

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

IANA PEDRO DA SILVA QUADROS

**PARTICIPAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO MEDIADA PELA PROTEÍNA
DCD/NRP NA MORTE CELULAR EM SOJA INDUZIDA POR CÁDMIO E
INFECÇÃO PELO FUNGO *Phakopsora pachyrhizi***

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

IANA PEDRO DA SILVA QUADROS

**PARTICIPAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO MEDIADA PELA PROTEÍNA
DCD/NRP NA MORTE CELULAR EM SOJA INDUZIDA POR CÁDMIO E
INFECCÃO PELO FUNGO *Phakopsora pachyrhizi***

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

Orientadora: Elizabeth Pacheco B. Fontes

Coorientador: Virgílio Adriano Pereira Loriato

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

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

T

Q1p
2021

Quadros, Iana Pedro da Silva, 1990-

Participação da via de sinalização mediada pela proteína DCD/NRP na morte celular em soja induzida por cádmio e infecção pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* / Iana Pedro da Silva Quadros. – Viçosa, MG, 2021.

108 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Plantas - Efeito do estresse. 2. Morte celular programada.
3. Proteínas de ligação. 4. Transdução de Sinais. 5. Fungos.
6. Soja. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação
em Genética e Melhoramento. II. Título.

CDD 22. ed. 572.8

Bibliotecário(a) responsável: Renata de Fatima Alves CRB6 2578


IANA PEDRO DA SILVA QUADROS


**PARTICIPAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO MEDIADA PELA PROTEÍNA
DCD/NRP NA MORTE CELULAR EM SOJA INDUZIDA POR CÁDMIO E
INFECCÃO PELO FUNGO *Phakopsora pachyrhizi***

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

APROVADA: 21 de maio de 2021

Assentimento:


Iana Pedro da Silva Quadros
Autora


Elizabeth Pacheco Batista Fontes
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me permitiu vida e oportunidades de experienciá-la. Gratidão por me guiar, proteger, iluminar e abençoar minha caminhada.

Aos meus pais, Reginaldo Ferreira Quadros (*in memoriam*) e Marlene Pedro da Silva Quadros, grandes exemplos de vida. Não há palavras para descrever o quanto vos amo e sou grata por ser sua filha. Mãe obrigada pelas infinitas orações que me fortaleceram tanto. Pai, mesmo de longe sei que comemora junto conosco.

À minha família, base de tudo, que me auxilia em qualquer ponto da jornada e não medem esforços para permitir realizar meus sonhos. Muito obrigada por serem tão generosos, carinhosos, por me apoiarem, darem-me forças e incentivos nos momentos mais difíceis. Gratidão.

Ao meu esposo, José Romário e meu filho João Guilherme, meu amor por vocês me fortalece sempre e saber que posso contar com esse amor, apoio e incentivo com certeza me fizeram mais fortes para concluir meu doutorado. Obrigada por toda compreensão pelas viagens e dias longe, sem isso não seria possível.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Programa de Genética e Melhoramento, pela oportunidade de realização do curso.

Agradeço aos órgãos de financiamento de pesquisas Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

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

À professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes, exemplo de dedicação profissional, pela orientação e ensinamentos durante todo tempo que passei em seu laboratório. Agradeço também pela oportunidade de desenvolver este projeto, que permitiu meu crescimento profissional.

Ao meu coorientador, Virgílio, que me apoiou e manteve firme nas extrações de RNA.

Aos professores Renildes, Wellington, Pedro, Sérgio e Humberto pela colaboração e troca de conhecimento ao longo do trabalho.

Aos membros da banca por aceitarem o convite e pelas contribuições para melhoria do trabalho.

Aos queridos membros do laboratório de biologia molecular de plantas que já passaram e aos que conheci um pouco mais Iara, Thais, Ruan, Gabriel, Danilo, Cleisinho, Chris,

Marco, Laura, Larissa, Dalton, Larissa, Otto, Eduardo, Bianca, Cauê, Bruno, Débora, Célio, Luís, Otávio, Hanna, Nayara, Lucas, Eugênio, Daiane, Grazi, Igor, Caio, Natália, Pedro, Fred, Nívea, Thainá, Sâmera, obrigada por tornarem as horas de trabalho mais leves e divertidas. A parceria ao longo desses anos foi fundamental para conclusão dessa tese, todos ajudaram em algum momento e sou imensamente grata por cada um de vocês.

Aos demais membros dos diversos laboratórios que constituem a UFV, em especial aos que estão localizados no BIOAGRO, que me socorreram em momentos ímpares ao longo desse trabalho, Monique, Ayane, Tarsi, Jéssica Nayara, Marina, Yan, Jéssica, Lucas, Angélica, Jéssica, Natália e Fernanda.

Ao BIOAGRO e sua equipe, principalmente aos porteiros que traziam um início de expediente com um ótimo bom dia.

A Juliana, amiga de república que me acolheu com tanto carinho.

Aos funcionários da casa de vegetação, sempre dispostos a ajudar no que precisei, agradeço pelo cuidado com minhas plantas, em especial ao Adriano, Daniel, Delfin e Guilherme.

A Marlene e Gláucia por todo carinho e gentileza conosco na manutenção do ambiente de trabalho.

Aos queridos amigos de Viçosa e do incrível grupo de Biodanza que Viçosa me permitiu conhecer, sem vocês não sei se teria conseguido, gratidão.

Aos secretários do programa de pós-graduação em Genética e Melhoramento, Marco Túlio e Odilon, por ajudar sempre que precisei.

A todos que de alguma forma, fizeram parte deste trabalho.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcuta)

RESUMO

QUADROS, Iana Pedro da Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2021. **Participação da via de sinalização mediada pela proteína DCD/NRP na morte celular em soja induzida por cádmio e infecção pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi***. Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Coorientador: Virgílio Adriano Pereira Loriato

Mudanças ambientais e condições extremas, como variações de temperatura, seca e salinidade, além de estresses bióticos, afetam adversamente o crescimento das plantas e causam grande perda de produtividade para as culturas agrícolas em todo o mundo. Entretanto, as plantas desenvolveram várias estratégias para tolerar esses fatores como mecanismos sofisticados de percepção de estresses, sinalização e respostas de defesa. A via de sinalização de morte celular mediada por DCD/NRPs (*Development and Cell Death Domain-containing N-Rich Proteins*) tem sido caracterizada em resposta a estresses abióticos, durante senescência foliar natural e em interações incompatíveis. Estes processos biológicos resultam em morte celular programada. O objetivo dessa pesquisa foi verificar a atuação da via de sinalização mediada por DCD/NRPs em resposta ao cádmio (Cd^{2+}), que promove morte celular, e estresse biótico causado pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*. No capítulo I, foi demonstrado que Cd^{2+} limita o crescimento da planta, causa intensa vermelhidão na nervura da folha, amarelecimento da folha e clorose na soja (*Glycine max*). Esses sintomas foram associados à morte celular programada (PCD) induzida por Cd^{2+} , dado que folhas de soja estressadas por Cd^{2+} exibiram número reduzido de núcleos, morte celular, dano ao DNA e atividade da caspase-1 aumentados em comparação com folhas não estressadas. Consistente com estas observações, Cd^{2+} causou indução dos genes *NRPs*, *GmNAC81*, *GmNAC30* e *VPE*, que são os componentes da sinalização de morte celular mediados por DCD/NRP, que executam PCD via atividade de caspase-1 de *VPE* (*Vacuolar Processing Enzyme*). Além disso, a superexpressão do regulador positivo desta sinalização de morte celular, *GmNAC81*, aumentou a sensibilidade ao estresse de Cd^{2+} e intensificou as marcas de PCD mediada por Cd^{2+} . A superexpressão de *GmNAC81* aumentou a produção de H_2O_2 induzida por Cd^{2+} , morte celular, dano ao DNA e expressão de *VPE*. Por outro lado, a superexpressão de BiP, um regulador negativo do módulo de sinalização NRPs/GmNACs/VPE, conferiu tolerância ao estresse de Cd^{2+} e redução da morte celular mediada por Cd^{2+} . O segundo capítulo focalizou na interação entre o fungo biotrófico *Phakopsora pachyrhizi* e soja. Esforços de triagem em germoplasmas de sojas levaram à identificação de várias fontes de resistência a *P. pachyrhizi* mediada por genes *Rpp*. Entretanto, a caracterização dos efetores ou outros determinantes que contribuem para o reconhecimento

dos isolados de *P. pachyrhizi* em soja não foi completamente elucidada. Neste estudo, também foi investigado se a via DCD/NRP poderia estar envolvida em interações compatíveis e incompatíveis durante a infecção com *P. pachyrhizi* em plantas de soja suscetíveis, BR16 e Conquista, e resistentes, BRS511 e TMG7262. Após 72 h da inoculação, a expressão dos componentes da via foi induzida nas linhagens suscetíveis BR16 e conquista e na linhagem resistente TGM7262 embora em extensões diferentes. Significativamente, a expressão dos componentes da via de morte celular em condições normais foi muito superior na linhagem resistente TGM7262, resultando em altíssima expressão de VPE, um componente importante de HR. Estes resultados sugerem que a via DCD/NRP de morte celular é ativada durante a infecção com o fungo. A fim de avaliar o envolvimento de VPE nos mecanismos de resistência, a expressão de VPE foi constitutivamente aumentada na linhagem suscetível BR16 através de superexpressão do gene *GmNAC081*. A superexpressão constitutiva de *GmNAC081* alterou o fenótipo de suscetibilidade, sendo que as plantas transgênicas infectadas apresentaram menor número de urédias abertas e amarelecimento menos intenso das folhas ao longo da infecção, quando comparadas com BR16 não transformada. Estes resultados sugerem que a expressão aumentada de VPE pode retardar o processo de infecção pelo fungo *P. pachyrhizi* em soja. Entretanto, a superexpressão de um regulador negativo da via DCD/NRP, BiP, não inibiu a indução dos componentes da via DCD/NRP durante a infecção. A expressão de VPE em plantas superexpressando *GmBiPD* foi induzida em todos os tempos analisados após a inoculação e as plantas apresentam maior severidade de infecção, com maior número de urédias abertas e um amarelecimento acentuado do tecido. Sendo a via de sinalização de morte celular mediada por DCD/NRP induzida pelos hormônios ácido abscísico (ABA) e ácido salicílico (AS), foi também investigado o acúmulo desses hormônios em plantas infectadas. Observou-se que plantas superexpressando BiP acumularam um nível superior dos hormônios ABA e AS do que as plantas controle conquista. Provavelmente, o acúmulo acentuado de ABA e AS nas linhagens transgênicas superaram o efeito negativo de BiP na indução da via DCD/NRP. Coletivamente, estes resultados sugerem que a via de morte celular mediada por DCD/NRPs integra uma resposta coordenada a diversos sinais de estresses, portanto, sua manipulação possui o potencial para melhorar a tolerância da cultura a estresses bióticos e abióticos.

Palavras-chave: Sinalização celular. Proteínas ricas em asparagina. Cd. Fungo. Morte celular. Morte celular mediada por NRP. Soja. Proteína de ligação. BiP. Enzima de processamento vacuolar. VPE.

ABSTRACT

QUADROS, Iana Pedro da Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2021. **Participation of the DCD/NRP-mediated signaling pathway in Cadmium- and *Phakopsora pachyrhizi* infection-induced cell death in soybean.** Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-adviser: Virgílio Adriano Pereira Loriato

Environmental changes and extreme conditions, including variations in temperature, drought, and salinity, in addition to biotic stresses, adversely affect plant growth and cause great yield loss for agricultural crops worldwide. However, plants have developed several strategies to tolerate these factors as sophisticated mechanisms for perceiving stresses, signaling, and defense responses. The cell death signaling pathway mediated by DCD/NRPs (Development and Cell Death domain-containing N-Rich Proteins) has been characterized in response to abiotic stresses, during natural leaf senescence and in incompatible interactions. These biological processes result in programmed cell death. This investigation aimed to examine the role of the DCD/NRPs-mediated signaling pathway in response to cadmium (Cd^{2+}), that promotes cell death, and biotic stress caused by the fungus *Phakopsora pachyrhizi*. In chapter I, we showed that Cd^{2+} limits the growth of the plant, causes intense redness in the leaf vein, leaf yellowing, and chlorosis in soybeans (*Glycine max*). These symptoms were associated with Cd^{2+} -induced programmed cell death (PCD), since Cd^{2+} stressed soybeans exhibited a reduced number of nuclei, increased cell death, DNA damage, and caspase-1 activity compared to non-stressed leaves. Accordingly, Cd^{2+} induced *NRPs*, *GmNAC81*, *GmNAC30*, and *VPE*, the DCD/NRP-mediated cell death signaling components, which executes PCD via caspase 1-like VPE activity. Furthermore, overexpression of the positive regulator of this cell death signaling, *GmNAC81*, increased the sensitivity to Cd^{2+} stress and intensified the Cd^{2+} mediated PCD hallmark. Overexpression of *GmNAC81* increased the production of H_2O_2 induced by Cd^{2+} , cell death, DNA damage and VPE expression. Conversely, the overexpression of BiP, a negative regulator of the NRPs/GmNACs/VPE signaling module, conferred tolerance to Cd^{2+} stress and reduced Cd^{2+} mediated cell death. Collectively, the results of chapter I indicate that Cd^{2+} induces PCD in plants via activation of the NRP/GmNAC/VPE regulatory circuit that links developmentally and stress-induced cell death. The second chapter focused on the interaction between the biotrophic fungus *Phakopsora pachyrhizi* and soybean. Screening efforts of soybean germplasms have led to the identification of several sources of *Rpp* genes-mediated resistance to *P. pachyrhizi*. However, the characterization of effectors or other determinants that contribute to the

recognition of *P. pachyrhizi* isolates in soybean has not been completely elucidated. In this study, we investigated whether the DCD/NRP pathway could be involved in compatible and incompatible interactions during infection with *P. pachyrhizi* in susceptible soybean plants, BR16 and Conquista, and resistant plants, BRS511 and TMG7262. At 72 hours after inoculation, the expression of the pathway components was induced in the susceptible strains BR16 and Conquista and in the resistant strain TGM7262 although to different extents. Significantly, the expression of the components of the cell death pathway under normal conditions was much higher in the resistant strain TGM7262, resulting in extremely high expression of VPE, an important component of HR. These results suggested that the cell death DCD/NRP pathway is activated during infection with the fungus. In order to evaluate the involvement of VPE in the resistance mechanisms, the expression of VPE was constitutively increased in the susceptible strain BR16 by overexpressing *GmNAC081*. Overexpression of *GmNAC081* altered the susceptibility phenotype, and the infected transgenic plants had fewer open uredinia and attenuated leaf yellowing during infection when compared to untransformed BR16. These results suggest that the increased expression of VPE may delay the infection process by the fungus *P. pachyrhizi* in soybeans. However, the overexpression of a negative regulator of the DCD/NRP pathway, BiP, did not inhibit the induction of components of the DCD/NRP pathway during infection. The expression of VPE in plants overexpressing *GmBiPD* was induced at all times analyzed after inoculation and the plants displayed higher severity of infection, with a greater number of open uredinia and a pronounced leaf yellowing. Since the DCD/NRP-mediated cell death signaling pathway is induced by the hormones abscisic acid (ABA) and salicylic acid (SA), the accumulation of these hormones in infected plants was also investigated. BiP-overexpressing plants accumulated higher levels of the hormones ABA and SA than control plants. Probably, the accentuated accumulation of ABA and SA in the transgenic strains overcame the negative effect of BiP on the fungus-mediated induction of the DCD/NRP pathway. Collectively, these results suggest that the cell death pathway mediated by DCD/NRPs integrates a coordinated response to various stress signals and, therefore, may be regarded as a potential genetic engineering target to improve crop tolerance to biotic and abiotic stresses.

Keywords: Cell signaling. Asparagine-rich proteins. Cd. Fungus. Cell death. NRP-mediated cell death. Soy. Binding protein. BiP. Vacuolar processing enzyme. VPE.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	11
REFERÊNCIAS.....	13
CAPÍTULO I.....	15
CAPÍTULO II.....	63
1. INTRODUÇÃO.....	66
2. MATERIAL E MÉTODOS	70
2.1 MATERIAIS VEGETAIS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO.....	70
2.2 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DOS POSSÍVEIS TRANSFORMANTES DE SOJA.....	71
2.1 INFECÇÃO DE PLANTAS DE SOJA COM FUNGO <i>PHAKOPSORA PACHYRHIZI</i>	71
2.2 AVALIAÇÃO FENOTÍPICA.....	72
2.3 ISOLAMENTO DE RNA TOTAL DE FOLHAS DE SOJA E SÍNTESE DE CDNA	72
2.4 INDUÇÃO DOS GENES NA VIA DCD/NRP	73
2.5 ANÁLISE DE FITORMÔNIOS	74
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	74
3 RESULTADOS	75
3.1 A VIA DE SINALIZAÇÃO DE MORTE CELULAR MEDIADA POR DCD/NRP É ALTERADA EM INTERAÇÕES COMPATÍVEIS E INCOMPATÍVEIS	75
3.2 MODULAÇÃO DA VIA DCD/NRP ALTERA O FENÓTIPO DA INFECÇÃO DE <i>P. PACHYRHIZI</i> EM SOJA	79
3.3 A VIA DCD/NRP É ALTERADA EM PLANTAS SUPEREXPRESSANDO <i>GmBIPD</i>	83
3.4 A VIA DCD/NRP É ALTERADA EM PLANTAS SUPEREXPRESSANDO <i>GmNAC81</i>	88
3.5 METABOLISMO HORMONAL DE PLANTAS DE SOJA EM INTERAÇÕES COMPATÍVEIS E INCOMPATÍVEIS SOB INFECÇÃO COM <i>P. PHACHYRHIZI</i>	90
4. DISCUSSÃO.....	93
5. CONCLUSÃO	99
REFERÊNCIAS.....	100

INTRODUÇÃO GERAL

Como organismos sésseis, constantemente expostos a condições adversas do meio ambiente, as plantas desenvolveram mecanismos coordenados de respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares a diferentes estresses, iniciadas pela percepção de sinais de estresses, seguida pela transdução desses sinais para restaurar a homeostase celular. Essas respostas levam à reprogramação da expressão gênica e lhes permite sobreviver sob condições que afetam o crescimento e sua produtividade (Nakashima et al., 2011; Melo et al., 2018).

Nos últimos anos, vários avanços foram realizados na identificação de genes e vias de sinalização capazes de aumentar a tolerância das plantas a diferentes situações de estresses. Uma dessas vias de sinalização é a resposta à morte celular mediada por proteínas ricas em asparagina (NRPs) contendo o domínio de desenvolvimento e morte celular (DCD), denominadas proteínas DCD/NRPs (Development and cell death domain-containing asparagine-rich protein) (Reis et al., 2016). Esta via foi inicialmente identificada em soja [*Glycine max* (L.) Merrill], sendo induzida por múltiplos sinais bióticos e abióticos (Pinheiro et al., 2009; Faria et al., 2011), além de estresse no retículo endoplasmático (RE), estresse osmótico ou durante a senescência foliar natural (Faria et al., 2011; Reis et al., 2016; Pimenta et al., 2016).

A via de proteínas DCD/NRPs induzida por estresses múltiplos transduz um sinal de morte celular com características de morte celular programada (PCD) (Costa et al., 2008; Reis et al., 2001), sendo iniciada pelo fator de transcrição (FT) induzido por estresse osmótico, GmERD15, (Alves et al., 2011) que se liga especificamente aos promotores de DCD/NRPs. Aumento da expressão de DCD/NRPs leva à ativação de uma cascata de sinalização que culmina com a indução dos FTs GmNAC81 e GmNAC30, os quais se dimerizam para ativar o promotor da enzima de processamento vacuolar (VPE). VPE exibe atividade do tipo caspase-1 e induz um tipo de PCD específica de plantas, mediada pelo colapso do vacúolo (Faria et al., 2011; Mendes et al., 2013).

Foi demonstrado que BiP, um chaperone molecular do retículo endoplasmático (RE), atua como um regulador negativo da via de morte celular mediada por DCD/NRPs e que a manipulação da expressão de BiP protege as plantas contra a seca e estresse do RE (Valente et al., 2009; Reis et al., 2011; Reis & Fontes, 2012; Carvalho et al., 2014). Além disso, foi demonstrado que BiP modula positivamente genes relacionados a patogênese em respostas de

hipersensibilidade (HR) provocada por interações de incompatibilidade a patógenos não-hospedeiros (Faria et al., 2011; Carvalho et al., 2014b), provavelmente através de aumento no acúmulo de ácido salicílico o que induz a via de morte celular mediada por DCD/NRPs (Carvalho et al., 2014b). Durante interações incompatíveis, a indução do gene DCD/NRP precede a resposta RH da planta, sendo ativada durante o estabelecimento de PCD (Ludwig & Tenhaken, 2001). Estes resultados indicam que a via de morte celular mediada por DCD/NRPs pode participar da execução da PCD em RH, além de estar envolvida como um ramo da resposta ao estresse do RE que se conecta a outras respostas ambientalmente induzidas, permitindo uma adaptação versátil das células a diferentes estresses (Reis & Fontes, 2012; Carvalho et al., 2014b).

A soja é uma das leguminosas de maior importância econômica no mundo, em que o Brasil ocupa a segunda posição como produtor mundial superado apenas pelos Estados Unidos, com produção estimada em 123,68 milhões de toneladas para safra de 2018/2019 (USDA, 2019). No Brasil, para esta safra a estimativa é de que a cultura ocupe 38,3 milhões de hectares com uma produção que pode chegar a 124 milhões de toneladas (CONAB, 2020). Esta grande produção depende de condições favoráveis de clima e cultivo; entretanto, fatores adversos como doenças e toxicidade a metais pesados presentes no solo podem comprometer a produtividade da soja (Saddique et al., 2018). Particularmente relevante é o basidiomiceto *Phakopsora pachyrhizi* (*P. pachyrhizi*) que causa ferrugem asiática na soja, uma das doenças mais sérias e devastadora da soja. Quando inoculado em genótipos resistentes, *P. pachyrhizi* causa lesões necróticas pequenas típicas de uma interação incompatível a qual envolve a reação de morte celular hipersensitiva (HR). Dado que o efetor de morte celular da via DCD/NRP, VPE, está envolvido em HR induzida por viroses, é possível que este fenômeno seja geral para todos os patógenos.

Além de HR que provoca morte celular, a toxidez de metais pesados também está relacionada à ativação de morte celular em plantas. Foi demonstrado que o metal pesado cádmio provoca morte celular em tabaco (Madeira, 2014) e que a superexpressão de BiP em tabaco confere tolerância a cádmio (Guan et al., 2015). Estes resultados sugerem que o mecanismo de proteção a cádmio mediado por BiP pode estar relacionado a sua capacidade de modulação da via de morte celular mediada por DCD/NRPs. Considerando o potencial da via de morte celular mediada por DCD/NRPs na indução de PCD que poderia ser efetiva na toxicidade por Cádmio e resposta HR, os objetivos da presente investigação consistiram em caracterizar funcionalmente eventos de sinalização associados com imunidade antifúngica e toxicidade por

cádmio em soja e suas interações com a via de sinalização de morte celular mediada por DCD/NRPs. A premissa central seria que esta via de sinalização integra uma resposta coordenada a diversos sinais de estresses, portanto, sua manipulação encerra o potencial para melhorar a tolerância a toxicidade de Cádmio e ao fungo. No primeiro capítulo, intitulado “Cadmium-mediated toxicity in plant cells is associated with the DCD/NRP-mediated cell death response”, foi examinada a participação da via DCD/NRPs em morte celular induzida por Cd, resultando em avanços significativos na elucidação dos mecanismos de toxicidade de Cd. No segundo capítulo, intitulado “VPE, enzima de processamento vacuolar, como possível componente de mecanismos de resistência contra *Phakopsora pachyrhizi*, foram abordados aspectos moleculares da interação *P. pachyrhizi*: soja e o envolvimento da via de morte celular mediada por DCD/NRPs e de VPE na resposta HR resultante dessa interação.

REFERÊNCIAS

- Alves, M.S., Reis, P.A.B., Dadalto, S.P., Faria, J.A.Q.A., Fontes, E.P.B., Fietto, L.G. 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, 2011.
- Carvalho, H.H., Brustolini, O.J.B., Pimenta, M.R., Mendes, G.C., Gouveia B.C., Silva, P.A., SILVA, J.C.F., Mota, C.S., Soares-Ramos, J.R.L., Fontes, E.P.B. The molecular chaperone binding protein BiP prevents leaf dehydration-induced cellular homeostasis disruption. **PLoS ONE**, 9:86661, 2014a.
- Carvalho, H.H., SILVA, P.A., Mendes, G.C., Brustolini, O.J.B., Pimenta, M.R., Gouveia, B.C. et al. The endoplasmic reticulum binding protein BiP displays dual function in modulating cell death events. **Plant Physiol**, 164:654-670, 2014b.
- Costa, M.D.L., Reis, P.A.B., Valente, M.A.S., Irsigler, A.S.T., Carvalho, C.M., LOUREIRO, M.E., et al. 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, 2008.
- Faria, J.A., Reis, P.A., Reis, M.T., Rosado, G.L., Pinheiro, G.L., Mendes, G.C. et al. 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, 2011.
- Guan, C., Jin, C., Ji, J., Wang, G., Li, X. LcBiP, a endoplasmic reticulum chaperone binding protein gene from *Lycium chinense*, confers cadmium tolerance in transgenic tobacco. **Biotechnology progress**, 31(2):358-368, 2015.

Ludwig, A.A., Tenhaken, R. A new cell wall located N-rich protein is strongly induced during the hypersensitive response in *Glycine max* L. **Eur J Plant Pathol** 107:323-36, 2001.

Madeira, N.N. **Toxicidade de cádmio em plantas transgênicas de soja e de tabaco expressando os genes BIP e aldeído desidrogenase**. 2014. 52f. Dissertação (Mestrado Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Viçosa - Viçosa, MG, 2014.

Melo, B.P., Fraga, O.T., Silva, J.C.F., Ferreira, D.O., Brustolini, O.J.B., Carpinetti, P.A., Machado, J.P.B., Reis, P.A.B., Fontes, E.P.B. Revisiting the Soybean GmNAC Superfamily. **Front Plant Sci.** 9:1864, 2018.

Mendes, G.C., Reis, P.A.B., Calil, I.P., Carvalho, H.H., Aragão, F.J.L., Fontes, E.P.B. GmNAC30 and GmNAC81 integrate the endoplasmic reticulum stress and osmotic stress-induced cell death responses through a vacuolar processing enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 110:19627–19632, 2013.

Nakashima, K., Takasaki, H., Mizoi, J., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. **Biochim. Biophys. Acta.**, 1819:97–103, 2011.

Pimenta, M.R., Silva, P.A., Mendes, G.C., Alves, J.R., Caetano, H.D.N., MACHADO, J.P.B., et al. The stress-induced soybean NAC transcription factor GmNAC81 plays a positive role in developmentally programmed leaf senescence. **Plant Cell Physiol**, 57:1098–1114, 2016.

Reis, P.A.B., Carpinetti, P.A., Freitas, P.P.J., Santos, E.G.D., Camargos, L.F., Oliveira, I.H.T., Silva, J.C.F., Carvalho, H.O.H., Dal-Bianco, M., Soares-Ramos, J.R.L., Fontes, E.P.B. Functional and regulatory conservation of the soybean ER stress-induced DCD/NRP-mediated cell death signaling in plants. **BMC Plant Biology**, 16:156, 2016.

Reis, P.A.B., Fontes, E.P.B. N-rich protein (NRP)-mediated cell death signaling: A new branch of the ER stress response with implications for plant biotechnology. **PLANT SIGNALING & BEHAVIOR**, 7:628-632, 2012.

Reis, P.A.B., Rosado, G.L., Silva, L.A.C., Oliveira, L.C., Oliveira, L.B., Costa, M.D.B.L., Alvim, C., Fontes, E.P.B. The Binding Protein BiP Attenuates Stress-Induced Cell Death in Soybean via Modulation of the N-Rich. **Plant Physiol.**, 157:1853–1865, 2011.

Saddique, M., Kamran, M., Shahbaz, M. Differential Responses of Plants to Biotic Stress and the Role of Metabolites. In: Ahmad, P., Ahanger, M.A., Singh, V.P., Tripathi, D.K., Alam, P., Alyemeni, M.N. (Eds) **Plant Metabolites and Regulation Under Environmental Stress**. 69-87, 2018.

Valente, M.A.S., Faria, J.A.Q.A., Ramos, J.R.L.S., Reis, P.A.B., Pinheiro, G.L., Piovesan, N.D. et al. 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, 2009.

CAPÍTULO I

Cadmium-mediated toxicity in plant cells is associated with the DCD/NRP-mediated cell death response

Artigo submetido para publicação no dia 02 de abril de 2021 na revista *Plant, Cell & Environment*, ISSN: 1365-3040

Iana Pedro da Silva Quadros, Nayara Nolasco Madeira, Virgílio Adriano Pereira Loriato, Thaina Fernanda Fillietaz Saia, Jéssica Coutinho Silva, Fernanda Aparecida Ferrari Soares, José Romário Carvalho, Pedro Augusto Braga dos Reis, Elizabeth Pacheco Batista Fontes, Wellington Ronildo Clarindo, Renildes Lucio Ferreira Fontes

Manuscript ID: PCE-21-0344

Cadmium-mediated toxicity in plant cells is associated with the DCD/NRP-mediated cell death response

Iana Pedro da Silva Quadros^{1*}, Nayara Nolasco Madeira^{2*}, Virgílio Adriano Pereira Loriato^{1,3}, Thaina Fernanda Fillietaz Saia¹, Jéssica Coutinho Silva⁴, Fernanda Aparecida Ferrari Soares⁴, José Romário Carvalho⁵, Pedro Augusto Braga dos Reis^{1,3}, Elizabeth Pacheco Batista Fontes^{1,3}, Wellington Ronildo Clarindo⁴, Renildes Lucio Ferreira Fontes²

¹National Institute of Science and Technology in Plant-Pest Interactions, Bioagro, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil, ²Soil Science Department, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil. ³Biochemistry and Molecular Biology Department/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil, ⁴Cytogenetics and Cytometry Laboratory, Department of General Biology, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil, ⁵Secretary of Education of the State of Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, ES, Brazil.

Corresponding author:

Renildes L.F. Fontes, Soil Science Department, Universidade Federal de Viçosa, 36570.000, Viçosa, Brazil E-mail: renildes@ufv.br

* IPSQ and NNM contributed equally to this work

Running Head: Cd²⁺-induced PCD via the NRP/NAC/VPE signaling module

Funding information: This work was financially supported by FAPEMIG grants no CBB - APQ-01491-14 (to EPBF) and no APQ-02632-18 (to RLFF)

ABSTRACT

Cadmium (Cd^{2+}) is highly harmful to plant growth. Although Cd^{2+} has been shown to induce programmed cell death (PCD) in plant cells, Cd^{2+} stress in whole plants during later developmental stages and the mechanism underlying Cd^{2+} -mediated toxicity are poorly understood. Here, we showed that Cd^{2+} limits plant growth, causes intense redness in leaf vein, leaf yellowing, and chlorosis during the R1 reproductive stage of soybean (*Glycine max*). These symptoms were associated with Cd^{2+} -induced PCD, as Cd^{2+} -stressed soybean leaves displayed decreased number of nuclei, enhanced cell death, DNA damage, and caspase 1 activity compared to unstressed leaves. Accordingly, Cd^{2+} induced NRPs, *GmNAC81*, *GmNAC30*, and VPE, the DCD/NRP-mediated cell death signaling components, which executes PCD via caspase 1-like VPE activity. Furthermore, overexpression of the positive regulator of this cell death signaling *GmNAC81* enhanced sensitivity to Cd^{2+} stress and intensified the hallmarks of Cd^{2+} -mediated PCD. *GmNAC81* overexpression enhanced Cd^{2+} -induced H_2O_2 production, cell death, DNA damage, and caspase-1-like VPE expression. Conversely, BiP overexpression, a negative regulator of the NRPs/GmNACs/VPE signaling module, conferred tolerance to Cd^{2+} stress and reduced Cd^{2+} -mediated cell death. Collectively, our data indicate that Cd^{2+} induces PCD in plants via activation of the NRP/GmNAC/VPE regulatory circuit that links developmentally and stress-induced cell death.

