kochian, 1995) Os efeitos fitotóxicos diretos do Al, bem como os efeitos indiretos que resultam na restrição da absorção de nutrientes e susceptibilidade à seca, são as principais causas de baixa produtividade das culturas em solos ácidos.

O alumínio também provoca a diminuição da permeabilidade da membrana plasmática (Ahn, 2001), por meio da interação com fosfolípidos de membrana (Jones, 1997), peroxidação de lípidos (Peixoto, 2001; Yamoto, 2001), assim como também a disfunção mitocondrial e aumento de espécies reativas do oxigênio ROS (Yamamoto, 2002). As plantas utilizam mecanismos de proteção que podem ser classificados em tolerância interna ao alumínio no simplasma e exclusão do Al do simplasma.

A planta do sorgo caracteriza-se pela tolerância ao estresse hídrico, o que a distingue do milho. Sob estresse hídrico, o milho encurta seu ciclo e tem sua produtividade reduzida; já o sorgo, nessas condições, paralisa seu desenvolvimento e aguarda condições favoráveis, demandando cerca de 325 mm de chuva para completar o seu ciclo. Num sistema integrado de produção, o sorgo, além de ser uma alternativa à cultura do milho nas regiões semi-áridas, tem um grande potencial de produção de biomassa, para forragem, bioenergia ou para cobertura do solo nos sistemas de plantio direto (Paul, 1990 em Walguil, 2006). O sorgo, sexto cereal mais cultivado do mundo, é, portanto, uma cultura economicamente importante. Devido ao seu valor agrônomico e nutritivo, pode ser comparado ao milho (Rodrigues *et al.*, 2002), aparecendo como alternativa interessante, uma vez que seu cultivo pode atender uma parte da demanda brasileira de grãos (Coelho *et al.*, 2002).

A herança da tolerância ao Al em sorgo foi estudada em uma população F2:3 derivada do cruzamento das linhagens de sorgo SC283 (tolerante) e BR007 (sensível). Os resultados mostraram tratar-se de uma herança monogênica, sendo o gene de tolerância ao Al, designado AltSB (Magalhães *et al.*, 2004). Posteriormente, o gene SbMATE, foi isolado pela técnica de clonagem posicional (Magalhães *et al.*, 2007)

SbMATE possui maior expressão no ápice radicular e codifica um transportador de membrana pertencente à família multigênica MATE (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion family*), responsável pelo efluxo de citrato ativado pelo tratamento com Al. Na linhagem tolerante, os níveis de expressão do gene SbMATE aumentam ao longo do tempo de exposição ao Al. O citrato liberado em resposta ao Al forma um complexo estável e insolúvel com os íons Al (atóxico), prevenindo assim a sua absorção pela planta (Magalhães *et al.*, 2007).

Em sorgo, a região codificadora do gene de tolerância ao alumínio, SbMATE, é idêntica entre cultivares tolerantes e sensíveis. Além do polimorfismo encontrado no segundo íntron, elementos transponíveis do tipo MITE foram detectados na região promotora, sendo o número de repetições MITE positivamente relacionada com a tolerância (Magalhães *et al.*, 2007). Linhagens isogênicas geradas de vários alelos de AltSB retêm diferentes graus de tolerância ao alumínio quando comparadas aos parentais. Tal diferença variou de 20% a 70% resultando em linhagens sensíveis mesmo quando originadas de doadores tolerantes, sugerindo a transferência incompleta do loci regulatório in trans (Melo, 2013). Esta transferência incompleta da tolerância ao alumínio

nas linhagens isogênicas é associada à expressão de SbMATE, enfatizando a importância de fatores regulatórios *in trans*.

O entendimento das interações moleculares que controlam expressão gênica constitui um pré-requisito para a definição de estratégias com a finalidade de alterar geneticamente a expressão e acúmulo de proteínas celulares específicas. As cinéticas de indução do gene SbMATE e seu padrão de expressão aumentado em linhagens tolerantes à toxidez do alumínio estão coerentes com um modelo no qual a potencialização da expressão do gene alvo confere tolerância a condições adversas de alumínio no solo. Assim sendo, torna-se absolutamente necessário elucidar os mecanismos de controle da expressão do gene SbMATE, a fim de aumentarmos a eficiência e o controle de tolerância a alumínio mediada por esse gene.

## **Revisão de literatura**

### **O Sorgo**

O sorgo *Sorghum bicolor* (L.) Moench pertence à família Poaceae e, agronomicamente, é classificado em quatro grupos: i) granífero, que inclui tipos de porte baixo (híbridos e variedades) adaptados à colheita mecânica; ii) forrageiro para silagem e/ou sacarino, que inclui tipos de porte alto (híbridos e variedades) apropriados para confecção de silagem e/ou produção de açúcar e álcool; iii) forrageiro, que inclui tipos utilizados principalmente para pastejo, corte verde, fenação e cobertura morta (variedades de capim sudão ou híbridos inter-específicos de *Sorghum bicolor* x *Sorghum sudanense*) e iv) vassoura, que inclui tipos de cujas panículas são confeccionadas vassouras (Ribas, 2003).

Atualmente, mais de 500 milhões de pessoas nos países em desenvolvimento dependem do sorgo como o principal alimento básico (Mutisya, *et al.*, 2009), onde é usado em diferentes preparações como pães, mingaus, cuscuz e tortilhas (Dicko, 2006; Queiroz, 2009; Queiroz, 2011). No Brasil, o sorgo é plantado em uma área de 644.050 ha, obtendo produção total de 1 499 396 t na safra 2010 (IBGE, 2011). Verifica-se, porém, um baixo rendimento médio (2 328 kg/ha). O cereal é cultivado, principalmente, visando

à produção de grãos para suprir a demanda das indústrias de ração animal e como forragem para a alimentação de ruminantes, praticamente não havendo consumo de sorgo na alimentação humana (Dykes *et al.*, 2005).

Sorgo é uma espécie versátil que pode ser produzida como fonte de grãos, forragem, açúcares e biomassa. Além disso, diversos trabalhos têm demonstrado que a farinha de sorgo, por não possuir glúten, tem grande potencial para ser usada, em substituição à farinha de trigo, especialmente, na preparação de produtos alimentícios destinados à indivíduos celíacos (Ciacci *et al.*, 2007). Esse cereal tem sido reconhecido como rico em fitoquímicos capazes de afetar significativamente a saúde humana, como taninos, ácidos fenólicos, antocianinas, fitoesteróis e policosanóis (Awika, 2004).

Devido ao pequeno genoma (735 Mb), o sorgo tem sido utilizado como um modelo atrativo para avanços no entendimento da estrutura, função e evolução dos genomas dos cereais. É um representante de gramíneas tropicais que têm fotossíntese “C4” (ao contrário do arroz, que tem fotossíntese “C3” e representa gramíneas de clima temperado), usando assim de bioquímica complexa e especializações morfológicas que melhoram a assimilação de carbono em temperaturas elevadas (Paterson, 2008). Sendo uma cultura economicamente importante, o desenvolvimento de cultivares superiores mais produtivas, tem atraído o interesse cada vez mais crescente de melhoristas e biólogos moleculares de plantas (Ribas, 2003).

### **Fisiologia do estresse por alumínio**

Apesar dos numerosos trabalhos, os mecanismos fisiológicos da tolerância ao alumínio ainda não estão totalmente conhecidos. Sabe-se que a região do ápice radicular é o alvo primário da ação fitotóxica do alumínio (Ryan, 1992). Este metal, ao ser absorvido, tende a se acumular, preferencialmente, no ápice da raiz, promovendo a inibição da divisão celular e, conseqüentemente, do alongamento radicular (Kochian, 1995). Outros sintomas causados ao sistema radicular pelo estresse ao alumínio incluem reduções no peso de massa seca, no número e comprimento das raízes, frequentemente associados ao aumento no raio médio e no volume radicular (Sivaguru, 1993). Isso resulta na redução de absorção da água e nutrientes minerais (Calbo, 1980; Mendonça, 2003), com efeito nas taxas fotossintéticas e respiratórias (Ohki, 1986), promovendo severas perdas em crescimento e produtividade.

Na parte aérea, as plantas demonstram os danos causados pelo Al após um tempo maior sob estresse. Tais danos parecem ser consequência daqueles ocorridos nas raízes (Matsumoto, 1976; Ryan, 1993). O estresse causado pelo Al pode modificar a translocação de nutrientes para a parte aérea das plantas, provocando o aparecimento de clorose (Chang, 1998) e necrose foliar (Nguyen, 2003).

Em alguns casos, estes sintomas assemelham-se aos das deficiências do fósforo, cálcio ou nitrogênio (Rout, 2001). Estes fatos foram observados por Mendonça (2003) e por Freitas, (2006) que, trabalhando com diferentes cultivares de arroz submetidos ao estresse por Al, evidenciaram alterações nas concentrações dos macronutrientes na parte aérea das plantas.

A carga elétrica  $Al^{3+}$  permite que o Al reaja com numerosos sítios nas células, alvos potenciais de injúria, incluindo a parede celular, citoesqueleto e membrana plasmática (Kochian, 2004). Segundo Wagatsuma (1995), a membrana plasmática parece ser o alvo primário dos danos provocados pelo Al. Na parede celular, o Al pode ligar-se aos grupos carboxílicos das pectinas e das proteínas diminuindo a extensibilidade (Delhaize, 1995). Já na membrana plasmática, a ligação do Al aos lipídeos e proteínas atua inibindo o transporte de nutrientes e acarretando distúrbios no metabolismo celular (Delhaize, 1995).

A peroxidação de lipídeos é outro processo induzido nas membranas celulares pelo Al. Os danos peroxidativos decorrem principalmente da deteriorização oxidativa de ácidos graxos insaturados das membranas pela ação de intermediários reativos do oxigênio (ROS) presentes no interior das células (Scandalios, 1993). ROS podem se tornar altamente destrutivas para células e tecidos se sua proteção não for estritamente controlada. Assim a formação de ROS é uma consequência inevitável do metabolismo dos organismos aeróbios e provocam estresse oxidativo devido a sua ação tóxica e mutagênica sobre as células (Apel, 2004).

Muitos processos deletérios sofridos pelas plantas submetidas à condições adversas são mediados por espécies reativas do oxigênio, como consequência tanto do funcionamento defeituoso de vias metabólicas, como também, de processos fisiológicos normais. Existem diversas situações ambientais capazes de produzir estresse oxidativo e, portanto, a redução das ROS pode, também, ser considerada como uma característica universal do estresse (Moldes, 2006).

A citotoxicidade de ROS ajuda a explicar a evolução de mecanismos complexos enzimáticos e não enzimáticos de detoxificação em plantas. As enzimas antioxidantes

catalase, superóxido dismutase, ascorbato/glutationa oxidase e glutaciona peroxidase participam do sistema enzimático. Enquanto, os sistemas peroxiredoxina, tioredoxina, glutaredoxina, carotenos e tocoferol, estão entre os não enzimáticos (Campos, 2009).

O aumento da tolerância aos estresses pode estar fortemente relacionado ao aumento da atividade de sistemas antioxidantes das plantas. A dismutase do superóxido (SOD) é a primeira enzima de defesa contra danos provocados pelas espécies reativas do oxigênio nas células, uma vez que ela transforma o ânio superóxido ( $O_2^-$ ) em  $O_2$  e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), utilizando  $2H^+$  (Alscher, 2002). O  $H_2O_2$  produzido pode ser eliminado pela ação da catalase, que o transforma em  $O_2$  e  $H_2O$ , ou pela atuação da peroxidase do ascorbato, que, ao oxidar o ascorbato (Asc), transforma-o em monodesidroascorbato (DHA). Caso os níveis de  $H_2O_2$  não sejam reduzidos por estas duas enzimas, ele pode reagir com outros ânios superóxidos, pela reação de Haber-Weiss, resultando em  $O_2$ , íons  $OH^-$  e radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ), aumentando o estresse oxidativo. Este último radical é mais uma forma de ROS, que pode contribuir, juntamente com as demais, para diversos tipos de danos oxidativos celulares (Resende, 2003).

### **Mecanismo de toxidez por alumínio**

As espécies de Al que são relevantes à fitotoxicidade podem ser categorizadas em várias classes diferentes. No que diz respeito às classes presentes na solução que banha a raiz, estas incluem formas livres ou formas mononucleares de Al, Al polinuclear e Al como complexos de baixo peso molecular. No citoplasma celular, podem ser considerados também complexos macromoleculares reversíveis ou irreversíveis (Magalhães, 2008).

Em soluções ácidas ( $pH < 5.0$ ), o Al solubiliza-se passando à forma de octaedro hexahidratado ( $Al(H_2O)_6^{3+}$ ), que por convenção é chamado  $Al^{3+}$  (Figura 1) Esta espécie é fitotóxica para as plantas, mesmo em concentrações micromolares (Delhaize e Ryan, 1995), interferindo em grande variedade de processos fisiológicos e moleculares (Kochian *et al.*, 1995) e causando danos no sistema radicular das plantas, cuja extensão dependendo grau de susceptibilidade do genótipo afetado e do nível de saturação de alumínio no solo (Magalhães, 2008). O aumento do pH causa desprotonações sucessivas formando  $Al(OH)_2^+$  e  $Al(OH)^{+2}$ . Em pH neutro, o alumínio apresenta-se na forma de  $Al(OH)_3$  (gibsite), composto que não é tóxico às raízes das plantas, sendo esta a base

química da neutralização do efeito fitotóxico do  $\text{Al}^{3+}$  pela prática da calagem (Magalhães, 2008). À medida que o pH aumenta para os valores comumente encontrados no citoplasma, (pH=7.4), o íon aluminato  $\text{Al}(\text{OH})_4^-$  domina a especiação (Kochian *et al.*, 1995).

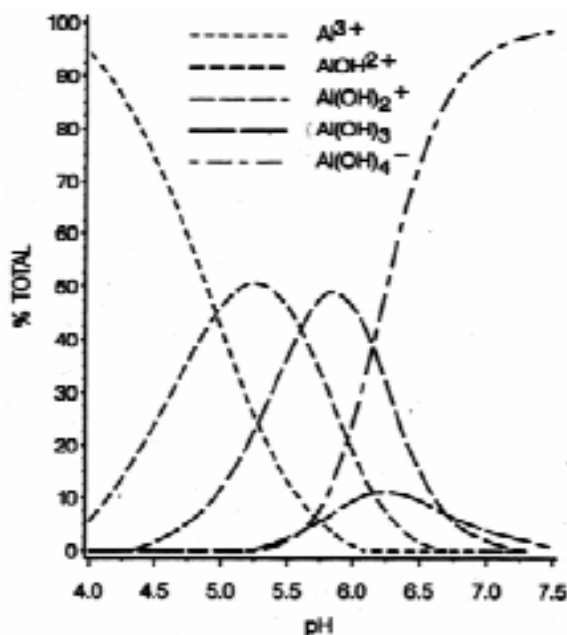


Figura 1: Hidrólise do  $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ . Em Martin (1992), citado por Magalhães 2008.

O Al é tóxico para a grande maioria das espécies de plantas cultivadas, interferindo em vários processos bioquímicos. Estes incluem transdução de sinais, particularmente na sinalização via  $\text{Ca}^{2+}$  (Rengel, 2003), por meio da inibição da enzima fosfolipase C (Jones, 1995). Além disso, pode ligar-se a componentes da parede celular (Yang, 2008) alterando sua capacidade de troca catiônica (Panda *et al.*, 2009) e sua extensibilidade (Ma *et al.*, 2004). Pode-se observar também deposição de calose (Sivaguru, 2000; Jones, 2006), podendo obstruir os plasmodesmas (Sivaguru, 2000) e a rigidificação da parede celular (Jones, 2006).

A membrana plasmática possui a superfície carregada negativamente, representando um alvo sensível a fitotoxicidade do Al (Ma, 2007. Panda *et al.*, 2009). O Al liga-se fortemente aos fosfolípidios modificando sua composição (Jones, 1997; Delhaize, 1999; Peixoto *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2009) reduzindo assim, a fluidez das membranas e aumentando a densidade de empacotamento dos lipídios (Chen *et al.*, 1991).

Além disso, o Al pode induzir a despolarização da membrana por inibir a H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática, impedindo a formação e manutenção do gradiente de H<sup>+</sup> (Ahn *et al.*, 2001; Kochian, 2005). O Al interfere no transporte secundário de íons, causando indiretamente alteração na homeostase dos íons nas células da raiz (Kochian, 2005), assim como também, inibe rápida e eficazmente o influxo de Ca<sup>2+</sup> para dentro das células vegetais (Rengel, 2003), modulando a atividade de transportadores através de mudanças no potencial de membrana (Kochian, 2005). No citoplasma celular, pode interromper a dinâmica do citoesqueleto, interagindo com os microtúbulos e filamentos de actina (Kochian, 2004), além de poder afetar as funções da respiração mitocondrial (Panda, 2008) e induzir o estresse oxidativo (Richards, 1998).

Embora, a maior fração do Al associado ao sistema radicular seja encontrado no apoplasma (Kue, 2008), parte significativa do cátion consegue penetrar rapidamente e interagir com moléculas e estruturas subcelulares do simplasma (Lazof, 1996; Taylor, 2000), como os núcleos de células da região meristemática do ápice da raiz. Graças à grande afinidade por grupos fosfato (Kiss, 1996), o Al liga-se ao DNA, afetando negativamente sua atividade molde e a estrutura da cromatina, resultando em modificação do processo de divisão celular (Barceló, 2002; Kochian, 2005).