Key-words: Cadmium, Cell death, NRP-mediated cell death, soybean, NAC, Binding protein, BiP, Vacuolar processing enzyme, VPE

INTRODUCTION

Environmental contamination with heavy metals is increasing in the world. There is a significant concern about soil and water contamination with cadmium (Cd^{2+}) since it is highly toxic to animals and humans (Kirkham, 2006). Food consumption and smoking are major pathways for chronic Cd^{2+} exposure in humans (Clemens et al., 2013). Besides cereals and leguminous grains as significant contributors, vegetables and processed foods may introduce Cd^{2+} into the food chain (Yu et al., 2006; Liu et al., 2007; Li and Zhou, 2019). In addition, Cd^{2+} is naturally accumulated in the tobacco plant (*Nicotiana tabacum*), leading to a high concentration of this metal in cigarettes (Satarug et al., 2004). Volcanic emissions and weathered Cd^{2+} -containing rocks are natural sources of Cd^{2+} introduction into soils, whereas Zn mining activities, combustion of energy sources, and agricultural fertilization practices are anthropogenic sources (Sheppard et al., 2009; Kabata-Pendias, 2010). Since Cd^{2+} occurs naturally and persistently in soils and minerals, plant uptake and the consequent risk of Cd^{2+} accumulation in the food chain and tobacco cigarettes are public health concerns (Roberts, 2014; Pan et al., 2016; Khan et al., 2017).

In addition to being deleterious to human health, Cd^{2+} is highly harmful to plant growth; it can be absorbed by roots even at low concentrations in the soil and transported to shoots. Accumulation of Cd^{2+} in plant tissue negatively affects seed germination (Zhang et al., 2014), reduces photosynthetic activity and respiration, causes damages to the photosynthetic machinery (Araújo et al., 2017), impacts N and S metabolism (Wang et al., 2017; Yamaguchi et al., 2016), impairs root development and causes yield loss (Bruno et al., 2017). At the cellular level, the exposure to Cd^{2+} increases reactive oxygen species (ROS) accumulation and DNA damage rates, resulting in programmed cell death (PCD) and necrosis (Romero-Puertas et al., 2004; Li et al., 2017; Zhou et al., 2017; Pormehr et al., 2019; Zhang et al., 2019a). Due to its relevance in mediating Cd^{2+} toxicity in plant tissues, there is an increasing interest in unraveling the mechanisms underlying Cd^{2+} -induced cell death and the protective measures to remediate its effects in environment.

Recently, Abscisic acid (ABA) has been demonstrated to interfere with Cd^{2+} uptake by roots and the subsequent upward-translocation of Cd^{2+} to shoots (Zhang et al., 2019a). This ABA-mediated restriction in root influx and Cd^{2+} accumulation alleviates Cd^{2+} -

induced cell death. Salicylic acid (SA) has also been shown to inhibit cell death and prevent damage of the photosynthetic apparatus in Cd²⁺-stressed plants (Zhang and Chen, 2011). The SA-mediated protection against Cd²⁺ is related to the inhibition of ROS overproduction. The modulation of signal transduction pathways can also protect plants against Cd²⁺-induced cell death (Pormehr et al., 2019; Zhang et al., 2019b). For instance, the overexpression of a *Malus hupehensis* mitogen-activated protein kinase (MAPK) gene, *MhMAPK4*, in tobacco attenuates Cd²⁺-induced cell death by directly inhibiting Cd²⁺ uptake and affecting the expression of the vacuolar processing enzyme (VPE). This caspase 1-like enzyme has been shown to trigger vacuolar collapse-mediated cell death in plants (Kinoshita et al., 1999; Hatsugai et al., 2004; Yamada et al., 2004). Likewise, the Cd²⁺-induced transcription factor WRKY13 acts upstream of the *PDR8* gene, which encodes a Cd²⁺ extrusion pump that positively regulates Cd²⁺ tolerance in plants (Sheng et al., 2019). The WRKY13-mediated activation of *PDR8* leads to a reduction in Cd²⁺ accumulation and thereby confers Cd²⁺ tolerance. Overexpression of the endoplasmic reticulum (ER)-resident molecular chaperone binding protein (BiP) has also been shown to alleviate Cd²⁺-mediated PCD in tobacco cells, but the underlying mechanism mediating BiP protection is poorly understood (Xu et al., 2013; Guan et al., 2015).

BiP is a multifunctional protein involved in several ER-supported processes. In addition to exhibiting molecular chaperone activity, plant BiP has been shown to participate directly in the ER quality control of protein processing as a component of the ER-associated protein degradation (ERAD) machinery and a regulator of ER stress-derived signaling pathways (Gupta and Tuteja, 2011; Srivastava et al. 2013). These BiP activities intrinsically contribute to its cytoprotective properties, associated with ER stress attenuation (Leborgne-Castel et al., 1999; Cascardo et al. 2000) and developmental and stress-induced cell death (Reis et al., 2011; Carvalho et al., 2014a; Yang et al., 2016). Plant BiP has also shown to function in drought tolerance (Alvim et al., 2001; Valente et al., 2009; Carvalho et al., 2014b), plant immunity (Wang et al., 2005; Eichmann and Schäfer, 2012; Carvalho et al., 2014a), and plant sporophyte development (Bao et al., 2019).

As a regulator of ER stress-induced signaling pathways, plant BiP has been shown to act primarily controlling the unfolded protein response (UPR) and the stress-induced developmental cell death (DCD) domain-containing N-rich protein (NRP)-mediated cell death response (Costa et al., 2008; Reis et al., 2011; Reis and Fontes, 2012; Srivastava et al. 2013). UPR is a cytoprotective signaling pathway that allows the communication of the ER with the

nucleus and cytoplasm (Fanata et al., 2013). UPR is activated by any condition that causes accumulation of misfolded proteins in the ER lumen or overload of the secretory protein processing capacity; situations referred to as ER stress. Plant UPR is transduced as a bipartite module represented by the ER transducer bZIP membrane-anchored transcription factor (TF) bZIP28/bZIP17 and the second signaling module Inositol-representing enzyme 1 (IRE1a/IRE1b)/bZIP60 in Arabidopsis (Fanata et al., 2013; Liu and Howell, 2016; Howell, 2017). Upon activation by ER stress, these UPR signaling branches act in concert to induce ER-resident chaperones, including BiP and the ERAD machinery-related genes, increasing the ER protein processing capacity to promote recovery from ER stress (Silva et al., 2015). However, under prolonged ER stress, the failure in restoring the ER homeostasis triggers cell death signaling pathways as the ultimate attempt to survive (Sun et al., 2013; Yang et al., 2016; Bao et al., 2018; Srivastava et al. 2018). The DCD/NRP-mediated cell death signaling represents one example of ER stress-induced plant-specific cell death signaling shared with other stress signals (Faria et al., 2011; Mendes et al., 2013).

In addition to ER stress, the DCD/NRP-mediated cell death response is induced by multiple abiotic and biotic signals, including drought, osmotic stress, activation of non-host resistance, and salicylic acid treatment (Irsigler et al., 2007; Costa et al., 2008; Carvalho et al., 2014a; Pimenta et al., 2016; Camargos et al., 2019). DCD/NRP represents the first identified component of this cell death pathway (Irsigler et al., 2007). Progress in elucidating this stress-induced cell death pathway includes identifying an upstream component, the transcriptional factor (TF) GmERD15, and the downstream components GmNAC81, GmNAC30, and VPE. Stress-mediated activation of the DCD/NRP signaling components promotes a cell death response resembling a PCD event (Faria et al., 2011; Reis et al., 2011). Furthermore, the activation of DCD/NRP-mediated cell death signaling is also induced by developmentally programmed leaf senescence (Pimenta et al., 2016). Therefore, the DCD/NRP-mediated cell death signaling pathway functions as a regulatory circuit integrating developmental and stress-induced PCD. The current model for this integrative pathway holds that the stress-induced TF ERD15 activates the expression of *DCD/NRPs*, which initiates a signaling cascade resulting in the induction of the TFs GmNAC30 and GmNAC81 (Alves et al., 2011; Mendes et al., 2013). These NAC TFs form a complex and synergistically upregulate the promoter and expression of *VPE*, an executioner of a plant-specific cell death program that leads to the vacuole collapse (Hara-Nishimura et al., 2005; Mendes et al., 2013). BiP negatively modulates the activity and

expression of the cell death pathway components resulting in delayed leaf senescence (Carvalho et al., 2014a), tolerance to drought (Valente et al., 2009), and protection against osmotic stress and ER stress-induced cell death (Reis et al., 2011). BiP also protects the plant against Cd²⁺-mediated toxicity and ameliorates Cd²⁺-induced cell death (Xu et al., 2013; Guan et al., 2015). This latter observation raised the hypothesis that BiP would protect plant cells against Cd²⁺-induced cell death via the modulation of the DCD/NRP-mediated cell death signaling pathway. This study directly investigated whether Cd²⁺ induces cell death via the DCD/NRP-mediated cell death signaling. For this, we analyzed Cd²⁺ toxicity in soybean plants, in which the DCD/NRP-mediated cell death signaling pathway has been modulated by ectopically expressing either a positive regulator (GmNAC81) or a negative regulator (BiP) of the pathway. Furthermore, soybean is a relevant crop for the Brazilian agribusiness, and little is known about Cd²⁺ toxicity in soybean at the whole plant level. Our results shed light on the mechanism underlying Cd²⁺-mediated toxicity in plant cells.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material

Wild type seeds (*Glycine max* cv. Conquista and *Glycine max* cv. BR16) were used as non-transformed control lines. The independently transformed transgenic lines BiP-2 and BiP-4 have been previously described (Valente et al., 2009). They express the soybean *soyBiPD* cDNA under the control of a duplicated cauliflower mosaic virus 35S promoter and the polyadenylation signal of the nopaline synthase (*nos*) gene in the Conquista genetic background (Valente et al., 2009). The *GmNAC81*-overexpressing BR16 lines, NAC81.1 and NAC81.3, which express *GmNAC81* under the control of 35S promoter and the polyadenylation signal of the *nos* gene, have been previously described (Pimenta et al., 2016). They are homozygous lines in the sixth (6th) generation.

Genomic DNA extraction and diagnostic of transgenic lines by PCR

The genomic DNA was extracted from 50 mg of 15 days-old transformed and non-transformed leaves grinded up in 750 µL of extraction buffer containing 2.0% cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), 1.4 M NaCl, 100.0 mM Tris-HCl, pH 8.0,

20.0 mM EDTA and 0.2% (v.v⁻¹) β -mercaptoethanol (Doyle & Doyle, 1987). Transgenic lines were confirmed by PCR. The reactions were performed using 50.0 ng of genomic DNA and 0.5 μ M each primer 35AMV-F and NAC6-R for the *GmNAC81* transgene (Table S1). Specific primers (SoyBiPD-F and SoyBiPD-R; Table S1) were used to confirm BiP transformants. The reactions were performed in a PCR 9700 system (Life Technologies) from 12.0 μ L final volume, using 1U of Taq DNA Polymerase (Promega) following the parameters: 94 °C during 3 min and evolved to 35 cycles of 3 steps (45 s at 94 °C, 45 s at 53 °C and 60 s at 72 °C), then a final extension step at 72 °C during 10 min. The PCR products were separated on 1.0% (m v⁻¹) agarose gel with 0.1 μ g mL⁻¹ ethidium bromide and analyzed under UV lights.

Gene copy number of *GmNAC81*

The DNA sequence of the *GmNAC81* gene was amplified from BR16 genomic DNA using the 35AMV-F and NAC6-R primers (Table S1). The amplification reaction was performed with 50 ng genomic DNA, 200 μ M dNTPs, 0.5 μ M of each primer, 2.5 U AccuTaq LA DNA Polymerase High fidelity enzyme (Sigma-Aldrich), and 1X AccuTaq LA reaction buffer, and with initial denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 45 s, 53 °C for 45 s, 68 °C for 1 min and a final extension at 68 °C for 7 min. The integrity and concentration of the amplification product were evaluated on 1.5% agarose gel and NanoDropTM Spectrophotometer. *GmNAC81* probes (~ 700 bp) were generated by a second round of the PCR reaction under the same conditions, adjusting the dTTP concentration to 100 μ M and adding 40 μ M of the nucleotide Tetramethyl-rhodamine 5-dUTP (Roche®) for probe labeling (Soares et al., 2020). *GmNAC81* copy number was determined from the fluorescent signals obtained by in situ hybridizations (nuclei-FISH) performed on the slides containing isolated and preserved nuclei of the BR16, NAC81.1, and NAC81.3 lines. The slides were pretreated with 1X PBS buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4) for 5 min, 4% formalin for 10 min, 1X PBS for 5 min, and cold ethanol series of 70%, 85% and 100% for 5 min each, and the nuclear chromatin was denatured in 70% formamide/2X SSC buffer (3 M NaCl, 0.3 M Na₃C₆H₅O₇ · 2H₂O, pH 7.0) for 3 min at 67 °C and dehydrated in 70%, 85% and 100% cold ethanol series (Schwarzacher & Heslop-Harrison, 2000; Soares et al., 2020). Hybridization mix consisted of 50% formamide, 2X SSC, and 200 ng of the probe, followed by its denaturation in a thermocycler for 5 min at 85 °C. The mix was applied to the slides, which were covered with a coverslip, sealed with rubber cement, kept at

37 °C for 20 h in a ThermoBrite™ system (ThermoFisher®), washed in 2X SSC at 42 °C for 10 min and counterstained with 40% glycerol/PBS + 5 mM 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). At least 20 frames were captured using a photomicroscope Olympus™ BX60 equipped with an immersion objective 100x/A.N. 1.4, a 12-bits CCD digital video camera (Olympus™ DP71), WG (GmNAC81 probe – red fluorescence), and WU (DAPI staining) filters, and a computer with a digitizer plate. Captured images using the exposure time of 1/1.8 s were processed by Image ProPlus 6.1 (Media Cybernetics®) and edited with the same brightness and contrast in Adobe Photoshop CC.

Cd²⁺ stress induction at the reproductive developmental stage

To induce Cd²⁺ stress, the experiments were conducted in a static hydroponic system. Fifteen days after soybean seed germination in organic soil (Bio plant), plants were transferred to plastic pots (two per pot) containing 4 L of Clark's nutrient solution (Clark, 1975) at ¼ of original ionic strength. Then, plants were acclimated for four weeks in a greenhouse under natural light and temperature conditions, gradually increasing the solution ionic strength until reaching the original Clark's solution strength. After the same acclimatization period of four weeks, BR16 reached the R1 reproductive stage, and Conquista reached the R4 reproductive stage defined according to Fehr and Caviness (1977). Therefore, BR16 and Conquista lines were exposed to Cd²⁺ stress at different reproductive stages as they displayed different juvenile periods and were subjected to the same acclimatization period. Throughout the experiment, the pH was monitored daily and maintained at 5.5-6.0 by adjusting it with NaOH or HCl solutions (1M), and the solutions continuously aerated to maintain good oxygenation of the root system. After reaching R1 (BR16 genetic background) or R4 (Conquista genetic background) reproductive stage, the plants were grown for 168 h in Clark's solution at the original formulation containing 0.0, 0.5, 1.5, and 3 mg L⁻¹ of Cd²⁺ (CdCl₂.2H₂O) in a preliminary study. For the remaining experiments, Cd²⁺ stress was induced with 3 mg L⁻¹ dose of Cd²⁺ and symptoms were evaluated 120 h post-treatment for plants at the R1 developmental stage [BR16 control, and genetically modified (GM) NAC81-1 and NAC81-3 lines] and 120 h or 168 h post-treatment for plants at the R4 developmental stage (Conquista control and GM BiP-2 and BiP-4 lines).

Cd²⁺ stress induction at the vegetative developmental stage

For the early vegetative stage experiment, soybean seeds from both BR16 and Conquista genetic backgrounds were germinated in organic soil (Bio plant) and grown in a growth chamber with a 10-h photoperiod at 22 °C until reaching the V2/V3 vegetative stage, when they were transferred to a hydroponic system. The roots were washed with water, and plants transferred to 250 mL of Clark's solution at ¼ of the ionic strength for a 24 h acclimatization period, keeping the pH at 5.5-6.0. After the acclimatization period, the plants at the V2/V3 developmental stage were grown for 120 h in Clark's solution containing 0.0, 6.0, 9.0, and 12.0 mg L⁻¹ of Cd²⁺ (CdCl₂.2H₂O) to define the Cd²⁺ concentration for stress. For the remaining experiments, Cd²⁺ stress was induced with 9 mg L⁻¹ dose of Cd²⁺ and symptoms were evaluated 48 h or 72 h post-treatment. Three plants of each genotype (BR16, NAC81.1, NAC81.3 or Conquista, BiP-2, and BiP-4) were kept in each container.

Cd²⁺ quantification

Roots and shoots from BR16, NAC81.1, and NAC81.3 plants at the R1 reproductive stage were collected 120 h after exposure to the Cd²⁺ solution. V2/V3 roots and shoots were harvested 48 h or 72 h after Cd²⁺ treatment. Roots and shoots from Conquista, BiP-2, and BiP-4 lines at the R4 reproductive stage were collected 168 h after exposure to the Cd²⁺ treatment and from plants at stage V2/V3 48 h or 72 h after Cd²⁺ treatment. The roots were washed with water for 1 min, followed by 0.1 M HCl solution for 1 min, then washed in demineralized water for 1 min and dried on paper towels. For Cd²⁺ quantification, the samples were dried in a forced ventilation oven at 65 °C until reaching constant weight. The dry weight was measured, and the tissue was ground in a Willey mill type (20 mesh sieve). Portions of 1.0 g of grounded dry matter of R1 and R4 roots and shoots and 0.5 g grounded dry matter of V2/V3 roots and shoots were digested with 10 mL of 3.5:1.0 (v v⁻¹) nitric: perchloric acid solution (Malavolta, Vitti & Oliveira, 1997). The analysis of Cd²⁺ in the extracts was performed by atomic absorption spectrophotometry (Varian SpectrAA 200) (Jordão et al. 2006). Only analytical grade reagents were used, and all glassware was carefully cleaned.

Real-time RT-PCR analyses

For quantitative RT-PCR, total RNA was extracted from leaves using TRIzol[®], according to the manufacturer's instructions. The quality and integrity of the RNA were monitored by electrophoresis on 1.2% (m v⁻¹) denatured agarose gels stained with 0.1 µg mL⁻¹ ethidium bromide. The cDNA was synthesized from 2.0 µg of total RNA treated with RNase-free DNase I, using oligo(dT) primers and M-MLV Reverse Transcriptase, according to the manufacturer's instructions.

The quantitative RT-PCR assays were performed on an ABI 7500 instrument, using SYBR Green and gene-specific primers for the DCD/NRP pathway components (*GmNRP-A*, *GmNRP-B*, *GmNAC81*, *GmNAC30*, and *GmVPE*, see Table S1). The conditions for the amplification reactions were: 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles at 94 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. The gene expression was quantified by the comparative delta Ct ($2^{-\Delta Ct}$) method and the soybean genes normalized to the endogenous control gene *Unknown2* (Gao et al., 2017; Melo et al., 2018). Under Cd²⁺ stress, *UKN2* has been shown to be one of the most stable reference genes in leaves (Gao et al., 2017). In addition to *UKN2*, we also analyzed two additional genes encoding RNA helicase and 18S rRNA. The RNA helicase was not used to normalize all values in the real-time RT-PCR assays because it exhibited the highest variation in expression values under Cd²⁺ stress. *18srDNA* served as an additional endogenous control gene for data normalization in real-time RT-PCR analysis and confirmed the *UKN2* results.

VPE Caspase1-like activity (YVADase)

The total protein was extracted from control (-Cd⁺) and Cd²⁺-treated soybean leaves. VPE Caspase1-like activity was determined with 200.0 µg of protein using the Caspase-1 Colorimetric Assay Kit, according to the manufacturer's instructions (Abnova[®]). The substrate used was YVAD-Pnitroaniline provided by the kit, and the inhibitor of caspase-1 activity was the synthetic tetrapeptide Ac-YVAD-CHO.

Detection of hydrogen peroxide by DAB (Diaminobenzidine)

The hydrogen peroxide (H₂O₂) was evaluated using the 3,3-diaminobenzidine reagent (DAB, Sigma[®]) (Weigel & Glazebrook, 2002). Unifoliolate leaves were collected at stage V2/V3, 72, 96, and 120 h after exposure to Cd²⁺ solution and immediately submerged in 10.0 mM potassium phosphate solution, pH 3.8, containing 1.0 mg mL⁻¹ DAB. The leaves were kept for 12 h under constant light. The leaves were then completely bleached by boiling in absolute ethanol and photographed by a Sony digital camera (DSLR-A550).

Cell death detection by propidium iodide and Evans blue leaf staining

Cell death was monitored in leaves at V2/V3 vegetative stage by Evans blue and propidium iodide (PI) staining. Leaf fragments of 1 cm² from 72 h/Cd²⁺-treated V2/V3 *G. max* plants were excised next to the petiole. For Evans blue staining, the leaf fragments were immediately transferred to microtubes with 2 mL 0.25% v.v⁻¹ Evans blue solution, kept under agitation for 5 h at 25°C, washed in dH₂O, and boiled in 95% ethanol for 30 min for clarification (Turner and Novacky, 1974 adapted by Backer and Mock, 1994; Romero-Puertas et al., 2004). Each fragment was placed under a clean slide and covered by a coverslip. For propidium iodide staining of dead leaf cells, each collected leaf fragment was placed under a clean slide, dropped 200 µL 75 µM propidium iodide (Praça-Fontes et al., 2011; Costa et al., 2018), covered by coverslip, and kept in the dark for 1 h.

More than ten frames were randomly captured for each slide using the 20x objective of an OlympusTM BX60 microscope equipped with a 12-bit CCD video camera OlympusTM DP71, coupled to a computer equipped with a digitizing plate. Evans blue and propidium iodide frames were captured using, respectively, 1/4,000 s and 3.0 s exposure time. The images were processed by Image ProPlus 6.1 (Media Cybernetics[®]) and edited with the same brightness and contrast in Adobe Photoshop CC. The cell death was confirmed by the leaf portions exhibiting blue color and propidium iodide fluorescence in nuclei, associated with the loss of the plasma membrane permeability to the dyes.

Measurement of the number of nuclei by flow cytometry

Two 1-cm² leaf fragments, next to the petiole, were excised from untreated and Cd²⁺-treated plants after 48 and 72 h of Cd²⁺ exposition. This leaf portion was selected based on the previous data of DAB staining. The leaf fragments were chopped in 500 µL nuclear extraction buffer OTTO-I (0.1 M citric acid, 2.0 mM dithiothreitol, 0.5% v v⁻¹ Tween 20[®], pH 2.3). After 3 min, 500 µL of the same buffer were added, the suspensions were filtered through 30.0 µm nylon membrane (Partec GmbH[®]) into a 2.0 mL microtube centrifuged at 100 x g for 5 min. The supernatant was discarded, 100 µL OTTO I buffer were added to the pellet, vortexed, and incubated for 10 min. The nucleus suspensions were stained with 500 µL OTTO-II buffer (0.4 M Na₂HPO₄·2H₂O, 2.0 mM dithiothreitol, 50 g mL⁻¹ RNase, 75 µM propidium iodide, pH 7.8) in the dark for 30 min (Praça-Fontes et al., 2011). The suspensions were filtered using 20 µm nylon membrane (Partec GmbH[®]) into a cytometry tube and analyzed on a BD Accuri C6 flow cytometer (Accuri cytometers, Belgium) equipped with a 488 nm laser (50 mW), forward scatter (FSC), side scatter (SSC) and four fluorescence detectors. FL2 (585/40) and FL3 (670 LP) filters were used to detect the fluorescence emitted by the nuclei stained with propidium iodide. Based on DNA ploidy level, we measured the number of nuclei in G0/G1 (DNA ploidy level 2C), S and G2/M (DNA ploidy level 4C), as well as the total nuclei number of the suspensions obtained from each untreated and Cd²⁺-treated (48 and 72 h) *G. max* plant. The nuclei suspensions were analyzed in BD Csamplere software (Flow Cytometry within reach), and the nuclei number was measured considering the data provided by monoparametric (propidium iodide fluorescence x nuclei count) and biparametric histograms (propidium iodide fluorescence x nuclei granularity and/or nuclear density – SSC x nuclei count) (Fioresi, Vieira, Campos, Sousa, 2020). We verified the Cd²⁺ cytotoxic effect from the number of nuclei as, in general, the leaf tissue is composed by mononucleated cells.

DNA damage evaluation by Comet Assay

Comet Assay monitored DNA damage performed from two 1-cm² leaf fragments excised next to the petiole of four untreated and Cd²⁺-treated BR16, NAC81.1, and NAC81.3 plants after 72 h. All Comet Assay procedures were carried out under low light intensity and approximately 4 °C to avoid further DNA damage. Clean slides were covered in 1.0% normal melting point agarose (Invitrogen™) at 50 °C and horizontally incubated at 30 °C

for at least 12 h (Zhang et al., 2011). Under an ice-cold surface, the leaf fragments were sliced with a razor blade in 300 μL isolation buffer (400 mM Tris-HCl, pH 7.5, and 20% polyethyleneglycol) to produce a fringe across the leaf area and incubated in the same buffer for 5 min. Then, 40 μL of the resulting nuclei suspension was mixed to 60 μL of 1.0% low melting point agarose solution (Sigma[®]) in 1X PBS. The mix was smoothly homogenized at 39 °C and immediately applied to each slide covered by a coverslip (24 x 50 mm) and incubated at 4 °C for 15 min. After removing the coverslips, the slides were placed in horizontal electrophoresis and incubated for 5 min in a modified alkaline buffer (250 mM Tris, 10.0 mM NaOH and 1.0 mM EDTA, pH 12.0), followed by electrophoresis at 0.8 V cm^{-1} (18 V) for 15 min. The slides were washed 3 times during 5 min in neutralization buffer (400 mM Tris, pH 7.5), and stained with 100 μL of 50 μM acridine orange for 15 min, and then dipped in cold dH_2O to remove the dye excess (Ojima et al., 2009; Costa et al., 2018). The slides were observed in an Olympus[™] photomicroscope BX60, bright field, and fluorescence lighting. The images were captured using 20x objective, WB filter (acridine orange fluorescence), and 12-bits CCD video camera (Olympus[™] DP71) coupled to the photomicroscope Olympus[™] BX60 and a computer equipped with a digitizing plate. Using the exposure time of 1/1.8 s, captured frames were processed by Image ProPlus 6.1 (Media Cybernetics[®]) and edited with the same brightness and contrast in Adobe Photoshop CC. The Cd^{2+} genotoxic effect was evaluated based on the statistical comparison of the percentual of nucleoids exhibiting DNA damage (nucleoids exhibiting DNA damage / total number of nucleoids) being 200 nucleoids per slide and 800 nucleoids per treatment (untreated and Cd^{2+} -treated BR16, NAC81-1 and NAC81-3).

Statistical analyses

The data of dry weight, cadmium content, gene expression, and enzyme activity were analyzed according to a completely randomized design. The untreated control and cadmium treatments were compared by the one-tailed *t-test* ($p \leq 0.05$).

The data of dry weight, cadmium content, and RNA accumulation, when compared among genotypes, were analyzed according to a completely randomized design in a factorial scheme using a generalized linear model with Gaussian error structure (link = identity). The means were compared by Tukey's test ($p \leq 0.05$).

The analysis of the number of cell nuclei followed a completely randomized design in a factorial scheme, with analysis by a generalized linear model with a negative binomial error structure (GLM-NB). The means were compared by Tukey's test ($p \leq 0.05$).

For the comet assay, the percentage data were analyzed by a generalized linear model with binomial error structure (link = logit) (GLM-B), and the means were compared by Tukey's test ($p \leq 0.05$). All statistical analyzes were performed using the software R (<https://www.R-project.org/>; R Development Core Equipe, 2019).

RESULTS

Cd²⁺ induces the expression and activity of the DCD/NRP-mediated cell death pathway components

Cadmium toxicity has been extensively examined in plant cells and seedlings, but studies of Cd²⁺ stress in later developmental stages are less frequent. Preliminary studies established that 3 mg/L of Cd²⁺ for 168 h leads to stunted growth of plants at R4 (Conquista genetic background) reproductive stage (Figure S1a, S1b), whereas 9 mg/L Cd²⁺ for 72 h, 96 h, and 120 h effectively caused typical Cd²⁺ stress symptoms in V2/V3 (Conquista and BR16) plants (Figure S1c and S1d). Therefore, for further experiments, we used 3 mg/L of Cd²⁺ to induce Cd²⁺ stress in soybean plants at the reproductive stage (R1, BR16, and R4, Conquista genetic background) and the plants at the V2/V3 developmental stage (BR16, Conquista and their respective transgenic lines) were routinely treated with 9 mg/L Cd²⁺.

We first examined Cd²⁺ stress in hydroponically grown soybean plants, cultivar BR16, at R1 or V2/V3 developmental stages. R1 BR16 plants subjected to 3 mg/L of Cd²⁺ for 120 h accumulated higher levels of Cd²⁺ in roots and shoots (Figure 1a) and displayed symptoms of Cd²⁺ stress, including leaf curly (Figure 1b), an intense reddish in the leaf veins (Figure 1c) and reduction in shoot and root dry weight (Figure 1d). Likewise, Cd²⁺ uptake by roots and translocation to shoots in V3 BR16 plants (Figure 1e) caused a slight reddish in the leaf veins along with leaf chlorosis (Figure S1d). Using flow cytometry analyses, the number of nuclei was measured from cells of fully expanded leaves. We showed that Cd²⁺ reduced the mean number of nuclei from fully expanded leaves, reflecting a decreased number of cells in treated leaves (Figure 1f). The reduced number of nuclei may be a consequence of Cd²⁺-

induced cell death rather than an alteration in the cell cycle progression because the abundance of Go/G1-, G2/M-phase cells and endocycles did not alter in response to Cd²⁺. In fully expanded leaves, the cell division activity is scarce, and most cells are differentiated and arrested in G1 phase, as shown by the high proportion of Go/G1-phase cells compared to that of G2/M-phase cells. Therefore, the DNA content from cells of span fully expanded leaves may not reveal an effect of Cd²⁺ on the cell cycle progression. To assess directly cell death, we used propidium iodide (PI) leaf-staining. As a fluorescent base-intercalating dye that is impermeable to the plasma membrane, PI stains the nucleus of dead cells. PI-stained nuclei were substantially enhanced in Cd²⁺-treated soybean leaves, confirming that Cd²⁺ induces cell death in fully expanded soybean leaves (Figure 1f). Likewise, ROS production was intensified with the persistence of Cd²⁺ treatment (Figure 1g), as hallmarks of Cd²⁺-mediated PCD.