Plantas afetadas pelo Al apresentam sintomas de deficiência de nutrientes, tais como P e o Ca<sup>2+</sup>, que são complexados ao alumínio ainda no solo, tornando-o indisponível para as plantas (Huang *et al.*, 1996; Pereira, 2008).

### **Mecanismos de tolerância ao alumínio**

Nas últimas décadas, muitos laboratórios ao redor do mundo têm concentrado seus esforços em identificar e caracterizar os mecanismos de tolerância das plantas a níveis tóxicos de Al em solos ácidos (Ma, 2001; Pana, 2009). A compreensão destes mecanismos é de fundamental importância para o desenvolvimento de procedimentos para a seleção rápida de plantas resistentes ao Al e com bom desempenho em solos ácidos (Barceló, 2002).

As plantas não respondem da mesma forma ao estresse por alumínio, utilizam-se de vários mecanismos, selecionados durante a evolução, para contornarem seus efeitos tóxicos (Hunag, 2009). Tais mecanismos parecem ser resultado de duas estratégias de desintoxicação do Al utilizadas pelas plantas e podem ser classificados em: tolerância

interna ao alumínio no simplasma e tolerância externa. Neste último caso há a exclusão do Al do ápice radicular por diferentes processos incluindo sua imobilização nas paredes celulares, a permeabilidade seletiva das membranas, a formação de barreira de pH induzida pela planta na rizosfera, bem como a liberação de ácidos orgânicos para o apoplasto e rizosfera (Ma *et al.*, 2001; Ryan *et al.*, 2001; Kochian *et al.*, 2005; Ma, 2007; Panda, 2009; Ryan, 2010).

Na tolerância interna, a planta seria capaz de crescer e se desenvolver mesmo após a entrada de Al no simplasma das células. Uma vez dentro das células ocorre a desintoxicação interna, envolvendo a quelação do Al citoplasmático e o seqüestro subsequente no vacúolo através de transportadores (Figura 2).

Em plantas que opera o mecanismo interno de desintoxicação, o Al é quelado no citosol por ácidos orgânicos, proteínas, ou outros ligantes orgânicos formando complexos não-tóxicos e, em seguida, estes complexos são compartimentalizados nos vacúolos. Deste modo, o Al modifica pouco ou nada o metabolismo da planta (Kochian, 2005; Ma, 2000; Ma, 2001. Ryan, 2010). Este mecanismo de tolerância é encontrado principalmente em espécies endêmicas de regiões com solos ácidos, onde a capacidade de lidar com a toxicidade ao Al é pré-requisito para sua sobrevivência (Ryan, 2010).

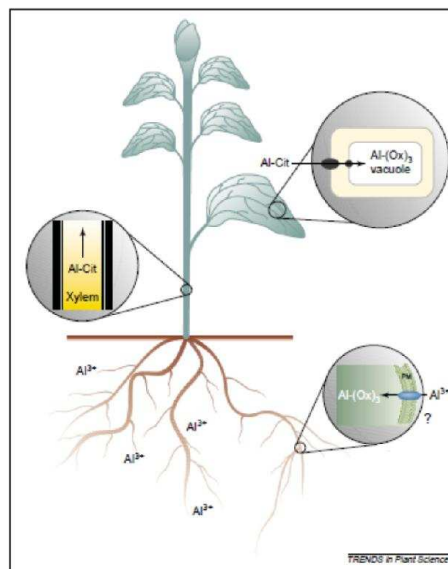


Figura 2: Absorção e distribuição de diferentes formas do alumínio em plantas acumuladoras. O alumínio entra na raiz por um mecanismo desconhecido, provavelmente como  $Al^{3+}$ . Uma vez que atravessa a membrana plasmática, o  $Al^{3+}$  é complexado com oxalato para formar um complexo Al:oxalato (1:3). Quando Al é translocado das raízes para a parte aérea, ocorre no xilema uma reação de troca de ligante para formar Al-citrato. Uma vez descarregado do xilema para as células foliares, outra mudança de ligante ocorre para reformar o complexo Al-oxalato, que é então armazenado no vacúolo. Abreviaturas: Cit, citrato; Ox, oxalato; PM, membrana plasmática (Ma, 2001)

Alguns estudos demonstram a existência de um mecanismo, que envolve genes que codificam proteínas similares às proteínas do tipo transportadores ABC (ATP binding cassette). Dois genes que codificam para transportadores ABC: ALS3 e ALS1, associados à tolerância ao alumínio em *Arabidopsis* (Larsen, 2005; 2007), e têm sido funcionalmente caracterizados, como responsáveis por desintoxicar substâncias orgânicas e inorgânicas (Shulz, 2006). ALS1 é expresso no ápice das raízes e em tecidos vasculares, sendo expresso na membrana vacuolar (Larsen, 2007). ALS3 é expresso em diferentes órgãos e está localizado na membrana plasmática (Larsen *et al.*, 2005)

Os genes STAR1 (*Sensitive to Al rhizotoxicity1*) e STAR2 foram identificados por sua indução ao Al. STAR1 codifica um domínio de ligação à nucleotídeos, enquanto STAR2 codifica um domínio transmembrana. Ambos os genes são expressos principalmente nas raízes e são especificamente induzidos pela exposição ao Al. STAR1 interage com STAR2 para formar um complexo que funciona como um único transportador ABC. O complexo transporta UDP-Glc e é necessário para atolerância ao Al em arroz (Huang, 2009). STAR2 é homólogo à ASL3 embora apresentem padrões de expressão diferentes. STAR2 é expresso apenas em raízes, enquanto ASL3 é expresso em raízes, folhas, caules e flores.

Todavia, o maior mecanismo de tolerância ao alumínio em plantas envolve a ativação de transportadores de membrana, que medeiam a exudação de ácidos orgânicos pela raiz (Kochian, 2004). Através do mecanismo de exclusão do alumínio, as plantas são capazes de impedir que seja absorvido pela raiz e se acumule no simplasma (Ryan, 2010). Isto se dá por meio da exudação pela planta de compostos fenólicos (Ofei-Manu, 2001), formação de mucilagem (Miyasaka, 2001), aumento do pH da rizosfera (Degenhardt, 1998) e exudação de ácidos orgânicos como o malato, citrato e oxalato, capazes de formar complexos com Al no meio externo; realizando a alcalinização da rizosfera; a redistribuição e, ou efluxo do alumínio (Ma, 2007).

Dois padrões de secreção de ácidos orgânicos são conhecidos (You, 2010- Figura 03). No padrão I, ocorre a exudação do ácido orgânico após poucos minutos de exposição ao alumínio. Ocorre a ativação do canal e liberação do ácido orgânico preexistente. Por exemplo, no trigo e trigo sarraceno, a secreção de malato ou oxalato, respectivamente, foi detectável dentro de 15 a 30 minutos após a exposição ao Al (Delhaize, 1993; Zheng, 1998).

No Padrão II, a secreção de ácido orgânico ocorre várias horas após a exposição ao alumínio. Tal atraso indica que a indução de proteínas, envolvidos no metabolismo do

ácido orgânico ou no transporte de ânions de ácidos orgânicos seria necessária. Por exemplo, em *C. tora*, o efluxo máximo de citrato ocorre após 4-h de exposição ao Al (Ma, 1997). Em milho, parece que Al pode desencadear tanto um efluxo rápido de citrato, quanto uma liberação retardada do ácido orgânico, aumentando durante um período de 48h (Pineros, 2001).

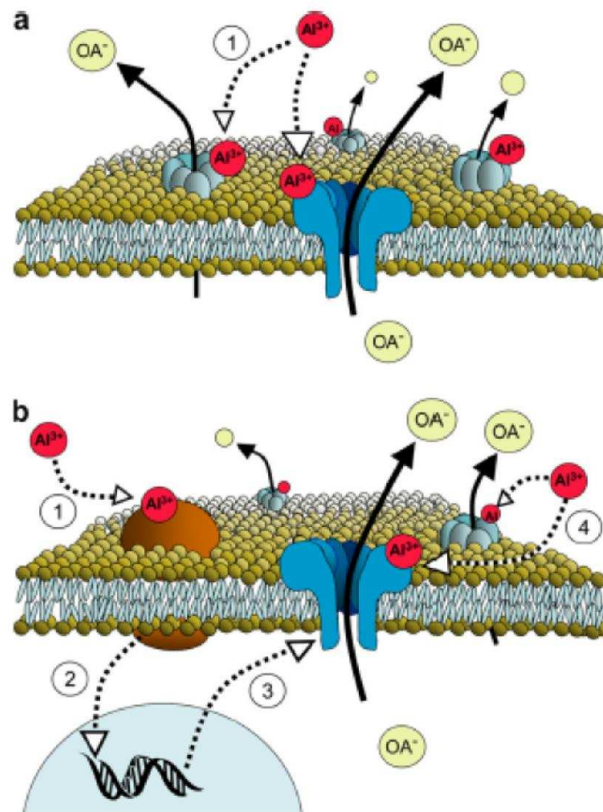


Figura 3: Modelos hipotéticos para o efluxo de ânions orgânicos, ativados por  $\text{Al}^{3+}$ , pelos membros das famílias de proteínas ALMT e MATE. (a) Padrão I: A proteína é expressa constitutivamente em ápices de raízes em genótipos resistentes, mostrando maior expressão do que genótipos sensíveis ao alumínio. O  $\text{Al}^{3+}$  (círculos vermelhos) ativa o efluxo de ânion orgânico ( $\text{OA}^-$ ), interagindo diretamente com as proteínas pré-existentes na membrana plasmática (proteínas azuis; seta 1). Este modelo explica o efluxo de malato via TaALMT1 em trigo. (b) Padrão II: O  $\text{Al}^{3+}$  primeiro induz a expressão das proteínas através de uma via de transdução de sinal possivelmente envolvendo um receptor específico (setas 1, 2 e 3) ou respostas de estresses não-específicas. O  $\text{Al}^{3+}$  ativa então o efluxo do ânion orgânico por interação com as proteínas recentemente sintetizadas na membrana plasmática (seta 4). Este modelo explica o efluxo de malato ativado por  $\text{Al}^{3+}$  via AtALMT1 em *Arabidopsis* e via BnALMT1 em *B. napus*, bem como o efluxo de citrato ativado por alumínio via AltSB em sorgo (Delhaize, 2007).

Embora a exudação de ácidos orgânicos já fosse previamente conhecida, o gene que controla a resistência ao alumínio, através da exudação de ácidos orgânicos, só foi isolado há nove anos. Sasaki *et al.* (2004), isolaram e caracterizaram, pela primeira vez, um gene que confere um efluxo de malato ativado por alumínio em trigo (*Triticum*

*aestivum*). TaALMT (*Triticum aestivum*aluminium-activated malate transporter) codifica um membro da família ALMT que consiste em proteínas transmembranas (Delhaize, 2007), que consiste em um transportador de malato ativado por alumínio que é capaz de conferir tolerância ao alumínio em células vegetais.

ALMT está localizado na membrana plasmática e funciona como um canal de ânion ativado pelo alumínio exudando malato pelas células da raiz (Yamaguchi, 2005; Zhang, 2008). Homólogos do referido gene foram também encontrados em *Brassica napus* (BnALMT; Ligaba, 2006) e *Arabidopsis thaliana* (AtALMT; Hoekenga, 2006), centeio (ScALMT1; Collins, 2008), e cevada (HvALMT1; Gruber, 2010). Entretanto, ZmALMT1 (Pineros, 2008) e ZmALMT2 (Ligaba, 2012) não são associados a tolerância ao alumínio em milho.

Outros importantes genes de resistência ao alumínio foram também descritos; nesses casos, o ácido orgânico exudado é o citrato, sendo a proteína envolvida pertencente à família MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*; Furukawa, 2007). A família de proteínas transportadoras MATE corresponde a um grande e diversificado grupo de proteínas presentes em procariotos e eucariotos. Muitos membros da família MATE parecem funcionar como transportadores secundários para remover pequenos compostos orgânicos do citosol (Omote *et al.*, 2006; Kuroda, 2009; Magalhães, 2010). Genes MATE foram relacionados à resistência ao alumínio em sorgo (Magalhães, 2007) cevada (HvAACT1; Furukawa, 2007), trigo (TaMATE1; RYAN, 2009), *Arabidopsis* (AtMATE; Liu *et al.*, 2009), centeio (ScFRDL2; Yokosho, 2010), milho (Maron, 2010) e arroz (OsFRDL4; Yokosho, 2011)

Embora os membros destas famílias de proteínas sejam diferentes em sua sequência e estrutura, conferem resistência ao  $Al^{3+}$  de uma forma similar, estão envolvidas na exudação de malato e citrato, podendo, em alguns casos, coexistirem na mesma espécie (Liu *et al.*, 2009). Acredita-se que o efluxo de oxalato e de outras espécies de ácidos orgânicos possa ser controlado por uma terceira família de genes, ainda não identificada.

## Regulação da expressão de genes de tolerância ao alumínio.

Em *Arabidopsis*, a expressão de ambos os genes, AtALMT e AtMATE, é regulada por um fator de transcrição do tipo dedo de Zinco Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>-type, designado STOP1 (*Sensitive to proton rhizotoxicity 1*), que é também associado com a tolerância à baixos pHs (Iuchi, 2007). Além de AtALMT e AtMATE (Liu, 2009), análises de microarranjo de mutantes *stop1* indicaram que ALS3 (Larsen, 2005) também é regulado por STOP1 (Sawaki, 2009)

Homólogo à STOP1, o gene ART1 (*Aluminium resistance transcription factor 1*), também pertence à família de fatores de transcrição do tipo dedo de Zinco Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>-type, interage com o cis-elemento [GGN(T/g/a/C)V(C/A/g)S(C/G)] e regula a expressão de genes envolvidos na tolerância ao alumínio (TSUTSUI, 2011), como STAR1 e STAR2, pertencentes à família de transportadores ABC (Huang, 2009), Nrat1 (Xia, 2010), OsFRDL (Yokosho, 2011) e OsALS1 (Huang, 2012).

*Nrat1* codifica para um transportador de membrana plasmática, específico para o alumínio trivalente, sendo necessário para tolerância ao Al em arroz, tem sua expressão, induzida pelo alumínio em células de raiz e é pertencente à família de proteínas Nramp (*natural resistance-associated macrophage protein*) (Xia, 2010). Linhagens knockout para *Nrat1* exibem alta sensibilidade ao alumínio, assim como aumento de acúmulo de alumínio na parede celular e sua diminuição nas células das raízes (Xia, 2010), o que sugere a importância de *Nrat1* na captação de alumínio. OsFRDL4, representante da família MATE, em arroz, é um transportador de citrato com baixo nível de expressão nas raízes, na ausência de Al, mas induzido após exposição ao metal (Yokosho, 2011); e OsALS1, um transportador ABC envolvido na tolerância ao alumínio em arroz (Huang, 2012) (Figura 4)

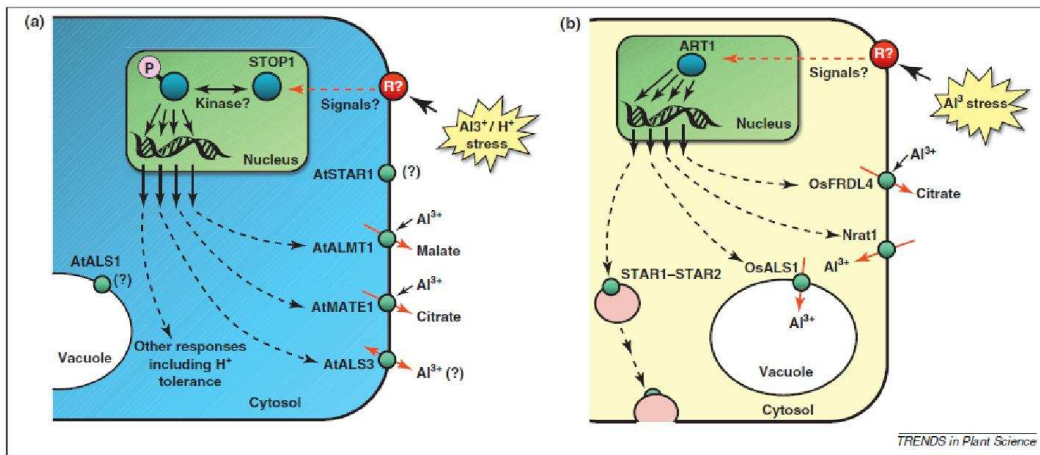


Figura 4: Modelos que ilustram a indução coordenada de genes envolvidos na tolerância ao alumínio (a) *Arabidopsis*: Alumínio e/ou prótons interagem com um receptor de membrana plasmática (R), para iniciar uma via de transdução de sinal (linha vermelha pontilhada). Uma cinase fosforila STOP1 (sensitive to proton rhizotoxicity 1) para convertê-lo à forma ativa. STOP1 ativada interage com sequências do promotor de alguns genes aumentando sua transcrição. A análise de mutantes confirmou que três destes genes estão envolvidos em mecanismos de tolerância ao alumínio. *Aluminium-activated malate transporter1 (AtALMT)* and *multidrug and toxic compound extrusion1 (AtMATE)* estão localizados na membrana plasmática de células de raízes, onde transportam ânions orgânicos para o meio externo, quando ativado por  $Al^{3+}$ . Os ânions orgânicos secretados se ligam e detoxicam o  $Al^{3+}$  para proteger os ápices radiculares. *Aluminium sensitive 3 (AtALS3)* é um transportador ABC que se encontra na membrana plasmática e acredita-se que seja responsável por redistribuir  $Al^{3+}$  dentro da planta, tais como células apicais das raízes. Outros genes também estão sob o controle de STOP1, incluindo aqueles que codificam para mecanismos de tolerância a prótons e, possivelmente, outros mecanismos de tolerância ao  $Al^{3+}$ . Até hoje, não existem evidências diretas para um receptor, via de transdução de sinal e quinase e/ou fosfatase específica para STOP1. AtALS1 e *Sensitive to Al rhizotoxicity1 (AtSTAR1)* não são induzidos pelo tratamento por  $Al^{3+}$  e suas funções permanecem desconhecidas. Este modelo é baseado em um proposto por Iuchi *et al.* 2009. (b)  $Al^{3+}$  resistance transcription factor 1 (ART)-regula a tolerância ao alumínio em arroz. ART1 é ativado por  $Al^{3+}$  através de uma via desconhecida e liga-se às regiões do promotor de múltiplos genes (pelo menos 31) envolvidos na tolerância. Os genes regulados pelo ART1 incluem: *Oryza sativa ferric reductase defective3-like4 (OsFRDL4)*, que codifica um transportador de citrato localizado na membrana e é ativado por  $Al$ ; *Nramp aluminium transporter 1 (Nrat1)*, que codifica um transportador de influxo de membrana plasmática; STAR1-STAR2, que codificam para um tipo bacteriano de transportador ABC implicado na modificação da parede celular e OsALS1, que codifica para um transportador para alumínio localizada no tonoplasto. A maioria dos genes regulados por ART1 ainda não foram caracterizados e o papel na tolerância ao alumínio não é conhecido. Os pontos de interrogação na figura denotam processos que não foram verificados experimentalmente (Delhaize, 2012).

Em *Sorghum bicolor*, através de clonagem posicional, Magalhães *et al.*, (2007) fizeram o mapeamento genético de linhagens tolerantes e sensíveis ao alumínio e localizaram o lócus de SbMATE, AltSB, numa região de 24, 6 Kpb do BAC 181g10, mapeado na região terminal do terceiro cromossomo.

Foram encontradas regiões polimórficas apenas em íntrons e regiões não codificantes quando comparadas aos éxons. A mais divergente dentre elas, apresenta um indel de 728-pb upstream ao TATA box predito para *SbMATE* e abriga um elemento transponível do tipo MITE (Figura 5). Magalhães *et al.*, (2007) amplificaram a região de inserção MITE e verificaram correlação positiva e significativa entre a variação no

tamanho dessa região e a tolerância ao alumínio. A análise da região MITE em acessos de sorgo selecionados também apresentou padrão altamente estruturado e repetido além de seqüências que flanqueavam o local de inserção MITE. Esta estrutura pode ser única ou repetida três, quatro e cinco vezes (BR007, BR012 e SC283 respectivamente).

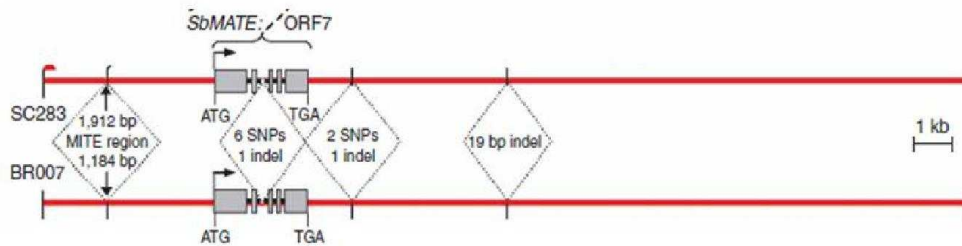


Figura 5: Região alvo (24,6 Kb) de SC283 (tolerante ao alumínio) e BR007 (sensível ao alumínio). Os polimorfismos estão mostrados nos losângulos, cinco éxons (em cinza) e quatro íntrons (linhas pretas) (Magalhães, 2007).

Polimorfismos na região codificadora são mais raros, tendo sido observados em duas linhagens Tx642 e SC566 (Melo *et al.*, 2013). Na primeira, sensível ao alumínio, inserções, deleções e SNPs promovem a formação de um stop codon prematuro, gerando uma proteína SbMATE truncada. Na linhagem SC566, que é resistente ao alumínio e mostra altas taxas de exudação de citrato pelas raízes, o único SNP, identificado no primeiro éxon, causa uma mudança não conservativa do aminoácido leucina para histidina na terceira hélice do domínio transmembrana próximo à grande alça citoplasmática.

Estes mesmos autores mostraram que linhagens isogênicas feitas pela introgressão de alelos de *AltSB* apresentaram grande variação na tolerância ao alumínio quando comparadas aos seus parentais e que, esta transferência incompleta da tolerância ao alumínio em linhagens isogênicas é associada à redução na expressão de SbMATE e indica a utilização de fatores regulatórios agindo *in trans*.

A detecção de um eQTL de efeito maior, co-localizado com o loco *AltSB*, confirmou a dominância dos efeitos em *cis* no controle da expressão do gene *SbMATE* (Melo *et al.*, 2013). Entretanto, um outro eQTL foi detectado fora do loco *AltSB*, no qual possivelmente estão localizados fatores em *trans* que afetam a expressão do gene *SbMATE*. O mapeamento por intervalo múltiplo (multiple interval mapping – MIM, Kao *et al.*, 1999) também foi realizado para melhor controle da variância genética residual e para analisar a ocorrência de interação epistática entre os QTLs identificados. Ao final, os eQTLs

identificados foram confirmados e observou-se a ocorrência de interação epistática entre eles, compatível com um modelo de interação entre transfatores e a região promotora do gene *SbMATE* (dados não publicados).

Devido ao fato das regiões físicas dos eQTLs serem extensas, compreendendo vários genes candidatos, foi realizado o estudo de mapeamento associativo (*genome-wide association* – GWAS) para mapeamento de alta resolução dos transfatores, por meio da qual foi possível encontrar SNPs associados à tolerância ao AI e à expressão do gene *SbMATE* co-localizados na região dos eQTLs, o que possibilitou a identificação dos 23 transfatores candidatos (dados não publicados), aqui estudados.

Levando-se em consideração que a região codificadora de *SbMATE* apresenta alta porcentagem de identidade entre os alelos sensíveis e tolerantes, e que, a maior divergência entre as linhagens apresenta-se no número de cópias repetidas de inserções MITE, acredita-se que as mesmas estejam localizadas em regiões regulatórias de *SbMATE*, e que, ajam aumentando a expressão do gene no ápice da raiz. Foi nosso objetivo no presente estudo, elucidar o mecanismo de controle transcricional da expressão do gene *SbMATE*.

## **Material e métodos**

### **Análise da atividade do promotor *SbMATE* em plantas de *Arabidopsis***

#### **Construção dos diferentes fragmentos do promotor de *SbMATE* fusionados ao gene repórter GUS**

DNA total da variedade tolerante SC283 foi utilizado como molde para isolamento de fragmentos do promotor *SbMATE* utilizando oligonucleotídeos específicos que anelam em diferentes extensões do referido promotor e contem sítios para as enzimas de restrição EcoRI e HindIII, gerando fragmentos de diferentes tamanhos (Tabela 1). Para todos os clones de promotores obtidos, a enumeração indica a extensão do fragmento do promotor clonado em relação ao possível ATG, a letra p denota promotor, seguido do nome do gene *SbMATE* e da variedade que originou o fragmento do promotor.

Tabela 1: Oligonucleotídeos usados para amplificação dos fragmentos do promotor de SC283.

Oligonucleotídeo	Sequência 5'-3'	Posição
PALTSB1975-Fwd*	ccccgaattcGCATGGGGCCATCAACGGTG	-1975
PALTSB1-Rvs**	ccccaaagcttCATGTGCGCCTAGCTACAAACC	1
PATTSB2838-Fwd*	ccccgaattcGGATCCAGTGAGCTACCGTACC	-2838
PALTSB536-Fwd*	ccccgaattcCCCCGTCTTGTCTTTCAGCTCT	-536
PALTSB1360-Fwd*	ccccgaattcGTCGTACGTCGACCAAACCTTTC	-1360
PALTSB536-Rvs ***	CcccaagcttAGAGCTGAAGAGCAAGACGGG	-536

\*Todos os oligonucleotídeos forward contêm sítio de EcoRI.

\*\*O oligonucleotídeo reverse SC283 contém o ATG putativo, códon inicial da sequência do gene SbMATE, seguido do sítio de HindIII.

\*\*\* O oligonucleotídeo reverse contendo o sítio de HindIII

Os fragmentos amplificados foram clonados em PCR TOPO8 e em PCR2.1 (Tabela 2), confirmados por sequenciamento e transferidos por recombinação para pMDC162. Alternativamente ou adicionalmente, os fragmentos amplificados foram digeridos com as enzimas EcoRI e HindIII e inseridos nos mesmos sítios de pCAMBIA1381Z em uma reação com a ligase T4, segundo especificações do fabricante. As ligações foram utilizadas na transformação de células competentes de *Escherichia coli* da estirpe DH5 $\alpha$ , pelo método do choque térmico, selecionados com o antibiótico apropriado e diagnosticados por sequenciamento. Os clones confirmados, em pMDC162 e em pCAMBIA1381Z (Tabela 3) foram armazenados em glicerol 50% e mantidos em freezer -80°C .

Tabela 2: Clones gerados pela clonagem de fragmentos do promotor de SbMATE da variedade SC283 em pCR2.1 e TOPO8

Fragmento	Clones em pCR2.1	Clones em TOPO8
-2396 pSbMATE- SC283	pUFV 1727	pUFV 2003
-1975 pSbMATE- SC283	pUFV 1736	pUFV 2007
-1360 pSbMATE- SC283	pUFV 1718	pUFV 2005
-536 pSbMATE- SC283	pUFV 1715	pUFV 2008
-1975 to-536 pSbMATE-SC283	pUFV 1728	pUFV 2006
-1360 to-536 pSbMATE-SC283	pUFV 1739	pUFV 2004

Tabela 3: Clones gerados pela clonagem de fragmentos do promotor de SbMATE da variedade SC283 em pCAMBIA1381Z e em pMDC162.

Fragmento	pCAMBIA1381Z	pMDC162
-2396 pSbMATE-SC283::GUS	pUFV2023	pUFV2028
-1975 pSbMATE-SC283::GUS	pUFV2027	pUFV2032
-1360 pSbMATE- SC283::GUS	pUFV2025	pUFV2030
-536 pSbMATE- SC283::GUS		pUFV2149
-1975 to-536pSbMATE-SC283::GUS	pUFV2026	pUFV2031
-1360 to-536SbMATE-SC283::GUS	pUFV2024	pUFV2029

Adicionalmente promotores inteiros das variedades SC283 (tolerante ao Alumínio), Tx430, BR007 e BR012 (sensíveis), foram sintetizados comercialmente contendo sítios de enzimas de restrição 3'EcoRI e 5'SmaI/SacI Os fragmentos sintetizados foram ligados ao vetor pBSK e a reação de ligação foi utilizada para transformação de *Escherichia coli* da estirpe DH5 $\alpha$ . Colônias positivas foram selecionadas em meio contendo ampicilina (10 mg/L), e os clones resultantes armazenados em estoques em glicerol (Tabela 4).

Tabela 4: Clones gerados pela inserção de promotores inteiros do gene SbMATE de diferentes variedades de Sorghum bicolor (SC283, Tx430, BR007 e BR012) e de dois fragmentos do promotor de SC283 em pCAMBIA1381Z

Fragmentos	Clones em pBSK	Clones em pCAMBIA1381Z
-5684pSbMATE-SC283::GUS	pUFV2371	pUFV2440
-5317pSbMATE-BR012::GUS	pUFV2374	pUFV2443
-4958pSbMATE-BR007:: GUS	pUFV2373	pUFV2442
-4232pSbMATE-Tx430:: GUS	pUFV2372	pUFV2441
-3935pSbMATE-SC283::GUS	pUFV2502	pUFV 2529
-2028pSbMATE-SC283::GUS	pUFV2503	pUFV2530

Os fragmentos das regiões promotoras de SbMATE de diferentes variedades foram liberados de pBSK por digestão com as enzimas EcoRI e SmaI, purificados de géis de agarose, clonados em vetor pCAMBIA1381Z, previamente digerido com as mesmas

enzimas, e sequenciados. As construções em pCAMBIA1381Z foram utilizadas na transformação de células competentes de DH5 $\alpha$ , pelo método do choque térmico, selecionados com o antibiótico apropriado, diagnosticados por sequenciamento e também foram mantidos em estoque de glicerol (Tabela 4).

### **Transformação e análise histoquímica do padrão de expressão de GUS em plantas de *Arabidopsis* transgênicas**

Os promotores e fragmentos de promotores, clonados em pCAMBIA1381Z e em pMDC162, foram utilizados para transformar *Agrobacterium tumefaciens* estirpe GV3101. As colônias positivas foram diagnosticadas via PCR, utilizando os oligonucleotídeos específicos para os fragmentos dos promotores de SbMATE e, em seguida, utilizadas para a transformação de *Arabidopsis thaliana* v. Col 0 pela técnica do mergulhamento floral (Bent, 2002). Após o período necessário passa o seu desenvolvimento, as sementes foram coletadas e armazenadas. Os transformantes primários foram selecionados em meio com higromicina 30 mg/L. Na fase de seleção de transformantes as sementes passaram por um processo de desinfestação em 1 mL de solução de desinfestação (12,5% de hipoclorito de sódio: 37% de água: 50 de etanol 70%), por 15 minutos, seguidos de três lavagens com etanol 100%.

As plantas transformadas com as construções ProSbMATE:GUS foram submetidas ao ensaio histoquímico, conforme McCabe, (1988), utilizando-se três transformantes independentes de cada construção.

Além de plântulas de 10 dias, discos foliares e raízes de plantas adultas foram embebidas no tampão de ensaio da enzima GUS [NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 100 mM (pH 7,0), K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>.3H<sub>2</sub>O 0,5 mM, Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O 10 mM, Triton X-100 0,1% (v/v)], contendo 1 mM de substrato (5- bromo-4-chloro-3-indolil- $\beta$ -D glucuronideo (X-Gluc) e incubados a 37°C, por *overnight*, sob a proteção da luz.

Os pigmentos foliares foram removidos dos tecidos corados por meio de várias lavagens com solução de metanol:acetona (3:1). Os tecidos clarificados foram armazenados em solução de glicerol 50% (v/v) para posterior fotodocumentação. As imagens digitais, foram obtidas em lupa acoplada a câmera digital.

## **Determinação da atividade de GUS em plantas de Arabidopsis transformadas**

O ensaio fluorimétrico para avaliar a atividade da  $\beta$ -glucuronidase foi conduzido segundo o protocolo de Jefferson *et al.*, (1987), utilizando-se methylumbelliferone (MU) como padrão. Amostras de três transformantes independentes e dos respectivos controles, foram trituradas e homogeneizadas em 500 $\mu$ l de tampão GUS [NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.0, 100mM, EDTA 10mM, sarcosil 0,1% (p/v), Triton X-100 0,1% (v/v)]. Para a reação de atividade da enzima, 50 $\mu$ l do extrato foram adicionados a 50 $\mu$ l do tampão GUS contendo como substrato 2mM de 4-methylumbelliferil- $\beta$ -D-glucuronideo (MUG). A mistura então foi incubada a 37°C por 30 minutos e a atividade de GUS mensurada utilizando o Lector Multi-Modal de Microplacas Synergy HT (BioTek). A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

## **Indução de estresses em plântulas transgênicas**

Para verificar a ativação do promotor em função do estresse por alumínio, sementes de Arabidopsis da primeira geração, foram desinfestadas por 15 minutos em solução de desinfestação (12,5% Hipoclorito: 37,5% água: 50 % etanol 100 %), lavadas por 3 vezes em etanol 100% e colocadas para germinar em meio MS 1%. Plântulas inteiras, com 10 dias foram transferidas para solução nutritiva contendo 16  $\mu$ M de AlCl<sub>3</sub> por um período de 5 dias, após o qual foram coletadas e submetidos a ensaio histoquímico e de atividade de GUS (análises fluorimétricas).

## **Prospecção de transfatores que se liguem à região promotora de SbMATE**

### **Obtenção da biblioteca de cDNA de sorgo submetido a tratamento de estresse por Alumínio**

Sementes do genótipo SC566 foram inicialmente desinfestadas com hipoclorito de sódio 0,5% por 5 minutos a 160 rpm, lavadas por 8 vezes com água destilada e postas para germinar em papel germitest por 3 dias à 27°C. As plântulas foram transplantadas

para solução nutritiva sem Alumínio, pH 4, por 4 horas e, após este período, para solução nutritiva, pH=4, contendo Alumínio a 27 µM por 5 dias.

O primeiro centímetro das raízes foi coletado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido sendo armazenado em freezer a -80 °C até o processamento das amostras. O material congelado foi utilizado para extração do RNA total pelo método do trizol.

O cDNA foi obtido pela tecnologia SMART III da Clontech, segundo a qual, o cDNA é sintetizado à partir da cauda poliA do RNA mensageiro (Figura 6).