We next examined whether Cd²⁺ upregulates the expression and activity of NRPs/GmNACs/VPE cell death signaling module. In R1 leaves, Cd²⁺ promoted a rapid induction of *NRP-B*, *GmNAC81*, and *VPE*, whereas *NRP-A* was induced after 4 h Cd²⁺ treatment (Figure 2a-2d). In contrast, the DCD/NRP-mediated cell death pathway components were only upregulated after 24 h Cd²⁺ treatment in V2/V3 leaves, in which a higher dosage of Cd²⁺ (9 mgL⁻¹) was necessary to promote typical symptoms of Cd²⁺ stress (Figure 2e-2h, Figure S2). In both R1 and V2/V3 BR16 leaves, the Cd²⁺-mediated induction of *VPE* expression was markedly associated with an increase in caspase 1-like activity, which was reversed to basal levels by the inclusion of a caspase 1 inhibitor (Figure 2j). At 48 h of Cd²⁺ treatment, the inhibitor did not cause complete inhibition of caspase 1-like activity (Figure 2i). This partial inhibition may reflect either a molar excess of the enzyme or some cross-reactivity between caspases that may be part of the Cd²⁺ toxicity-mediated proteolytic cascade in soybean (McStay et al., 2008). In tomato cells, Cd²⁺ toxicity is mediated by a proteolytic cascade employing caspase-like enzymes, serine, and cysteine peptidases (Iakimova et al., 2008). Caspase 1-like VPE is an executioner of vacuolar collapse-mediated PCD in pathogenesis and development (Kinoshita et al., 1999; Hatsuai et al., 2004; Yamada et al., 2004). Therefore, the Cd²⁺ induction of the DCD/NRP-mediated cell death cascade culminating in activation of caspase 1-like VPE may underlie a mechanism for executing a Cd²⁺-mediated cell death program.

A positive regulator of the DCD/NRP-mediated cell death signaling, *GmNAC081*, enhances Cd²⁺-mediated cell death in plants

GmNCA81/GmNAC30 and VPE constitute a regulatory cascade for developmental and stress-induced cell death in soybean (Mendes et al., 2013; Pimenta et al., 2016), and we showed here that this signaling module was upregulated by Cd²⁺. To further examine whether Cd²⁺ induces cell death via activation of the DCD/NRP-mediated cell death signaling, we used two previously described *GmNAC81*-overexpressing lines (NAC81-1 and NAC81-3 lines; Pimenta et al., 2016) and compared the intensity of Cd²⁺ stress and cell death with the untransformed, BR16 line. Initially, we further characterized these transgenic lines determining the transgene copy number by nuclei-FISH using a *GmNAC81* probe. Two hybridization spots were detected on the BR16 genome, revealing the *GmNAC81* gene and its highly conserved paralog, *GmNAC77* (Figure S3a). One additional hybridization site on interphase nuclei of each transgenic line demonstrated a single *GmNAC81* insertion in each overexpressing line. We also confirmed that *GmNAC81* transcript levels remained higher in the R6 generation of the NAC81-1 and NAC81-3 lines than in the BR16 control line (Figure S3b). Cd²⁺ induction of endogenous *GmNAC81* caused an additional increase in the *GmNAC81* transcript levels in the overexpressing lines compared to the untreated control. Cd²⁺ uptake by roots and translocation to shoots in the transgenic lines NAC81-1 and NAC81-3 were as efficient as in BR16 (Figure S4a and S4b). Although WT and *GmNAC81*-overexpressing lines displayed similar Cd²⁺-induced reduction of the shoot and root dry weight (Figure S4c and S4d), the typical symptoms of Cd²⁺ stress, including leaf curly and reddish veins in soybean R1 leaves, were more severe in NAC81-1 and NAC81-3 transgenic lines than in control lines (Figure 3a, Figure S5). Likewise, 48 h after Cd²⁺ treatment, the NAC81-1 and NAC81-3 transgenic lines, but not BR16, displayed intense reddish and chlorosis in V2/V3 leaf veins (Figure 3b), although the Cd²⁺ content in roots was similar among the genotypes and in shoots was higher in *GmNAC81*-overexpressing lines than in BR16 (Figure S4e and S4f). These differences in the severity of Cd²⁺-induced symptoms between transformed and untransformed lines were associated with enhanced Cd²⁺-mediated cell death in *GmNAC81*-overexpressing lines (Figure 3c-3h).

In overexpressing lines, Cd²⁺ caused a higher production of H₂O₂ in NAC81-1 and NAC81-3 overexpressing lines than in BR16, the control line (Figure 3c). Likewise, Cd²⁺-induced caspase 1-like VPE expression was more remarkable in NAC81-1 and NAC81-3 than in BR16 (Figure 3d). Furthermore, after 48 h of Cd²⁺ treatment, the mean number of nuclei was

significantly lower in the NAC81-3 line and, after 72 h of Cd²⁺ treatment, was lower in both NAC81-1 and NAC81-3 transgenic lines as compared to BR16 (Figure 3e and 3f). In the NAC81-3 transgenic line, which displays enhanced NAC81 (Figure S3b) and VPE (Figure 3d) expression under unstressed conditions, the number of nuclei was reduced even in Cd²⁺-untreated leaves, which may be associated with the cytotoxic effect of the VPE expression. The extent of Cd²⁺-mediated cell death in NAC81-1 and NAC81-3 was monitored by Evans blue leaf-staining and DNA fragmentation assay (Figure 3g and 3h). NAC81 overexpression enhanced Cd²⁺-induced cell death, as demonstrated by the intense blue staining displayed by leaf mesophyll cells of NAC81-1 and NAC81-3 lines compared to mesophyll cells of untransformed, control BR16 (Figure 3g). These cell death phenotypes were associated with the level of Cd²⁺-induced DNA damage. We used the comet assay (single nucleotide gel electrophoresis) to examine DNA damage in BR16, NAC81-1, and NAC81-3 lines. As shown in Figure S6, DNA strand breaks were detected through acridine orange fluorescence in the nucleoids. The mean rate (%) of nucleoids with DNA damage was higher in Cd²⁺-treated plants (BR16, Nac81-1, and NAC81-3) than the untreated counterparts and markedly higher in Cd²⁺-treated *GmNAC81*-overexpressing lines than BR16, treated control (Figure 3h). These data demonstrated the genotoxic effect of the Cd²⁺ and *GmNAC81* overexpression. Collectively, these results indicate that overexpression of *GmNAC81*, a positive regulator of the DCD/NRP-mediated cell death signaling, enhances Cd²⁺-mediated PCD in soybean.

The BiP cytoprotective property against Cd²⁺ toxicity may be linked to its negative function in the DCD/NRP-mediated cell death signaling

As overexpression of the positive regulator of DCD/NRP-mediated cell death signaling enhances Cd²⁺-mediated toxicity in soybean, we rationalized that a negative regulator of the pathway would attenuate Cd²⁺-induced cell death. BiP is the most well-characterized inhibitor of the stress-induced DCD/NRP-mediated cell death signaling and has been shown before to ameliorate Cd²⁺-mediated cell death in tobacco cells and seedlings (Reis et al., 2011; Xu et al., 2013; Guan et al., 2015). We took advantage of previously described *BiPD*-overexpressing soybean lines (BiP-2 and BiP-4; Valente et al., 2009), which accumulate higher BiP protein levels (Figure 4a), to examine the effect of *BiP* overexpression on Cd²⁺ toxicity in whole soybean plants at later developmental stages. Untransformed Conquista line and genetically modified Conquista BiP-2 and BiP-4 lines at the R4 reproductive stage were exposed to 3 mg/L

Cd^{2+} for 168 h. (Figure 4). Although BiPD-overexpressing lines accumulated lower Cd^{2+} content in roots, they displayed higher content in shoots compared to the untransformed line (Figure 4b and 4c). The typical symptoms of Cd^{2+} stress were attenuated by BiP overexpression (Figure 4d, 4e, and 4g). The Cd^{2+} -mediated reduction in the shoot dry weight and root dry weight was significantly lower in the BiPD-overexpressing lines BiP-2 and BiP-4 than in the untransformed line Conquista (Figure 4d and 4e). Likewise, the Cd^{2+} -induced reddish in leaf veins was attenuated in R4 BiP-2 and BiP-4 leaves (Figure 4f). BiP overexpression also led symptoms of Cd^{2+} stress (9 mgL^{-1} / 72 h) in V2/V3 leaves. Cd^{2+} -induced vein reddish and leaf yellowing were more severe in untransformed lines than in BiP-2 and BiP-4 lines (Figure 4h). Likewise, Cd^{2+} -induced production of ROS was lower in BiPD-overexpressing lines than in Conquista, untransformed line (Figure 4i), which was associated with decreased cell death, as determined by the remarkably lower Cd^{2+} -mediated PI-stained nuclei in BiPD-overexpressing V2/V3 leaves compared to control, untransformed leaves (Figure 4g). We then examined whether BiP overexpression modulates the Cd^{2+} -induced expression of the *NRP-B/GmNAC30/VPE* regulatory module. As expected, Cd^{2+} induces the expression of *NRP-B*, *GmNAC30*, and *VPE* in the control, Conquista line (Figure 5a, 5b, and 5c). Nevertheless, BiP overexpression negatively impacts the Cd^{2+} -mediated induction of *NRP-B* and significantly reduces *GmNAC30* and *VPE* induction by Cd^{2+} stress in BiP-2 and BiP-4 lines as compared to the control line Conquista. Collectively, these results further substantiate the interpretation that the Cd^{2+} genotoxic and cytotoxic effects are associated with the induction of the DCD/NRP-mediated cell death signaling.

Cd^{2+} has been shown to induce ER stress in tobacco and activate the unfolded protein response (UPR) in yeast, which is modulated by BiP (Xu et al., 2013; Le et al., 2016). BiP has also been shown to modulate ER stress in Arabidopsis via association with the plant UPR transducer bZIP28 (Srivastava et al., 2013). As the DCD/NRP-mediated cell death signaling has been identified and uncovered in soybean under ER stress (Camargos et al., 2019), we next examined whether Cd^{2+} , an inducer of the cell death signaling as showed here, also induces ER stress in soybean leaves. We confirmed here that Cd^{2+} promotes ER stress in V2/V3 soybean leaves, as the UPR-associated marker genes, *BiP*, *CNX* (calnexin), *PDI* (protein disulfide isomerase), and *bZIP28*, were significantly upregulated in Cd^{2+} -stressed leaves (Figure 5d and Figure S7). We also showed that BiP overexpression in BiP-2 and BiP-4 lines significantly decreased the Cd^{2+} -mediated induction of the UPR-associated marker genes (Figure 5d and Figure S7). Collectively, our results indicate that Cd^{2+} induces UPR, activates the ER stress-

induced DCD/NRP-mediated cell death signaling, and BiP inhibits both Cd²⁺ stress-induced responses. Thereby, it seems reasonable to suggest that Cd²⁺ activates the *NRP/GmNAC/VPE* signaling module via ER stress induction.

DISCUSSION

Cd²⁺ toxicity is extremely harmful to plants. The growth-related phenotypes caused by Cd²⁺ stress include damages in the photosynthetic apparatus, unbalance in S and N metabolism, impairment of root development, and yield loss. At the cellular level, Cd²⁺ toxicity is linked to the induction of PCD and ROS production. Mechanisms that interfere with Cd²⁺ uptake and accumulation have been shown to reduce Cd²⁺ toxicity (Sheng et al., 2019; Zhang et al., 2019a; 2019b), but the mechanisms underlying Cd²⁺-induced PCD remains to be elucidated. Here, we provided several lines of evidence demonstrating that Cd²⁺ induces cell death via activation of the DCD/NRP-mediated cell death signaling in early and late developmental stages. First, we showed that Cd²⁺ induces the expression of the DCD/NRP-mediated cell death pathway components *NRP-A*, *NRP-B*, *GmNAC30*, *GmNAC81*, and *VPE*. The induction of the cell death components was associated with reduced mean number of nuclei and increased ROS production, DNA damage, and caspase 1-like *VPE* activity. Second, overexpression of *GmNAC81*, a positive regulator of the NRP cell death signaling, aggravated the hallmarks of Cd²⁺-mediated PCD. In *GmNAC81*-overexpressing leaves, the Cd²⁺-induced ROS production, caspase 1-like *VPE* expression, DNA damage, and cell death (as shown by the reduction of the mean number of nuclei) were higher than in Cd²⁺-stressed control BR16 leaves. Finally, we showed that BiP, a negative regulator of the DCD/NRP-mediated cell death signaling, alleviates the Cd²⁺-mediated PCD by negatively regulating the Cd²⁺-induced expression and activity of the cell death pathway components. These results support our interpretation that the DCD/NRP-mediated cell death signaling is involved in regulating Cd²⁺-mediated cell death in plant cells.

As an ER-resident molecular chaperone that controls activation of UPR transducers, BiP has been shown to protect eukaryotic cells against ER stress-induced cell death. In mammalian cells, BiP acts as an apoptotic regulator by inhibiting ER stress-induced apoptotic cascades (Liu et al., 1997; Kish et al., 2010). This prosurvival function of mammalian BiP has been associated with direct and repressive interactions with caspases 7 and 12, and with BIK, a BH3-only pro-

apoptotic member of the BCL-2 family (Rao et al., 2002; Fu et al., 2007). In plants, BiP has also been shown to alleviate osmotic and ER stress-induced PCD (Reis et al., 2011; 2016) and Cd²⁺-induced PCD (Xu et al., 2013). BiP has also been shown to ameliorate Cd²⁺-mediated PCD via modulation of cell death signaling pathways radiated from the ER stress. Accordingly, Cd²⁺ impairs protein folding in the ER, induces ER stress-associated marker genes, and ER chemical chaperones alleviate Cd²⁺-induced PCD (Xu et al., 2013; Le et al., 2016). However, the mechanism by which BiP modulates ER stress-induced Cd²⁺-mediated PCD is still a matter of debate. We demonstrated that Cd²⁺ activates the ER stress-induced DCD/NRP-mediated cell death signaling. Furthermore, BiP inhibits the expression of these cell death-associated components and hence prevents the activation of caspase 1-like VPE, the executioner of the cell death program. Therefore, the underlying mechanism of BiP-mediated resistance to Cd²⁺ toxicity may be at least partially associated with its capacity to modulate the stress-induced DCD/NRP-mediated cell death signaling.

The finding that Cd²⁺ activates the DCD/NRP-mediated cell death signaling raises the question about how this heavy metal would alter the expression of the cell death pathway components. Cd²⁺ has been shown to alter gene expression of drought stress-responsive genes directly and upregulate ROS-scavenging enzymes, chelators, and metal transporters (Oono et al., 2014; 2016). These upregulated changes in gene expression may reflect the mechanisms of Cd²⁺ uptake / translocation and tolerance. Consistent with our results, the Cd²⁺-induced transcriptome analysis in *Arabidopsis* identified *ATAF2*, a *GmNAC30* ortholog, in the upregulated changes, and, in rice, several stress-induced *NAC* genes were also upregulated by Cd²⁺ stress (Oono et al., 2014).

The Cd²⁺-induced PCD via activation of the DCD/NRP-mediated cell death signaling may be a general phenomenon in plants because this soybean cell death pathway has been shown to operate with similar regulatory mechanisms in other plant species, including *Arabidopsis* (Reis et al., 2016) and tobacco (Alvim et al., 2001). The cell death pathway is induced by multiple biotic and abiotic signals, including ER stress and osmotic stress that generate ROS (Reis et al., 2011; Mendes et al., 2013). As Cd²⁺ has been shown to promote ER stress (Figure 5d and Figure S7; Xu et al., 2013; Le et al., 2016) and ROS accumulation as a secondary effect rather than a direct genetic and biochemical interaction of pathway components with Cd²⁺. Our current findings, along with previous results, suggest a mechanistic model for the Cd²⁺-induced PCD in plant cells (Figure 6). An increase in intracellular Cd²⁺ concentration causes ER stress and ROS accumulation, which in turn promote the induction of

DCD/NRPs synergistically, leading to upregulation of *GmNAC81* and *GmNAC30*. These NAC TFs interact with each other to fully induce the promoter activity and expression of *VPE*, which is associated with an increase in caspase 1-like VPE activity that executes a plant-specific kind of PCD (Kinoshita et al., 1999; Hatsugai et al., 2004; Yamada et al., 2004). As a negative regulator of the DCD/NRP-mediated cell death signaling, *BiP* is induced by ER stress via the unfolded protein response (UPR) and negatively modulates the Cd²⁺-induced expression and activity of the cell death components (*NRP*, *GmNAC81*, *GmNAC30*, *VPE*), attenuating Cd²⁺-induced cell death in plant cells. It remains, however, to determine the mechanisms underlying Cd²⁺-induced ER stress.

Heavy metal contamination is considered a significant environmental problem to agriculture and a significant threat to human health. A deeper understanding of the mechanisms that protect plants against heavy metal stress is expected to enable researchers to breed for or engineer superior crops. While the strategy to enhance the accumulation of BiP, a negative regulator of Cd²⁺-induced PCD in plants, enables soybean to cope with Cd²⁺ stress, we show here that BiP does not prevent the intracellular accumulation of Cd²⁺ in plants. Therefore, the positive contribution of these agriculturally superior crops to food security would compromise food safety and hence must not be introduced in the food chain. In contrast, the BiP-mediated enhanced tolerance to Cd²⁺ stress may be considered a practical molecular tool in phytoremediation. In this case, *BiP*-overexpressing plants would be helpful to recover polluted soils and waters.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the Brazilian funding agencies CAPES finance code 001, CNPq, FAPEMIG, and the National Institute of Science and Technology in Plant-Pest interactions for supporting this study. IPSQ was supported by a Ph.D. fellowship from CNPq.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCE

- Alves, M.S., Reis, P.A.B., Dadalto, S.P., Faria, JAQA, Fontes, E.P.B. & Fietto, L.G. (2011) A novel transcription factor, early responsive to dehydration 15, connects ER stress with an osmotic stress-induced cell death signal. *Journal of Biological Chemistry*, **286**, 20020–20030.
- Alvim, F.C., Carolino, S.M., Cascardo, J.C., Nunes, C.C., Martinez, C.A., Otoni, W.C. & Fontes, E.P.B. (2001) Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. *Plant Physiology*, **126**, 1042-1054.
- Araújo, R.P., Furtado, A.A., Silva, L.P., Mangabeira, P.A.O., Souza, J.O., Pirovani, C.P., Ahnert, D. & Baligar, V.C. (2017) Photosynthetic, antioxidative, molecular and ultrastructural responses of young cacao plants to Cd toxicity in the soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **144**, 148–157.
- Baker, J. C. & Mock, N.M. (1974) An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using evans blue. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **39**, 7-12.
- Bao, Y., Bassham, D.C. & Howell, S.H. (2019) A functional unfolded protein response is required for normal vegetative development. *Plant Physiology*, **179**, 1834-1843.
- Bao, Y., Pu, Y., Yu, X., Gregory, B.D., Srivastava, R., Howell, S.H. & Bassham, D.C. (2018) IRE1B degrades RNAs encoding proteins that interfere with the induction of autophagy by ER stress in *Arabidopsis thaliana*. *Autophagy*, **14**, 1562-1573.
- Bruno, L., Pacenza, M., Forgione, I., Lamerton, L.R., Greco, M., Chiappetta, A. & Bitonti, M.B. (2017) *Arabidopsis thaliana* cadmium impact on the growth of primary root by altering SCR expression and auxin-cytokinin cross-talk. *Frontiers in Plant Science*, **8**, 1323.
- Camargos, L.F., Fraga, O.T., Oliveira, C.C., Silva, J.C.F., Fontes, E.P.B. & Reis, P.A.B. (2019) Development and cell death domain-containing asparagine rich protein (DCD/NRP): an essential protein in plant development and stress responses. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, **31**, 59–70.
- Carvalho, H.H., Brustolini, O.J.B., Pimenta, M.R., Mendes, G.C., Gouveia, B.C., Silva, P.A., Silva, J.C.F., Mota, C.S., Soares-Ramos, J.R.L. & Fontes, E.P.B. (2014b) The molecular chaperone binding protein BiP prevents leaf dehydration-induced cellular homeostasis disruption. *PLoS ONE*, **9**, e86661.
- 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. (2014a) The endoplasmic reticulum binding protein BiP displays dual function in modulating cell death events. *Plant Physiology*, **164**, 654–670.
- Cascardo, J.C.M., Almeida, R.S., Buzeli, R.A.A., Carolino, S.M.B., Otoni, W.C. & Fontes, E.P.B. (2000) The phosphorylation state and expression of soybean BiP isoforms are differentially regulated following abiotic stresses. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 14494-14500.

- Clark, R.B. (1975) Characterization of phosphatase of intact maize roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **23**, 458-460.
- Clemens, S., Aarts, M.G.M., Thomine, S. & Verbruggen, N. (2013) Plant science: The key to preventing slow cadmium poisoning. *Trends in Plant Science*, **18**, 92–99.
- Costa, M.D., Reis, P.A., Valente, M.A., Irsigler, A.S., Carvalho, C.M., Loureiro, M.E., Aragão, F.J., 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. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 20209–20219.
- Costa, N.L.B., Carvalho, C.R. & Clarindo, W.R. (2018) Improved procedures to assess plant protoplast viability: evidencing cytological and genomic damage. *Cytologia*, **83**, 397-405.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, **19**, 11-15.
- Eichmann, R. & Schäfer, P. (2012) The endoplasmic reticulum in plant immunity and cell death. *Frontiers in Plant Science*, **3**, 200.
- Fanata, W.I.D., Lee, S.Y. & Lee, K.O. (2013) The unfolded protein response in plants: a fundamental adaptive cellular response to internal and external stresses. *Journal of Proteomics*, **93**, 356–368.
- 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 Biology*, **11**, 129.
- Fehr, W.R. & Caviness, C.E. (1977) Stages of soybean development. Special Report 87. <https://lib.dr.iastate.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1076&context=specialreports>
- Fioresi, V.S., Vieira, B.C.R., Campos, J.M.S. & Sousa, T.S. (2020) Cytogenotoxic activity of the pesticides imidacloprid and iprodione on *Allium cepa* root meristem. *Environmental Science and Pollution Research*, **27**, 28066–28076.
- Fu, Y., Li, J. & Lee, A.S. (2007) GRP78/BiP inhibits endoplasmic reticulum BIK and protects human breast cancer cells against estrogen starvation–induced apoptosis. *Cancer Research*, **67**, 3734-3740.
- Gao, M., Liu, Y., Ma, X., Shuai, Q., Gai, J. & Li, Y. (2017) Evaluation of reference genes for normalization of gene expression using quantitative RT-PCR under aluminum, cadmium, and heat stresses in soybean. *PLoS ONE*, **12**, e0168965.
- Guan, C., Jin, C., Ji, J., Wang, G. & Li, X. (2015) LcBiP, a endoplasmic reticulum chaperone binding protein gene from *Lycium chinense*, confers cadmium tolerance in transgenic tobacco. *Biotechnology Progress*, **31**, 358-68.
- Gupta, D. & Tuteja, N. (2011) Chaperones and foldases in endoplasmic reticulum stress signaling in plants. *Plant Signaling and Behavior*, **6**, 232–236.

Hara-Nishimura, I., Hatsugai, N., Nakaune, S., Kuroyanagi, M. & Nishimura, M. (2005) Vacuolar processing enzyme: an executor of plant cell death. *Current Opinion in Plant Biology*, **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.

Howell, S.H. (2017) When is the unfolded protein response not the unfolded protein response? *Plant Science* **260**, 139–143.

Iakimova, E.T., Woltering, E.J., Kapchina-Toteva, V.M., Harren, F.J. & Cristescu, S.M. (2008) Cadmium toxicity in cultured tomato cells--role of ethylene, proteases and oxidative stress in cell death signaling. *Cell Biology International*, **32**, 1521–1529.

Irsigler, A.S.T., Costa, M.D.L., Zhang, P., Braga, P.A., Dewey, R.E., Boston, R.S. & Fontes, E.P.B. (2007) Expression profiling on soybean leaves reveals integration of ER- and osmotic stress pathways. *BMC Genomics*, **8**, 431.

Kabata-Pendias, A. (2010) Trace Elements in Soils and Plants. 4th edition. Boca Raton, FL, USA: CRC Press/Taylor & Francis Group (2010), pp. 548.

Khan, M.A., Khan, S., Khan, A. & Alam, M. (2017) Soil contamination with cadmium, consequences and remediation using organic amendments. *Science of the Total Environment*, **601**, 1591–1605.

Kinoshita, T., Yamada, K., Hiraiwa, N., Kondo, M., Nishimura, M. & Hara-Nishimura, I. (1999) Vacuolar processing enzyme is upregulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stressed conditions. *Plant Journal*, **19**, 43–53.

Kirkham, M.B. (2006) Cadmium in plants on polluted soils: Effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments. *Geoderma*, **137**, 19–32.

Kishi, S., Shimoke, K., Nakatani, Y., Shimada, T., Okumura, N., Nagai, K., Shinya, K. & Ikeuchi, T. (2010) Nerve growth factor attenuates 2-deoxy-D-glucose-triggered endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis via enhanced expression of GRP78. *Neuroscience Research*, **66**, 14–21.

Le, Q.G., Ishiwata-Kimata, Y., Kohno, K., Kimata, Y.F. (2016) Cadmium impairs protein folding in the endoplasmic reticulum and induces the unfolded protein response.

EMS Yeast Res, **16**, 5, fow049.

Leborgne-Castel, N., Jelitto-Van Dooren, EPWM, Crofts, A.J. & Denecke, J. (1999) Overexpression of BiP in tobacco alleviates endoplasmic reticulum stress. *Plant Cell*, **11**, 459–469.

Li, R., Lub, X., Zhu, Y., Zhao, L., Li, L., Peng, Q., Ma, M. & Gao, Y. (2017) ATM signals to AMPK to promote autophagy and positively regulate DNA damage in response to cadmium-induced ROS in mouse spermatocytes. *Environmental Pollution*, **231**, 1560–1568.

- Li, X.F. & Zhou, D.M. (2019) A meta-analysis on phenotypic variation in cadmium accumulation of rice and wheat: Implications for food cadmium risk control. *Pedosphere*, **29**, 545–553.
- Liu, H., Bowes, R.C., Water, B.V., Sillence, C., Nagelkerke, J.F. & Stevens, J.L. (1997) Endoplasmic reticulum chaperones GRP78 and calreticulin prevent oxidative stress, Ca^{2+} disturbances, and cell death in renal epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 21751–21759.
- Liu, J., Qian, M., Cai, G., Yang, J. & Zhu, Q. (2007) Uptake and translocation of Cd in different rice cultivars and the relation with Cd accumulation in rice grain. *Journal of Hazardous Materials*, **143**, 443e447.
- Liu, J.-X. & Howell, S.H. (2016) Managing the protein folding demands in the endoplasmic reticulum of plants. *New Phytologist*, **211**, 418–428.
- Malavolta, E., Vitti, G.C. & Oliveira, S.A. (1997) Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2ª edição. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potássio e do Fósforo (1997), pp. 319.
- McStay, G.P., Salvesen, G.S. & Green, D.R. (2008) Overlapping cleavage motif selectivity of caspases: implications for analysis of apoptotic pathways. *Cell Death and Differentiation*, **15**, 322–331.
- Melo, B.P., Fraga, O.T., Silva, J.C.F., Ferreira, D.O., Brustolini, O.J.B., Carpinetti, P.A., Machado, J.P.B., Reis, P.A.B. & Fontes, E.P.B. (2018) Revisiting the soybean GmNAC superfamily. *Frontiers in Plant Science*, **9**, 1864.
- Mendes, G.C., Reis, P.A.B., Calil, I.P., Carvalho, H.H., Aragão, J.F. & Fontes, E.P.B. (2013) GmNAC30 and GmNAC81 integrate the ER-stress and osmotic stress-induced cell death responses through vacuolar processing enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 19627–19632.
- Ojima, Y., Nishioka, M., Matsumoto, M. & Taya, M. (2009) Quantification of DNA damage by the comet assay in radish sprouts exposed to excess light irradiation. *Biochemical Engineering Journal*, **46**, 69–72.
- Oono, Y., Yazawa, T., Kawahara, Y., Kanamori, H., Kobayashi, F., Sasaki, H., Mori, S., Wu, J., Handa, H., Itoh, T., Matsumoto, T. (2014) Genome-wide transcriptome analysis reveals that cadmium stress signaling controls the expression of genes in drought stress signal pathways in rice. *Plos One*, **9**, 5, e96946.
- Oono Y, Yazawa T, Kanamori H, Sasaki H, Mori S, Handa H, Matsumoto T. (2016) Genome-wide transcriptome analysis of cadmium stress in rice. *BioMed Research International*, e9739505.
- Pan, L.B., Ma, J., Wang, X.L. & Hou, H. (2016) Heavy metals in soils from a typical county in Shanxi Province, China: levels, sources and spatial distribution. *Chemosphere*, **148**, 248–254.
- Pimenta, M.R., Silva, P.A., Mendes, G.C., Alves, J.R., Caetano, H.D.N., Machado, J.P.B., Brustolini, O.J.B., Carpinetti, P.A., Melo, B.P., Silva, J.C.F., Rosado, G.L., Ferreira, M.F.F., Costa, M.D.B.L., Picoli, E.A.T., Aragao, F.J.L., Ramos, H.J.O. & Fontes, E.P.B. (2016) The

stress-induced soybean NAC transcription factor GmNAC81 plays a positive role in developmentally programmed leaf senescence. *Plant Cell Physiology*, **57**, 1098–1114.

Pormehr, M., Ghanati, F., Sharifi, M., McCabe, P.F., Hosseinkhani, S. & Zare-Maivan, H. (2019) The role of SIPK signaling pathway in antioxidant activity and programmed cell death of tobacco cells after exposure to cadmium. *Plant Science*, **280**, 416–423.

Praça-Fontes, M.M., Carvalho, C.R., Clarindo, W.R. & Criz, C.D. (2011) Revisiting the DNA C-values of the genome size-standards used in plant flow cytometry to chose the “best primary standards”. *Plant Cell Reports*, **30**, 1183–1191.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, version 3.5. 2019. Available at: <https://www.R-project.org>.

Reis, P.A.B. & 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 Signaling & Behavior*, **7**, 628–632.

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 Physiology*, **157**, 1853–1865.

Rao, R.V., Peel, A., Logvinova, A., del Rio, G., Hermel, E., Yokota, T., Goldsmith, P.C., Ellerby, L.M., Ellerby, H.M. & Bredesen, D.E. (2002) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78. *Federation of European Biochemical Societies Letter*, **514**, 122–128.

Roberts, T. (2014) Cadmium and Phosphorous Fertilizers: The Issues and the Science. *Procedia Engineering*, **83**, 52 – 59.

Romero-Puertas, M.C., Rodriguez-Serrano, M., Corpas, F.J., Gomez, M., Del Rio, L.A. & Sandalio, L.M. (2004) Cadmium-induced subcellular accumulation of O₂ and H₂O₂ in pea leaves. *Plant, Cell and Environment*, **27**, 1122–1134.

Satarug, S. & Moore, M.R. (2004) Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. *Environmental Health Perspectives*, **112**, 1099–1103

Schwarzacher, T. & Heslop-Harrison, P. (2000). Practical in situ hybridization. Oxford: BIOS Scientific Publishers Ltd.

Sheng, Y., Yan, X., Huang, Y., Han, Y., Zhang, C., Ren, Y., Fan, T., Xiao F. & Shuqing Cao, S. (2019) The WRKY transcription factor, WRKY13, activates PDR8 expression to positively regulate cadmium tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell and Environment*, **42**, 891–903.