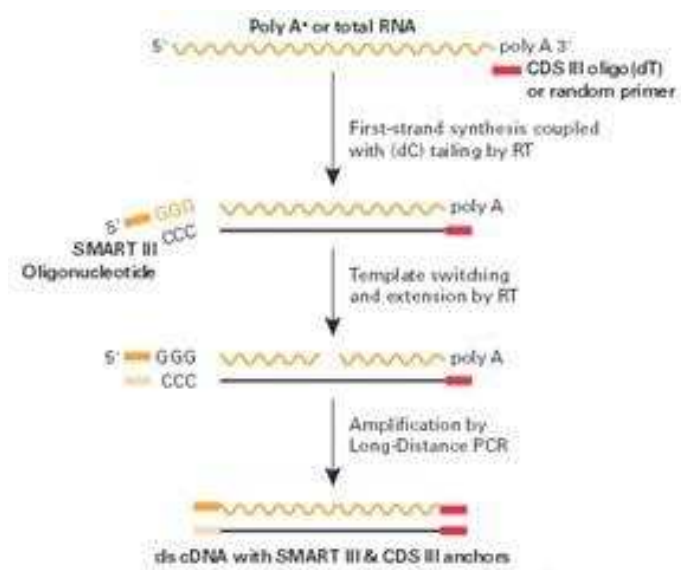


Figura 6: Confeção do cDNA pela tecnologia SMART III da Clontech. A primeira fita do cDNA é feita utilizando-se o primer CDSIII oligodT. A segunda fita

A construção da biblioteca foi feita por recombinação homologa com o vetor pGADT7-Rec em leveduras, segundo o “Matchmaker One-Hybrid Library Construction & Screening Kit” da Clontech. Para isso, células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* da linhagem W303 (*MATa/MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 [phi<sup>+</sup>]*), que é deficiente na produção de leucina, triptofano, uracila e histidina (Trp-, Leu-, Ura-, His-), foram crescidas em meio YPD-A por 16 horas, sendo então submetidas à centrifugação de 13000 g por 30 segundos e re-suspensas com 1 mL de água deionizada. Após re-centrifugação a 13000 g por 30 segundos, as células pré-lavadas e foram então, transformadas com pGADT7-Rec2 linearizado, o cDNA de Sorgo, juntamente com 100

µg de DNA carreador de esperma de salmão (ssDNA), pelo método de acetato de lítio/poli(etileno)glicol (PEG), segundo especificações da Clontech.

Os transformantes foram plaqueados em meio seletivo com deficiência em leucina (SD, *Synthetic Dropout*, -Leu) e crescidos de três a quatro dias a 28°C. As colônias obtidas em cada uma das 35 placas foram raspadas com 3 mL de YPDA e estocados em glicerol 50% (alíquotas de 2 mL) a -80°C, para triagens posteriores (Figura 7).

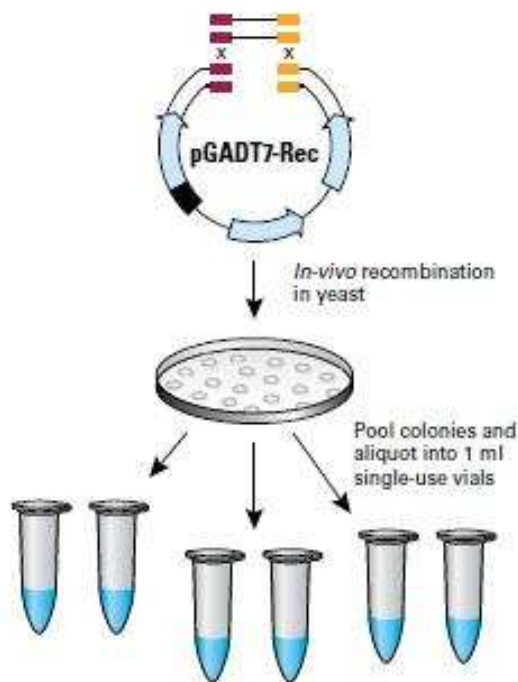


Figura 7. Construção da biblioteca de cDNA segundo especificações da Clontech (Cat no 630490). O cDNA recombinante foi clonado por recombinação via tecnologia SMART III da Clontech e transformado em leveduras. As colônias resultantes foram raspadas e alíquotadas em criotubos

### **Determinação do título da biblioteca pGADT7-Rec2-cDNA**

Para a determinação do título, uma alíquota de 10 µL da biblioteca foi transferida para 1 mL de meio YPDA e misturada gentilmente (Diluição A- fator de diluição = $10^{-2}$ ). Em seguida, 10 µL da diluição A foi adicionada em 1 mL de meio YPDA (Diluição B- fator e diluição = $10^{-4}$ ). 10 µL da diluição A foi adicionado à 40 µL de YPDA e o volume total foi plaqueado em meio sólido SD-Leu. Adicionalmente, foram plaqueados também

50 uL da diluição B. As placas foram invertidas e incubadas à 28 °C por 3 dias. O número de colônias nas placas foi contado e o título calculado através da fórmula:

$$\frac{\text{Número de colônias}}{\text{Volume plaqueado (mL)} \times \text{fator de diluição}} = \text{cfu/mL}$$

### **Clonagem da região promotora de SbMATE em vetor de expressão em levedura**

Os promotores inteiros das variedades de sorgo SC283, Tx430, BR007 e BR012, assim como fragmentos menores do promotor de SC283 foram liberados dos clones pUFV2371, pUFV2374, pUFV 2373, pUFV2372, pUFV 2502, pUFV2503 (Tabela 4) e pUFV1727 (Tabela 2) por digestão com as enzimas de restrição adequadas e purificados de géis de agarose, utilizando-se o kit GelExtraction Kit (Qiagen). Em seguida, os fragmentos purificados foram clonados no vetor pHIS2.1 (Clontech) de expressão em leveduras, previamente digerido com as mesmas enzimas e transformados em DH5a. Os clones confirmados por sequenciamento foram estocados em -80°C (Tabela 6) e contêm o gene repórter HIS3 sob o controle do promotor inserido, sendo específico para o sistema de mono-híbrido no escrutínio de cDNAs de fatores de transcrição.

Tabela 6. Promotores inteiros do gene SbMATE de diferentes variedades de Sorghum bicolor e fragmentos do promotor da variedade SC283, obtidos comercialmente clonados em pBSK e transferidos para pHIS2.1 por digestão com as enzimas de restrição EcoRI e SmaI

Fragmento	Identificação	Clone em pHIS2.1
-5684pSbMATEpHIS2.1	SC283	pUFV2376*
-4232pSbMATEpHIS2.1	BR012	pUFV2377*
-4958pSbMATEpHIS2.1	BR007	pUFV2378*
-5317pSbMATEpHIS2.1	Tx430	pUFV2379*
-3935pSbMATEpHIS2.1	Fragmento de SC283	pUFV2529*
-2028pSbMATEpHIS2.1	Fragmento de SC283	pUFV2530*
-2396pSbMATEpHIS2.1	Fragmento de SC283	pUFV2044**

\*Promotores obtidos comercialmente transferidos para pHIS2.1 por digestão com as enzimas de restrição EcoRI e SmaI

\*\* Fragmento do promotor de SC283 obtido por amplificação via PCR e transferido para pHIS2.1 por digestão com EcoRI

## **Transformação de leveduras**

Células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* da linhagem W303 (MATa/MAT $\alpha$  leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 [phi<sup>+</sup>]), que é deficiente na produção de leucina, triptofano, uracila e histidina (Trp-, Leu-, Ura-, His-), foram crescidas em meio YPD-A por 16 horas, sendo então submetidas à centrifugação de 13000 g por 30 segundos e re-suspensas com 1 mL de água deionizada. Após re-centrifugação a 13000 g por 30 segundos, foram obtidas as células pré-lavadas utilizadas para transformação com DNA plasmidial, utilizando-se o método de transformação com acetato de lítio/polietilenoglicol (PEG), segundo instruções da Clontech. Os transformantes obtidos foram plaqueados em meio seletivo e crescidos de três a quatro dias a 28°C.

## **Determinação da concentração de 3-amino-1,2,4-triazole (3AT)**

Na ausência de ativação, a expressão constitutiva de HIS3 é muito baixa. Durante a triagem, a expressão basal é controlada pela adição de 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) ao meio. Para se determinar a concentração necessária para suprimir totalmente a expressão de HIS3 para o fragmento de DNA a ser utilizado, células de levedura W303 transformadas com os plasmídeos recombinantes -5684pSbMATEpHIS2.1 ou -2396pSbMATE::GUS pHIS2.1 foram plaqueadas em meio SD-TRIP-HIS suplementado com diferentes concentrações de 3-AT.

## **Triagens de possíveis cDNAs que codificam fatores de transcrição que se ligem a região promotora de SbMATE a partir do sistema de mono-híbrido de leveduras**

Células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* da linhagem W303 previamente transformadas com a biblioteca de cDNA e *Sorgum bicolor* SC566, foram co-transformadas com os plasmídeos recombinantes 5684pSbMATEpHIS2.1 ou -

2396pSbMATE::GUS pHIS2.1 Para a seleção dos transformantes duplos, as células transformadas foram plaqueadas em SD-Leu-Trp. A seleção da interação dos possíveis transfatores com a região promotora do gene foi monitorada pela ativação do gene repórter HIS3. A prototrofia a HIS foi monitorada pelo crescimento na ausência de histidina e presença de 3 AT, segundo o protocolo da Clontech.

Após realizada a seleção das colônias candidatas a possuírem o clone contendo cDNA de transfatores, foi feita a extração e purificação dos plasmídeos em leveduras, pelo kit Qiaprep (Qiagen), utilizando-se pérolas de vidro, seguido de transformação de *E. coli* linhagem DH5 $\alpha$ . Os clones foram confirmados por sequenciamento.

Análises de comparação de seqüências dos cDNAs seqüenciados foram realizadas nos bancos de dados do Phytozome (<http://www.phytozome.net>) e do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para verificação de seqüências incompletas e identificação de possíveis genes ortólogos.

Análises de bioinformática foram também realizadas a fim de mapear os domínios conservados e analisar a similaridade de seqüências com proteínas já conhecidas na literatura.

Para as análises da seqüência aberta de leitura com o gene de Gal4, presente no vetor pGADT7-Rec, foi utilizado o programa ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>).

### **Análise in silico das proteínas candidatas**

Os clones de cDNA potencialmente positivos resultantes da triagen mono-híbrido foram submetidos a análises de comparação de seqüência nos bancos de dados do Phytozome (<http://www.phytozome.net>). As sequencias completas foram obtidas e submetidas ao programa WolfPsot. Para a obtenção da região coficiadora completa, foram desenhados oligonucleotídeos com o auxílio do programa Oligo Analyser (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>), contendo a metade o sítio de recombinação AttB.

**Interação de genes candidatos com o promotor de SbMATE da variedade SC283 de Sorghum bicolor.**

22 cDNAs dos transfatores candidatos a interagirem com o promotor de SC283, foram obtidos a partir de experimentos de QTL, sintetizados comercialmente flaqueados por metade da sequência do sítio de recombinação AttB1 e AttB2, clonados em pBSK, e propagados em *E. coli* DH5a. Para a reestruturação da região de recombinação AttB inteira, os cDNAs dos genes candidatos foram amplificados por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para a região de recombinação.

O produto de PCR purificado foi transferido por recombinação (GW) ao vetor de entrada comercial pDONR201, utilizando-se a enzima BP clonase (Invitrogen), segundo especificações do fabricante. O produto de recombinação foi utilizado na transformação de DH5a. As colônias crescidas em meio seletivo, foram confirmadas por sequenciamento e geraram os clones listados na Tabela 7.

Os DNAs dos clones em pDONR201, foram utilizados na recombinação com a enzima LR clonase (Invitrogen) e assim, transferidos para o vetor de expressão em leveduras pDEST22. Os DNAs dos clones em pDEST22 foram utilizados para co-transformar W303 pré-transformada com pUFV2376 (-5684pSbMATEpHIS2.1)

Tabela 7. Clones dos genes candidatos a interagirem com o promotor de SbMATE.

Transfator candidato*	Tamanho (pb)	Clones em Pbsk	Clones em pDONR201	Clones em pDEST22
1	3442	pUFV2446	pUFV2491	pUFV2523
2	2350	pUFV2447	pUFV2517	pUFV2524
3	502	pUFV2448	pUFV2492	pUFV2557
5	1897	pUFV2450	pUFV2518	pUFV2525
7	916	pUFV2452	pUFV2493	pUFV2526
8	619	pUFV2453	pUFV2520	pUFV2527
10	802	pUFV2455	pUFV2494	pUFV2558
11	1273	pUFV2456	pUFV2495	pUFV2559
12	961	pUFV2457	pUFV2496	pUFV2563
13	604	pUFV2458	pUFV2497	pUFV2548
14	796	pUFV2459	pUFV2498	pUFV2549
15	691	pUFV2460	pUFV2521	pUFV2528

16	1354	pUFV2461	pUFV2499	pUFV2550
19	589	pUFV2464	pUFV2522	pUFV2551
20	1234	pUFV2465	pUFV2500	pUFV2560

\*Genes candidatos obtidos a partir de experimentos de QTL, sintetizados comercialmente clonados em pBSK, contendo a metade dos sítios de recombinação GW AttB1 e AttB2. Os cDNAs dos genes candidatos foram amplificados via PCR com primers específicos para a região de recombinação AttB1 e AttB2 e transferidos para vetor de entrada pDONR201 por ação da BP clonasse (invitrogen) e, posteriormente para vetor de expressão em leveduras, pDEST22 (invitrogen)

## Resultados e discussão

### Análise in silico do promotor de SbMATE

A sequência de 2.3 kp da região promotora do gene SbMATE, variedade SC283, foi submetida a uma análise para presença de cis-elementos regulatórios de promotores de plantas, utilizando o programa Place (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>). Foram encontrados 126 potenciais cis-elementos regulatórios distintos, em uma frequência de 609 sítios de ligação. Para verificar se a presença dos referidos fatores não estava acontecendo ao acaso, foi realizada uma análise de enriquecimento utilizando-se a distribuição de probabilidade binomial. O critério estabelecido para considerar os elementos enriquecidos foi o p-valor < 0,01 os resultados obtidos apresentaram 77 cis-elementos enriquecidos, indicando a probabilidade de 99% ou superior de não estarem acontecendo ao acaso (Tabela 8).

Tabela 8. Enriquecimento de cis-elementos no promotor de SbMATE pelo teste da binomial

Núcleo do promotor				
Nome	Sequência conservada	Frequência	P valor	Descrição
CAATBOX1	CAAT	14	0	"CAAT promoter consensus sequence" found in legA gene of pea;
CCAATBOX1	CCAAT	2	0,164416	Common sequence found in the 5'-non-coding regions of eukaryotic genes; "CCAAT box" found in the promoter of heat shock protein genes; Located immediately upstream from the most distal HSE of the promoter; "CCAAT box" act cooperatively with HSEs to increase the hs promoter activity;

TATABOX2	TATAAAT	2	0,000771324	"TATA box"; TATA box found in the 5'upstream region of pea legA gene; sporamin A of sweet potato; TATA box found in beta-phaseolin promoter (Grace <i>et al.</i> ); sequence and spacing of TATA box elements are critical for accurate initiation (Grace <i>et al.</i> );	
TATABOX3	TATTAAT	4	1,02586E-007	"TATA box"; TATA box found in the 5'upstream region of sweet potato sporamin A gene;	
TATABOX4	TATATAA	5	8,17781E-010	"TATA box"; TATA box found in the 5'upstream region of sweet potato sporamin A gene; TATA box found in beta-phaseolin promoter (Grace <i>et al.</i> ); sequence and spacing of TATA box elements are critical for accurate initiation (Grace <i>et al.</i> );	
TATABOX5	TTATTT	5	1,56237E-006	"TATA box"; TATA box found in the 5'upstream region of pea ( <i>Pisum sativum</i> ) glutamine synthetase gene; a functional TATA element by <i>in vivo</i> analysis;	
TATABOXO SPAL	TATTTAA	4	1,02586E-007	Binding site for OsTBP2, found in the promoter of rice pal gene encoding phenylalanine ammonia-lyase; OsTFIIB stimulated the DNA binding and bending activities of OsTBP2 and synergistically enhanced OsTBP2-mediated transcription from the pal promoter;	
TATAPVTR NALEU	TTTATATA	3	0,000000111	"TATA-like motif"; A TATA-like sequence found in <i>Phaseolus vulgaris</i> tRNA <sup>Leu</sup> gene promoter; Frequently observed upstream of plant tRNA genes; Found in maize glycolytic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 4 (GapC4) gene promoter; Binding site of TATA binding protein (TBP);	
<b>Total de ocorrências: 39</b>					
<b>Resposta a Alumínio</b>					
CGCGBOXAT	VCGCGB	4	-1692 (+); -1690 (+); -1692 (-); -1690 (-);	0,0620698	"CGCG box" recognized by AtSR1-6 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> signal-responsive genes); Multiple CGCG elements are found in promoters of many genes; Ca <sup>++</sup> /calmodulin binds to all AtSRs; V=A/C/G; B=G/T/C;
<b>Total de ocorrências: 4</b>					
Reference: <b>STOP1, CAMTA2 and other transcription factors are involved in aluminum-inducible AtALMT1 expression</b> <a href="http://www.plantphysiol.org/content/early/2015/01/28/pp.114.256552.long">http://www.plantphysiol.org/content/early/2015/01/28/pp.114.256552.long</a>					
<b>ABA Response</b>					

ABREDISTB BNNAPA	GCCACTTG TC	1	0,000438498	"dist B (distal portion of B-box)" found in napA gene of Brassica napus (B.n.); Shows similarity to ABRE; Found between -148 and -124; Required for seed specific expression and ABA responsiveness; See S000263, S000264; dist B ABRE mediated transactivation by ABI3 and ABI3-dependent response to ABA; a tetramer of the composite RY/G complex mediated only ABA-independent transactivation by ABI3; B2 domain of ABI3 is necessary for ABA-independent and ABA-dependent activation through the dist B ABRE;
ABRELATE RD1	ACGTG	7	3,75527E- 005	ABRE-like sequence (from -199 to -195) required for etiolation-induced expression of erd1 (early responsive to dehydration) in Arabidopsis;
ABREMOTI FAOSEM	TACGTGTC	1	0,00869729	"motif A" ABRE-like sequence found in rice (O.s.) Osem gene promoter; Essential for activation by VP1; Important for regulation by ABA; See S000102, S000300; TRAB1, bZIP transcription factor, interacts with VP1 and mediates abscisic acid-induced transcription;
ABRERATC AL	MACGYGB	3	0,0114482	"ABRE-related sequence" or "Repeated sequence motifs" identified in the upstream regions of 162 Ca(2+)-responsive upregulated genes; see also ABRE; M=C/A; Y=T/C; B=T/C/G;
ACGTABRE MOTIFA2O SEM	ACGTGKC	2	0,00296437	Experimentally determined sequence requirement of ACGT-core of motif A in ABRE of the rice gene, OSEM; See S000281; DRE and ABRE are interdependent in the ABA-responsive expression of the rd29A in Arabidopsis; K=G/T;
ACGTABRE MOTIFAOS OSEM	TACGTGTC	1	0,00869729	"ABRE motif A" found in the promoter of the rice (O.s.) Osem gene; ACGT-containing ABRE; Required for ABA-responsiveness and VP1 activation; Binding site of TRAB1; Motif A and CE3 (S000282) are functionally equivalent; TRAB1, bZIP transcription factor, interacts with VP1 and mediates abscisic acid-induced transcription;
ACGTATER D1	ACGT	14	0,000169256	ACGT sequence (from -155 to -152) required for etiolation-induced expression of erd1 (early responsive to dehydration) in Arabidopsis;
CGCGBOXA T	VCGCGB	4	0,0620698	"CGCG box" recognized by AtSR1-6 (Arabidopsis thaliana signal-responsive genes); Multiple CGCG elements are found in promoters of many genes;

				Ca <sup>++</sup> /calmodulin binds to all AtSRs; V=A/C/G; B=G/T/C;
DPBFCORE DCDC3	ACACNNG	4	0,00369653	A novel class of bZIP transcription factors, DPBF-1 and 2 (Dc3 promoter-binding factor-1 and 2) binding core sequence; Found in the carrot (D.c.) Dc3 gene promoter; Dc3 expression is normally embryo-specific, and also can be induced by ABA; The Arabidopsis abscisic acid response gene ABI5 encodes a bZIP transcription factor; abi5 mutant have a pleiotropic defects in ABA response; ABI5 regulates a subset of late embryogenesis-abundant genes; GIA1 (growth-insensitivity to ABA) is identical to ABI5;
LTRECORE ATCOR15	CCGAC	1	0,366046	Core of low temperature responsive element (LTRE) of cor15a gene in Arabidopsis (A.t.); A portion of repeat-C (C-repeat), TGGCCGAC, which is repeated twice in cor15a promoter (Baker <i>et al.</i> , 1994); ABA responsiveness; Involved in cold induction of BN115 gene from winter Brassica napus; LTRE; See S000157, S000152; Light signaling mediated by phytochrome is necessary for cold- or drought- induced gene expression through the C/DRE in Arabidopsis; See S000152;
MYBATRD2 2	CTAACCA	1	0,0385262	Binding site for MYB (ATMYB2) in dehydration-responsive gene, rd22; MYB binding site in rd22 gene of Arabidopsis thaliana; ABA-induction; Located at ca. -141 of rd22 gene; Also MYC at ca. -200 of rd22 gene; See S000174 (MYCATRD22); See S000355;
MYCATRD2 2	CACATG	3	0,000901244	Binding site for MYC (rd22BP1) in Arabidopsis (A.t.) dehydration-responsive gene, rd22; MYC binding site in rd22 gene of Arabidopsis thaliana; ABA-induction; Located at ca. -200 of rd22 gene; Also MYB at ca. -141 of rd22 gene; See also S000175 (MYBATRD22);
PROXBNN APA	CAAACAC C	1	0,00869729	"prox B (proximal portion of B-box) found in napA gene of Brassica napus (B.n.); CA-rich sequence; Found between -130 and -124; Required for seed specific expression and ABA responsiveness; See S000262, S000264; dist B ABRE mediated transactivation by ABI3 and ABI3-dependent response to ABA; a tetramer of the composite RY/G complex mediated only ABA-independent transactivation by ABI3; B2 domain of

				ABI3 is necessary for ABA-independent and ABA-dependent activation through the dist B ABRE;
RYREPEAT BNNAPA	CATGCA	4	0,000041981	"RY repeat" found in RY/G box (the complex containing the two RY repeats and the G-box) of napA gene in Brassica napus (B.n.); Found between -78 and -50; Required for seed specific expression; See S000262, S000263; dist B ABRE mediated transactivation by ABI3 and ABI3-dependent response to ABA; a tetramer of the composite RY/G complex mediated only ABA-independent transactivation by ABI3; B2 domain of ABI3 is necessary for ABA-independent and ABA-dependent activation through the dist B ABRE;
<b>Total: 47</b>				
<b>Abiotic and Biotic stress</b>				
ASF1MOTIF CAMV	TGACG	4	0,0110211	"ASF-1 binding site" in CaMV 35S promoter; ASF-1 binds to two TGACG motifs; See S000023 (AS1); Found in HBP-1 binding site of wheat histone H3 gene; TGACG motifs are found in many promoters and are involved in transcriptional activation of several genes by auxin and/or salicylic acid; May be relevant to light regulation; Binding site of tobacco TGA1a; TGA1a and b show homology to CREB; TGA6 is a new member of the TGA family; Abiotic and biotic stress differentially stimulate "as-1 element" activity;
<b>Total: 4</b>				
<b>Water stress</b>				
MYB2AT	TAACTG	1	0,155148	Binding site for ATMYB2, an Arabidopsis MYB homolog; ATMYB2 binds oligonucleotides that contained a consensus MYB recognition sequence (TAACTG), such as is in the SV40 enhancer and the maize bronze-1 promoter (Urao <i>et al.</i> , Plant Cell 5:1529 (1993)); ATMYB2 is involved in regulation of genes that are responsive to water stress in Arabidopsis; See S000355;
MYBCORE	CNGTTR	7	0,000734351	Binding site for all animal MYB and at least two plant MYB proteins ATMYB1 and ATMYB2, both isolated from Arabidopsis; ATMYB2 is involved in regulation of genes that are responsive to

				water stress in Arabidopsis; A petunia MYB protein (MYB.Ph3) is involved in regulation of flavonoid biosynthesis (Solano <i>et al.</i> EMBO J 14:1773 (1995)); See S000355;
<b>Total: 8</b>				
<b>Pathogens response</b>				
GCCCORE	GCCGCC	1	0,155148	Core of GCC-box found in many pathogen-responsive genes such as PDF1.2, Thi2.1, and PR4; Has been shown to function as ethylene-responsive element; See S000036, S000232, S000332; Appears to play important roles in regulating jasmonate-responsive gene expression; Tomato Pti4 (ERF) regulates defence-related gene expression via GCC box and non-GCC box cis elements (Myb1 (GTTAGTT) and G-box(CACGTG));
GT1GMSCAM4	GAAAAA	6	4,83909E-008	"GT-1 motif" found in the promoter of soybean (Glycine max) CaM isoform, SCaM-4; Plays a role in pathogen- and salt-induced SCaM-4 gene expression; See also S000198 (GT-1 consensus);
SEBFCONSSTPR10A	YTGTCWC	3	0,000583617	Binding site of the potato silencing element binding factor (SEBF) gene found in promoter of pathogenesis-related gene (PR-10a); Located between -45 and -39; Similar to the auxin response element; W=A/T;
WRKY71OS	TGAC	21	9,87263E-009	"A core of TGAC-containing W-box" of, e.g., Amy32b promoter; Binding site of rice WRKY71, a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway; Parsley WRKY proteins bind specifically to TGAC-containing W box elements within the Pathogenesis-Related Class10 (PR-10) genes (Eulgem <i>et al.</i> , 1999); See S000390 (TTGAC), S000442 (TGACT);
<b>Total:31</b>				

Sequências conservadas típicas de promotores eucarióticos, como TATA-box e CAAT-box, foram encontradas em várias posições. Assim também foi encontrado o cis-elemento regulatório CGCGBOXAT, localizado nas posições -1692 (+); -1690 (+); -1692 (-); -1690 (-) em relação ao ATG, que confere induzibilidade ao alumínio em promotores de genes de Arabidopsis (Tokizawa, 2015). Os potenciais elementos cis-regulatórios encontrados na região promotora de SbMATE pertencem as seguintes categorias com a respectiva frequência: (i) elementos responsivos a ABA, frequência 47, (ii) elementos

responsivos a estresses bióticos e abióticos (4), (iii) estresse hídrico (8), resposta a patógenos (31).

Promotores inteiros das variedades SC283, tolerante ao alumínio; Tx430; BR007 e BR012, sensíveis, além de duas versões truncadas (-3935pSbMATE-SC283::GUS e -2028pSbMATE-SC283::GUS) do promotor de SC283 foram clonados em vetor para expressão em plantas pCAMBIA 1381Z (Figura 8; Tabela 4) e utilizados para transformação de Arabidopsis.

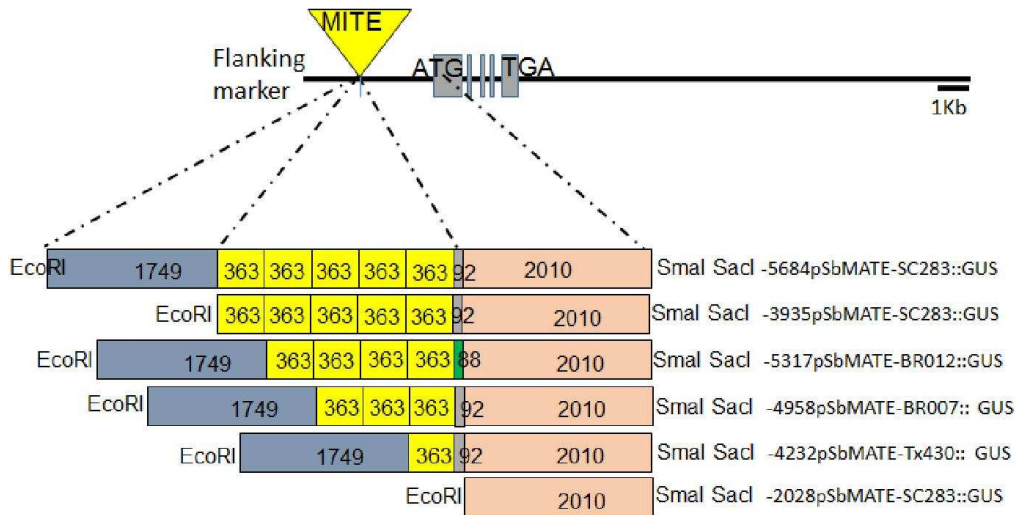


Figura 8: Promotores inteiros de SbMATE para diferentes variedades de Sorghum, tolerante (-5684pSbMATE-SC283) ou sensíveis ao alumínio (-3935pSbMATE -4940SbMATE, -4214pSbMATE), sintetizados comercialmente com as enzimas de restrição

A atividade do gene repórter GUS foi determinada histoquimicamente em plântulas e em discos foliares de plantas adultas de pelo menos três transformantes, geração T2, de cada construção de DNA (Figura 9). Exceto pelo promotor truncado de SC283 estendendo até posição -2028, que apresentou atividade de GUS tanto em plântulas quanto em discos foliares, as demais construções de DNA que incluíam os promotores completos de SbMATE, isolados de variedades tolerantes e susceptíveis, não exibiram atividade de GUS. Estes resultados sugerem a existência de elementos cis-regulatórios negativos reprimindo a atividade do promotor SbMATE em Arabidopsis. No caso do promotor SbMATE isolado da variedade tolerante SC283, estes elementos repressores se localizam entre as posições -5684 e -2018.













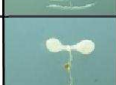

-5684pSbMATE-SC283::GUS		
-3935pSbMATE-SC283::GUS		
-5317pSbMATE-BR012::GUS		
-4958pSbMATE-BR007:: GUS		
-4232pSbMATE-Tx430:: GUS		
-2028pSbMATE-SC283::GUS		
Col 0		

Figura 9. Análise histoquímica de plântulas de *Arabidopsis thaliana* (col 0) transformadas com os promotores de SbMATE fusionados ao gene repórter GUS ( $\beta$ -Glucuronidase). Plântulas inteiras, com 10 dias após a germinação, foram embebidas no tampão de ensaio da enzima GUS, contendo o substrato 5- bromo-4-chloro-3-indolil- $\beta$ -D glucuronideo (X-Gluc) e incubados a 37°C por 16 horas, sob a proteção da luz. Os pigmentos foliares foram removidos dos tecidos corados por meio de várias lavagens com solução de metanol:acetona (3:1). A expressão gênica foi avaliada pela atividade tecido-específica de GUS.

A região do promotor SbMATE da variedade SC283 possui cinco repetições MITE, as quais tem sido correlacionadas geneticamente com regulação positiva do referido promotor (Magalhães, 2007). O nível de tolerância ao alumínio e de expressão do gene SbMATE das variedades sensíveis e tolerantes é diretamente proporcional ao número de repetições MITE presentes no referido promotor. Assim, esperava-se que a expressão do promotor completo SbMATE de SC283 apresentasse o maior nível de expressão entre as construções analisadas. Entretanto, somente com a deleção de todas as repetições MITEs se observou atividade do promotor SbMATE em *Arabidopsis*. Duas possibilidades podem explicar os resultados obtidos. Inicialmente, a natureza da sequência MITE com características de transposon pode ter acionado um sistema de silenciamento transcricional por RNA de interferência em *Arabidopsis*, o que não ocorre no sistema homólogo sorgo. Uma análise do nível de metilação desses promotores inseridos no genoma de *Arabidopsis*, em comparação com os promotores no loci de sorgo poderia esclarecer esta possibilidade. Alternativamente, os promotores contendo as sequências MITE somente são ativos após indução com Al, que aliviaria a repressão natural dos mesmos. Conseqüentemente, na presença de AL, as sequências MITE

funcionariam como intensificadores de expressão (“enhancers”) reconciliando nossos resultados com a literatura. Entretanto, nas condições de nosso experimento, a adição de Al ao meio de cultivo não ativou os promotores completos.

Com o objetivo de caracterizar elementos cis-regulatórios no promotor SbMATE, foi obtido deleções progressivas via PCR a partir da região aparentemente ativa. Esta série de deleções e trunicações gerou 6 fragmentos adicionais de regiões truncadas do promotor (Figura 10).

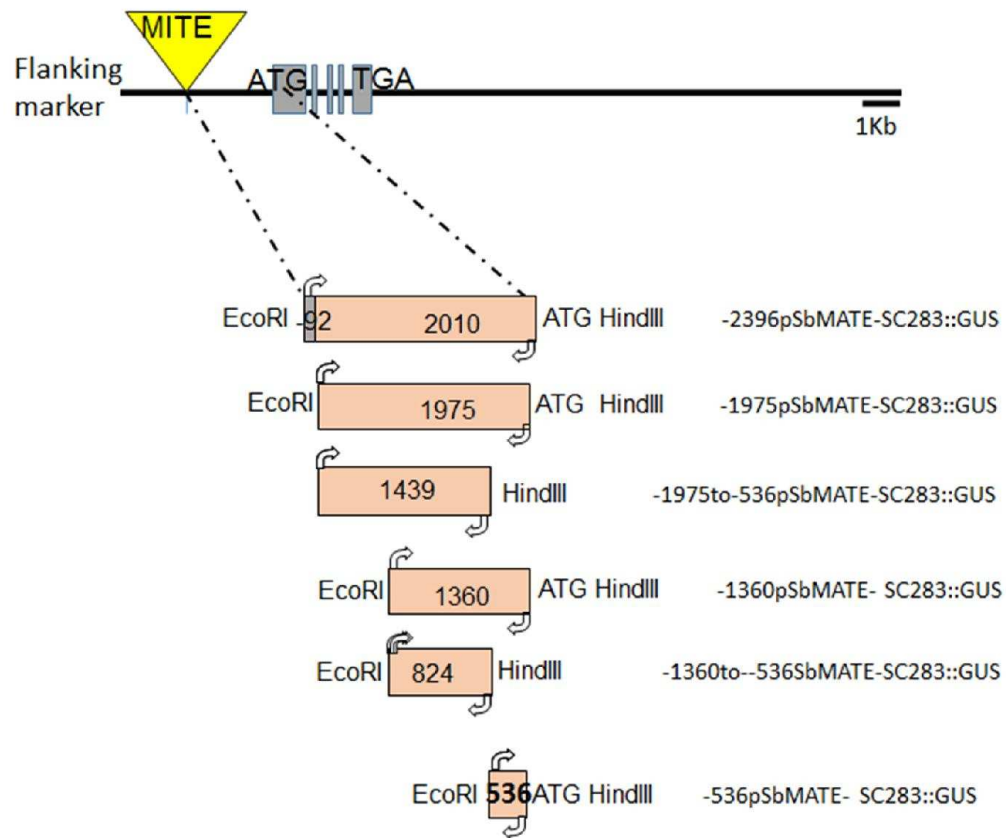


Figura 10. Deleções do promotor de SbMATE da variedade SC283 Sorghum bicolor. Foram desenhados primers específicos, contendo sítios das enzimas de restrição EcoRI e HindIII. Os fragmentos -2396pSbMATE-SC283::GUS, -1965pSbMATE-SC283::GUS, -1360pSbMATE-SC283::GUS e -536pSbMATE-SC283::GUS foram amplificados com primers foward diferentes e o mesmo primer reverse, que contém o ATG do gene SbMATE. Para a amplificação dos fragmentos caracterizar elementos cis regulatórios.