Sheppard, S.C., Grant, C.A., Sheppard, M.I., de Jong, R. & Long, J. (2009) Risk indicator for agricultural inputs of trace elements to Canadian soils. *Journal of Environmental Quality*,

38, 919–932.

- Silva, P.A., Silva, J.C., Caetano, H.D., Machado, J.P., Mendes, G.C., Reis, P.A., Brustolini, O.J., Dal-Bianco, M. & Fontes, E.P.B. (2015) Comprehensive analysis of the endoplasmic reticulum stress response in the soybean genome: conserved and plant-specific features. *BMC Genomics*, **16**, 783.
- Soares, F.A.F., Carvalho, C.R., Sattler, M.C., Silva, J.C., Pinto, D.E.E., Passamani, P.Z., Silva, A.J. & Clarindo, W.R. (2020) Plant chromosome-specific probes by microdissection of a single chromosome: Is that a reality? *Frontiers in Plant Science*, **11**, 1-9.
- Srivastava, R., Deng, Y., Shah, S., Rao, A.G. & Howell, S.H. (2013) Binding protein is a master regulator of the endoplasmic reticulum stress sensor/transducer bZIP28 in Arabidopsis. *Plant Cell*, **25**, 1416–1429.
- Srivastava, R., Li, Z., Russo, G., Tang, J., Bi, R., Muppirala, U., Chudalayandi, S., Severin, A., He, M., Vaitkevicius, S.I., Lawrence-Dill, C.J., Liu, P., Stapleton, A.E., Bassham, D.C., Brandizzi, F. & Howell, S.H. (2018) Response to persistent ER stress in plants: a multiphasic process that transitions cells from prosurvival activities to cell death. *Plant Cell*, **30**, 1220–1242.
- Sun, L., Yang, Z.T., Song, Z.T., Wang, M.J., Sun, L., Lu, S.J. & Liu, J.-X. (2013) The plant-specific transcription factor gene NAC103 is induced by bZIP60 through a new cis-regulatory element to modulate the unfolded protein response in Arabidopsis. *Plant Journal*, **76**, 274–286.
- Turner, J.G. & Novacky, A. (1974) The quantitative relationship between plant and bacterial cells involved in the hypersensitive reaction. *Phytopathology*, **64**, 885-890.
- Valente, M.A., Faria, J.A., Soares-Ramos, J.R., Reis, P.A., Pinheiro, G.L., Piovesan, N.D., Morais, A.T., Menezes, C.C., Cano, M.A., 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. *Journal of Experimental Botany*, **60**, 533–546.
- Wang, D., Weaver, N.D., Kesarwani, M. & Dong, X. (2005) Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance. *Science*, **308**, 1036-1040.
- Weigel, D. & Glazebrook, J. (2002) Arabidopsis, a Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbour Press.
- Xu, H., Xu, W., Xi, H., Ma, W., He, Z. & Ma, M. (2013) The ER luminal binding protein (BiP) alleviates Cd²⁺-induced programmed cell death through endoplasmic reticulum stress–cell death signaling pathway in tobacco cells. *Journal of Plant Physiology*, **170**, 1434– 1441.
- Yamada, K., Shimada, T., Nishimura, M. & Hara-Nishimura, I. (2004) A VPE family supporting various vacuolar functions in plants. *Physiologia Plantarum*, **123**, 369–375.
- Yang, X., Srivastava, R., Howell, S.H. & Bassham, D.C. (2016) Activation of autophagy by unfolded proteins during endoplasmic reticulum stress. *Plant Journal*, **85**, 83-95.
- Yu, H., Wang, J., Fang, W., Yuan, J. & Yang, Z. (2006) Cadmium accumulation in different rice cultivars and screening for pollution-safe cultivars of rice. *Science of the Total Environment*, **370**, 302-309.

Zhang, L. J., Jia, J. F., Hao, J. G., Cen, J. R. & Li, T. K. (2011) A modified protocol for the comet assay allowing the processing of multiple samples. *Mutation Research*, **721**, 153-156.

Zhang, W., Song, J., Yue, S., Duan, K. & Yang, H. (2019b) MhMAPK4 from *Malus hupehensis* Rehd. decreases cell death in tobacco roots by controlling Cd²⁺ uptake. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **168**, 230–240.

Zhang, W., Wang, Z., Song, J., Yue, S. & Yang, H. (2019a.) Cd²⁺ uptake inhibited by MhNCED3 from *Malus hupehensis* alleviates Cd-induced cell death. *Environmental and Experimental Botany*, **166**, 103802.

Zhang, W., Yang, H., You, S., Xu, Y., Ran, K. & Fan, S. (2014) Cloning, characterization and functional analysis of the role MhNCED3, a gene encoding 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase in *Malus hupehensis* Rehd., plays in plant tolerance to osmotic and Cd²⁺ stresses. *Plant Soil*, **381**, 143–160.

Zhou, J., Wan, H., He, J., Lyu, D. & Li, H. (2017) Integration of cadmium accumulation, subcellular distribution, and physiological responses to understand cadmium tolerance in apple rootstocks. *Frontiers in Plant Science*, **8**, 966.

FIGURES

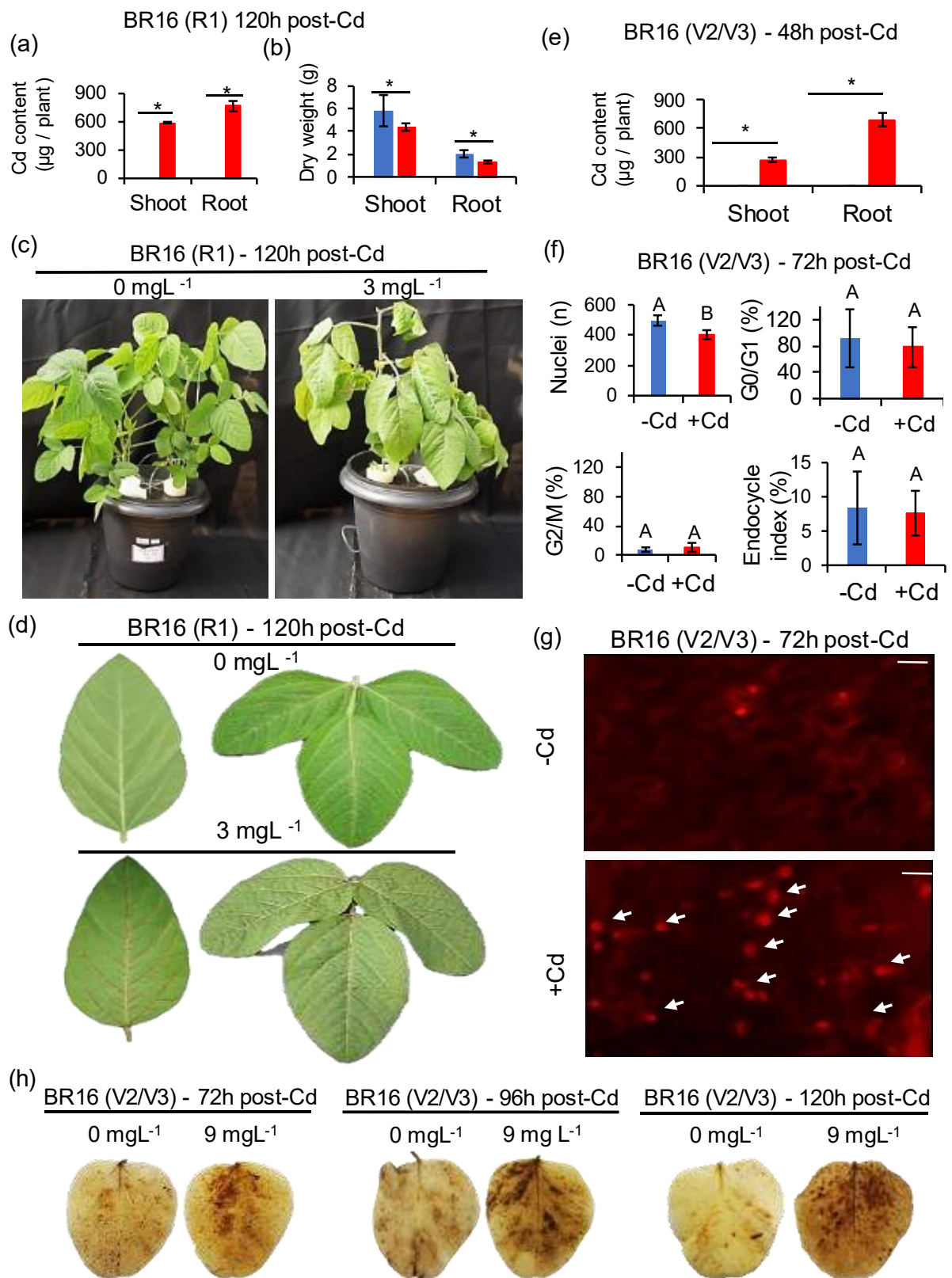


Figure 1. Symptoms of Cd²⁺ stress on BR16 soybean plants.

(a-d) Plants at the R1 reproductive stage, hydroponically grown without (0 mgL^{-1}) or in the presence of (3 mgL^{-1}) Cd^{2+} for 120 hours: (a) Cd^{2+} level in roots and shoots; (b) Shoot and root dry weight; (c) Plant phenotypes; (d) Leaf phenotype. Bars (\pm standard deviation, SD) with an asterisk differ from each other by the t-test ($p < 0.05$), $n = 6$.

(e-h) Plants at the V2/V3 vegetative stage hydroponically grown without (0 mgL^{-1}) or in the presence of (9 mgL^{-1}) Cd^{2+} for different times. (e) Cd^{2+} levels in roots and shoots after 48 h of Cd^{2+} treatment. Bars (\pm SD) with an asterisk differ from each other by the t-test ($p < 0.05$), $n = 3$. (f) Cd^{2+} -mediated reduction of the mean number of nuclei in leaves. DNA content was measured from leaf cells of fully expanded leaves at 72 h post-treatment using flow cytometry analyses to determine the frequency of G0/G1-phase cells, G2/M-phase cells, and the endocycle index. Bars (\pm SD) with different letters are significantly different at $p < 0.05$ (Tukey's test), $n = 3$ (g) Propidium iodide (PI) leaf-staining after 72 h of Cd^{2+} exposition. PI stains the cell wall of living cells, whereas dead cells show nuclei and cytoplasm stain. White arrows indicate regions with extensive cell death and PI-stained nuclei. Scale bars = $20 \mu\text{m}$. (h) Production of H_2O_2 in leaves after 72 h, 96 h, or 120 h of Cd^{2+} treatment and subsequent exposure to DAB for 12 h.

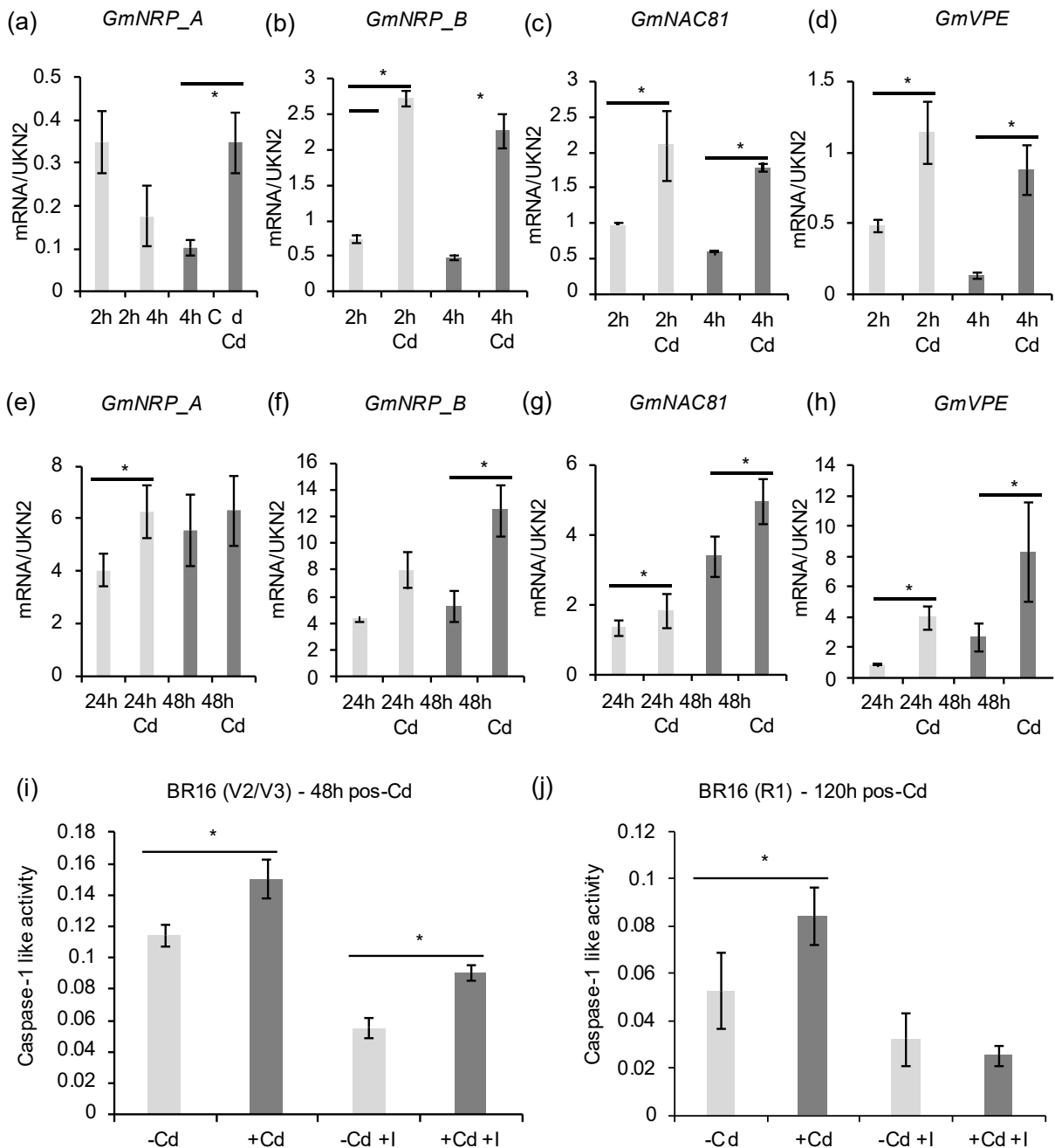


Figure 2. Cd²⁺ induces the expression and activity of the DCD/NRP-mediated cell death pathway components.

(a, b, c, d) Early induction of the DCD/NRP pathway components by Cd²⁺ in BR16 (R1) soybean plants exposed to Cd²⁺ (0 mgL⁻¹ and 3 mgL⁻¹) for 2 h and 4 h. The transcript levels of *GmNRP-A* (a), *GmNRP-B* (b), *GmNAC81* (c), and *VPE* (d) were quantified by RT-qPCR and normalized with *UKN2*. Bars (\pm SD) with an asterisk differ from each other by the t-test ($p < 0.05$), $n = 2$.

(e, f, g, h) Induction of the DCD/NRP pathway components by Cd²⁺ in BR16 (V2/V3) soybean plants subjected to 0 mgL⁻¹ or 9 mgL⁻¹ of Cd²⁺ for 24 h and 48 h. The transcript levels of *GmNRP-A* (e), *GmNRP-B* (f), *GmNAC81* (g), and *VPE* (h) were quantified by RT-qPCR and normalized with *UKN2*. Bars (\pm SD) with an asterisk differ from each other by the t-test ($p < 0.05$), $n = 4$.

(i,j) Cd²⁺ induces VPE activity in (i) BR16 (V2/V3) and (j) BR16 (R1) soybean leaves. Caspase 1-like (YVADase) activity was determined from the total protein of V2/V3

leaves treated with 0 mgL⁻¹ (-Cd) and 9 mgL⁻¹ (+ Cd) of cadmium for 48 h, and R1 leaves treated with 0 mgL⁻¹ (-Cd) and 3 mgL⁻¹ (+ Cd) of cadmium for 120 h, in the presence and absence of inhibitor (I). Bars (\pm SD) with an asterisk differ from each other by the t-test ($p < 0.05$), $n = 3$.

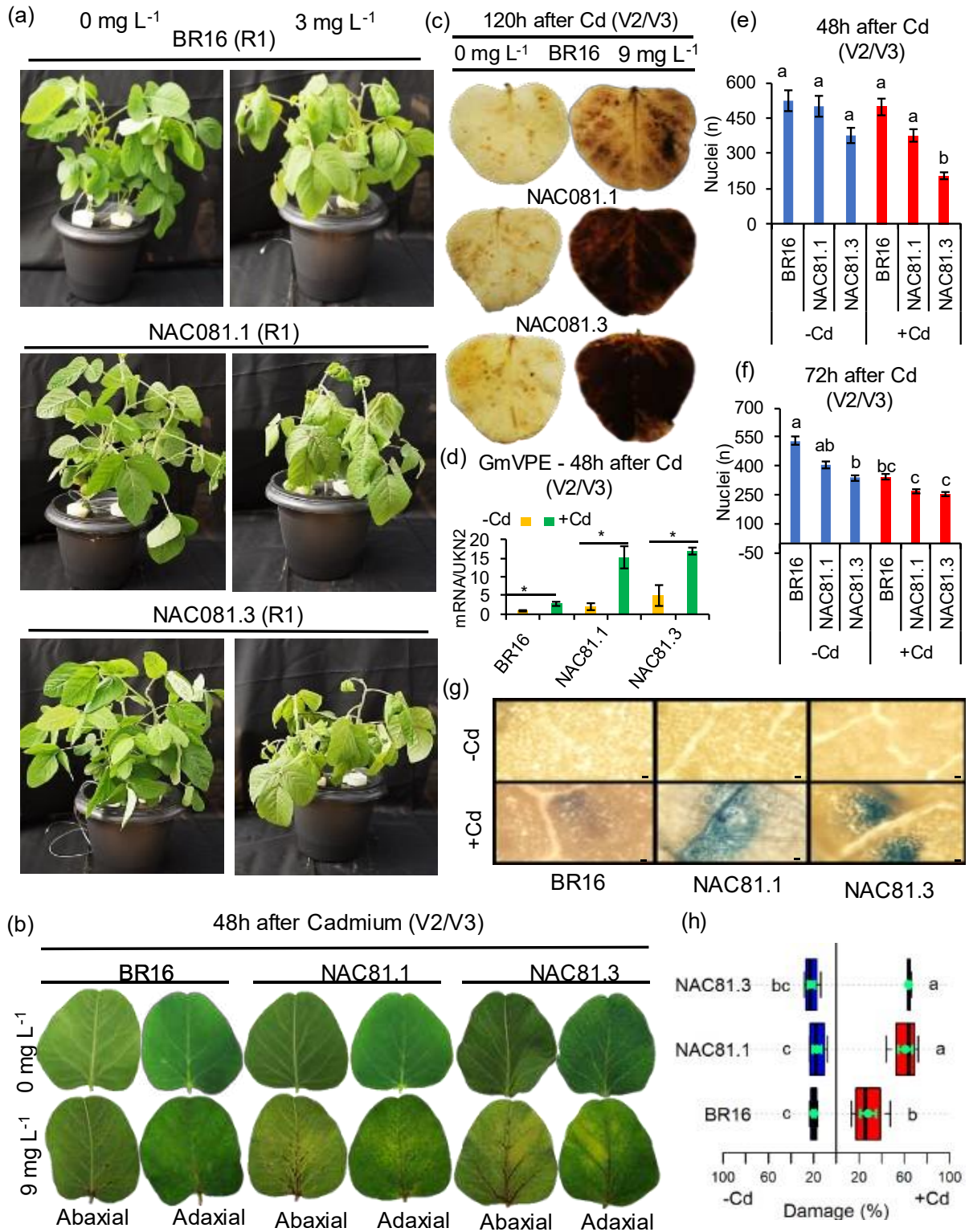


Figure 3. *GmNAC81* overexpression enhances Cd²⁺-mediated cell death.

(a) Cd²⁺-induced phenotype in *GmNAC81*-overexpressing lines (NAC81.1 and NAC81.3). Plants at the R1 reproductive stage were hydroponically grown without (0 mgL⁻¹) or in the presence of (3 mgL⁻¹) Cd²⁺ for 120 h.

(b, c, d, e, f, g, h) BR16 and *GmNAC81*-overexpressing lines (NAC81.1 and NAC81.3) at the V2/V3 vegetative stage were hydroponically grown without (0 mgL⁻¹; -Cd) or with (9 mg L⁻¹; +Cd) of Cd²⁺ for different times (n=3). (b) Cd²⁺-induced severe symptoms in V2/V3 leaves of *GmNAC81*-overexpressing lines after 48 h of Cd²⁺ treatment. (c) H₂O₂ production in V2/V2

leaves of BR16 NAC81-1 and NAC81-3 lines after 120 h of Cd^{2+} treatment and subsequent exposure to DAB for 12 h, $n = 3$. (d) Cd^{2+} -induced *VPE* expression in *GmNAC81*-overexpressing lines. After 48 h of Cd^{2+} treatment, the *GmVPE* transcript level was monitored by RT-qPCR and normalized with *UKN2*. (e, f) Cd^{2+} -mediated reduction in the mean number of nuclei in *GmNAC81*-overexpressing leaves at 48 h (e) and 72 h (f) post-treatment. The mean number of nuclei was measured by flow cytometry of a nuclei preparation from treated and untreated (V2/V3) leaves of BR16, NAC81.1, and NAC81.3 plants. Bars (\pm SD) with different lowercase letters are significantly different at $p < 0.05$ (Tukey's test) $n = 5$. (g) *GmNAC81* overexpression enhances Cd^{2+} -induced cell death in soybean mesophyll cells. Evans blue staining for cell death is shown in mesophylls of BR16, NAC81-1, and NAC81-3 leaves exposed to Cd^{2+} for 72 h. Scale bars = 20 μm . (h) Cd^{2+} induces a higher degree of DNA damage in *GmNAC81*-overexpressing lines. Cd^{2+} -induced DNA damage was assessed 72 h post-treatment by the comet assay and expressed as the mean rate (%) of nucleoid showing DNA damage. Boxplots with different lowercase letters are significantly different by the Tukey's test ($p < 0.05$).

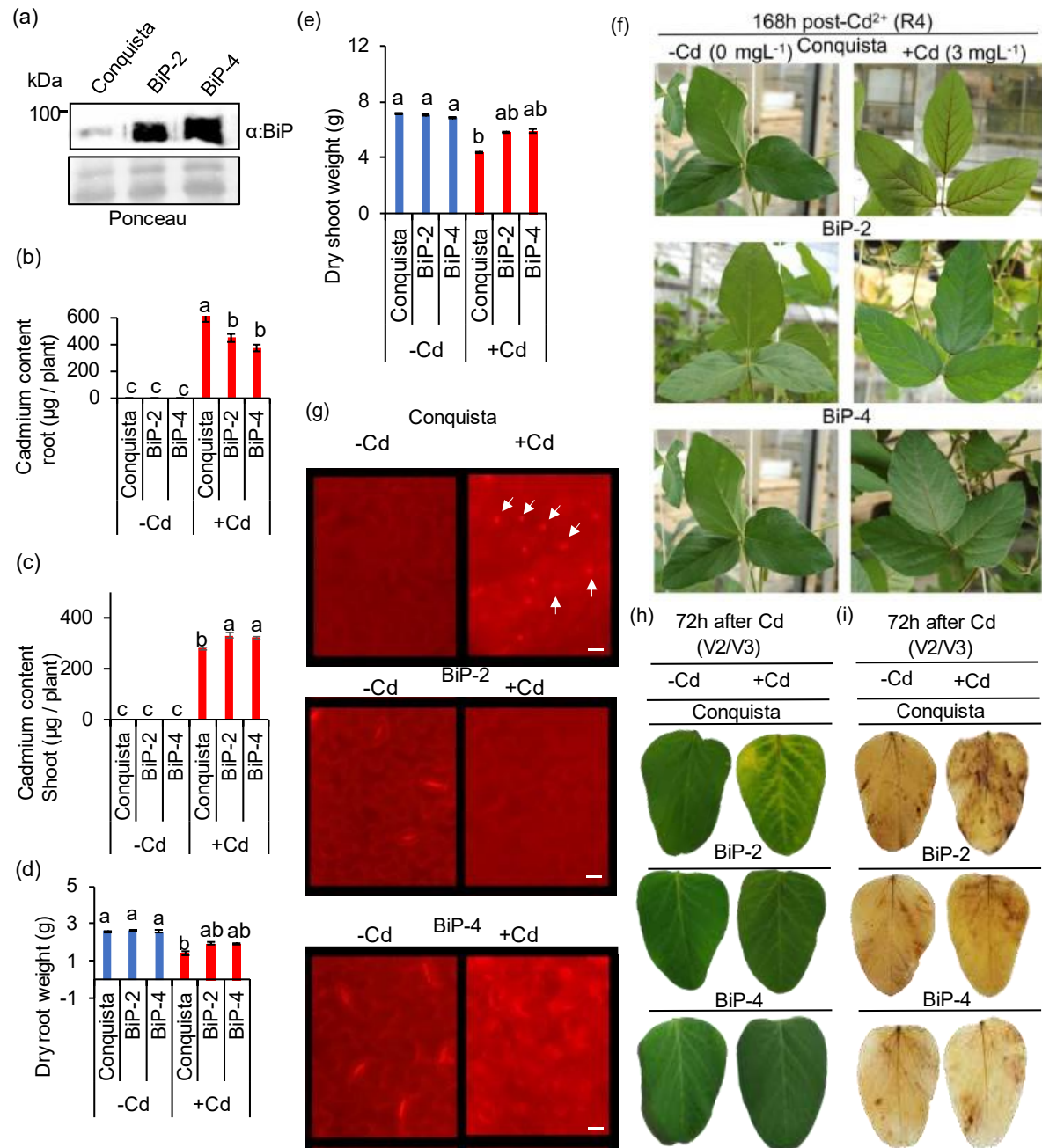


Figure 4. *BiPD* overexpression attenuates Cd²⁺-mediated cell death at early and late developmental stages.

(a) BiP protein levels in Conquista plants (wild type) and *BiPD*-overexpressing lines (BiP-2 and BiP-4). BiP protein levels were monitored by immunoblotting total protein extracts with an anti-BiP antibody, $n = 2$. Protein loading was evaluated by Ponceau S staining of proteins (bottom panel).

(b, c, d, e, f) Conquista, BiP-2, and BiP-4 plants at the R4 reproductive stage, hydroponically grown without (0 mg L⁻¹) and in the presence of (3mg L⁻¹) Cd²⁺ for 168 h. (b) Cd²⁺ accumulation in roots of Conquista and *BiPD*-overexpressing lines (c) Cd²⁺ accumulation in shoots of R4 Conquista and R4 *BiPD*-overexpressing lines. (d) BiP attenuates the Cd²⁺-mediated growth inhibition of soybean roots. The root dry weight was determined for Conquista and *BiPD*-overexpressing lines (e) BiP attenuates Cd²⁺-mediated stunted growth of soybean shoots. The shoot dry weight was determined for Conquista and *BiPD*-overexpressing lines. For (b), (c), (d) and (e), bars (\pm SD) with different letters are

significantly different at $p < 0.05$ by the Tukey's test, $n = 3$. (f) BiP attenuates Cd^{2+} stress-induced symptoms in soybean leaves at the R4 reproductive stage, $n = 3$. (g, h, i) Conquista and *BiPD*-overexpressing leaves treated without (-Cd, 0 mgL^{-1}) and in the presence of (+Cd, 9 mgL^{-1}) Cd^{2+} for 72 h, $n = 3$. (g) BiP attenuates Cd^{2+} -mediated cell death. Propidium iodide (PI) leaf-staining after 72 h of Cd^{2+} treatment. PI stains the cell wall of living cells, whereas dead cells show nuclei and cytoplasm stain. Dead cells display PI-stained nuclei shown by the white arrows. Scale bars = $20 \text{ }\mu\text{m}$. (h) Cd^{2+} stress-induced symptoms in Conquista and *BiPD*-overexpressing leaves at the V2/V3 vegetative stage, $n = 3$. (i) H_2O_2 production in Cd^{2+} -treated Conquista and *BiPD*-overexpressing soybean leaves after exposure to DAB for 12 h.

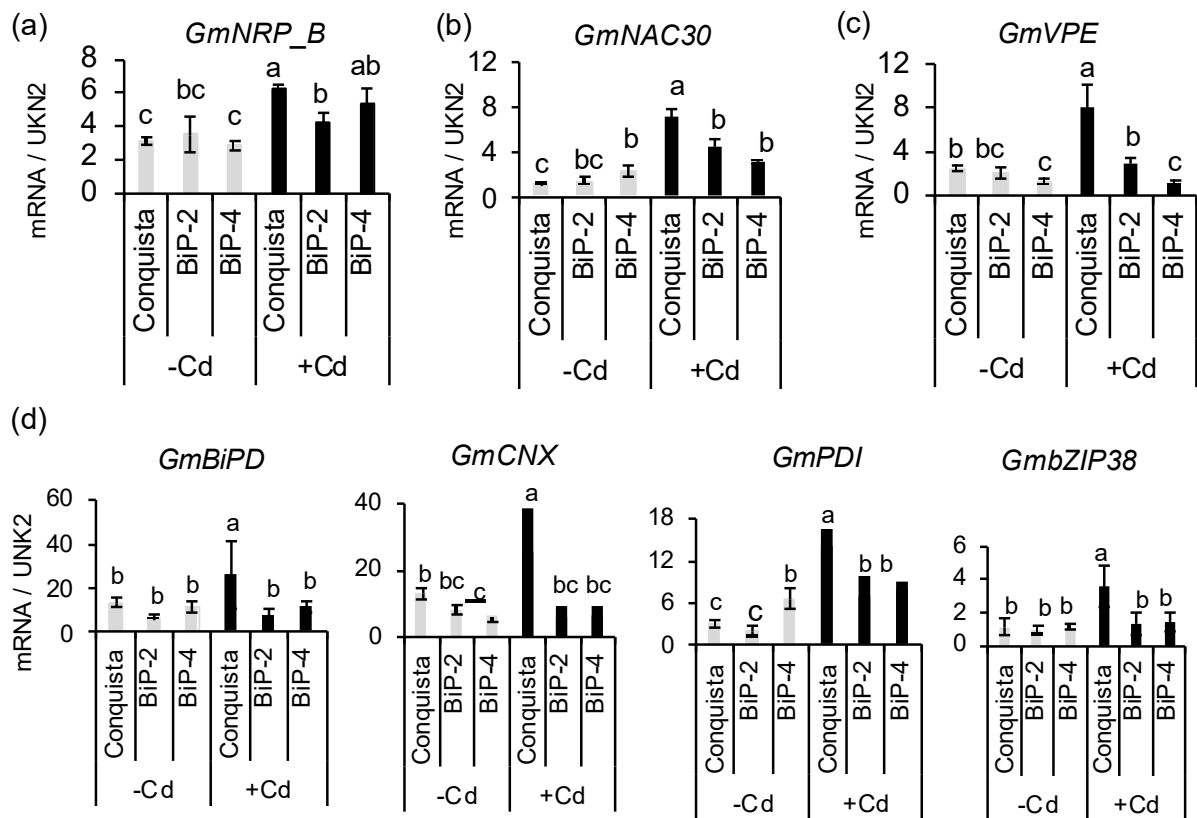


Figure 5. *BiP* negatively modulates Cd²⁺-mediated induction of the DCD/NRP-mediated cell death pathway components.