Uma vez que a sequência do oligonucleotídeo reverso PALTSB1-Rvs sobrepõe o possível ATG iniciador (Tabela 1), as construções -2396pSbMATE-SC283::GUS, -1965pSbMATE-SC283::GUS e -1360pSbMATE-SC283::GUS foram fusões tradicionais, levando-se em consideração a sequência aberta de leitura de GUS com o ATG de SbMATE. As construções transcricionalmente fusionadas em pCAMBIA1381Z

foram armazenadas, as construções fusionadas tradicionalmente em pMDC162, 163, 164 foram usadas para transformação de *Arabidopsis* e a atividade de GUS determinada histoquimicamente em plântulas (Figura 11).

Todos os fragmentos testados foram capazes de induzir a expressão de GUS, embora com diferentes intensidades, sugerindo a presença de elementos positivos e negativos (Figura 11).








-2396pSbMATE-SC283::GUS	
-1975pSbMATE-SC283::GUS	
-1975 to -536pSbMATE-SC283::GUS	
-1360pSbMATE- SC283::GUS	
-1360 to -536pSbMATE-SC283::GUS	
-536pSbMATE- SC283::GUS	
Col 0	

Figura 11. Análise histoquímica de plântulas de *Arabidopsis thaliana* (col 0) transformadas com as deleções do promotor de SbMATE da variedade SC283 fusionados ao gene repórter GUS ( $\beta$ -Glucuronidase). Plântulas inteiras, com 10 dias após a germinação, foram embebidas no tampão de ensaio da enzima GUS, contendo o substrato 5- bromo-4-chloro-3-indolil- $\beta$ -D glucuronideo (X-Gluc) e incubados a 37°C por 16 horas, sob a proteção da luz. Os pigmentos foliares foram removidos dos tecidos corados por meio de várias lavagens com solução de metanol:acetona (3:1). A expressão gênica foi avaliada pela atividade tecido-específica de GUS.

Plantas transformadas com os fragmentos -1975 to-536 pSbMATE-SC283::GUS e -1360 to -536 pSbMATE-SC283::GUS, que aparentemente não contêm um promotor núcleo apresentaram atividade qualitativamente semelhante aos demais fragmentos. Neles, está presente uma sequência TATA, cuja posição (-633) parece ser corretamente posicionado para funcionar como um promotor núcleo com a deleção do fragmento delimitado pela posição -536 até o códon ATG (Tabela 9). O Fragmento -536pSbMATE-SC283::GUS, de apenas 500 pb possui apenas um TATA box (-233), que não está presente nos fragmentos -1975to-536pSbMATE-SC283::GUS e -1975to-536pSbMATE-

SC283::GUS, mas sim nos demais fragmentos amplificados utilizando-se o primer reverse PALTSB1-Rvs (ccccaagcttCATGTCGGCCTAGCTACAAACC). Embora a atividade do promotor -536 aparentemente seja menor do que os demais fragmentos, estes resultados indicam que provavelmente o TATA Box (-233) seja funcional, definindo o promotor mínimo do gene. Entretanto, também é evidente a presença de outros elementos positivos delimitados pelas posições -2396 a -536. Estes resultados, indicam o sofisticado mecanismo de controle transcricional do gene SbMATE.

Tabela 9. Posições do TATA box

CAATBOX1	CAAT	14	-2302 (+); -1953 (+); -1516 (+); -1316 (+); -982 (+); -954 (+); -926 (+); -2308 (-); -2068 (-); -1794 (-); -1732 (-); -1628 (-); -782 (-); -46	0,000169256
CCAATBOX1	CCAAT	2	-2303 (+); -1732 (-);	0,164416
TATABOX2	TATAAAT	2	-1435 (+); -1670 (-);	0,000771324
TATABOX3	TATTAAT	4	-2004 (+); -1235 (+); -1544 (-); -1234 (-);	1,02586E-007
TATABOX4	TATATAA	5	-1331 (+); -633 (+); -1332 (-); -1262 (-); -1223 (-);	8,17781E-010
TATABOX5	TTATTT	5	-2235 (+); -1015 (+); -233 (+); -1432 (-); -1300 (-);	1,56237E-006
TATABOXOSPAL	TATTTAA	4	-2222 (+); -1218 (+); -1440 (-); -1080 (-);	1,02586E-007
TATAPVTRNALEU	TTTATATA	3	-1333 (+); -1224 (+); -1331 (-);	0,000000111

### Screening da biblioteca de cDNA de raízes de *Sorghum bicolor* variedade SC566

Com o objetivo de determinar a concentração de 3AT a ser utilizada na triagem, leveduras W303 foram transformadas com as construções -5684pSbMATEpHIS2.1 (promotor completo) ou -2396pSbMATE::GUSpHIS2.1 e crescidas em concentrações crescentes de 3AT (Figura 12). Ambas as construções foram capazes de crescer em meio

deficiente em triptofano, histidina e na ausência de 3AT. O crescimento foi menor quando adicionado 2,5mM de 3AT e completamente suprimido, quando adicionados 5mM de 3AT. Assim, esta concentração foi a escolhida para realizar os screenings.











	-2396pSbMATEpHIS2.1	-5684pSbMATEpHIS2.1
SD- Trp-His		
SD- Trp-His+ 2,5 mM3AT		
SD- Trp-His+ 5,0 mM3AT		
SD- Trp-His+ 7,5 mM3AT		
SD- Trp-His+ 10 mM3AT		

Figura 12: Prototrofia de HIS3. O promotor inteiro da variedade SC283 (-5684pSbMATE) ou o fragmento do promotor desta mesma variedade (-2396pSbMATE), transformados em W303 e plaqueados em meio sólido SD-trp-his não direcionam a prototrofia de histidina em diferentes concentrações de 3AT.

Foram realizadas triagens de cDNAs a partir da utilização do método do mono-híbrido de leveduras. Para isto foi utilizada uma biblioteca de cDNA de Soghum bicolor variedade SC566, construída a partir de mRNA extraído de plantas tratadas com Alumínio (27uM), sendo a biblioteca construída no vetor pGADT7-Rec. O cDNA foi purificado utilizando-se a coluna CHROMA SPIN + TE-400 (User manual PT1300-1), fornecida pelo Kit. Os tamanhos de cDNA selecionados por esta coluna variam entre 200 pb (90%) e 1000 pb (10%) (Figura 13)

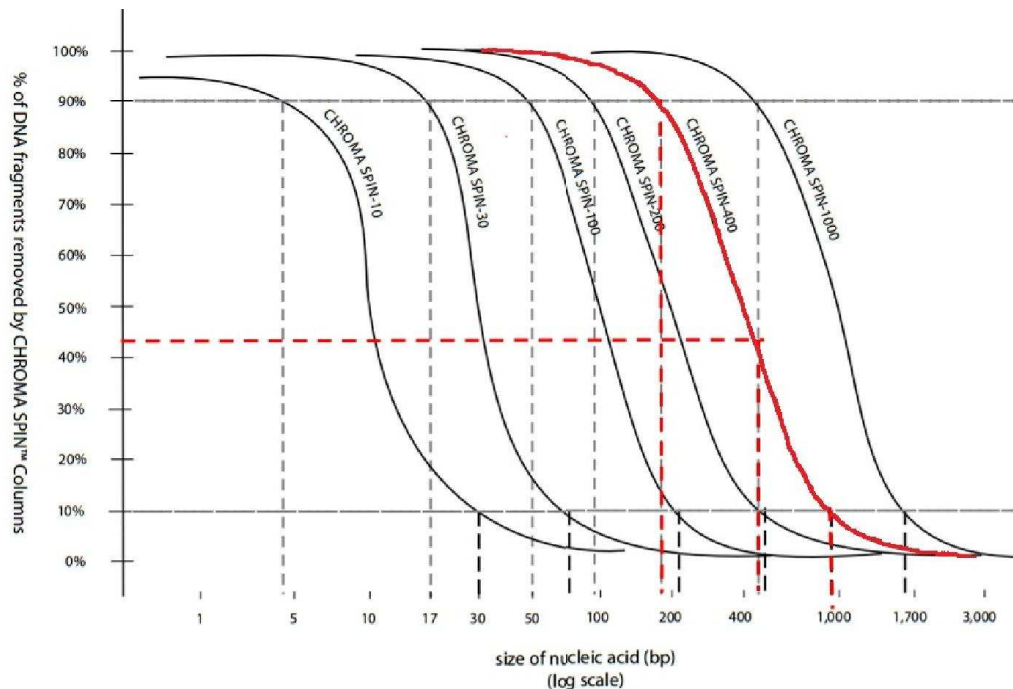


Figura 13. Remoção de fragmentos de dsDNA por colunas CHROMA SPIN em função do tamanho. Em vermelho, a coluna TE-400 utilizada neste trabalho, que recupera desde fragmentos <200 pb (90%) até fragmentos de 1000 pb (10%) (Clontech PT1300-1).

Foram realizados dois screenings utilizando-se o fragmento -2396pSbMATEpHIS2.1, e um com o promotor inteiro-5684pSbMATEpHIS2.1. A cotransformação realizada com o promotor inteiro de SC283, apresentou infinitas colônias quando plaqueadas em 5mM de 3AT, assim para este screening, foi utilizada a concentração inicial de 50 mM 3AT.

Para cada triagem realizada foi feita a titulação da biblioteca de forma a se saber o número de clones escrutinados assim como também a eficiência de transformação do vetor pGADT7-Rec (Tabela 10). Os três screenings, resultaram juntos em 489 colônias, que foram estriadas em 50 mM de 3AT, reduzindo este número para 132 colônias que foram sequenciadas.

Tabela 10. Titulação da biblioteca de Sorghum bicolor utilizada nos três screenings.

Screening	Promotor utilizado	Titulação Cfu/mL	Eficiência de transformação de pHIS+promotor	Total de colônias obtidas	Colônias sequenciadas
I YAltSb	-2396pSbMATEpHIS2.1	$2,6 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$	285	42
IYSbMATE	-2396pSbMATEpHIS2.1	$1,2 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	129	87
IYSC283	-5684pSbMATEpHIS2.1	$6,0 \times 10^4$	$5,59 \times 10^2$	75	15

As sequências foram analisadas utilizando-se o banco de dados do Phytozome e também pelo algoritmo de busca local (BLAST) com a finalidade de verificar a identidade e o alinhamento entre as sequências obtidas e o genoma de Sorghum.

Com exceção de 05 sequenciamentos falhos e de 12 sequências que não apresentaram transcrito quando blastadas contra o banco de dados de Sorghum bicolor no Phytozome, todos os demais 127 fragmentos de cDNA resultantes das triagens realizadas, foram capazes de alinhar no genoma de Sorgho.. 100 delas (78,74%) alinharam à sequências codificadoras (CDS), sendo as demais (21,26%), localizadas nas regiões 3'-UTR (*untranslated region*), que se estendem desde o códon de terminação até a cauda poli-A, e que por serem, regiões não traduzidas, eliminam a possibilidade de interação positiva com o promotor SbMATE e portanto foram descartadas.

Tendo em vista que o tamanho da região 3'UTR dos genes de sorgo mostrou o tamanho médio de 405 pb (Figura 14), e que, a média dos cDNAs purificados pela coluna TE-400 tendem a ter 400 pb (Figura 13), era esperado que grande porcentagem das sequências analisadas para o Sorgho, quando se utiliza esta coluna, estivessem localizadas nesta região, o que pode inviabilizar a utilização deste protocolo para confecção da biblioteca de cDNA para esta planta. Quando se utilizam genes de Arabidopsis, por exemplo, que têm tamanho médio de região 3' não transcrita de 216 pb (Figura 14), apenas 25% dos cDNAs analisados devem estar localizados nesta região.

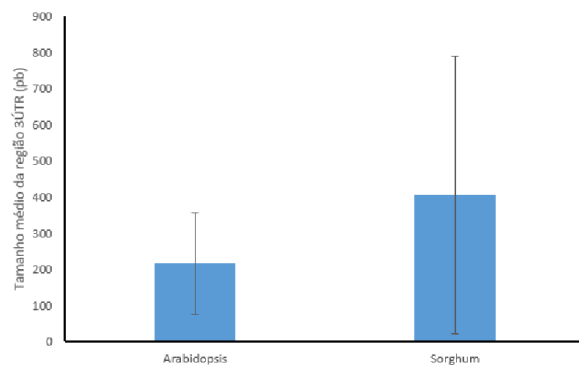


Figura 14: Tamanho médio da região 3'UTR em Arabidopsis e em Sorghum. As barras indicam o desvio padrão da média

Os 97cDNAs obtidos, capazes de alinhar com as sequências codificadoras (CDS), foram ainda reduzidos para 65 após a retirada de sequências repetidas. Conforme esperado, o tamanho médio dos cDNAs candidatos à transfatoses selecionados pela coluna Choma Spin TE-400 foi de 456 pb, enquanto o tamanho médio das regiões 3'UTR das sequências identificadas neste estudo foi de 418,27 pb (Tabela 11). Todas as sequências foram analisadas quanto à sequência aberta de leitura, mas apenas 09 apresentavam-se *in frame* com o gene de Gal4. Nenhuma delas entretanto foram reconfirmadas em ensaios de transativação do promotor em leveduras, não se procedendo caracterizações adicionais.

O protocolo “Matchmaker™ One-Hybrid Library Construction & Screening Kit” (Cat. No 630403-Clontech), utilizado neste trabalho, foi descontinuado pelo fabricante e substituído pelo “Matchmaker® Gold Yeast One-Hybrid Library Screening System” (Cat. no. 630491). Entretanto, ambos utilizam a coluna TE-400 na confecção da biblioteca do cDNA e, portanto, sua utilização pode ser inviabilizada pelo grande número de falsos positivos gerados à partir da clonagem do cDNA de regiões não transcritas e ainda, pela clonagem de cDNAs que estejam fora de frame com o gene de Gal4, inviabilizando a funcionalidade do sistema mono-híbrido em leveduras.

### **Interação de genes candidatos com o promotor de SbMATE**

A detecção de um eQTL co-localizado com o loco *Alt<sub>SB</sub>*, confirmou a dominância dos efeitos em *cis* no controle da expressão do gene *SbMATE*. Outro eQTL localizado

fora do loco *Alt<sub>SB</sub>*, no qual possivelmente estão localizados fatores em *trans* que afetam a expressão do gene *SbMATE*. Estes resultados levaram à determinação de 22 genes, todos eles localizados no cromossomo 9. Dentre os 22 candidatos foram obtidas 15 clones de cDNAs correspondentes e transferidos para vetores monohíbridos de leveduras.

Células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* da linhagem W303, previamente transformadas com -5684pSbMATEpHIS2.1, foram co-transformadas com as 15 construções cDNA obtidas. Para seleção das interações, as células transformadas foram plaqueadas em SD-Trp-His+5mM de 3AT, e mantidas em BOD 28°C por 36 horas. A interação dos possíveis transfatores com a região promotora do gene foi monitorada pela ativação do gene repórter HIS3. Para isso a levedura transformada com o promotor inteiro de SC283 foi co-transformada com o vetor pDEST22 vazio e plaqueadas em SD-Trp-His suplementado com diferentes concentrações de 3AT, havendo crescimento apenas no meio com ausência de 3AT (Figura 15).





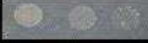
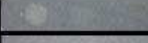

W303-5684pSbMATEpHIS2.1 + pDEST22 Vazio	
SD-Trp-His + 0 mM 3AT	
SD-Trp-His + 2,5 mM 3AT	
SD-Trp-His + 5,0 mM 3AT	
SD-Trp-His + 7,5 mM 3AT	
SD-Trp-His + 10 mM 3AT	
SD-Trp-His + 15 mM 3AT	
SD-Trp-His + 40 mM 3AT	
SD-Trp-His + 60 mM 3AT	

Figura 15. Análise de interação entre W303-5684pSbMATEpHIS2.2 e pDEST22 vazio. Células de W303 pSC283 foram crescidas em meio líquido e, co-transformada com o vetor pDEST22 vazio. Duas colônias crescidas foram inoculadas em meio líquido e mantidas ON até OD=1. Foram feitas gotas com as leveduras co-transformadas em meios suplementados com diferentes concentrações de 3AT

Assim, as cotransformações do promotor com as proteínas candidadas foram plaqueadas em meio deficiente em triptofano e histidina, sem suplementação com 3AT, entretanto, ao contrário do que esperávamos, houve crescimento em todas as placas, inclusive nos controles negativos. As colônias resultantes foram inoculadas em meio líquido e o crescimento analisado em meio suplementado por 3AT ( Figura 16).





































15 mM 3AT	1	0,1	0,01
(-)			
pDEST22			
3			
5			
7			
8			
11			
12			
13			
14			
15			
16			

Figura 16. Crescimento de colônias resultantes da cotransformação entre W303-5684pSbMATEpHIS2.2 e pDEST22 vazio. Foram analisada três colônias resultantes da cotransformação, crescidas em meio líquido até OD=1. Foram feitas gotas com as leveduras co-transformadas em meio SD-Trp-His suplementado com 15 mM de 3AT

As transformações foram repetidas e plaqueadas nas concentrações de 2,5; 5,0; 10 e 15 mM de 3AT, todavia o crescimento continuou a ser observado. Estes resultados, em conjunto sugerem a ineficiência do sistema mono-híbrido quando utilizados os vetores HIS2.1 e pDEST22 em conjunto, por possuírem a mesma marca de seleção, impossibilitando os corretos controles e interpretações.

Tabela 11. Interação entre proteínas candidatas e o promotor de SC283

Escrutíneo	Colônia	Sequência	Ocorrência	UTR predita	Frame	Nome do locus	Descrição
1EAltSb	1.23	618	1	424	n	Sobic.008G114500	similar to Probable histone H2AXb
1EAltSb	2.4	394	1	453	n	Sobic.001G350500	similar to Histone H3.3
1EAltSb	2.24	690	2	382	n	Sobic.009G242400	similar to 40S ribosomal protein S12
1EAltSb	3.2	442	1	547	FRAME	Sobic.001G089100	similar to Exoglucanase precursor
1EAltSb	3.6	373	1	365	n	Sobic.001G057300	similar to Putative uncharacterized protein
1EAltSb	3.16	382	1	1506	n	Sobic.001G012200	similar to Cytochrome P450 71E1
1EAltSb	4.2	459	1	306	n	Sobic.001G540100	similar to Putative uncharacterized protein-SUBGROUP III AMINOTRANSFERASE
1EAltSb	4.3	382	3	391	n	Sobic.005G041300	similar to Os1lg0155500 protein-AMINO ACID TRANSPORTER
1EAltSb	4.7	514	1	365	n	Sobic.007G192800	similar to Nuclear transport factor 2
1EAltSb	4.16	520	2	420	n	Sobic.008G185900	similar to Glycine-rich RNA-binding protein 1- Nuclear cap-binding protein complex, subunit CBP20 (RRM superfamily)
1EAltSb	4.17	297	1	2127	n	Sobic.002G141000	similar to CAX-interacting protein 4 (CAXIP4)-like GO: nucleic acid binding
1EAltSb	4.27	365	1	324	n	Sobic.001G211500	similar to DNA ligase
1EAltSb	4.28	556	2	719	n	Sobic.001G417600	similar to Actin-depolymerizing factor 7
1EAltSb	5.4	428	1	305	n	Sobic.004G032000	similar to Proteasome subunit alpha type-1
1EAltSb	5.16	260	2	242	n	Sobic.001G012500	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE, GST, SUPERFAMILY, GST DOMAIN

							CONTAINING-protein binding
1EAltSb	5.19	317	1	407	FRAM E	Sobic.001G081100	(M=56) PTHR10795:SF17 - SUBTILISIN-LIKE PROTEASE (PLANT)
1EAltSb	6.6	423	1	463	n	Sobic.002G406500	similar to Elongation factor 1-beta-elongation factor EF-1 beta subunit
1EAltSb	6.10	422	1	231	n	Sobic.004G093800	similar to Integral membrane family protein-like-Domain of unknown function (DUF588)-NITRATE, FROMATE, IRON DEHYDROGENASE
1EAltSb	6.15	361	1	347	n	Sobic.001G401700	similar to Aspartate aminotransferase, putative, expressed
1EAltSb	6.20	618	1	285	FRAM E	Sobic.001G418100	similar to UDP-D- glucuronate decarboxylase
1EAltSb	6.35	372	1	446	FRAM E	Sobic.001G476300	similar to Homeobox domain containing protein, expressed- Transcription factor HEX, contains HOX and HALZ domains
1EAltSb	6.36	133	1	401	n	Sobic.001G389900	similar to Aquaporin SIP2-1
1EAltSb	7.24	791	2	513	n	Sobic.006G108400	similar to 14-3-3-like protein GF14-B-- Multifunctional chaperone (14-3-3 family)
1EAltSb	9.20	361	1	326	n	Sobic.002G354900	similar to Putative chitin-inducible gibberellin-responsive protein
1EAltSb	9.31	358	1	296	n	Sobic.003G041300	similar to Putative uncharacterized protein Frigida-like protein
1EAltSb	9.36	293	1	364	n	Sobic.009G135900	similar to Putative cystatin-cysteine protease inhibitor activity
1EAltSb	10.1 2	757	1	474	n	Sobic.001G443200	similar to Endomembrane protein

							70 containing protein, expressed
1EAItSb	11.20	414	1	467	n	Sobic.001G503100	similar to RTCN Protein of unknown function DUF260
1ESbMAT E	1.2	224	4	310	n	Sobic.006G043700	Mitochondrial/plastidial beta-ketoacyl-ACP reductase
1ESbMAT E	1.3	486	9	335	n	Sobic.007G152000	similar to Putative activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1
1ESbMAT E	1.4	344	5	404	n	Sobic.003G257000	similar to Os01g0679600 protein
1ESbMAT E	2.1	246	1	282	n	Sorbic.002G350400	similar to Tubulin alpha-2/alpha-4 chain
1ESbMAT E	2.4	670	1	570	FRAM E	Sobic.003G280900	similar to NADP dependent malic enzyme
1ESbMAT E	2.5	535	1	520	n	Sobic.001G372000	similar to Tubby protein, putative, expressed
1ESbMAT E	2.6	481	1	337	n	Sobic.001G107100	similar to Tubulin alpha-2/alpha-4 chain
1ESbMAT E	3.4	0	1	0	n	Sobic.006G035300	similar to Os04g0298600 protein
1ESbMAT E	3.8	640	2	421	n	Sobic.004G160700	similar to RNA binding protein Rp120
1ESbMAT E	3.9	294	1	381	FRAM E	Sobic.001G417800	similar to ARF GAP-like zinc finger-containing protein ZIGA2, putative, expressed
1ESbMAT E	4.1	351	1	239	n	Sobic.003G152600	similar to Ubiquitin/40S ribosomal protein S27a fusion protein
1ESbMAT E	4.6	869	4	0	n	Sobic.001G461000	<i>No functional annotations for this locu</i>
1ESbMAT E	4.8	637	2	353	n	Sobic.003G301900	transferase activity, transferring phosphorus-containing groups
1ESbMAT E	4.10	470	1	334	n	Sobic.003G211100	NUCLEAR RNA BINDING PROTEIN A-LIKE PROTEIN

1ESbMAT E	5.1	292	1	175	n	Sobic.005G09740 0	similar to HSR203J, putative, expressed
1ESbMAT E	5.3	363	1	544	n	Sobic.006G23110 0	similar to H0315F07.12 protein
1ESbMAT E	5.6	620	2	387	FRAM E	Sobic.008G15870 0	(M=80) PF00234 - Protease inhibitor/seed storage/LTP Family
1ESbMAT E	5.7	455	1	384	n	Sobic.003G40140 0	similar to OsGRP2
1ESbMAT E	5.15	593	1	328	n	Sobic.009G11990 0	imilar to Acyl carrier protein
1ESbMAT E	6.2	0	1	0	n	Sobic.006G03530 0	similar to Os04g0298600 protein
1ESbMAT E	6.5	509	1	552	FRAM E	Sobic.010G02230 0	(M=5) PTHR21229:SF2 - LUNG SEVEN TRANSMEMBRANE RECEPTOR
1ESbMAT E	6.13	238	3	282	n	Sobic.002G35040 0	similar to Tubulin alpha-2/alpha-4 chain
1ESbMAT E	6.14	553	2	265	n	Sobic.001G17780 0	similar to 60S ribosomal protein L10
1ESbMAT E	7.4	535	1	282	n	Sobic.003G18660 0	similar to Putative uncharacterized protein B1156H12.26
1ESbMAT E	7.6	562	1	321	n	Sobic.009G16510 0	similar to Root cap- specific glycine-rich protein
1ESbMAT E	7.10	637	1	0	n	Sobic.004G29220 0	(M=80) PF00234 - Protease inhibitor/seed storage/LTP Family
1ESbMAT E	7.13	547	1	331	n	Sobic.001G09760 0	similar to Alcohol dehydrogenase 1
1ESbMAT E	7.16	264	1	305	n	Sobic.001G37190 0	similar to Superoxide dismutase [Cu-Zn] 4 <sup>a</sup>
1ESbMAT E	8.2	376	3	373	n	Sobic.001G01230 0	similar to Cytochrome P450 79A1
1ESbMAT E	8.4	488	1	336	n	Sobic.001G29330 0	similar to Chloroplast chaperonin 10, putative, expressed
1ESbMAT E	8.5	463	1	658	FRAM E	Sobic.001G49850 0	similar to Putative phosphoserine aminotransferase

1ESC283	1.1	832	1	719	n	Sobic.002G36840 0	similar to Translocase inner membrane-like protein
1ESC284	2.2	428	4	387	n	Sobic.009G17350 0	similar to 40S ribosomal protein S26
1ESC287	11.1	597	1	1242	n	Sobic.008G03540 0	similar to Expressed protein
1ESC290	14.1	475	1	402	n	Sobic.006G08770 0	similar to H0525C06.4 protein
1ESC291	16.1	454	1	321	n	Sobic.003G38670 0	similar to Putative uncharacterized protein
1ESC297	20.1	837	1	212	n	Sobic.002G19560 0	similar to Putative uncharacterized protein
		456		418,2769 2			

\*cDNAs obtidos a partir da triagem de fatores de transcrição pela técnica no mono híbrido em leveduras. As sequencias obtidas foram alinhadas nas sequencias codificantes do genoma de Sorghum

## Conclusões

Recentemente, GmNAC81 foi identificado como componente da via de sinalização de morte celular mediada por proteínas NRPs e induzida por estresse osmótico e estresse do retículo endoplasmático. Apesar da relevância dessa via de sinalização que integra respostas a múltiplos sinais de estresse em plantas, o conhecimento do mecanismo pelo qual GmNAC81 provoca a morte celular é limitado.

Nesta investigação, nós demonstramos que a superexpressão de GmNAC81 dirigida pelo promotor 35S acelera a senescência foliar por causar o amarelecimento foliar precoce, queda nos teores de clorofila, de fotossíntese e da razão Fv/Fm, além de elevada produção de malonaldeído e expressão de genes marcadores de senescência. Foi demonstrado também que o promotor de GmNAC81 é ativado durante a senescência foliar.

A função de GmNAC81 como efetor da senescência foi confirmada em plantas de soja silenciadas para este gene, nas quais os teores de malonaldeído e a expressão de genes marcadores de senescência foram reduzidos quando comparados às plantas não silenciadas. Adicionalmente, a observação do florescimento antecipado, sugere que GmNAC81 pode ter efeitos pleiotrópicos na indução do florescimento.

A análise de RT-PCR revelou que a expressão GmNAC081 está mal detectada em folhas em expansão (29 DAG) antes do início da senescência. Os baixos níveis de GmNAC081 em folhas, jovens não senescentes e os altos níveis nas folhas senescentes pareceu ser regulada ao nível da transcrição, porque a atividade do gene repórter GUS sob o controle do promotor GmNAC081 foi detectada em folhas senescentes e muito baixa em folhas jovens. A expressão de GmNAC081 também pode ser controlada postranscricionalmente porque a expressão ectópica GmNAC081 sob o controle do promotor constitutivo 35S resultou no acúmulo de transcritos GmNAC081 ao longo do desenvolvimento. Provas convincentes na literatura têm demonstrado que o controle do desenvolvimento e a indução e genes NAC por estresse são sob controle apertado de reguladores transcrpcionais e pos-transcrpcionais ou por miRNA (Kim et al., 2009). No entanto, o controle da expressão GmNAC081 deve ser confirmado usando iniciadores específicos para o transgene para excluir a possibilidade de que a expressão do gene endógeno nas linhagens transgênicas seja responsável pela variação elevada na expressão do gene dirigido pelo promotor 35S durante o desenvolvimento.

O gene de resistência ao Al em Sorgo, SbMATE, foi isolado por clonagem posicional e é altamente expresso no ápice da raiz, codificando um transportador transmembrana pertencente à família MATE (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion family*) que é responsável pelo efluxo de citrato ativado por alumínio. Nesta espécie a região codificadora do gene de tolerância ao alumínio é idêntica entre cultivares tolerantes e sensíveis. Foi demonstrado que além de um polimorfismo encontrado no segundo íntron, elementos transponíveis do tipo MITE foram detectados na região promotora, sendo o número de repetições MITE positivamente relacionada com a tolerância.

Nesta investigação, nós descrevemos a prospecção de fatores de transcrição que controlam a capacidade de resposta do gene SbMATE. Entretanto, nossos resultados evidenciaram a ineficiência do kit de confecção da biblioteca de cDNA, quando utilizado com esta espécie.

A análise da atividade do promotor do gene SbMATE foi realizada em Arabidopsis e nossos resultados sugerem a existência de elementos cis-regulatórios negativos reprimindo a atividade do promotor SbMATE em Arabidopsis. Além disso, somente com a deleção de todas as repetições MITEs se observou atividade do promotor SbMATE em Arabidopsis. Indicando que a natureza da sequência MITE com características de transposon pode ter acionado um sistema de silenciamento transcricional por RNA de interferência em Arabidopsis, o que não ocorre no sistema homólogo sorgo. Assim, uma análise do nível de metilação desses promotores inseridos no genoma de Arabidopsis, em comparação com os promotores no loci de sorgo poderia esclarecer esta possibilidade. Alternativamente, os promotores contendo as sequências MITE somente são ativos após indução com Al, que aliviaria a repressão natural dos mesmos. Consequentemente, na presença de Al, as sequências MITE funcionariam como intensificadores de expressão (“enhancers”) reconciliando nossos resultados com a literatura. Entretanto, nas condições de nosso experimento, a adição de Al ao meio de cultivo não ativou os promotores completos, sendo necessária nova análise.

Plantas transformadas com os fragmentos -1975 to-536 pSbMATE-SC283::GUS e -1360 to -536 pSbMATE-SC283::GUS, que aparentemente não contem um promotor núcleo apresentaram atividade qualitativamente semelhante aos demais fragmentos. Neles, está presente uma sequência TATA, cuja posição (-633) parece ser corretamente posicionado para funcionar como um promotor núcleo com a deleção do fragmento delimitado pela posição -536 até o códon ATG.

O Fragmento -536pSbMATE- SC283::GUS, de apenas 500 pb possui apenas um TATA box (-233), que não está presente nos fragmentos -1975to-536pSbMATE-SC283::GUS e -1975to-536pSbMATE-SC283::GUS, mas sim nos demais fragmentos amplificados utilizando-se o primer reverse PALTSB1-Rvs (ccccaagcttCATGTCGGCCTAGCTACAAACC)

Embora a atividade do promotor -536 aparentemente seja menor do que os demais fragmentos, estes resultados indicam que provavelmente o TATA Box (-233) seja funcional, definindo o promotor mínimo do gene. Entretanto, também é evidente a presença de outros elementos positivos delimitados pelas posições -2396 a -536. Estes resultados, indicam o sofisticado mecanismo de controle transcricional do gene SbMATE e que, experimentos adicionais serão necessários para elucidar o mecanismo pelo qual SbMATE promove a tolerância ao alumínio em Sorghum .