(a, b, c) Cd²⁺-mediated induction of the DCD/NRP-mediated cell death pathway components in *BiPD*-overexpressing lines. Total RNA was isolated from V2/V3 leaves of Conquista (wild type) and *BiPD*-overexpressing lines (BiP-2 and BiP-4) hydroponically grown in the absence (0 mgL⁻¹) and presence (9 mgL⁻¹) of Cd²⁺ for 48 h. The transcript levels of *GmNRP-B* (a), *GmNAC30* (b), and *GmVPE* (c) were monitored by RT-qPCR and normalized with *UKN2*.

(d) *BiP*-overexpression attenuates Cd²⁺-mediated induction of the unfolded protein response (UPR). The transcript levels of endogenous *GmBiPD*, *GmCNX*, *GmPDI*, and *GmbZIP38* were monitored by RT-qPCR and normalized with *UKN2*. Bars (\pm SD with different lowercase letters are significantly different at $p < 0.05$ (Tukey's test), $n = 3$).

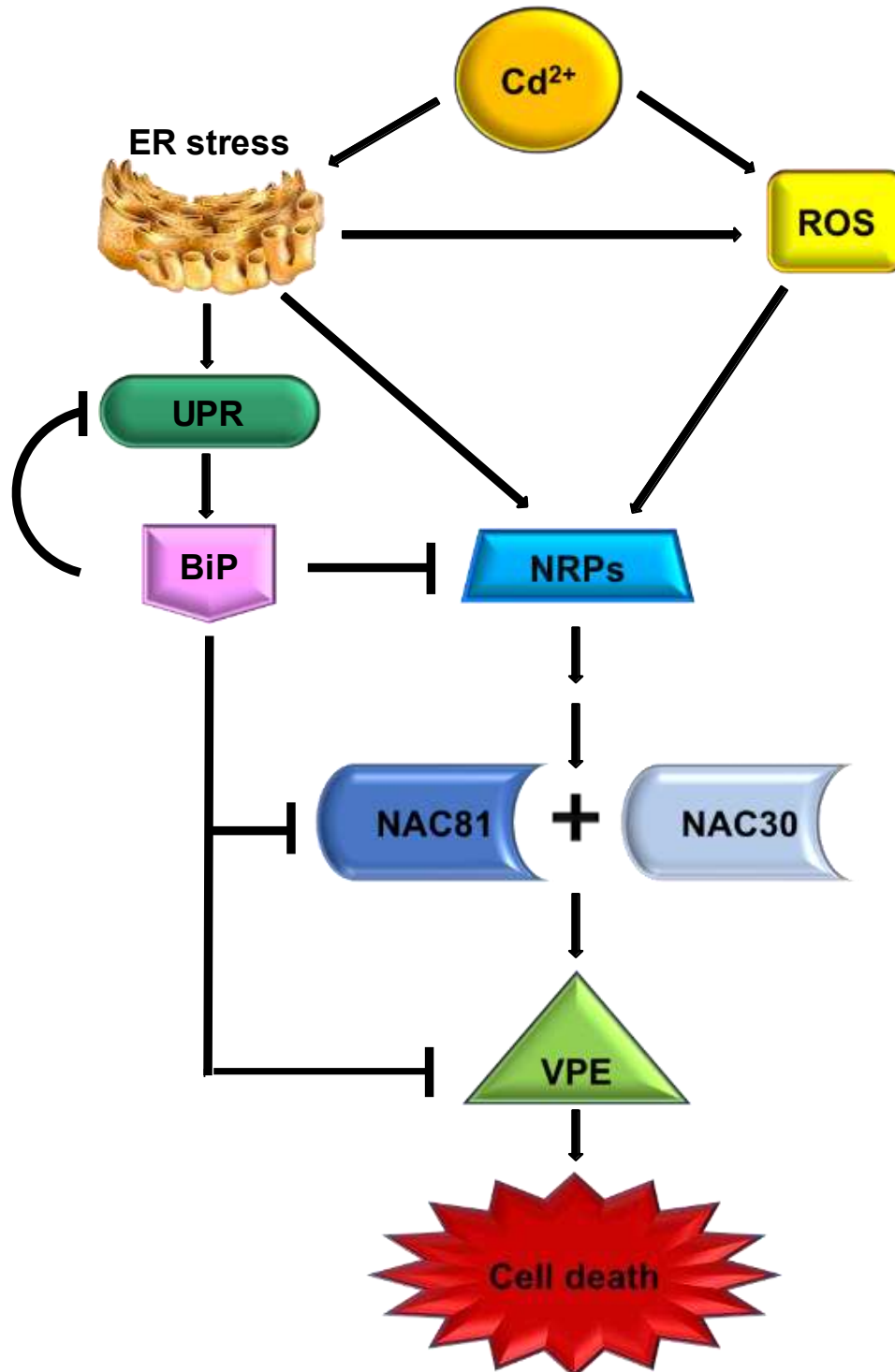


Figure 6. A mechanistic model for Cd^{2+} -mediated induction of programmed cell death in soybean. Toxic concentrations of Cd^{2+} cause ER stress and accumulation of ROS, which upregulate the expression of *NRPs* synergistically. Activated *NRPs* initiate a signaling cascade that converges to the *GmNAC81* and *GmNAC30* induction. These transcriptional factors form a heterocomplex to fully activate the promoter and expression of *VPE*, the executioner of a cell death program. The Cd^{2+} -mediated ER stress induces *BiP* expression via activation of the unfolded protein response (UPR), leading to the inhibition of the UPR (ER stress) and the expression and activity of the *NRP*-mediated cell death pathway components; hence attenuating the Cd^{2+} -mediated cell death response.

SUPPORTING INFORMATION

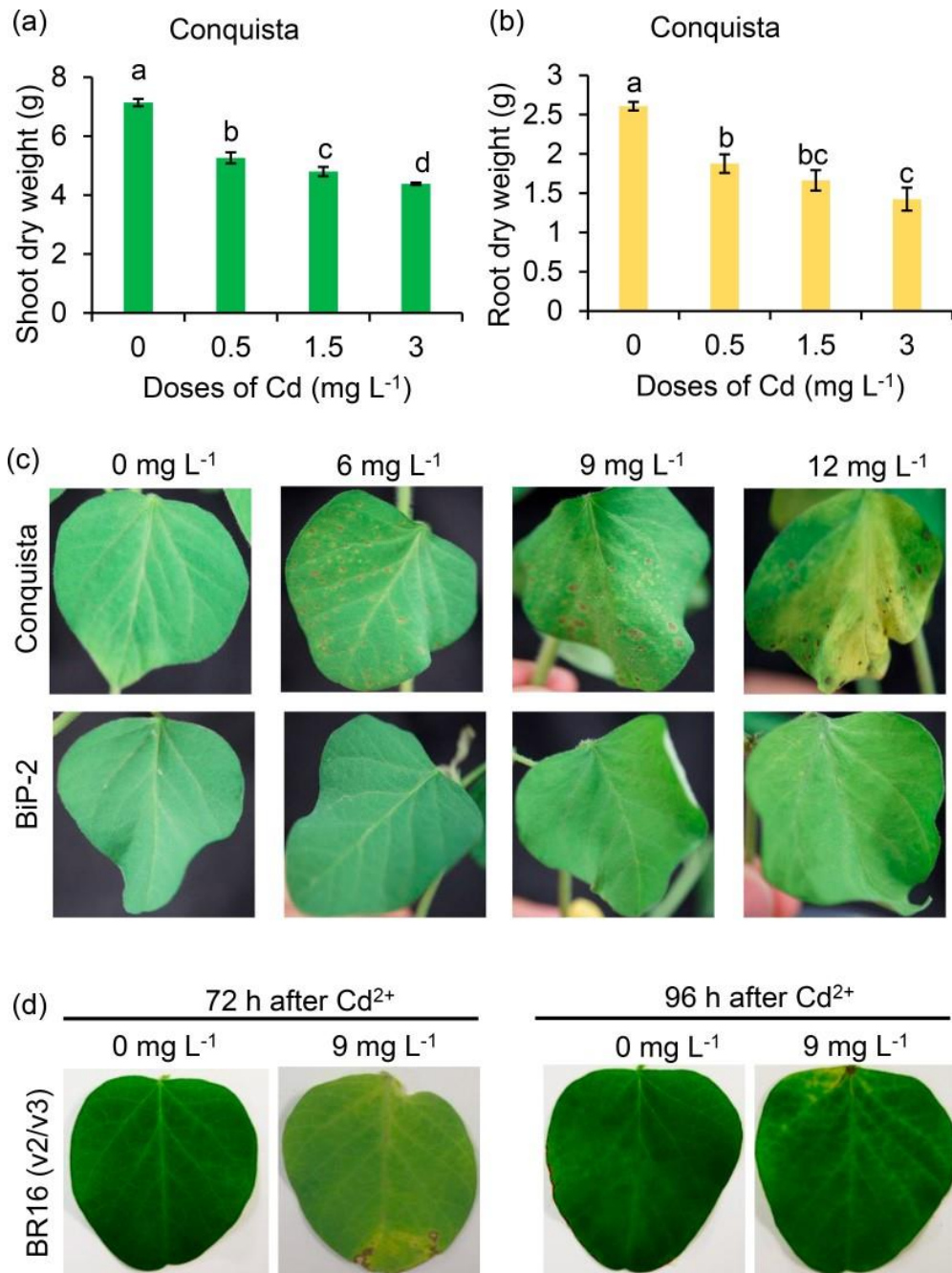


Figure S1. Cd²⁺ stress-induced symptoms in soybean. (a, b) Cd²⁺-mediated inhibition of plant growth. Soybean (Conquista) plants at the R4 developmental stage were hydroponically grown in the presence and absence of increasing concentration of Cd²⁺ for 168 h. The dry weight of shoots (a) and roots (b) was measured after 168 h of the treatment. Bars (\pm SD) with different lowercase letters are significantly different at $p < 0.05$ (Tukey's test), $n = 3$. (c) Cd²⁺ stress-induced symptoms in Conquista and *BiPD*-overexpressing leaves. Conquista and *BiPD*-overexpressing lines (BiP-2) at the V2/V3 vegetative stage were hydroponically grown under different cadmium doses for 120 h, $n = 3$. (d) Cd²⁺ stress-induced symptoms in BR16 leaves at the V2/V3 vegetative stage treated with 9 mgL⁻¹ of Cd²⁺ for 72 h and 96 h.

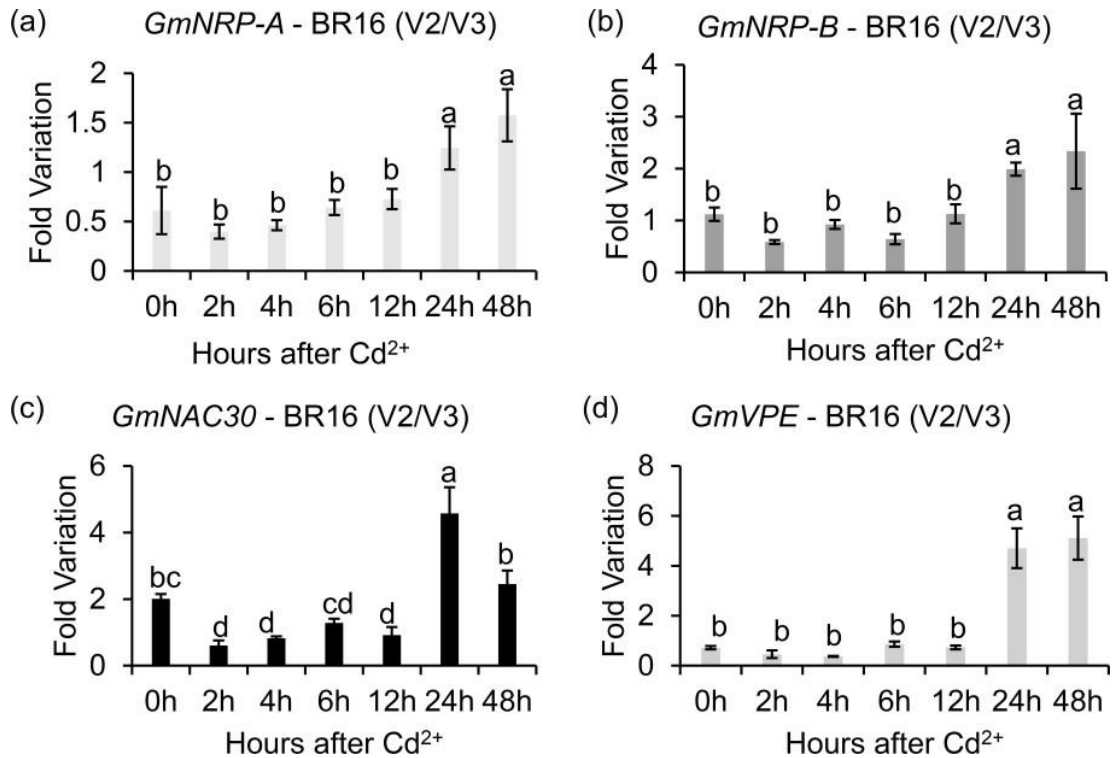


Figure S2. Time course induction of NRP/DCD-mediated cell death pathway components in response to Cd²⁺. BR16 plants at the V2/V3 developmental stage were treated with 9 mgL⁻¹ of Cd²⁺ for the indicated time. The transcript levels of *GmNRP-A* (a), *GmNRP-B* (b), *GmNAC30* (c) and *VPE* (d) were quantified by RT-qPCR. The fold variation in gene expression (relative to the (control treatments)) was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method with *UKN2* as an endogenous control. Bars (\pm SD) with different lowercase letters are significantly different at $p < 0.05$ (Tukey's test), $n = 4$.

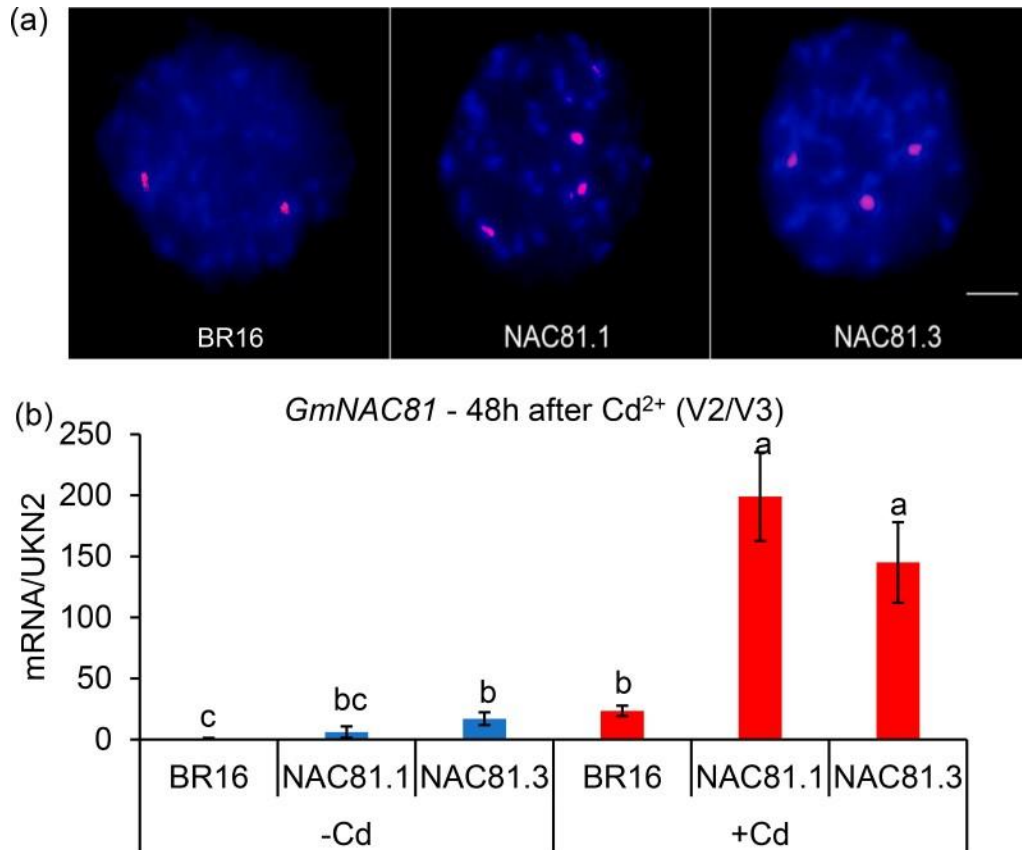


Figure S3. Molecular characterization of *GmNAC81*-overexpressing lines. (a) Transgene copy number in *GmNAC81*-overexpressing lines. Nuclei-Fish was performed on BR16, NAC81-1, and NAC81-3 soybean interphase nuclei from the *GmNAC81* red- probe. Two hybridizing spots were detected in more than 50 BR16 nuclei. *GmNAC81* and its paralog *GmNAC77* were detected on BR16 nuclei, whereas both overexpressing lines NAC81-1 and NAC81-3 (more than 50 nuclei) contained an additional hybridizing signal corresponding to a single copy transgene. (b) *GmNAC81* transcript accumulation in overexpressing lines and in response to Cd²⁺ treatment. BR16 (wild type) and *GmNAC81*-overexpressing lines (NAC81.1 and NAC81-3) at the V2 / V3 vegetative stage were hydroponically grown with 0 mg L⁻¹ (-Cd) or 3 mgL⁻¹ (+ Cd) Cd²⁺ for 48 h. Then, RNA was isolated from leaves of untreated and Cd²⁺-treated soybean plants, and transcript accumulation was determined by RT-qPCR and normalized with *UKN2*. Bars (\pm SD) with different letters are significantly different by Tukey's test ($p < 0.05$).

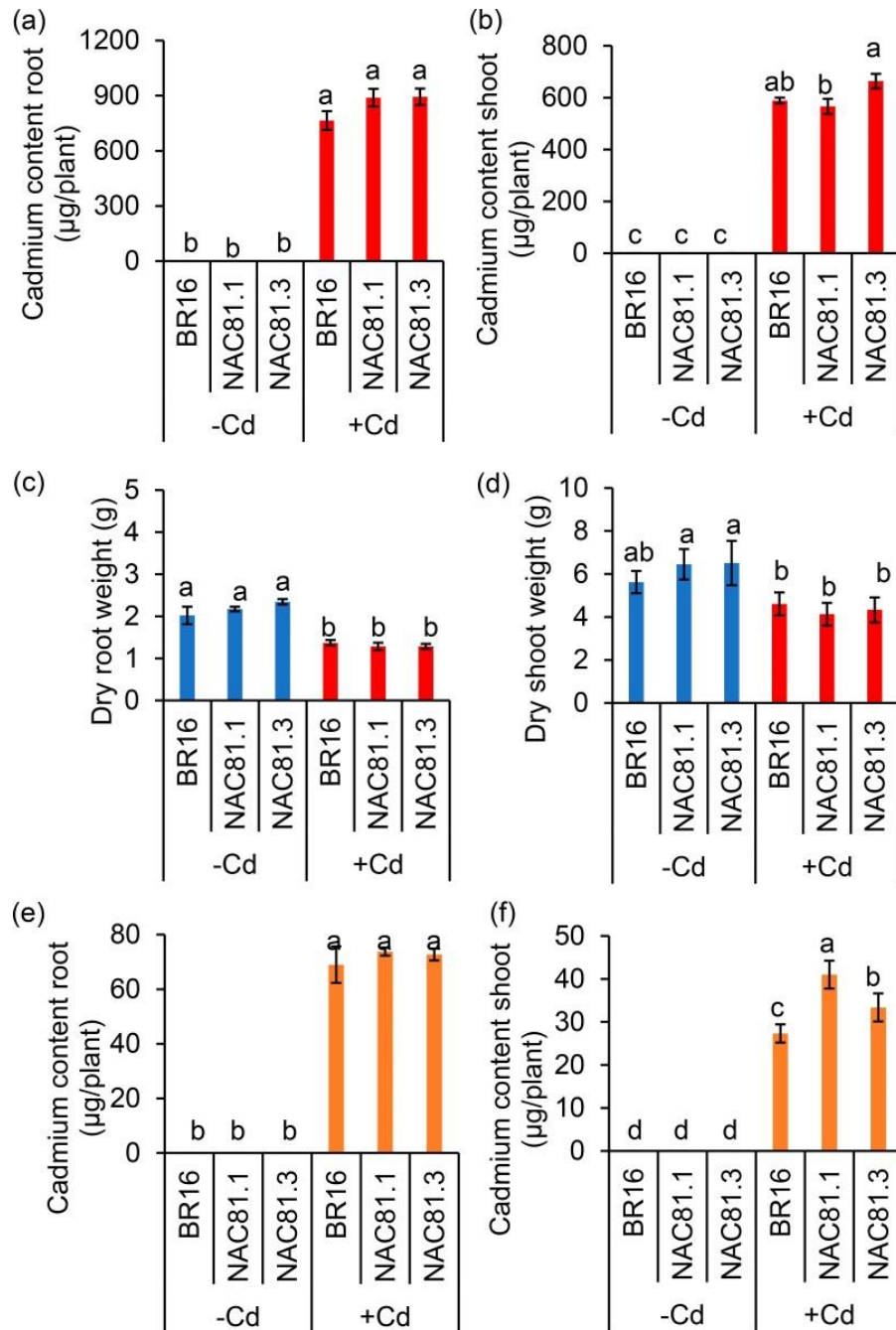


Figure S4. Cd²⁺-induced growth inhibition in soybean plants at the R1 reproductive stage. (a, b, c, d) BR16, NAC81-1, and NAC81-3 lines at the R1 reproductive stage were treated with 3 mgL⁻¹ of Cd²⁺ for 120 h: (a) The Cd²⁺ content in roots from untreated (-Cd) and Cd²⁺-treated (+Cd), (b) Cd²⁺ content in shoots. (c) Root dry weight of untreated (-Cd) and Cd²⁺-treated (+Cd) BR16, NAC81-1, and NAC81-3 lines. (d) Shoot dry weight of untreated (-Cd) and Cd²⁺-treated (+Cd) BR16, NAC81-1, and NAC81-3 lines (e, f) BR16, NAC81-1, and NAC81-3 lines at the V2/V3 vegetative stage were subjected to 9 mgL⁻¹ of Cd²⁺ for 48 h: (e) Cd²⁺ uptake in roots and (f) translocation to shoots of untreated (-Cd) and Cd²⁺-treated plants (+Cd, 9 mgL⁻¹ for 48 h) BR16, NAC81-1, and NAC81-3 lines at the V2/V3 vegetative stage. For (a) to (f), the bars (± SD) with different lowercase letters are significantly different by the Tukey's test (p < 0.05), n = 6 for (a), (b), (c) and (d) and n = 5 for (e) and (f).

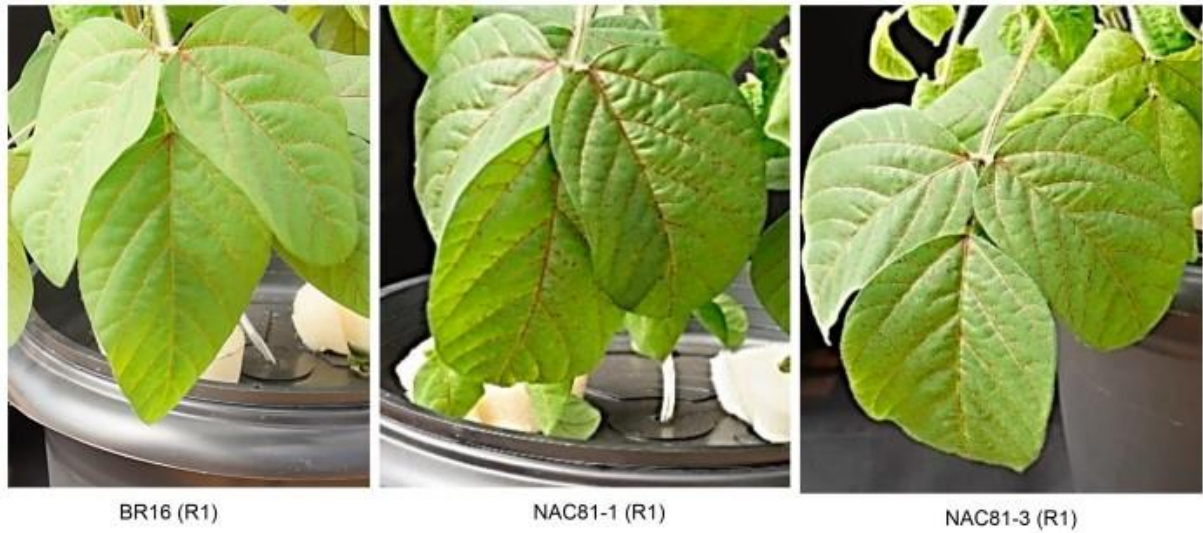


Figure S5. Cd²⁺-induced symptoms in BR16, NAC81-1, NAC81-3 at the R1 vegetative stage (3 mL⁻¹ of Cd²⁺ for 120 h). The images are a magnification of leaves of the Cd²⁺-treated plants displayed in Figure 3a.

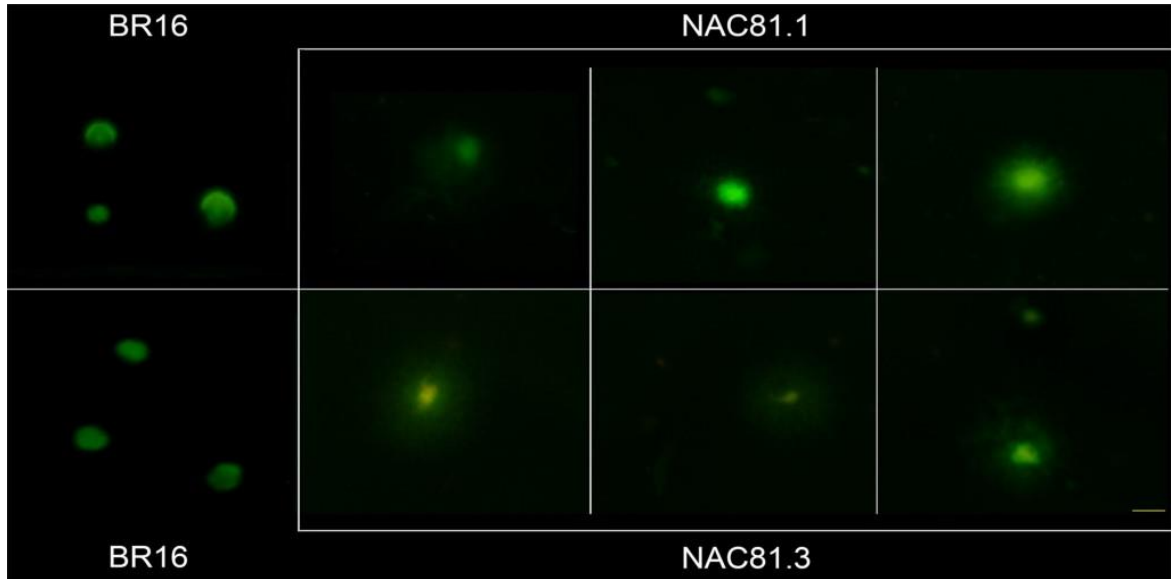


Figure S6. Nucleoids of BR16 and nucleoids exhibiting DNA damage of *GmNAC81*-overexpressing leaves (NAC81.1 and NAC81.3) at the V2/V3 vegetative stage treated with Cd^{2+} (9 mgL^{-1}) for 72 h.

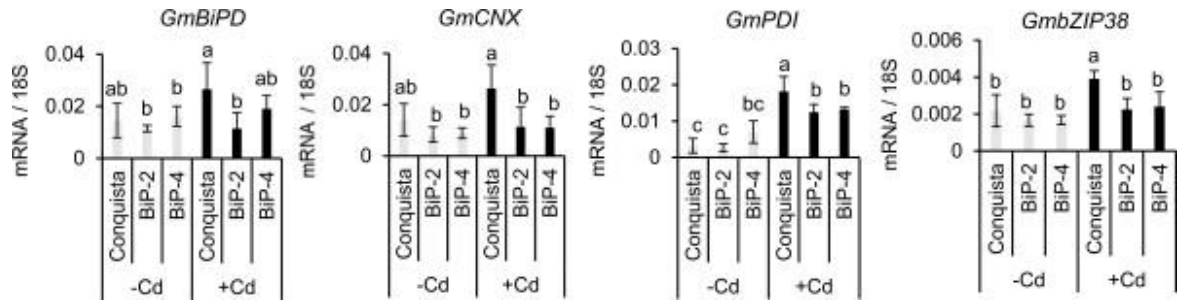


Figure S7. *BiPD*-overexpression attenuates Cd^{2+} -mediated induction of the unfolded protein response (UPR). The transcript levels of endogenous *GmBiPD*, *GmCNX*, *GmPDI*, and *GmbZIP38* were monitored by RT-qPCR and normalized with *18S rDNA*. Bars (\pm SD) with different lowercase letters are significantly different at $p < 0.05$ (Tukey's test), $n = 3$.

TABLE

Table S1. Primers used for PCR and expression analyses by quantitative RT-PCR (qRT-PCR).

PCR		
Primer designation	Sequence	Target gene
35AMV-F	CCACTATCCTTCGCAAGAC	35S promoter
NAC6-R	TCTCTCTCTTCCTCTAGTGCTC G	<i>GmNAC81</i>
SoyBiPD-F	GAGAGACTAATTGGAGAGGCT	<i>soyBiPD</i>
SoyBiPD-R	ATAGGCAATGGCAGCAGCAGT	<i>soyBiPD</i>
qRT-PCR		
GMNAC6FWD	CCAACAAAAGCACTTGTGGCA	<i>GmNAC81</i>
GMNAC6RVS	GGACTATTCAACTGAGCCCAA AAG	<i>GmNAC81</i>
GMQRTNAC32FWD	TGCCGGAAGCGGGTACT	<i>GmNAC30</i>
GMQRTNAC32RVS	CGGATTTCCGATCGGTTTG	<i>GmNAC30</i>
GMNRICHFWD	TACAGGCATCCAATTTGGCGA ACC	<i>GmNRP-B</i>
GMNRICHRVS	TGACTTGAAAGAGTTGATCTC ACCCC	<i>GmNRP-B</i>
Glyma14g10620FWD	AACCCAAGGCCTGGAGTCAT	<i>GmVPE</i>
Glyma14g10620RVS	TCGCCGGTGTAATCCTTTG	<i>GmVPE</i>
GMNRPFWD	GGCACAAAGACTGGTGCTGAG A	<i>GmNRP-A</i>
GMNRPRVS	CTCTGTATCGTGGAGGCAGAC C	<i>GmNRP-A</i>
GmUKN2FWD	TGTGCTCTGTGAAGAGATTG	<i>GmUKN2</i>
GmUKN2RVS	TCATAATCTGTGTGCAGTTC	<i>GmUKN2</i>
GmqRTBiPDFWD	ATCTGGAGGAGCCCCAGGCGG TGG	<i>GmBiPD</i>
GmqRTBiPDRVS	CTTGAAGAAGCTTCGTCGTAA AACTAAG	<i>GmBiPD</i>
CALNEXIN-FWD	TGATGGGGAGGAGAAGAAAA AGC	<i>GmCNX</i>
CALNEXIN-RVS	ATCTGGAGGAGCCCCAGGCGG TGG	<i>GmCNX</i>
qRTSoy18S FWD	AAACGGCTACCACATCCAAG	<i>Gm18SrRNA</i>
qRTSoy18S RVS	AAACGGCTACCACATCCAAG	<i>Gm18SrRNA</i>
qRTGmPDI FWD	CGAAAAGGGAGAGGAGGACT TC	<i>GmPDI</i>
qRTGmPDI RVS	TCTGGGTCACCGAAAGGCAA	<i>GmPDI</i>
RT_Glyma03g27865Fw	TCGACGACCTCGATGACATC	<i>GmbZIP38</i>
RT_Glyma03g27865Rv	GCGAAACGGAGGCGTAATTA	<i>GmbZIP38</i>

SUMMARY STATEMENT

The non-essential heavy metal Cadmium induces programmed cell death (PCD) in plants. We demonstrated that a mechanism for Cd-mediated PCD is the induction of the NRP/GmNAC81-GmNAC30/VPE signaling module, which increases a caspase 1-like VPE activity. BiP protects plant cells against Cd toxicity by negatively modulating the Cd-mediated induction of the NRP/GmNAC81-GmNAC30/VPE signaling module.