## Bibliografia

- Ahn S J, Sivaguru M, Osawa H, Chung GC, Matsumoto H** (2001). Aluminum inhibits the H<sup>+</sup>-ATPase activity by permanently altering the plasma membrane surface potentials in squash roots. *Plant Physiology*, **126**, 1381-1390
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS** (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, **53**: 1331-1341.
- Apel K, Hirt H** (2004). REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction *Annu. Rev. Plant Biol.* 2004. **55**:373–99
- Awika J M, Rooney L W** (2004) Review Sorghum phytochemicals and their potential impact on human health. *Phytochemistry* **65** :1199–1221
- Barceló J, Poschemrieder C** (2002). Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environmental and Experimental Botany*, **48**, 75-92.
- Buchanan B B, Gruissem W, Jones R L** (2000). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*.
- Calbo A G, Cambraia J** (1980) Efeito do alumínio sobre a composição mineral de dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Revista Ceres*, **27**:369-378
- Campos W F** (2009) Estresse salino afeta a performance fotossintética dos genótipos CB 47-89 e CB 45-3 em cana de açúcar *Saccharum sp.*- Dissertação de mestrado.
- Chen J, Sucoff E I, Stadelmann E J** (1991). Aluminum and temperature alteration of cell membrane permeability of *Quercus rubra*. *Plant Physiol*, **96**:644-649.
- Ciacci C, Maiuri L, Caporaso N, Bucci C, Del Guidice L, Massardo D R, Pontieri P, Di Fonzo N, Bean R S, Ioerger B, Londei M** (2007) Celiac disease: In vitro and in vivo safety and palatability of wheat-free sorghum food products. *Clinical Nutrition* **26**, 799–805 doi:10.1016/j.clnu.2007.05.006
- Coelho A M, Waquil J M, Karan D, Casela C R, Ribas P M** (2002). Seja o doutor do seu sorgo. *Informações Agronômicas*, Piracicaba, n.100, dez. 2002. Arquivo do Agrônomo, Piracicaba, n.14, 24p. dez. Encarte
- Chang Y C, Ma J F, Matsumoto H** (1998) Mechanisms of Al-induced iron chlorosis in wheat (*Triticum aestivum*) Al-inhibited biosynthesis and secretion of phytosiderophore. *Physiologia Plantarum*, **102**:9-15

- Delhaize E, Ryan P R, Randall P J** (1993). Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.): II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiol.* **103**:695–702
- Delhaize E, Ryan P R** (1995). Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiology*, **107**, 315-321.
- Delhaize E; Hebb D.M., Richards K D, Lin J M, Ryan P R, Gardner R C** (1999) Cloning and Expression of a Wheat (*Triticum aestivum* L.) Phosphatidylserine Synthase cDNA overexpression in plants alters the composition of phospholipids. *The journal of Biological Chemistry* vol. **274**, No. 11, Issue of March **12**, pp. 7082–7088.
- Delhaize E, Gruber B D, Ryan P R** (2007) The roles of organic anion permeases in aluminium resistance and mineral nutrition. *FEBS Letters* **581**, 2255–2262 doi:10.1016/j.febslet.2007.03.057
- Dicko M H, Gruppen H, Traoré A S, Voragen A G J, van Berkel W J H** (2006). Review Sorghum grain as human food in Africa: relevance of content of starch and amylase activities *African Journal of Biotechnology* Vol. **5** (5), pp. 384-395, 1 March
- Dykes L, Rooney L W, Waniska R D, Rooney W L**(2005) Phenolic compounds and antioxidant activity of sorghum grains of varying genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. **53**, n. 17, p. 6813- 6818,
- Freitas F A, Kopp M M, Sousa R O, Zimmer P D, Carvalho F I F, Oliveira A C** (2006). Absorção de P, Mg, Ca e K e tolerância de genótipos de arroz submetidos a estresse por alumínio em sistemas hidroponicos. *Ciência Rural* **36**:72-79
- Furukawa J, Yamaji N, Wang H, Mitani N, Murata Y, Sato K, Katsuhara M, Takeda K, Ma JF.** (2007). An aluminum-activated citrate transporter in barley. *Plant and Cell Physiology* **48**, 1081–1091.
- Hoekenga O A, Maron L G, Pinerros M A.** (2006). AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **103**, 9738–9743.
- Huang J W, Pellet D M, Papernik L A** (1996) Aluminum interactions with voltage-dependent calcium transport in plasma membrane vesicles isolated from roots of aluminum- sensitive and -resistant wheat cultivars. *Plant Physiology*, v.**110**, n.2, p.561-569, 1996.
- Huang C F, Yamaji N, Mitani N, Yano M, Nagamura Y, Ma J F** (2009). A bacterial-type ABC transporter is involved in aluminum tolerance in rice. *The Plant Cell*, Vol. **21**, 655-667.

- Huang C F, Yamaji N, Chen Z, Ma J F** (2012) A tonoplast-localized half-size ABC transporter is required for internal detoxification of aluminum in rice. *Plant J.* **69**, 857–867
- Iuchi S, Koyama H, Iuchi A, Kobayashi Y, Kitabayashi S, Kobayashi M, Ikka T, Hirayama T, Shinozaki K, Kobayashi M** (2007) Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in Arabidopsis and coregulates a key gene in aluminum tolerance. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **104**, 9900–9905.
- Jones D L, Kochian L V** (1995). Aluminum inhibition of the inositol 1,4,5-trisphosphate signal transduction pathway in wheat roots: a role in aluminum toxicity? *The Plant Cell*, **7**, 1913-1922.
- Jones D L, Kochian L V** (1997). Aluminum interaction with plasma membrane lipids and enzyme metal binding sites and its potential role in Al cytotoxicity. *FEBS Letters* **400** (1997) 51-57
- Jones D L, Blancaflor E B, Kochian L V, Gilroy S** (2006) Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. *Plant, Cell and Environment*, **29**, 1309-1318. doi: 10.1111/j.1365-3040.2006.01509.x
- Khan M S H, Tawaraya K, Sekimoto H, Koyama H, Kobayashi Y, Murayama T, Chuba T, Kambayashi M, Shiono Y, Uemura M, Ishikawa S, Wagatsuma T** (2009). Relative abundance of  $\Delta 5$ -sterols in plasma membrane lipids of root-tip cells correlates with aluminum tolerance of rice. *Physiologia Plantarum*, **135**, 73-83.
- Kiss T, Zatta P, Corain B** (1996) Interaction of aluminium (III) with phosphate-binding sites: biological aspects and implications. *Coordination Chemistry Reviews*, **149**, 329-346.
- Kochian L V** (1995). Mechanisms of aluminium toxicity and resistance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**:237-60
- Kochian L V, Hoekenga O A, Pineros M A** (2004). How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annual Review Plant Biology*, **55**, 459-493.
- Kochian L V, Pineros M A, Hoekenga O A** (2005). The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant and Soil*, **274**, 175-195. DOI 10.1007/s11104-004-1158-7

- Kuroda T, Tsuchiya T.**(2009)Review: Multidrug efflux transporters in the MATE family *Biochimica et Biophysica Acta* 1794 763–768 doi:10.1016/j.bbapap.2008.11.012
- Larsen P B, Geiseler M J B, Jones CA, Williams K M, Cancel J D** (2005) ALS3 encodes a phloem-localized ABC transporter-like protein that is required for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, **41**: 353-363.
- Larsen P B, Cancel J D, Rounds M, Ochoa V** (2007) *Arabidopsis* ALS1 encodes a root tip and stele localized half type ABC transporter required for root growth in an aluminium toxic environment. *Planta*, **225**:1447-1458
- Lazof D B, Goldsmith J G, Ruffy T W, Linton R W** (1996) The early entry of Al into cells of intact soybean roots (a comparison of three developmental root regions using secondary ion mass spectrometry imaging). *Plant Physiology*, **112**, 1289-1300.
- Ligaba A, Katsuhara M, Ryan P.R, Shibasaka M , Matsumoto, H** (2006) The BnALMT1 and BnALMT2 genes from rape encode aluminum activated malate transporters that enhance the aluminum resistance of plant cells. *Plant Physiol.* **142**, 1294– 1303.
- Liu JP, Magalhaes JV, Shaff J, Kochian LV** (2009). Aluminum-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer *Arabidopsis* aluminum tolerance. *The Plant Journal* **57**, 389–399.
- Maron LG, Pineros MA, Guimaraes CT, Magalhaes JV, Pleiman JK, Mao CZ, Shaff J, Belicuas SNJ, Kochian LV.** (2010). Two functionally distinct members of the MATE (multi-drug and toxic compound extrusion) family of transporters potentially underlie two major aluminum tolerance QTLs in maize. *The Plant Journal* **61**, 728–740.
- Ma J F** (2000) Mini Review: Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. *Plant & Cell Physiology*, **41**(4), 383-390.
- Ma J F, Ryan P R, Delhaize E** (2001) Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science*, **6**, 273-278.
- Ma J F, Shen R, Nagao S, Tanimoto E** (2004) Aluminum targets elongating cells by reducing cell wall extensibility in wheat roots. *Plant & Cell Physiology*, **45**(5), 583-589.
- Ma J F** (2007) Syndrome of aluminum toxicity and diversity of aluminum resistance in higher plants. *International Review of Cytology*, **264**, 225-253.

- Magalhães J V, Garvin D F, Wang Y, Sorrells M E, Klein P E, Schaffert R E, Li L, Kochian L V** (2004) Comparative mapping of a major aluminum tolerance gene in sorghum and other species in the Poaceae. *Genetics* **167**: 1905-1914.
- Magalhães J V, Liu J, Guimarães C T, Lana U G P, Alves V M C, Wang Y-H, Schaffert R E, Hoekenga O A, Piñeros M A, Shaff J E, Klein P E, Carneiro N P., Coelho C M, Trick H N, Kochian L V** (2007) A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. *Nature Genetics*, **39**, 1156-1161.
- Magalhães JvV** (2010) REVIEW: PART OF A HIGHLIGHT SECTION ON PLANT–SOIL INTERACTIONS AT LOW PH How a microbial drug transporter became essential for crop cultivation on acid soils: aluminium tolerance conferred by the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family. *Annals of Botany* **106**: 199–203, 2010 doi:10.1093/aob/mcq115.
- Matsumoto H, Hirasawa F, Torinkai H** (1976) Localization absorbed aluminium in peã root and its binding to nuclei acid. *Plant Cell Physiology* **17**:627-631
- Mendonça R J, Cambraia J, Oliveira J A, Oliva M A** (2003) Efeito do alumínio na absorção e na utilização de macronutrientes em duas cultivares de arroz. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, **38**:843-848.
- Melo J O, Lana U G P, Pineros M A, Alves V M C, Guimarães G T, Liu J, Zheng Y, Zhong S, Fei Z, Maron L G, Schaffert R E, Kochian L V, Magalhães J V** (2013) Incomplete transfer of accessory loci influencing SbMATE expression underlies genetic background effects for aluminum tolerance in sorghum *The Plant Journal* **73**, 276–288 doi: 10.1111/tpj.12029
- Moldes C A** (2006). Respostas de enzimas antioxidantes a aplicação do herbicida glifosato em variedades de soja transgênicas e não transgênicas- Tese de doutorado.
- Mutisya J, Sun C, Rosenquist S, Baguma Y, Jansson C** (2009) Diurnal oscillation of SBE expression in sorghum endosperm. *Journal of Plant Physiology*, Stuttgart, v. **166**(4) p. 428-434
- Nguyen N T, Hiep N D, Fujita K** (2005) Iron enhances aluminum-induced leaf necrosis and plant growth inhibition in *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant and Soil* **277**:139-152
- Ohki K** (1987). Aluminum stress on Sorghum growth and nutrient relationship. *Plant Soil* **98**:195-202

- Omote H, Hiasa M, Matsumoto T, Otsuka M, Moriyama Y.**(2006).The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. *TRENDS in Pharmacological Sciences* Vol.27 No.11
- Panda S K, Yamamoto Y, Kondo H, Matsumoto H.**(2008) Mitochondrial alterations related to programmed cell death in tobacco cells under aluminium stress . *C. R. Biologies* **331** 597–610
- Panda S K, Baluska F, Matsumoto H** (2009) Aluminum stress signaling in plants. *Plant Signaling & Behavior*, **4**, 592-597.
- Paul C L** (1990) Agronomía del sorgo. Comisión Latinoamericana de Investigadores en sorgo (CLAIS), ICRISAT, Patancheru P.O., Andhra Pradesh, Índia. 301 p., in: **Waquil J M, Ramalho J H** (2006) Incentivo à Produção de Sorgo no Norte de Minas Gerais EMBRAPA, Documento **56**
- Paterson A H** (2008) Review Article Genomics of Sorghum *International Journal of Plant Genomics*, Article ID 362451, 6 pages doi:10.1155/2008/362451
- Peixoto P H P, Cambraia J, Sant’anna R, Mosquim P R, Moreira M A** (2001) Aluminum effects on fatty acid composition and lipid peroxidation of a purified plasma membrane fraction of root apices of two sorghum cultivars. *Journal of Plant Nutrition*, **24**, 1061-1070
- Pereira J M, Cambraia J, Meira F J E, Ribeiro C** (2008) Efeito do alumínio sobre a absorção, o acúmulo e o fracionamento do fósforo em sorgo Bragantia: revista de ciencias agronómicas, Vol. 67, Núm. 4, octubre-diciembre, pp. 961-967
- Pineros M A, Cancado G MA** (2008) Novel properties of the wheat aluminum tolerance organic acid transporter (TaALMT1) revealed by electrophysiological characterization in *Xenopus oocytes*: functional and structural implications. *Plant Physiol.* **147**, 2131–2146.
- Queiroz V A V, Vizzotto M, Carvalho C W P, Martino H S D** (2009) O Sorgo na Alimentação Humana *Circular Técnica* **133** Embrapa ISSN 0100-9915
- Queiroz V A V, Gonçalves A C A, Rodrigues J A S, Schaffert R E** (2011) Como Utilizar Grãos de Sorgo no Preparo de Produtos Caseiros *Circular Técnica* **190** Embrapa ISSN 1679-0162
- Rengel Z, Zhang W H** (2003). Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium-toxicity syndrome. *New Phytologist*, **159**, 295-314
- Resende M L V, Salgado S M L, Chaves Z M** (2003) Espécies relativas do oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatologia Brasileira*, **28**:123-130.

- Ribas P M** (2003) Sorgo: Introdução e Importância Econômica. Documentos **26** Embrapa ISSN 1518-4277
- Richards, K.D.; Schott, E.J.; Sharma, Y.K.; Davis, K.R. and Gardner, R.C.**(1998) Aluminum Induces Oxidative Stress Genes in *Arabidopsis thaliana* Plant Physiol. (1998) **116**: 409–418
- Rodrigues P H M, Senatore A L., Lucci C S, Andrade S J T, Lima F R, Melotti L**(2002) Valor nutritivo da silagem de sorgo tratada com inoculantes enzimo-microbianos. Acta Scientiarum, Londrina, v. **24**, p.1141-1145.
- Rout G R, Samantaray S, Das P** (2001) Aluminium toxicity in plants: A review Agronomie **21**:3-21
- Ryan P R, Delhaize E** (2010) The convergent evolution of aluminium resistance in plants exploits a convenient currency. Functional Plant Biology, **37**, 275–284.
- Sasaki T S, Yamamoto Y, Ezaki B, Katsuhara, M, Ahn S J, Ryan P R, Delhaize E, Matsumoto, H**(2004) A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. The Plant Journal **37**, 645-653
- Sawaki Y, Iuchi S, Kogayashi, Y.** (2009) STOP1 regulates multiple genes that protect Arabidopsis from proton and aluminum toxicities. *Plant Physiol.* **150**:281-294
- Scandalios J G** (1993) Oxigen stress and superoxide dismutase. Plant Physiology v.**101**, p. 7-12
- Schulz B, Kolukisaoglu H** (2006) Genomics of plant ABC transporters: the alphabet of photosynthetic life forms or just holes in membranes? FEBS Lett. **580**, 1010–1016
- Sivaguru M, Paliwal K**(1993) Differential aluminium tolerance in some tropical rice cultivars. II. Mechanism of aluminium tolerance **Journal of Plants Nutrition**, **16**: 1717-1732
- Sivaguru M, Fujiwara T, Samaj J, Baluska F, Yang Z, Osawa H, Maeda T, Mori T. Volkmann D, Matsumoto H** (2000). Aluminum-induced 1-3- $\beta$ -D-glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminum toxicity in plants. Plant Physiol. **124**:991–1005.
- Taylor G J, McDonald-Stephens J L, Hunter D B, Bertsch P M, Elmore D, Rengel Z, Reid R J** (2000). Direct measurement of aluminum uptake and distribution in single cells of *Chara corallina*. Plant Physiology, **123**, 987-96.
- Von Uexkull H R, Mutert E** (1995). Global extent, development and economic impact of acid soils. Plant and Soil, Dordrecht, v.**171**, p.1-15.

- Xue Y J, Tao L, Yang Z M** (2008). Aluminum-induced cell wall peroxidase activity and lignin synthesis are differentially regulated by jasmonate and nitric oxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 9676-9684.
- Yamaguchi M, Sasaki T, Sivaguru M, Yamamoto Y, Osawa H, Ahn SJ, Matsumoto H** (2005) Evidence for the plasma membrane localization of Al-activated malate transporter (ALMT1). *Plant & Cell Physiology* **46**, 812–816. doi:10.1093/pcp/pci083
- Yamamoto Y, Kobayashi Y, Davi S R, Rikiishi S, Matsumoto H** (2002). Aluminium toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiology* vol. **128**:63-72
- Yamamoto Y, Kobayashi Y, Matsumoto H** (2001) Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminium, but not primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Plant Physiology* v. **125**: 199-208
- Yokosho K, Yamaji N, Ma J F** (2011). An Al-inducible MATE gene is involved in external detoxification of Al in rice. *Plant J.* **68**:1061-1069.
- You J F, Hou N N, Xu M Y, Zhang H M, Yang Z M** (2010). BRIEF COMMUNICATION: Citrate transporters play an important role in regulating aluminum-induced citrate secretion in *Glycine max* *Biologia Plantarum* **54** (4): 766-768.
- Wagatsuma T, Ishikawa S, Obata H, Tawarayama K, Katoh A, TOHDA S.** (1995) Plasma membrane of younger and outer cells in the primary specific site for aluminium toxicity in roots. *Plant Soil* **171**: 105-112.
- Xia J, Yamaji N, Kasai T, Ma J F** (2010) Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **107**, 18381–18385.
- Zhang W, Ryan PR, Sasaki T, Yamamoto Y, Sullivan W, Tyerman SD** (2008) Characterization of the TaALMT1 protein as an Al<sup>3+</sup>-activated anion channel in transformed tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cells. *Plant & Cell Physiology* **49**, 1316–1330. doi:10.1093/pcp/pcn10
- Zheng S J** (1998) High aluminum resistance in buckwheat. I. Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tips. *Plant Physiol.* **117**, 745–751