CAPÍTULO II

**VPE, ENZIMA DE PROCESSAMENTO VACUOLAR, COMO POSSÍVEL
COMPONENTE DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA CONTRA *Phakopsora*
*pachyrhizi***

RESUMO

O fungo biotrófico *Phakopsora pachyrhizi* é atualmente o principal patógeno que afeta a produção de soja em todo o mundo. O fungo causa lesões do tipo RB (*reddish-brown*), visualizada em genótipos resistentes de soja, e lesões tipo TAN (*tan colored*) em genótipos suscetíveis, levando as plantas a redução de fotossimilados que acarreta perda do desempenho das plantas atacadas. Esforços de triagem em germoplasmas de sojas levaram à identificação de várias fontes de resistência a *P. pachyrhizi* mediada por genes *Rpp*. Entretanto, a caracterização dos efetores ou outros determinantes que contribuem para o reconhecimento dos isolados de *P. pachyrhizi* em soja não foram completamente elucidados. Precedentes na literatura implicam a resposta à morte celular mediada por DCD/NRPs (*Development and Cell Death Domain-containing N-Rich Proteins*) como componente da resposta de hipersensibilidade elicitada por interações de incompatibilidade a patógenos. Neste estudo, foi investigado se a via DCD/NRP de morte celular, induzida por múltiplos estresses e que resulta na ativação de VPE (*Vacuolar Processing Enzyme*), poderia estar envolvida em interações compatíveis e incompatíveis durante a infecção com *P. pachyrhizi* em plantas de soja suscetíveis, BR16 e Conquista, e resistentes, BRS511 e TMG7262. Após 72 h da inoculação, a expressão dos componentes da via foi induzida nas linhagens suscetíveis BR16 e conquista e na linhagem resistente TGM7262 embora em extensões diferentes. Significativamente, a expressão dos componentes da via de morte celular em condições normais foi muito superior na linhagem resistente TGM7262, resultando em altíssima expressão de VPE, um componente importante de HR. Estes resultados sugerem que a via DCD/NRP de morte celular é ativada durante a infecção com o fungo e, ao contrário de infecções com bactérias, pode estar envolvida em interações compatíveis e incompatíveis. A fim de avaliar o envolvimento de VPE nos mecanismos de resistência, a expressão de VPE foi constitutivamente aumentada na linhagem suscetível BR16 por meio de superexpressão do gene *GmNAC81*. A superexpressão de VPE alterou o fenótipo de suscetibilidade, sendo que as plantas transgênicas infectadas apresentaram menor número de urédias abertas e amarelecimento menos intenso das folhas ao longo da infecção, quando comparadas com BR16 não transformada. Estes resultados sugerem que a expressão aumentada de VPE pode retardar o processo de infecção pelo fungo *P. pachyrhizi* em soja. Entretanto, a superexpressão de um regulador negativo da via DCD/NRP, BiP, não inibiu a indução dos componentes da via DCD/NRP durante a infecção. A expressão de VPE em plantas superexpressando *GmBiPD* foi induzida em todos os tempos analisados após a inoculação e as plantas apresentam maior severidade de infecção, com maior número de urédias

abertas e um amarelecimento acentuado do tecido. Sendo a via de sinalização de morte celular mediada por DCD/NRP induzida pelos hormônios ácido abscísico (ABA) e ácido salicílico (AS), foi também investigado o acúmulo desses hormônios em plantas infectadas. Observou-se que plantas superexpressando BiP acumularam um nível superior dos hormônios ABA e AS em relação às plantas controle, Conquista. Provavelmente, o acúmulo acentuado de ABA e AS nas linhagens transgênicas superaram o efeito negativo de BiP na indução da via DCD/NRP. Entretanto, é possível que BiP, pela sua propriedade de chaperone molecular, tenha afetado a atividade da enzima, o que deverá ser avaliado posteriormente. Coletivamente, estes resultados sugerem que a via de morte celular mediada por DCD/NRPs pode estar envolvida nos processos moleculares de reconhecimento fungo-planta e nas respostas de defesa em interações incompatíveis. Análises de introgressão de alelos 35S:BiP no cultivar resistente TGM7262 estão sendo desenvolvidas para esclarecer o mecanismo de resistência baseado na superexpressão de VPE.

Palavras-chave: proteínas ricas em asparagina, HR, VPE, *GmNAC81*, *GmBIPD*

1. INTRODUÇÃO

As plantas como organismos sésseis são expostas a condições ambientais adversas e são uma fonte potencial de açúcares e outros nutrientes para pragas e patógenos. Ao longo da evolução, diversos mecanismos foram descritos em plantas para proteger esses recursos; entretanto, organismos patogênicos superaram essas barreiras estruturais e químicas pré-formadas. Como resultado, as plantas desenvolveram sistemas adicionais para detectar possíveis ataques e ativar defesas para impedir a infecção. Coletivamente, esses sistemas e os mecanismos subjacentes a eles são referidos como imunidade de plantas (Pedley et al., 2018).

As plantas utilizam duas respostas imunes distintas, mas que se sobrepõem, uma associada ao reconhecimento de padrões moleculares associados a microrganismos ou patógenos (MAMPs ou PAMPs) e a outra refere-se à imunidade desencadeada por efetores do patógeno. Na primeira linha de defesa, há o reconhecimento de PAMPs por receptores transmembranas, resultando em imunidade desencadeada por PAMP (PTI) (Jones & Dangl, 2006; Dodds & Rathjen, 2010). Na segunda linha de defesa de planta, designada ETI (imunidade desencadeada por efetores) ou resistência específica do hospedeiro, os patógenos secretam proteínas efetoras na célula da planta que interferem na sinalização e outras respostas de defesa a jusante. Esse reconhecimento ou a detecção dos efetores por proteínas de resistência de plantas resulta em resistência desencadeada por efector, que geralmente culmina com uma forma rápida e localizada de morte celular, conhecida como resposta de hipersensitividade (HR), que limita a capacidade do patógeno de se espalhar além do ponto de infecção (Boller & Felix, 2009; Jones & Dangl, 2006; Dodds & Rathjen, 2010; Pedley et al., 2018).

Mais de 300 espécies de patógenos atacam a soja (*Glycine max* Linnaeus) em todo o mundo, embora relativamente poucos causem danos econômicos significativos (Hartman et al., 2015). Particularmente, o fungo *Phakopsora pachyrhizi* causador da Ferrugem Asiática da Soja (FAS) é singularmente relevante. Este fungo é considerado originário da Ásia-Austrália, mas se espalhou para a maioria das áreas produtoras de soja e apresenta potencial de causar mais de 90% de perda de rendimento em cultivares suscetíveis sob condições favoráveis (Akamatsu et al., 2013; 2017). Atualmente está estabelecido que a FAS é causada por duas espécies fúngicas biotróficas obrigatórias: *Phakopsora meibomiae* e *P. pachyrhizi*. Este basidiomiceto é um dos patógenos mais virulentos de plantas (Tremblay et al., 2013). É capaz de infectar mais de 31 espécies de 17 gêneros de leguminosas, o que é uma característica bastante incomum para fungos de ferrugem que geralmente são altamente especializados para hospedeiros específicos

(revisado em Goellner et al., 2010). Este patógeno difere em outro aspecto importante da maioria das ferrugens, pois penetra diretamente nas células da folha em vez de entrar através dos estômatos, como os demais fungos da ferrugem (Heath, 1997). Após um período prolongado úmido e fresco, o fungo pode completar o ciclo da infecção em apenas nove dias (Miles et al., 2003). O início da infecção ocorre com a germinação dos urediniósporos, geralmente após 1 h em temperaturas ideais que podem variar de 15°C a 28°C e ambiente úmido, em até 4 h já há a formação do tubo germinativo. A partir de 24 h após a inoculação, os urediniósporos que formaram apressórios começam a murchar. Isso indica que o conteúdo celular dos mesmos foi transferido para o tubo germinativo. O tubo germinativo possui em sua extremidade o apressório que é uma estrutura globosa da qual emerge o cone apressorial responsável por originar a hifa de penetração, esta, é encarregada pela penetração na célula epidérmica da planta. Após atravessar os espaços intercelulares, ela se separa em hifa primária, ou hifa de infecção; as hifas primárias começam a colonizar os espaços intercelulares do parênquima esponjoso e no tecido do mesófilo e se ramificam em várias hifas secundárias. Com 72 e 96 horas após infecção, as hifas secundárias se desenvolvem por todo o parênquima esponjoso do limbo foliar do hospedeiro (Magnani et al., 2007). Em contato com as células do mesófilo, a célula mãe do haustório é então formada e, ao atingir o espaço intracelular, se diferencia no haustório (Goellner et al., 2010). Por meio da formação de hifas secundárias, outros haustórios seguem colonizando o parênquima esponjoso (Koch et al., 1983).

Os haustórios constituem o principal sítio de absorção de nutrientes a partir do hospedeiro, sendo determinantes no estabelecimento e manutenção da fase biotrófica, realizando também trocas de informações entre hospedeiro e patógeno (Vieira et al., 2012). Assim, substâncias produzidas pelo haustório devem atravessar a membrana plasmática deste, a matriz extra-haustorial e a membrana plasmática do hospedeiro, para ter acesso ao citoplasma vegetal. Entre seis e oito dias pós-inoculação é possível observar as urédias e seu desenvolvimento pode se estender por até quatro semanas (Marchetti et al., 1975; Zambolim, 2006).

Os sintomas mais comuns da doença são lesões marrom-escuras ou marrom-avermelhadas, com uma a muitas urédias globosas e abertas, na superfície abaxial das folhas (Hartman et al., 2015). As células penetradas sofrem uma resposta de morte celular, novamente uma propriedade inesperada para um patógeno biotrófico. Experimentos com plantas não hospedeiras, como cevada e *Arabidopsis* mostraram que durante a penetração e morte celular concomitantemente, genes marcadores associados a respostas a patógenos necrotróficos são ativados e que a supressão da morte celular tem uma influência negativa no sucesso da infecção

de *P. pachyrhizi* (Hoefle et al., 2009; Campe et al., 2014). Os dados sugerem que *P. pachyrhizi* provoca uma morte celular programada (PCD), facilitando a entrada de fungos nas células epidérmicas da cevada, as células epidérmicas penetradas tornam-se principalmente necróticas e o fungo invade o mesofilo. O papel da morte celular epidérmica para resistência ou patogênese não é conhecido (Loehrer et al., 2008; Hoefle et al., 2009).

O aparecimento de lesões e sua cor são frequentemente usados para determinar a suscetibilidade ou resistência da soja ao fungo sendo que ocorrem três fenótipos de reações distintas: (1) reação suscetível, caracterizada por lesões tipo TAN (*tan-colored*) de cor marrom, devido à abundância de urediniósporos de cor bege e esporulação abundante no lado abaxial das folhas infectadas; (2) reação resistente caracterizada por lesões RB (*reddish-brown*) de cor marrom avermelhada com poucas urédias e esporulação escassa; e (3) reação imune diferenciada pela falta de lesões macroscopicamente visíveis ou urédias (Bromfield; Hartwig, 1980; Bromfield, 1984).

Esforços de triagem em germoplasmas de sojas levaram à identificação de várias fontes de resistência a *P. pachyrhizi*, sendo que análises de mapeamento identificaram oito principais loci relacionados as respostas ao fungo (*Rpp*, *Rpp1* a *Rpp7* e *Rpp1-b*). Esses genes fornecem graus variados de resistência e com exceção do *Rpp1*, todos os *Rpp* conhecidos condicionam uma reação RB (Garcia et al., 2008; Hyten et al., 2007; Li et al., 2012; Silva et al., 2008; Goellner et al., 2010; King et al., 2016; Kelly et al., 2015; Childs et al., 2018).

A resistência mediada por esses genes *Rpp* tem sido caracterizada em termos de respostas fenotípicas, moleculares, geográficas e temporais contra diferentes isolados do fungo. A questão mais desafiadora, é que o fungo mostra uma capacidade de virulência diferente a depender de diferentes regiões geográficas e condições temporais (Akamatsu et al., 2017). Com base no genoma de referência da soja, todos os loci *Rpp* conhecidos, exceto *Rpp5* e *Rpp6*, parecem conter genes R em *tandem* que codificam proteínas NLR (*Rpp1/Rpp1b*-NLR, *Rpp2*-TIR-NLR, *Rpp3*-TIR-NLR, *Rpp4*-CC-NLR, *Rpp7*-NLR) (Whitham et al., 2016; Childs et al., 2018). Entretanto, a caracterização dos efetores ou outros determinantes que contribuem para o reconhecimento dos isolados de *P. pachyrhizi* em soja não foi completamente elucidada (Pedley et al., 2018; Chander et al., 2019).

Na tentativa de caracterizar outros componentes nas respostas compatíveis e incompatíveis contra *P. pachyrhizi*, até o momento, foi utilizado principalmente abordagens transcriptômicas e metabolômicas, mas que se concentraram apenas na defesa mediada pelos genes *Rpp2*, *Rpp3* e *Rpp4*. Uma importante questão levantada por estes estudos foi a observação de uma resposta bifásica durante o curso da infecção (Van de Mortel et al., 2007; Panthee et al.,

2007; Choi et al., 2008; Panthee et al., 2009; Tremblay et al., 2010; 2012). Com a atribuição da resistência conferida pelos genes *Rpps*, outros trabalhos buscaram elucidar outros possíveis genes e mecanismos envolvidos na interação entre o fungo e plantas contendo alguns dos genes de resistência já estabelecidos. Por exemplo, em plantas contendo o gene *Rpp2*, onze genes foram identificados como essenciais para desenvolvimento de lesões RB, além de quatorze fatores de transcrição (Morales et al., 2013; Pandey et al., 2011). Já em plantas com os genes de resistência *Rpp3* e *Rpp4*, apenas fatores de transcrição previamente associados ao estresse de defesa abióticos (WRKY, MYB e NAC) foram diferencialmente expressos. Estes trabalhos indicam o importante papel dos FT na regulação das respostas, porém dificilmente esclareceram o mecanismo da resistência mediada por genes *Rpp* (Morales et al., 2013; Chader et al., 2019).

Todos os esforços com os estudos transcriptômicos e proteômicos desenvolvidos para a interação com *P. Phakirhizi* ainda foram incapazes de esclarecer os mecanismos de resistência mediada pelos genes *Rpp* (Hossain et al., 2018). Portanto, estudos de genética funcionais são necessários para possíveis esclarecimentos desses mecanismos. Foi demonstrado que BiP, um chaperone molecular do retículo endoplasmático (RE), influencia positivamente genes relacionados a patogênese em respostas da reação hipersensitiva (HR) provocadas por interações de incompatibilidade a patógenos não-hospedeiros, provavelmente por aumento no acúmulo de ácido salicílico o que induz a via de morte celular mediada por DCD/NRPs (Faria et al., 2011; Carvalho et al., 2014b).

BiP atua como um regulador negativo da via de morte celular mediada por DCD/NRPs (Valente et al., 2009; Reis et al., 2011; Reis & Fontes, 2012; Carvalho et al., 2014a). Essa via foi descrita como um integrador de sinais de morte celular, gerados a partir de estresse RE prolongado e estresse osmótico em uma resposta de sinalização convergente e sinérgica. O modelo atual para a sinalização de morte celular mediada por DCD/NRP afirma que, em resposta a estresse RE e estresse osmótico, o fator de transcrição ERD15 se liga especificamente aos promotores de *NRP-A* e *NRP-B* para ativar sua transcrição. O acúmulo aumentado de NRPs causa a indução dos fatores transcricionais do tipo NAC, *GmNAC81* e *GmNAC30*, específicos da planta, que interagem entre si para ativar completamente a expressão da enzima de processamento vacuolar (VPE), um executor específico da planta para morte celular programada (Camargo et al., 2019). A ativação da resposta mediada por proteína NRPs não é específica para o estresse do RE ou o estresse osmótico, mas um ramo compartilhado das vias adaptativas ambientais gerais (Valente et al., 2009; Faria et al., 2011; Reis et al., 2016; Pimenta, 2016).

Precedentes na literatura implicam a resposta à morte celular mediada por DCD/NRPs

como parte da resposta de hipersensibilidade elicitada por interações de incompatibilidade a patógenos. Inicialmente foi demonstrado que a expressão de NRPs e *GmNAC81* é induzida por interações de incompatibilidade e por ácido salicílico (Carvalho et al., 2014b). Em seguida, foi demonstrado que a expressão prolongada de *GmNAC81* e NRPs causa lesões necróticas, semelhantes às do fenótipo de resposta à hipersensibilidade, e induz a expressão de genes relacionados à patogênese (*PRI*) (Faria et al., 2011). Finalmente, o fator de transcrição ERD15, ativador transcrricional da expressão da via DCD/NRP, foi descrito em *Arabidopsis* como um gene que funciona como um regulador negativo da resposta mediada por ácido abscísico (ABA) e um regulador positivo do ácido salicílico que aciona vias de defesa das plantas (Alves et al., 2011).

Estes resultados levantaram a hipótese de que a via DCD/NRP estivesse envolvida nas interações compatíveis e incompatíveis à *P. pachyrhizi*. Para elucidação desses mecanismos, avaliou-se a expressão dos genes da via de sinalização mediada por DCD/NRPs durante o curso da infecção pelo fungo em cultivares resistentes, que induzem a resposta de hipersensibilidade por interações incompatíveis, e em plantas suscetíveis. Finalmente, a relevância dos genes da via foi avaliada pela análise do efeito da superexpressão destes genes na tentativa de elucidar o mecanismo de resposta de defesa da planta contra *P. pachyrhizi*. Estes estudos constituem etapas de fundamental importância para a estruturação de um modelo de interação planta/patógeno, possibilitando o estabelecimento de estratégias de resistência, através da engenharia genética de plantas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS VEGETAIS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Para determinar a resposta de plantas transgênicas ao estresse pelo fungo *P. pachyrhizi*, foram utilizadas linhagens de soja (*Glycine max* 'Conquista') tipo selvagem e superexpressando o gene *GmBiPD* (BIP-2 e BIP-4; Valente et al., 2009) e linhagens de soja do tipo selvagem (*Glycine max* cv. BR16) e transgênica com superexpressão de *GmNAC81* (NAC81.1 e NAC81.3; Pimenta et al., 2016), além de duas cultivares comerciais com diferentes genes de resistência, BRS511 e TMG7262. As sementes das plantas foram obtidas no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas da Universidade Federal de Viçosa (BIOAGRO-UFV).

As sementes de soja foram germinadas em solo orgânico (Bioplant) e, logo após a

emergência do primeiro folíolo, foram retirados fragmentos (disco foliar) para confirmação da transformação das plantas transgênicas através de extração de DNA e reação em cadeia da polimerase (PCR). Após a confirmação, as plantas foram transferidas para vasos de 3,0 L contendo mistura de solo orgânico e terra de barranco (3:1 volume/volume), cultivados em casa de vegetação sob luz natural, umidade relativa (65-85%) e temperatura (15-35°C).

2.2 CONFIRMAÇÃO DOS TRANSFORMANTES DE SOJA

O DNA total foi isolado a partir de folhas com 15 dias de idade de soja transformada e não transformada utilizando tampão de extração contendo 2% de brometo de cetiltrimetil amônio, NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, EDTA 20 mM e 0,2% β -mercaptoetanol (Doyle; Doyle, 1987).

A confirmação das linhagens transformadas com *GmNAC81* ou *GmBiPD* foi feita por PCR utilizando primers específicos do transgene. PCR foi realizado em 50 ng de DNA genômico usando primers 35AMV-F 5'-CCACTATCCTTCGCAAGAC-3' e NAC6-R 5'-TCTCTCTCTTCCTCTAGTGCTC-3' (0,5 nM cada) para os transformantes com *GmNAC81* e os oligonucleotídeos específicos para o transgene BiP (SoyBiPD-F e NOS2009-R) com 1 U de Taq DNA Polymerase (Promega) em um volume final de 12 μ l. As condições das reações de amplificação foram 94°C durante 3 min, seguido por 35 ciclos de PCR (45 s a 94°C, 45 s a 53°C e 60 s a 72°C) com uma extensão final a 72°C por 10 min.

2.1 INFECÇÃO DE PLANTAS DE SOJA COM O FUNGO *Phakopsora pachyrhizi*

Para inoculação, foram utilizados esporos de um único monopustulado pPUFV002 do fungo *P. pachyrhizi* previamente multiplicados na cv. Conquista. Os esporos foram colhidos das folhas exibindo urédias esporulante e diluídos em água destilada contendo 0,01% Tween-20 até uma concentração final de $2,0 \times 10^5$ urediniósporos/mL. A suspensão de esporos foi pulverizada sobre as plantas (3 repetições/planta) no estágio de desenvolvimento V3/V4 usando um atomizador de ar direto. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro por 24 horas, a 25 °C no escuro, sendo posteriormente transferidas para casa de vegetação. Os cultivares BR16 e Conquista desenvolvem lesão do tipo TAN bronzeadas, *tan-colored* (lesões classificadas como indicativas de suscetibilidade), e, desta maneira, foram utilizados como padrão suscetíveis e as plantas BRS511 (*Rpp5*) e TMG7262 (*Rpp4*) apresentam

lesões RB (marrom avermelhadas, *reddish-brown* - lesões associadas à reação de resistência incompleta, devido à presença de urédias esporulantes no interior das lesões; Miles et al., 2011), portanto, utilizadas como padrões resistentes. Para todas as linhagens transgênicas e genótipos avaliados, plantas não inoculadas foram mantidas como controle experimental (3 repetições).

2.2 AVALIAÇÃO FENOTÍPICA

A avaliação fenotípica foi realizada 12 dias após a inoculação, segundo Yamanaka et al. (2014), mensurando-se parâmetros quali e quantitativos para resistência. Na análise qualitativa, a lesão foi avaliada como RB e TAN (Miles et al., 2011). Para a análise quantitativa, os caracteres de resistência foram medidos, como nível de esporulação, número de total de urédias e porcentagem de urédias abertas e fechadas.

2.3 ISOLAMENTO DE RNA TOTAL DE FOLHAS DE SOJA E SÍNTESE DE cDNA

RNA total foi extraído de folhas congeladas, com TRIzol (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante. A qualidade e a integridade do RNA foram monitoradas por eletroforese em géis de agarose desnaturantes a 1,2% (m/v) corados com 0,1 µg/mL de brometo de etídio. O cDNA foi sintetizado a partir de 2 µg de RNA total tratado com DNase I isento de RNase utilizando iniciadores oligo-dT e Transcriptase Reversa M-MLV (Life Technologies), segundo as instruções do fabricante.

Primeiramente foi estabelecido uma cinética de expressão de genes da via durante a infecção. Para isso foram realizadas coletas em diferentes tempos, 2, 24 e 72 h após inoculação, em cultivar resistente contendo o gene *Rpp5* (BRS511) e a cv. susceptível BR16. Uma folha do segundo trifólio de cada planta foi coletada, congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80 °C. Essa cinética também foi conduzida em plantas superexpressando o gene *GmBiPD* (BIP-4) ou *GmNAC81* (NAC81.3). Após definição do tempo de indução, os demais genes da via foram avaliados em experimentos com duas das linhagens de soja superexpressando o gene *GmBiPD* (BIP-2 e BIP-4) e seu controle não transformado (*Glycine max* var “Conquista”), assim como em duas linhagens superexpressando *GmNAC81* (NAC81.1, NAC81.3) e seu tipo selvagem não transformado (*G. max* cv. BR16), além da variedade resistente TGM7262.

2.4 INDUÇÃO DOS GENES NA VIA DCD/NRP

Os procedimentos de PCR em tempo real, incluindo os testes piloto, validações e experimentos para os genes da via de sinalização DCD/NRP foram realizados com um instrumento ABI 7500 (Life Technologies) utilizando SYBR Green (Life Technologies) e iniciadores específicos dos genes na via DCD/NRP (*GmNRP-A*, *GmNRP-B*, *GmNAC81*, *GmNAC30*, *GmVPE*; Tabela 1). As condições para as reações de amplificação foram: 10 min a 95 °C, seguido por 40 ciclos a 94 °C durante 15 s e 60 °C durante 1 min. A expressão gênica foi quantificada pelo método comparativo Ct ($2^{-\Delta Ct}$) e os genes da soja normalizados para o gene de controle endógeno *Unknown2*, recomendado para este experimento com soja e *P. pachyrhizi* (Hirschburger et al., 2015).

Tabela 1. Oligonucleotídeos usados para PCR e análises de expressão por RT-PCR quantitativo (RT-qPCR).

PCR		
Nome dos oligonucleotídeos	Sequência	Target gene
35AMV-F	CCACTATCCTTCGCAAGAC	35S promoter
NAC6-R	TCTCTCTCTTCCTCTAGTGCTCG	<i>GmNAC81</i>
SoyBiPD-F	GAGAGACTAATTGGAGAGGCT	<i>soyBiPD</i>
NOS2009-R	CATCGCAAGACCGGCAACAGGAT	3' nos
SoyBiPD-R	ATAGGCAATGGCAGCAGCAGT	<i>soyBiPD</i>
RT-qPCR		
GMNAC6FWD	CCAACAAAAGCACTTGTGGCA	<i>GmNAC81</i>
GMNAC6RVS	GGACTATTCAACTGAGCCCAA AAG	<i>GmNAC81</i>
GMNRICHFWD	TACAGGCATCCAATTTGGCGA ACC	<i>GmNRP-B</i>
GMNRICHRVS	TGACTTGAAAGAGTTGATCTCACCCC	<i>GmNRP-B</i>
Glyma14g10620FWD	AACCCAAGGCCTGGAGTCAT	<i>GmVPE</i>
Glyma14g10620RVS	TCGCCGGTGTAATCCTTTG	<i>GmVPE</i>
GMNRPFWFWD	GGCACAAAGACTGGTGCTGAGA	<i>GmNRP-A</i>
GMNRPFRVS	CTCTGTATCGTGGAGGCAGACC	<i>GmNRP-A</i>
GmUKN2FWD	TGTGCTCTGTGAAGAGATTG	<i>GmUKN2</i>
GmUKN2RVS	TCATAATCTGTGTGCAGTTC	<i>GmUKN2</i>

2.5 ANÁLISE DE FITORMÔNIOS

Quantificou-se os fitormônios totais nos genótipos para avaliar o efeito sinérgico dessas moléculas em resposta à infecção ao fungo. As extrações de fitormônios foram realizadas a partir de 110 mg de folhas de soja maceradas em nitrogênio líquido. Após completa pulverização, foram adicionados 400 µl de solução de extração [metanol, isopropanol e ácido acético 20:79:1 (v/v/v)]. Em seguida, as amostras foram agitadas em vórtex quatro vezes por 10 segundos, submetidas à ultrasonicação por 5 min à 4 °C, mantidas em gelo por 30 min e novamente submetidas à ultrasonicação por 5 min à 4 °C, e então centrifugadas a 12.000×g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi removido e transferido para um novo tubo. Um novo ciclo de extração foi realizado com o *pellet* resultante da extração anterior. Finalmente, juntaram-se os sobrenadantes para filtração através de filtros de 0,22 µm. Cerca de 400 µL dos extratos foram transferidos para frascos de citometria de massas e 5,0 µL foram injetados no sistema LC/MS (Agilent Eclipse Plus, RRHD, 1,8 µm, 2,1×50 mm) do NuBioMol (Centro de Análise de Biomoléculas-UFV, Brasil), com fluxo contínuo ($\Phi = 0,3$ mL/min), acoplado online a um espectrômetro de massa QqQ triplo quadrupolo (Agilent) (Lima et al., 2019; Coutinho et al., 2019; Vital et al., 2019a).

Os fitormônios foram separados por cromatografia de ultra-alto desempenho (UHPLC, Agilent) usando coluna de cromatografia C18 (50 mm×1,0 mm ID, partículas de 1,7 µm e 300 Å) acoplada ao espectrômetro de massa (QqQ Agilent) nos modos negativo/positivo, alternando de acordo ao tempo de retenção de cada hormônio. As amostras foram digitalizadas por MRM (monitoramento de reação múltipla) para detecção dos fitormônios. Os testes foram realizados com três repetições biológicas para cada tratamento. Os cromatogramas foram processados no software Skyline (MacCoss Lab Software) segundo os métodos descritos por Coutinho et al. (2019) e Vital et al. (2019). Uma curva padrão de cada hormônio, em concentração variada, foi usada para converter os valores de área de XIC em ng/g de tecido vegetal. Os valores de área foram convertidos usando o programa Excel em ng/g (hormônio vegetal/tecido vegetal fresco).

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software R (R Development Core Equipe, 2019) com delineamento inteiramente casualizado sendo as médias comparadas pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$) ou pelo teste t ($p \leq 0,05$), quando necessário.

3 RESULTADOS

3.1 A VIA DE SINALIZAÇÃO DE MORTE CELULAR MEDIADA POR DCD/NRP É ALTERADA EM INTERAÇÕES COMPATÍVEIS E INCOMPATÍVEIS

VPE possui atividade de caspase-1, promove morte celular, exibe expressão e atividade aumentada durante infecção por patógenos e tem sido implicada em HR (Hatsugai et al., 2004; Hara-Nishimura et al., 2005; Carvalho et al., 2014b). Além disso, tem sido demonstrado que a expressão de VPE é controlada pela via de sinalização de morte celular mediada por DCD/NRPs (Mendes et al, 2013; Reis et al., 2016; Camargos et al., 2019; Ferreira et al., 2020). Para examinar se a infecção pelo fungo *P. pachyrhizi* altera a via DCD/NRP e consequentemente a expressão de VPE em interações compatíveis ou incompatíveis, plantas suscetíveis (BR16) e resistentes (BRS511) foram inoculadas com o patógeno, o fenótipo desenvolvido avaliado e a expressão de genes alvos da via DCD/NRP foi monitorada em 2, 24 e 72 h após inoculação (AI) (Figura 1). Os sintomas de HR foram observados no genótipo resistente BRS511 após 15 dias de inoculação, mostrando a formação de pontos marrons, sinais de necrose no local da infecção, com baixos níveis de esporulação, número de urédias e porcentagem de urédias abertas baixos, indicando reação incompatível (Figura 1a, 1b). Em contraste, as folhas das plantas BR16 apresentaram maior nível de esporulação, número de urédias e porcentagem de urédias abertas altos como esperado para sintomas de suscetibilidade (Figura 1a, 1b), indicando que houve correta inoculação e desenvolvimento do fungo.

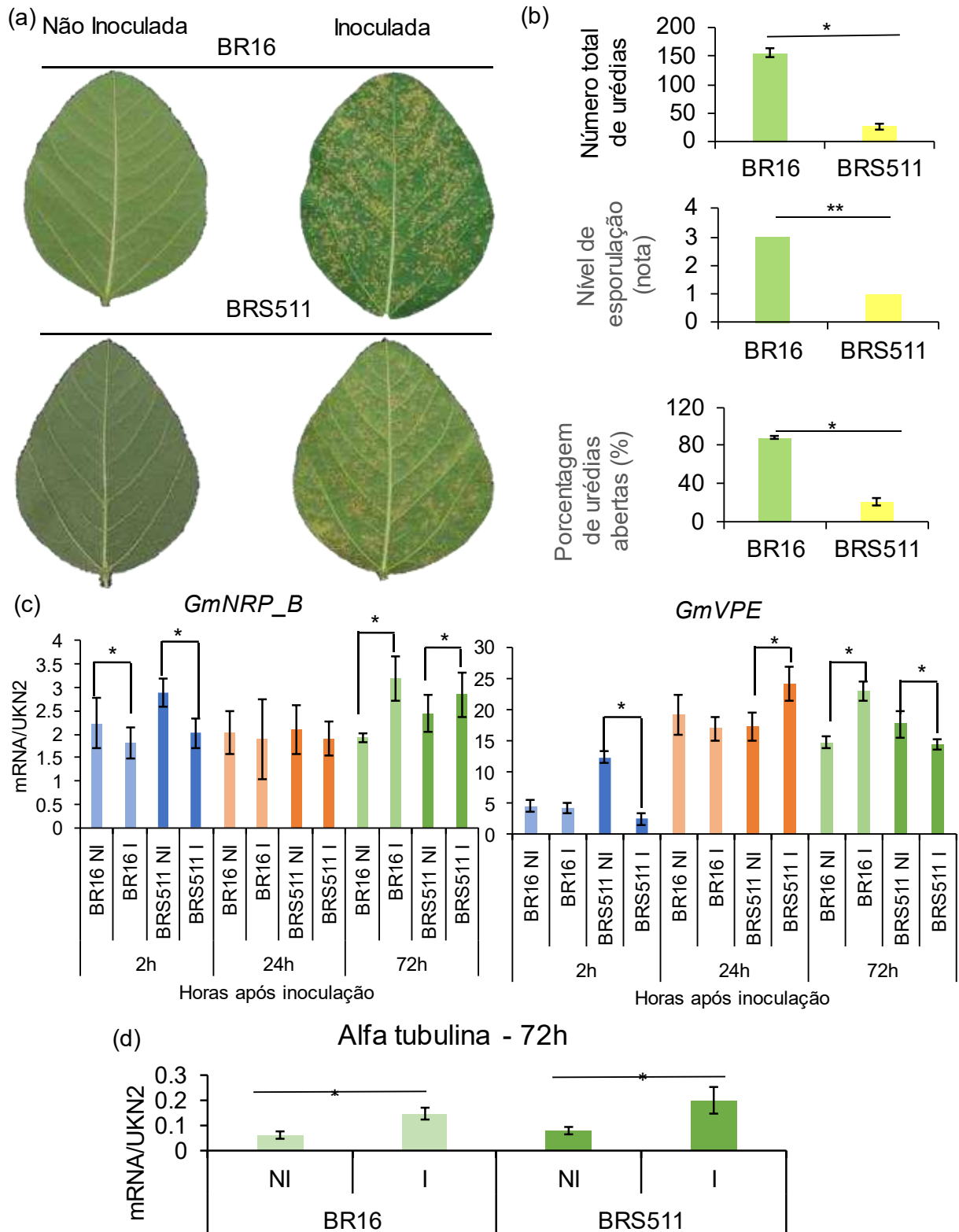


Figura 1 – A via de sinalização de morte celular mediada por DCD/NRP é induzida durante infecção por *Phakopsora pachirhyzi* em soja. Plantas de soja BR16 e BRS511 (V3/V4) cultivados em casa de vegetação foram inoculadas com *Phakopsora pachirhyzi*. A infecção foi confirmada 12 dias após inoculação com o fungo *Phakopsora pachirhyzi* por desenvolvimento de sintomas típicos de genótipos suscetíveis (BR16) e resistentes (BRS511) (a) Fenótipo qualitativo de folíolos; (b) Fenótipo quantitativo, barras (\pm desvio padrão) acompanhadas por um asterisco diferem entre si pelo teste t ($p < 0,05$). (c) Nível de transcritos *GmNRP-B* e *GmVPE*

após 2, 24 e 72 h após inoculação com o fungo. O nível de transcritos dos genes selecionados após inoculação com o fungo foi monitorado por RT-qPCR pelo método comparativo $2^{-\Delta Ct}$ normalizados para controle endógeno *Unknown2*, n = 3, barras (\pm desvio padrão) acompanhadas por um asterisco diferem entre si pelo teste t ($p < 0,05$), n = 3, (d) Nível de transcritos *alfa-tubulina* 72 h após inoculação com fungo.

Tanto na cultivar suscetível BR16, quanto na cultivar resistente BRS511, o gene *GmNRP-B*, *upstream* na via DCD/NRP, foi reprimido após 2 h de inoculação do fungo, um fenômeno revertido as 72 h pós-infecção (Figura 1c). Esta cinética de resposta de *GmNRP-B* ao fungo parece estar coordenada com uma resposta de morte celular observada no processo de infecção, apesar de se tratar de um patógeno biotrófico. A expressão do componente a jusante da via DCD/NRP, *VPE*, foi coordenada com a expressão de *GmNRP-B* em resposta ao patógeno, embora não tenha observado a repressão precoce (2 h pós-inoculação) de *VPE* em BR16 (Figura 1c). Entretanto, em BRS511, a expressão de *VPE* em resposta ao fungo foi induzida 24 h pós-inoculação e reprimida as 72 h após a inoculação. As análises 72 h após a inoculação incluíram também as variedades Conquista (suscetível) e TGM7262 (resistente; Figura 2). Os genes *GmNRP-B* e *GmNAC81* foram induzidos pelo fungo em Conquista, mas não na variedade resistente TGM7262 que apresentou a expressão dos genes da via DCD/NRP significativamente aumentada mesmo em condições normais. Coletivamente, estes resultados implicam, pelo menos em partes, a via DCD/NRP de morte celular em interações compatíveis e incompatíveis geradas por *P. pachyrhizi* em soja. Interessantemente, a expressão do gene *VPE* em TGM7262 foi muito superior do que em outras variedades testadas, ressaltando um possível mecanismo de resistência. Enquanto a variedade BRS511 possui o *locus* de resistência *Rpp5* que não codifica proteínas R em tandem do tipo *Rpp4-CC-NLR*, o *locus* de resistência de TGM7262, *Rpp4*, parece se relacionar com genes típicos de resistência NLRs.

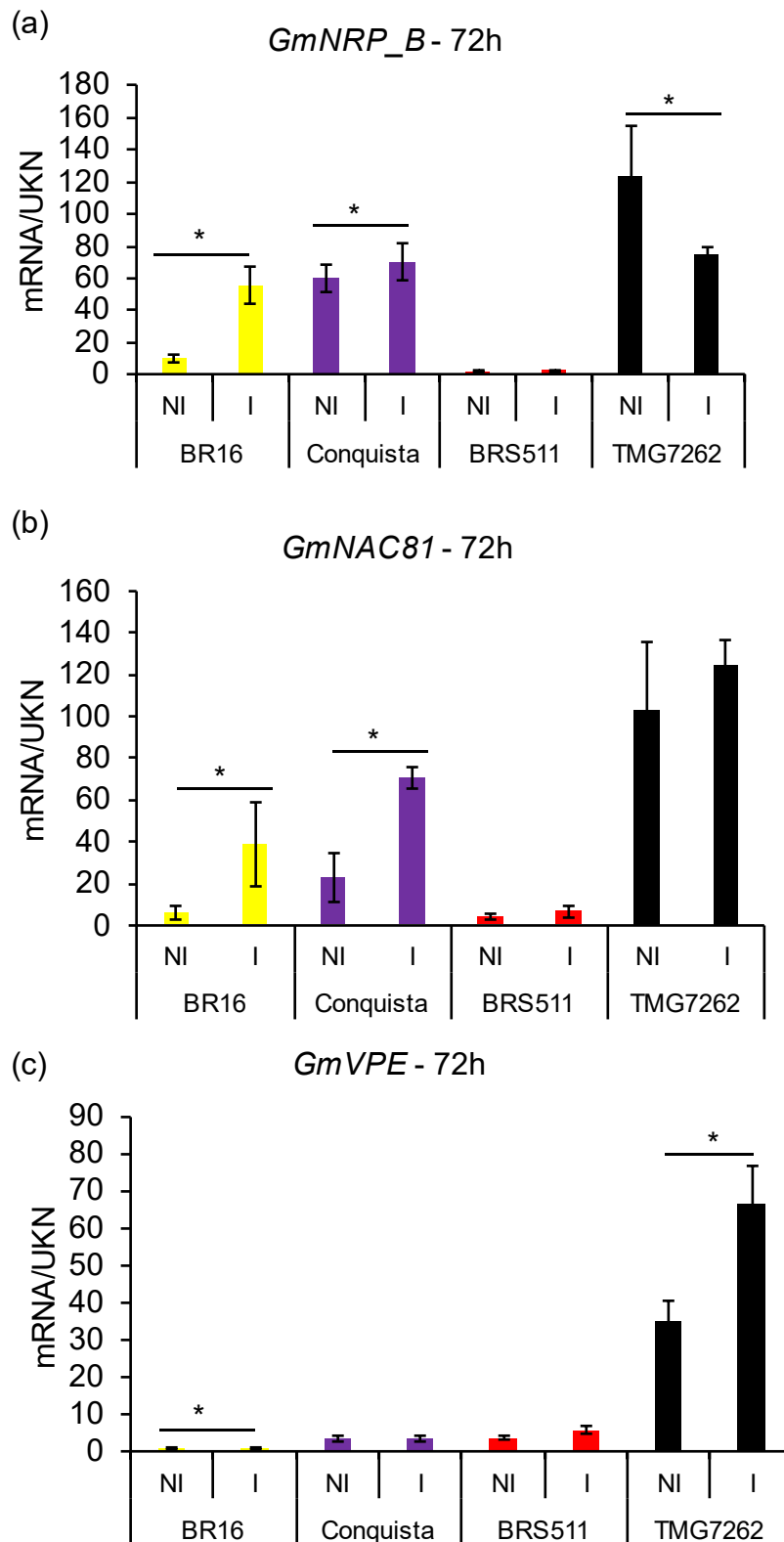


Figura 2 – A via de sinalização de morte celular mediada por DCD/NRP é constitutiva e altamente expressa em TGM7262. Plantas de soja BR16, Conquista, BRS511 e TMG7262 foram cultivadas em casa de vegetação até alcançarem o estágio V3/V4 quando foram inoculadas com o fungo *Phakopsora pachirhyzi*. Os níveis de transcritos de *GmNRP-B* (a), *GmNAC81* (b) e *GmVPE* (c) foram determinados por RT-qPCR 72 h pós-infecção, utilizando

o método comparativo $2^{-\Delta Ct}$ e o controle endógeno *Unknown2* como normalizador. Barras (\pm desvio padrão) acompanhadas por um asterisco diferem entre si pelo teste t ($p < 0,05$), $n = 3$.

3.2 MODULAÇÃO DA VIA DCD/NRP ALTERA O FENÓTIPO DA INFECÇÃO DE *P. pachyrhizi* EM SOJA

Dado que a expressão dos genes da via DCD/NRP em soja é alterada em resposta à *P. pachyrhizi* nas interações compatível e incompatível, levantou-se a hipótese de que esta via pudesse participar de um mecanismo de defesa contra o patógeno. Esta hipótese foi testada em plantas de soja expressando um modulador negativo da via DCD/NRP, *GmBiPD*, e um componente positivo da via de morte celular, *GmNAC81*.

O fungo *P. pachyrhizi* foi inoculado em plantas de soja estágio V3/V4 superexpressando a proteína BiPD e NAC81, além de seus respectivos controles não transformados, Conquista e BR16, respectivamente, e o fenótipo resultante da interação foi avaliado qualitativa (Figura 3) e quantitativamente (Figura 4a, 4b, 4c). Após 12 dias da inoculação, todos os genótipos avaliados desenvolveram sintomas típicos de interação suscetível tipo TAN, com abundância similar de urédias totais, sendo em média mais de 100 urédias em 30 lesões avaliadas para cada repetição. Em contraste, os genótipos BRS511 e TMG7262, que possuem genes de resistência já conhecidos, *Rpp4* e *Rpp5*, respectivamente, apresentaram lesão tipo RB (Figura 5), com média de menos de 10 urédias em 30 lesões avaliadas por repetição, estando praticamente todas fechadas (Figura 3a, 3c). Entretanto, a superexpressão de BiP e de NAC81 nos cultivares suscetíveis alterou a porcentagem de urédias abertas e fechadas em tendência opostas.

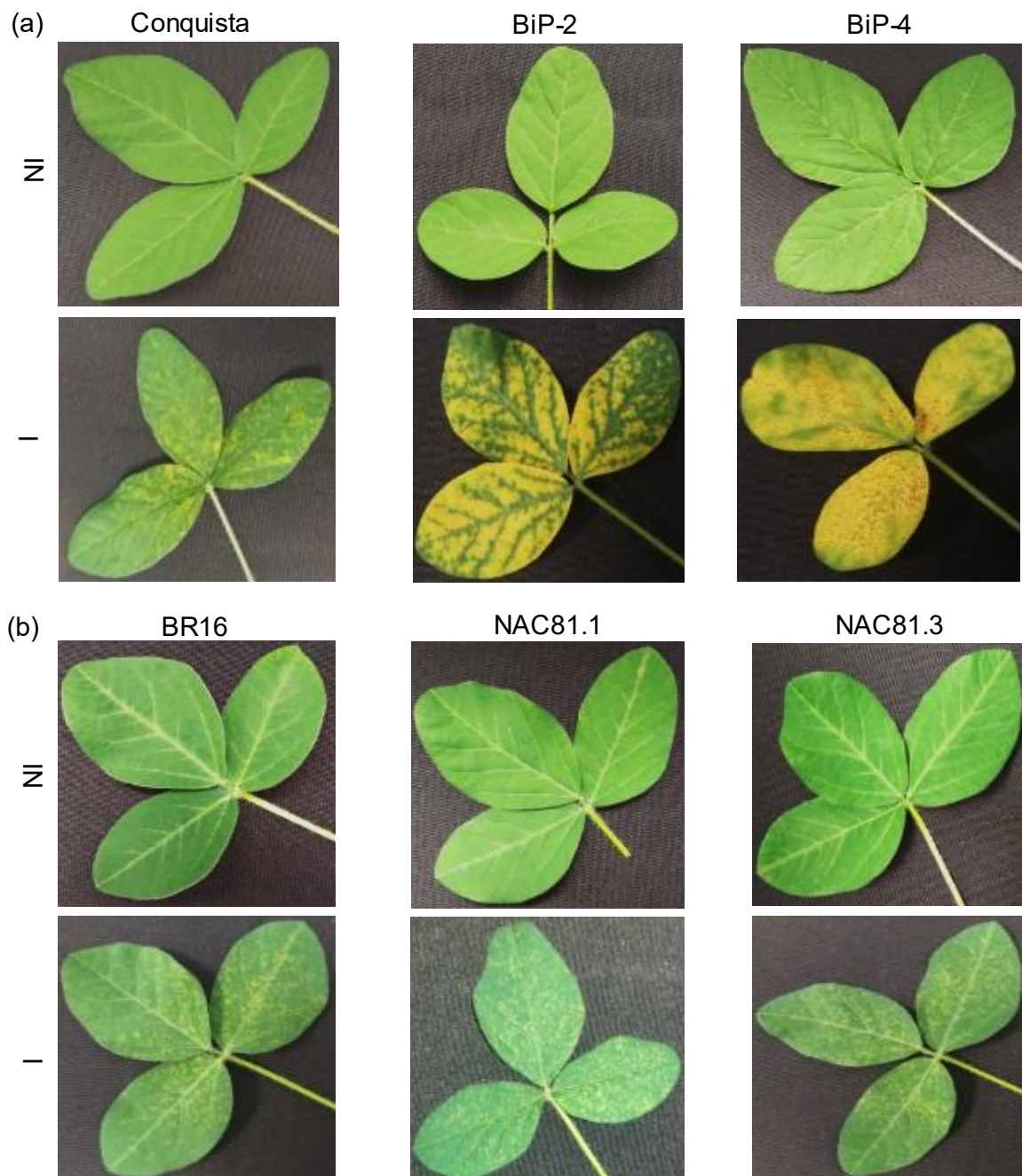


Figura 3 - Fenótipo qualitativo de trifólios de soja. Plantas V3/V4 cultivadas em casa de vegetação 12 dias após inoculação com o fungo *Phakopsora pachirhyzi*, (a) Conquista, BiP-2, BiP-4; (b) BR16, NAC81.1 e NAC81.3; não inoculadas (NI) e inoculadas (I), n =3.

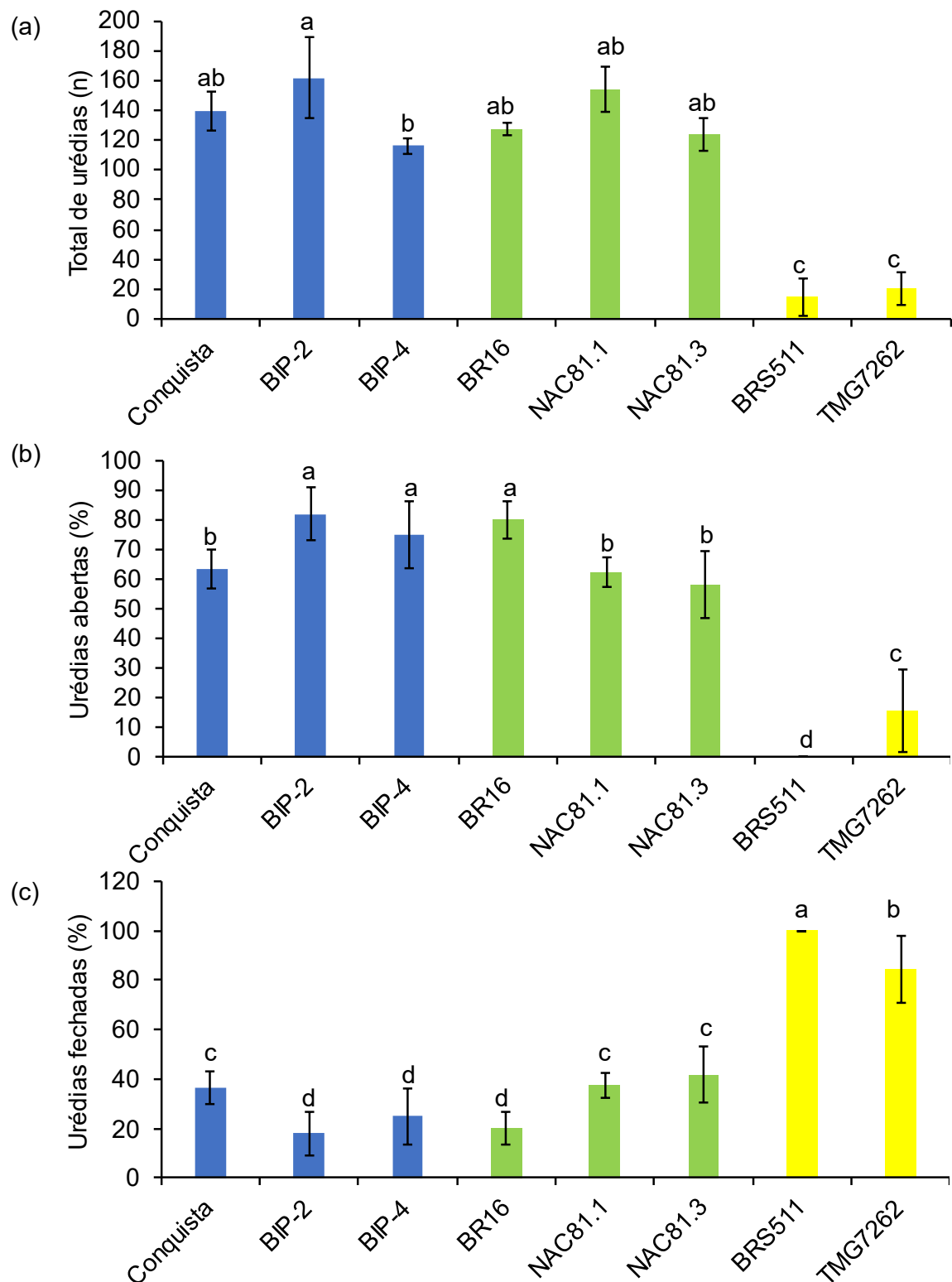


Figura 4 - Fenótipo quantitativo de plantas de soja. Plantas Conquista, BiP-2, BiP-4, BR16, NAC81.1, NAC81.3 BRS511 e TMG7262 (V3/V4) cultivados em casa de vegetação após 12 dias da inoculação com o fungo *Phakopsora pachirhyzi*, barras (\pm desvio padrão) acompanhadas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), $n = 3$. (a) Número de urédias totais; (b) porcentagem de urédias abertas; (c) porcentagem de urédias fechadas.

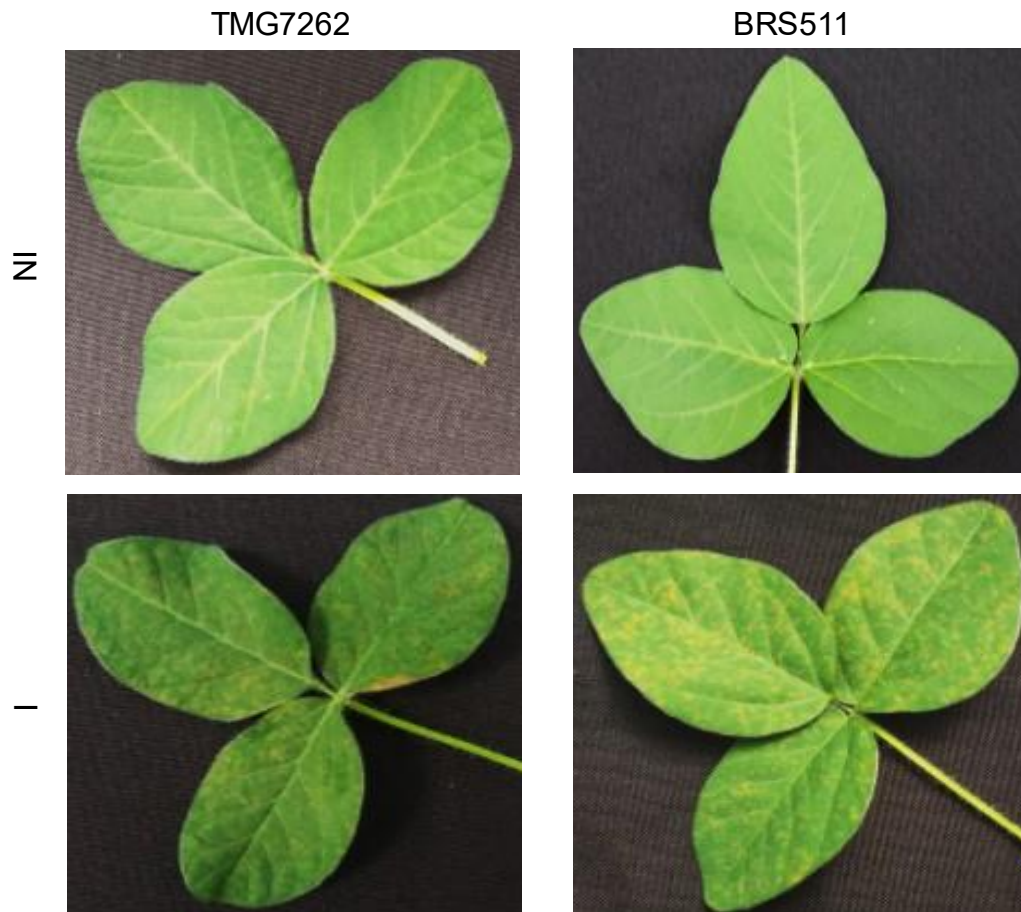


Figura 5 - Fenótipo qualitativo de trifólios de soja. Plantas V3/V4 cultivadas em casa de vegetação 12 dias após inoculação com o fungo *Phakopsora pachirhyzi* TMG7262 e BRS511; não inoculadas (NI) e inoculadas (I), n = 3.

Portanto, aos 12 dias após inoculação foi observado em plantas superexpressando *GmBiPD* (BiP-2 e BiP-4) maior porcentagem de urédias abertas (Figura 4b) em contraposto à porcentagem de urédias fechadas (Figura 4c) em comparação ao genótipo não transformado Conquista e as plantas superexpressando *GmNAC81* (NAC81.1 e NAC81.3). Em contraste, as plantas de soja superexpressando *GmNAC81* apresentaram sintomas opostos com menor porcentagem de urédias abertas e maior porcentagem de urédias fechadas em relação à planta não transformada BR16 e os genótipos BiP-2 e BiP-4 (Figura 4b e 4c). Essa alteração quanto ao tempo para urédias abrirem ou se manterem fechadas pode estar relacionado a alterações para o fungo completar seu ciclo, em que plantas de BiP de alguma maneira podem estar propiciando melhores condições para o desenvolvimento do fungo e assim ele consegue esporular mais rapidamente, enquanto as plantas superexpressando *GmNAC81* retardam o ciclo

de vida do fungo. Outra alteração observada aos 12 dias após a inoculação, foi a presença de um acentuado amarelecimento em plantas BiP-2 e BiP-4 inoculadas em relação aos demais genótipos avaliados (Figura 3a) o que pode ser em decorrência do desenvolvimento do fungo mais acelerado nestes genótipos, corroborando com a maior porcentagem de urédias abertas, ao contrário do observado para plantas superexpressando *GmNAC81* que permaneceram verdes com maior porcentagem de urédias fechadas (Figura 3b, 4c).

3.3 A VIA DCD/NRP É ALTERADA EM PLANTAS SUPEREXPRESSANDO *GmBiPD*

Foi demonstrada que a proteína de ligação (BiP) atenua o estresse do retículo endoplasmático e a morte celular induzida por estresse osmótico, e que esses eventos estão correlacionados com a modulação da sinalização de morte celular mediada por proteína rica em Asparagina (NRP) (Valente et al., 2009; Faria et al., 2011; Reis et al., 2016). Além disso, BiP tem sido correlacionada com a imunidade inata (Wang et al., 2005; Carvalho et al., 2014a; Rodrigues et al., 2021). Plantas de soja superexpressando BiP foram molecularmente caracterizadas (Valente et al., 2009) e demonstraram apresentar uma resposta hipersensitiva acelerada que é desencadeada por *P. Syringae* pv tomato em *Nicotiana benthamiana* e soja (Carvalho et al., 2014a; Rodrigues et al., 2021). As plantas analisadas neste estudo superexpressando BiP (BiP-2 e BiP-4) acumulam diferentes níveis da proteína, mas que são funcionalmente ativas (Valente et al., 2009). Nestas mesmas plantas, em um estudo de transcriptoma de folhas de sojas cultivadas em condições normais, foi observado uma predominância de genes de defesa *up*-regulados, bem como de genes relacionados ao sistema imunológico, como genes envolvidos em resposta de hipersensibilidade desencadeada em uma interação não compatível (Carvalho et al., 2014b). Entretanto, o fenótipo desenvolvido pelo fungo em plantas superexpressando BiP observado nesta investigação indica um efeito oposto de BiP, aumentando a suscetibilidade ao fungo em soja. Assim, avaliamos o perfil de expressão dos genes relacionados à via DCD/NRP em folhas de soja superexpressando BiP que apresentaram um processo de suscetibilidade maior induzido por *P. phachyrhizi*.

Inicialmente foi examinado a cinética de indução do gene *GmVPE*, que executa o processo de morte celular. Consistente com os resultados anteriores, *GmVPE* é induzido pelo fungo no cultivar suscetível Conquista, porém um incremento acentuado na indução de *GmVPE* é observado em plantas BiP-4 alcançando altos níveis de indução a partir de 168 h após

inoculação (Figura 5a). Foi observada indução significativa de VPE em plantas BiP-4 não inoculadas, após 24 h, o que provavelmente foi devido a permanências dessas plantas no escuro nas 24 horas iniciais após inoculação. O gene *DCD/NRP* (*GDA, B2*) de trigo, posicionado à montante da via de sinalização de morte celular, é fortemente induzido pelo escuro (Li et al., 1998), acarretando assim em indução de *VPE* pelo escuro. Consequentemente, os resultados de indução da via de sinalização de morte celular mediada por *DCD/NRPs* a 24 h pós-inoculação devem ser interpretados com cautela levando-se em consideração que uma parcela de indução pode ser simplesmente devido ao artefato da técnica artificial de inoculação do fungo.

Considerando o curso da infecção, é possível que em 24 h esteja ocorrendo a penetração do fungo (injúria) e as 72 h, reconhecimento de proteínas do fungo pela planta, já que o haustório poderia estar totalmente formado. Assim sendo a expressão dos demais genes envolvidos na via *DCD/NRP* foi avaliada 24 h e 72 h pós-inoculação. Após 24 h de inoculação com o fungo *P. phachyrhizi*, não houve indução da expressão dos genes *GmNRP-B* e *GmNAC81* (Figura 6b), não apresentando diferença significativa entre as plantas não inoculadas e inoculadas em todos os genótipos avaliados. Entretanto, o acúmulo dos transcritos dos genes *GmNRP-B* e *GmNAC81* foi superior nas linhagens superexpressando BiP, mesmo na ausência do fungo, quando comparado com a variedade controle, Conquista. Sendo um componente a jusante da via *DCD/NRP* e alvo direto de *GmNAC81*, a expressão aumentada de *GmNAC81* em linhagens superexpressando BiP levam ao aumento de expressão de *GmVPE* nestas linhagens.

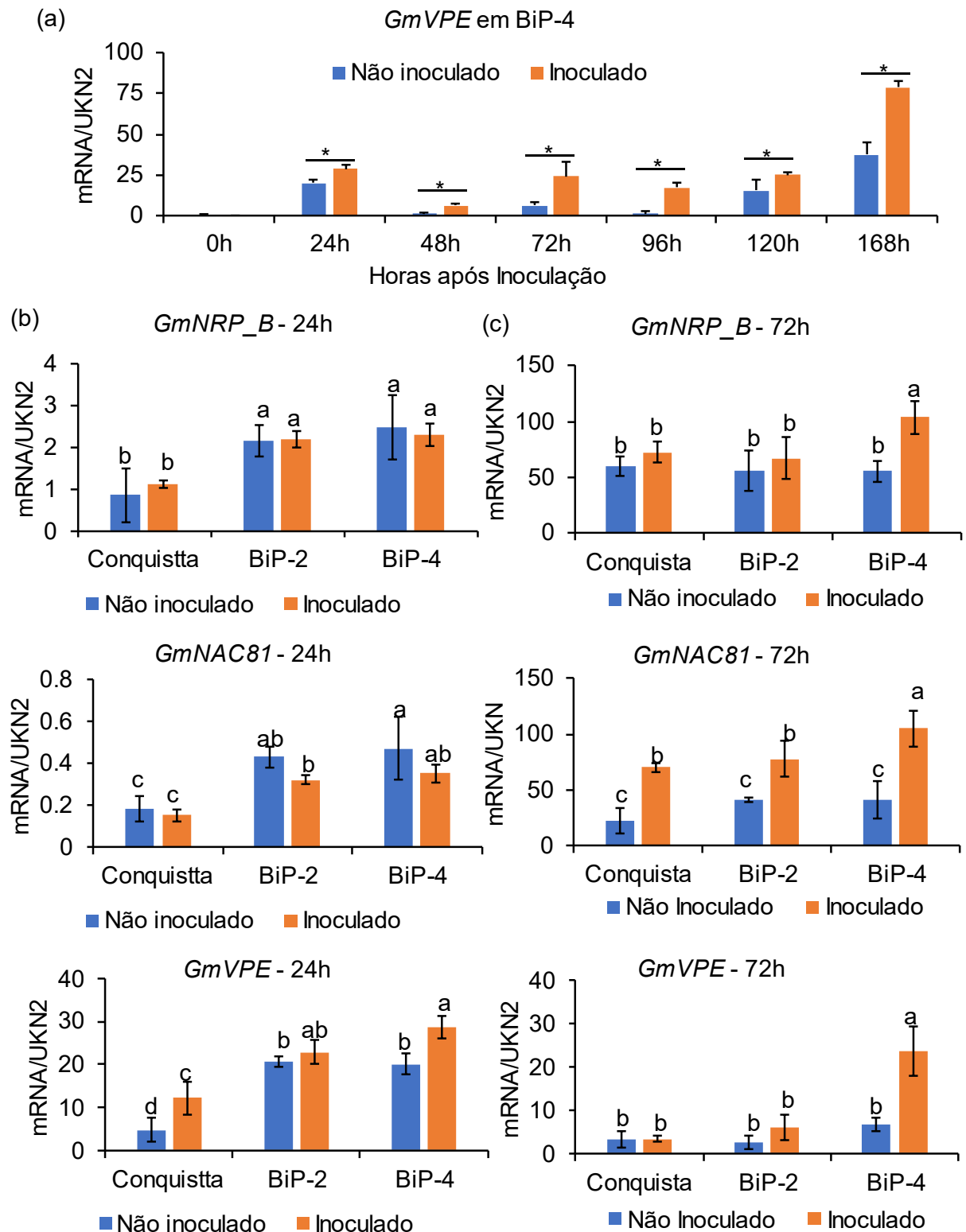


Figura 6 – Indução da via DCD/NRP em plantas de soja Conquista, BiP-2 e BiP-4 (V3/V4) cultivados em casa de vegetação em resposta ao fungo *Phakopsora pachirhyzi*. (a) Nível de transcritos de *GmVPE* em plantas BiP-4 analisados ao longo de 0, 24, 48, 72, 96, 120, 168 h após a inoculação. A expressão relativa de *VPE* foi monitorada por RT-qPCR utilizando o método comparativo $2^{-\Delta C_t}$ e normalizados pelo endógeno *Unknown2*. As barras (\pm desvio padrão) acompanhadas por um asterisco diferem entre si pelo teste t ($p < 0,05$), $n = 3$. (b, c) Nível de transcritos de *GmNRP-B*, *GmNAC81* e *GmVPE* em plantas, Conquista, BiP-2 e BiP-4

(b) 24h após inoculação, (c) 72h após inoculação. Barras (\pm desvio padrão) acompanhadas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), $n = 3$.

72h após inoculação observou-se um aumento da expressão dos genes *GmNRP-B*, *GmNAC81*, *GmVPE* (Figura 6c) *PR1* e *PR5* (Figura 7a, 7b) em uma intensidade maior nos genótipos superexpressando BiP (BiP-2 e BiP-4) comparados com Conquista, (Figura 6c). A presença do fungo foi confirmada pela expressão de alfa-tubulina nas plantas inoculadas e não detecção em plantas não inoculadas (Figura 7c). Este aumento da expressão dos genes da via, em geral, foi mais pronunciada nas plantas transgênicas, indicando que a via DCD/NRP poderia estar sendo mais ativa nestas linhagens em consequência de interações com o fungo. Consistentes com estes resultados, tem sido demonstrado que em interações *Pseudomonas* x Tabaco a atenuação da via DCD/NRP por BiP é superada pela ativação da via DCD/NRP em resposta a altas concentrações de ácido salicílico (AS) (Carvalho et al., 2014). Este efeito positivo de BiP na via de sinalização DCD/NRP não é devido à falha de BiP regular a via de resposta a proteínas mal dobradas no RE (UPR), porque em plantas superexpressando BiP a indução de marcadores da UPR (*GmCNX*, Figure 7h) é atenuada em relação ao controle. Considerando que a via de sinalização de morte celular mediada por DCD/NRPs não é específica de estresse no RE, mas responde a múltiplos estresses, é possível que a infecção com o fungo esteja fornecendo elicitores adicionais da via de morte celular.

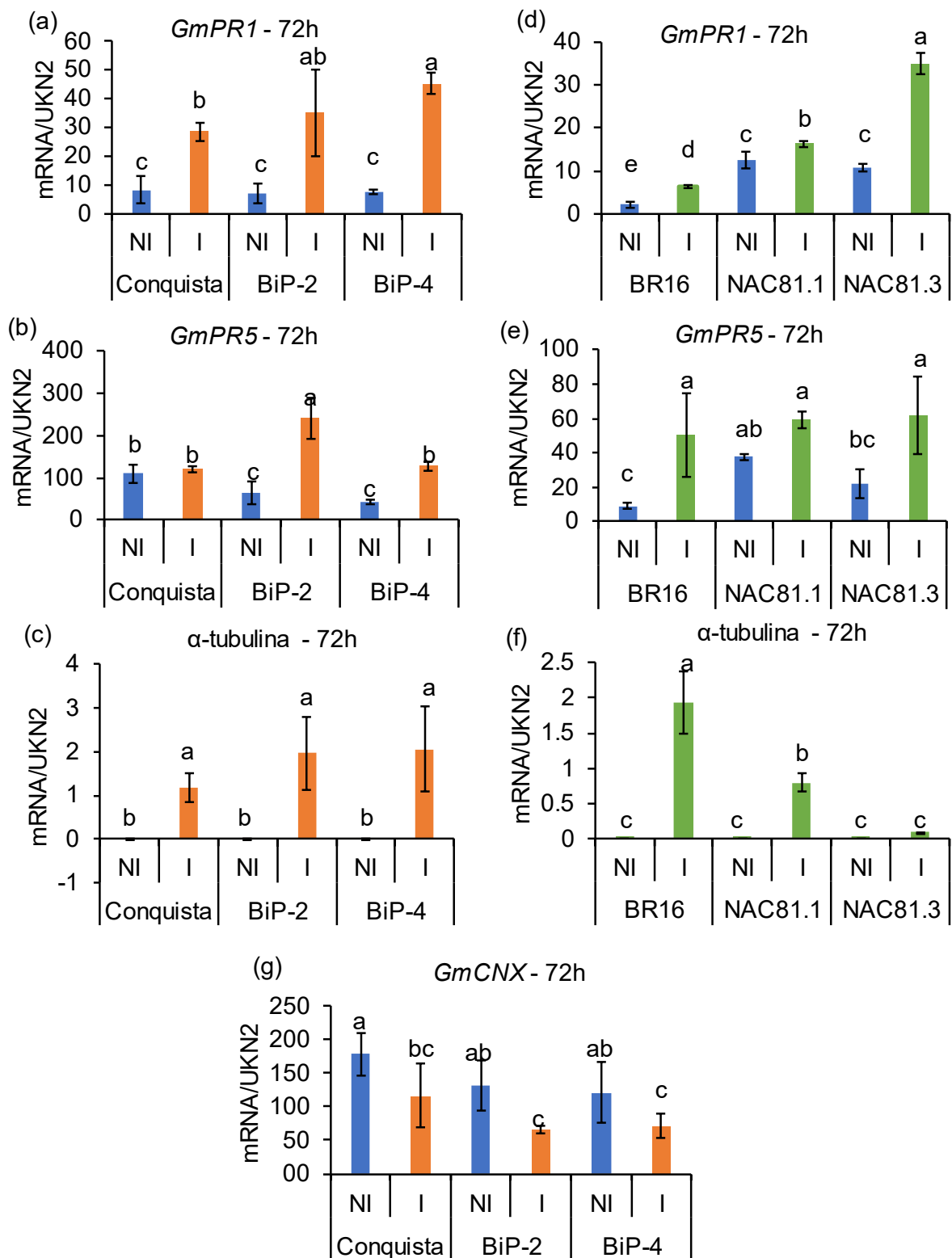


Figura 7 - Indução de genes PRs e marcadores de UPR em plantas de soja (V3/V4) cultivadas em casa de vegetação inoculadas com o fungo *Phakopsora pachirhyzi*. Nível de transcritos em plantas Conquista, BiP-2 e BiP-4 não inoculadas (azul) e inoculadas (laranja) para genes (a) *PR1*, (b) *PR5*, (c) α -tubulina, (g) *GmbZIP38* e (h) *GmCNX* foram determinados por RT-qPCR utilizando o método comparativo $2^{-\Delta C_t}$ e o normalizador endógeno *Unknown2*, 72 h após inoculação. Nível de transcritos em plantas BR16, NAC81.1 e NAC81.3 não inoculadas (azul)

e inoculadas (verde) dos genes (d) *PRI*, (e) *PR5* e (f) alfa-tubulina. Barras (\pm desvio padrão) acompanhadas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), $n = 3$.

3.4 A VIA DCD/NRP É ALTERADA EM PLANTAS SUPEREXPRESSANDO *GmNAC81*

GmNAC81 é um componente *downstream* da sinalização de morte celular mediada por DCD/NRP induzida por vários estresses. Em plantas de soja superexpressando esse gene foi confirmado o papel essencial de *GmNAC81* como um regulador positivo da senescência foliar programada para o desenvolvimento e um regulador negativo na resposta à seca (Pimenta et al., 2016; Ferreira et al., 2020). Recentemente, o transcriptoma induzido por *GmNAC81* no estágio V2/V3 revelou regulação negativa de genes responsivos à seca e ABA, e regulação positiva de genes relacionados à defesa de plantas (como proteínas PRs) (Ferreira et al., 2020). Nesta investigação, foi demonstrado que a superexpressão de *GmNAC81* em BR16 atenuou o amarelecimento das folhas na presença do fungo, e promoveu uma diminuição na porcentagem de urédias abertas, retardando o ciclo de vida do fungo quando comparadas com o controle BR16. Dado que *VPE* é um dos genes alvos do transativador *GmNAC81*, foi analisada a cinética de indução do gene *GmVPE* pelo fungo na linha transgênica NAC81.3 (Figura 8a). A expressão de *GmVPE* em GmNAC81.3 foi induzida após 72 horas de inoculação. Entretanto, esta indução da expressão de *GmVPE* em resposta ao fungo nas linhagens NAC81.3 não parece estar coordenado com o aumento da expressão do gene *GmNAC81* nesta linhagem (Figura 7b). Sendo *VPE* alvo direto do transativador NAC81, tanto em plantas não inoculadas quanto em plantas inoculadas, os níveis de transcrito de *VPE* é muito superior nas linhagens NAC81.1 e NAC81.3 em relação à linhagem controle BR16. O grau diferenciado de suscetibilidade entre as linhagens superexpressando *GmNAC81* comparadas com o controle BR16 correlaciona com o nível da expressão de *VPE* nestas linhagens.

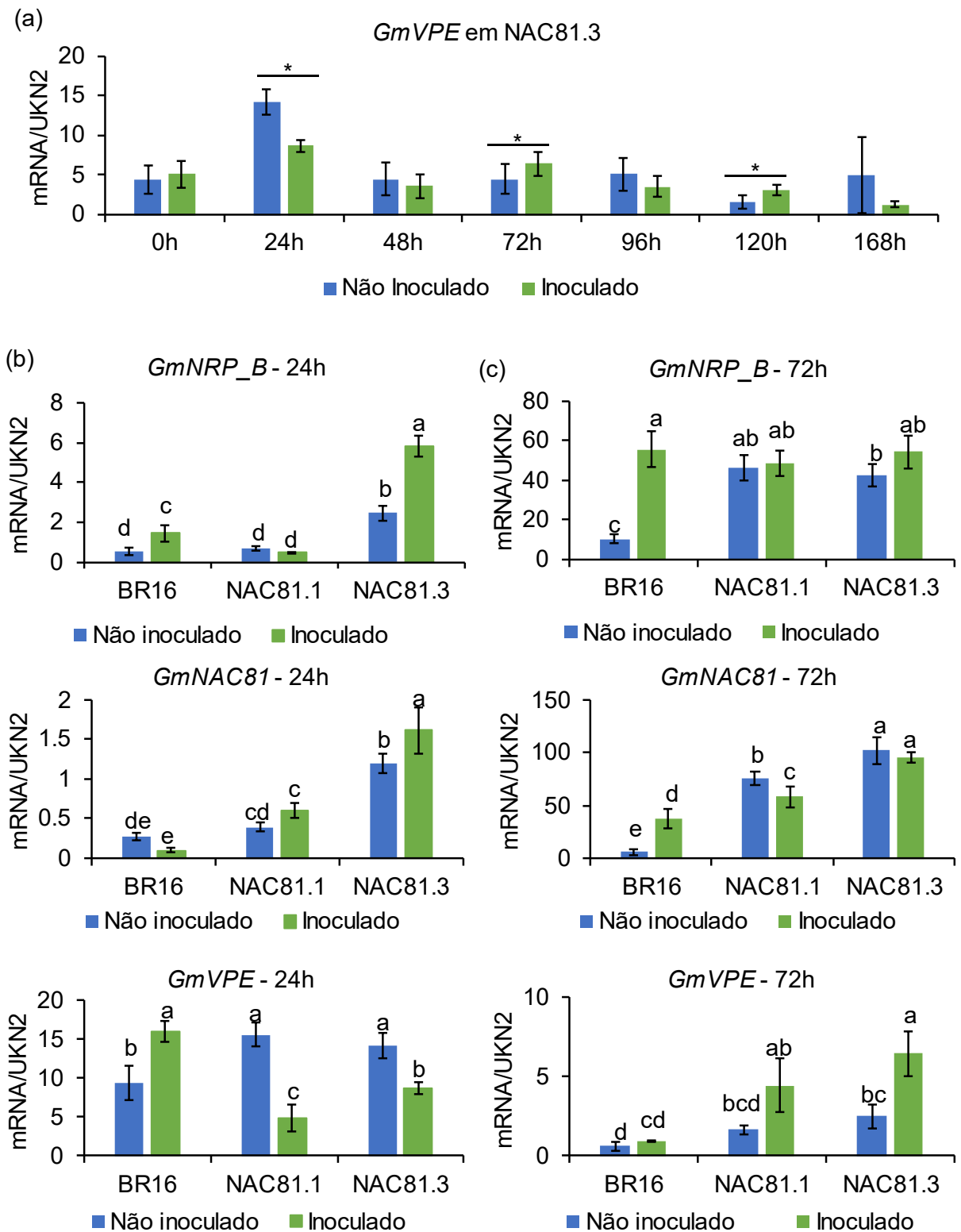


Figura 8 – A superexpressão de *GmNAC81* em BR16 aumenta a expressão constitutiva e indução de VPE pelo fungo *Phakopsora pachirhyzi*. (a) Nível de transcritos de *GmVPE* em plantas NAC81.1 analisados ao longo de 0, 24, 48, 72, 96, 120, 168 h após inoculação. A expressão relativa de VPE foi monitorada por RT-qPCR utilizando o método comparativo $2^{-\Delta Ct}$ e o normalizados pelo endógeno *Unknown2*. As barras (\pm desvio padrão) acompanhadas por um asterisco diferem entre si pelo teste t ($p < 0,05$), $n = 3$. (b, c) Nível de transcritos de *GmNRP-B*, *GmNAC81* e *GmVPE* em plantas BR16, NAC81.1 e NAC81.2 (b) 24h após inoculação, (c)

72h após inoculação. A expressão relativa dos genes foi monitorada por RT-qPCR utilizando o método comparativo $2^{-\Delta C_t}$ e o normalizados pelo endógeno *Unknown2Barras* (\pm desvio padrão) acompanhadas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), $n = 3$.

Após 72 h de inoculação, plantas não transformadas BR16 apresentaram indução dos genes da via *GmNRP-B*, *GmNAC81* e *GmVPE* em relação ao controle não inoculado (Figura 8c). A infecção pelo fungo foi confirmada monitorando a expressão de alfa-tubulina nas plantas inoculadas e não detectada em plantas não inoculadas (Figura 7f) em todos os genótipos analisados. Nas linhagens superexpressando *GmNAC81*, NAC81.1 e NAC81.3, a indução dos componentes da via pelo fungo foi atenuada em relação ao controle não inoculado, porém alcançando um nível de expressão dos respectivos genes superior ao da linhagem não transformada, BR16, inoculada com o fungo 6 (Figura 8c). A maior expressão dos genes da via resultando em maior indução de *GmVPE* pelo fungo pode contribuir para o retardamento do ciclo do fungo nestas linhagens.

3.5 METABOLISMO HORMONAL DE PLANTAS DE SOJA EM INTERAÇÕES COMPATÍVEIS E INCOMPATÍVEIS SOB INFECÇÃO COM *P. phachyrhizi*

Tem sido demonstrado que a indução dos genes da via de morte celular mediada por DCD/NRP em resposta à seca (Valente et al., 2009), indutores de estresses osmótico e no retículo endoplasmático (Reis et al., 2011), senescência natural (Carvalho et al., 2014) e toxicidade de Cd (CapI) é atenuada em plantas superexpressando BiP. Entretanto, em interações incompatíveis foi observado que a atenuação da via DCD/NRP por BiP é superada pela ativação da via DCD/NRP em resposta a altas concentrações de ácido salicílico (AS) (Carvalho et al., 2014). Consistentemente, os genes da sinalização de morte celular por DCD/NRP são induzidos por uma série de estresses abióticos, além de AS e ABA (Pimenta et al., 2016). Com a finalidade de examinar a relação entre a infecção pelo fungo com as alterações da via DCD/NRP em genótipos de soja que apresentam suscetibilidade e resistência, os níveis endógenos dos hormônios AS, ABA, JA e MeJa foram examinados 72h após inoculação.

A concentração de AS e ABA aumentou em todos os genótipos analisados nas plantas inoculadas, sendo maior nas plantas BiP-2 e BiP-4 em relação ao controle não inoculado (Figura 9a, 9b). O ácido jasmônico (JA) aumentou apenas para planta inoculada no genótipo Conquista, mas não alterou nos genótipos superexpressando BiP (BiP-2 e BiP-4) (Figura 9c).

O hormônio metil jasmonato não sofreu alteração frente a inoculação com o fungo nas linhagens de BiP, para Conquista apresentou uma diminuição em sua produção (Figura 9d).

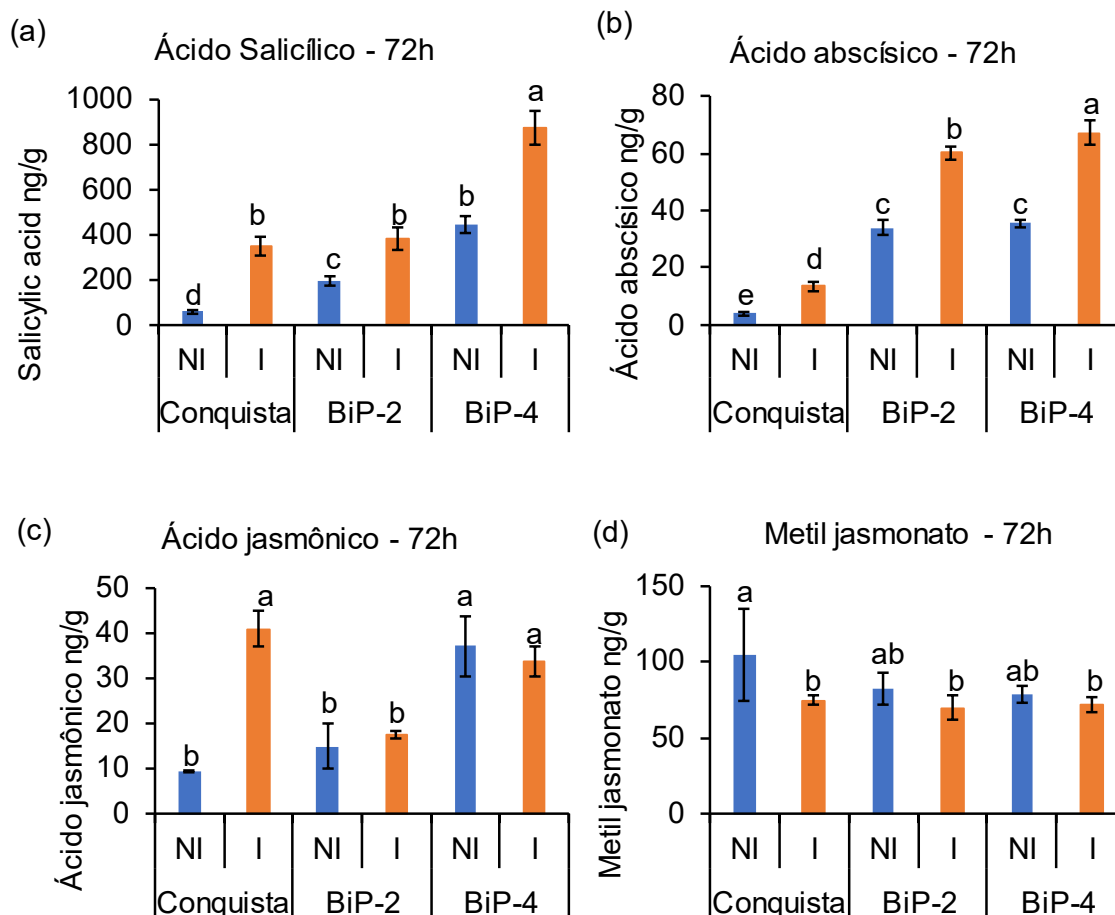


Figura 9 – Perfil hormonal em plantas de soja Conquista, BiP-2 e BiP-4 (V3/V4) cultivadas em casa de vegetação inoculadas com o fungo *Phakopsora pachirhyzi*. Os hormônios foram extraídos com solução de metanol, isopropanol e ácido acético 20:79:1 (v/v/v) e analisados em sistema LC/MS acoplado online a um espectrômetro de massa QqQ triplo quadrupolo. Os valores de área foram convertidos usando o programa Excel em ng/g (hormônio vegetal/tecido vegetal fresco). Plantas não inoculadas (azul) e inoculadas (laranja) com o fungo 72 h após inoculação. (a) Nível de ácido salicílico (AS), (b) Nível de ácido abscísico (ABA), (c) Nível de ácido jasmônico (JA), (c) Nível de metil Jasmonato. Barras (\pm desvio padrão) acompanhadas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), $n = 3$.

Após 72h de inoculação, o perfil hormonal em plantas BR16, NAC81.1 e NAC81.3 inoculadas comparado com as não inoculadas apresentaram aumento para AS, ABA e JA, sendo maior nas plantas superexpressando *GmNAC81* (Figura 10a, 10b, 10c). Para metil jasmonato observou-se uma tendência de queda, mais pronunciado na linhagem NAC81.3 (Figura 10d), isso possivelmente ocorreu devido à diferença no nível de expressão do transgene nessas

linhagens. Estes resultados claramente indicam que a infecção pelo fungo provocou uma alteração na homeostase de hormônios, aumentando significamente a concentração de AS e ABA, indutores da via de sinalização de morte celular mediada por DCD/NRP.

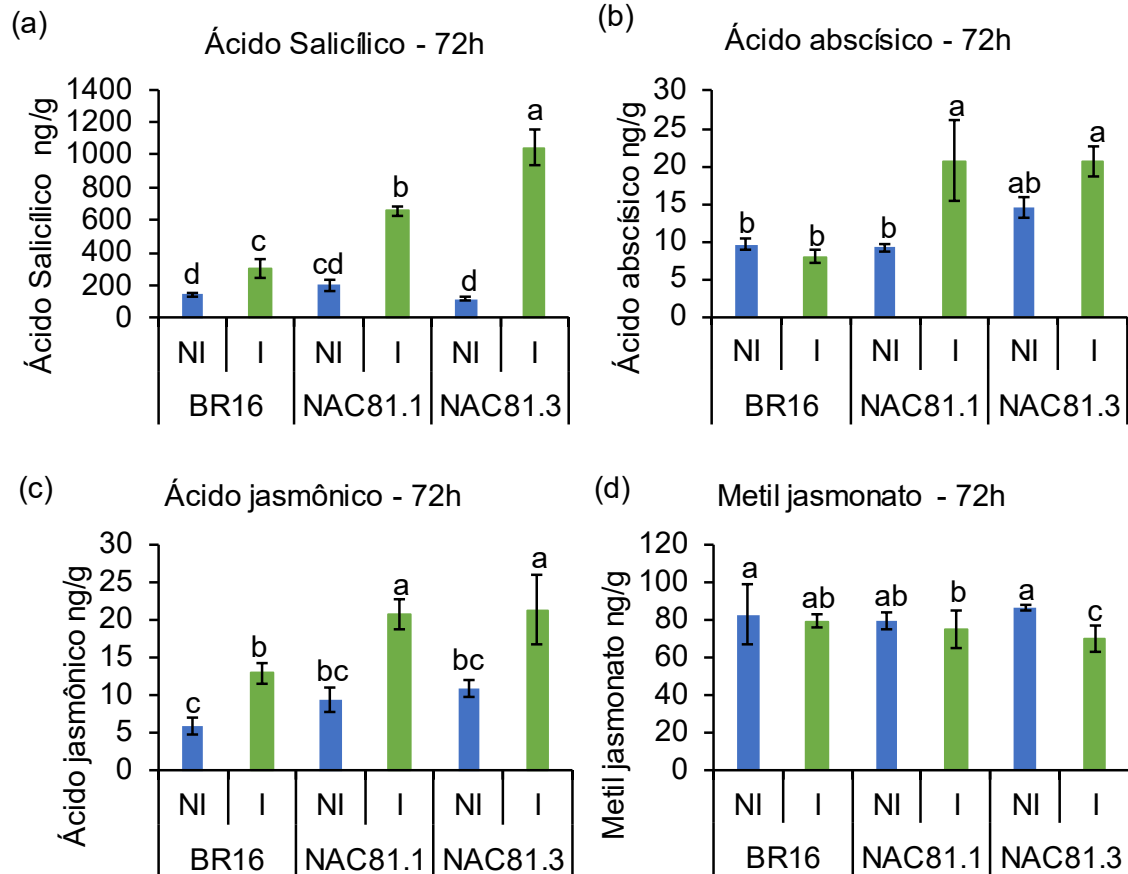


Figura 10 - Perfil hormonal em plantas de soja BR16, NAC81.1 e NAC81.3 (V3/V4) cultivadas em casa de vegetação inoculadas com o fungo *Phakopsora pachirhyzi*. Os hormônios foram extraídos com solução de metanol, isopropanol e ácido acético 20:79:1 (v/v/v) e analisados em sistema LC/MS acoplado online a um espectrômetro de massa QqQ triplo quadrupolo. Os valores de área foram convertidos usando o programa Excel em ng/g (hormônio vegetal/tecido vegetal fresco). Plantas não inoculadas (azul) e inoculadas (laranja) com o fungo 72 h após inoculação. (a) Nível de ácido salicílico (AS), (b) Nível de ácido abscísico (ABA), (c) Nível de ácido jasmônico (JA), (c) Nível de metil Jasmonato. Barras (\pm desvio padrão) acompanhadas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), $n = 3$.

4. DISCUSSÃO

O potencial de perdas pela infecção de *P. pachyrhizi* juntamente com sua introdução nos principais países produtores de soja gerou interesse no entendimento das interações moleculares envolvendo o fungo, a soja, interações compatíveis e incompatíveis (Hoefle et al, 2009; Goellner et al, 2010). A compreensão que a via DCD/NRP é alterada em interações compatíveis e incompatíveis de soja com o fungo *P. pachyrhizi*, identificadas nesse estudo, presume que reações de defesa semelhantes estão ativas na resistência hospedeira (compatível) e não hospedeira (incompatível) (Loehrer et al., 2008). Aparentemente, um patógeno tem que suprimir a defesa da planta para ter sucesso em seu desenvolvimento (Chisholm, et al., 2006, Hüchelhoven, 2007, Thordal-Christensen, 2003). Portanto, uma reação de repressão da via DCD/NRP com duas horas após inoculação em BR16 e BRS511 parece condizente com uma resposta de defesa da planta na tentativa de impedir a morte celular epidérmica e assim detectar e ativar respostas de defesa contra o fungo. No entanto, ocorre a morte celular epidérmica pela penetração do patógeno e desenvolvimento das hifas fúngicas, tanto na reação compatível, quanto na incompatível. Após penetração ocorre a formação do apressório na grande maioria das células penetradas das plantas susceptíveis (Schneider et al., 2011), mecanismo que pode estar associado a indução da via DCD/NRP. As células epidérmicas penetradas tornam-se principalmente necróticas e o fungo invade o mesófilo. O papel da morte celular epidérmica para resistência ou patogênese não é conhecido (Hoefle et al., 2009).

Nas interações incompatíveis entre *P. pachyrhizi* e *Arabidopsis*, as células epidérmicas acumulam H_2O_2 , o que provavelmente orquestra a morte celular epidérmica observada (Loehrer et al., 2008). Além disso, foi detectada a expressão de PDF1.2, gene de resposta a necrotróficos envolvido nas fases iniciais do fungo, sugerindo que *P. pachyrhizi*, um biotrófico, mimetiza aspectos de um necrotrófico em estágios iniciais da infecção (Barros et al., 2020). Portanto, a morte celular epidérmica não é capaz de impedir o desenvolvimento do fungo. As hifas crescem continuando o processo de infecção. Os estágios da infecção são semelhantes entre as interações compatíveis e incompatíveis, com germinação de esporos, formação de apressório e penetração epidérmica. Entretanto, em interações incompatíveis, o crescimento do fungo é interrompido ou limitado após a penetração (Keogh et al., 1980; McLean & Byth, 1981). Nesse processo, em genótipos resistentes, ocorre a reação de hipersensitividade (HR). Nesse contexto, HR inclui uma forma de morte celular programada (PCD) que dependente de um metabolismo ativo da célula atacada (Greenberg, Yao, 2004; Heath, 2000), enquanto em plantas susceptíveis o fungo continua seu desenvolvimento (Loehrer et al., 2008).

Consistente com HR, observamos a via DCD/NRP aumentada com 72h após inoculação em BRS511 (resistente), mas também no genótipo suscetível BR16, indicando mecanismos comuns de resposta de defesa para as interações. Interessantemente, a expressão dos componentes da via DCD/NRP de morte celular é significativamente aumentada mesmo na ausência do fungo no cultivar resistente TGM7262. Neste cultivar, após 72 h da inoculação com o fungo, a expressão de VPE é pelo menos 10 vezes superior às linhagens NAC81.1 e NAC81.3, superexpressando *GmNAC81* (compare Figura 2 com Figura 8), e aproximadamente 20 vezes superior às linhagens suscetíveis, BR16 e Conquista, (Figura 2), o que deve contribuir para a indução de HR das linhagens TGM7262. Este cenário indica que a ativação constitutiva da via DCD/NRP de morte celular e, conseqüentemente, expressão significativamente aumentada de VPE pode ser um componente da via de resistência de TGM7262. Consistente com esta interpretação, a introdução de um alelo de 35S:BiP, regulador negativo da via DCD/NRP, diminui a resistência contra *P. pachyrhizi* no *background* genético TGM7262 (Marcia Flores, comunicação pessoal). Consistente com a participação de VPE em mecanismos de resistência, foi demonstrado, nesta investigação, que a superexpressão do transativador do gene VPE, *GmNAC81*, diminui a suscetibilidade ao fungo em BR16.

HR é um processo precedido em muitas interações com um aumento de Ca^{2+} citosólico, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (Heath, 2000; Ma & Berkowitz, 2007; Xu & Heath, 1998). HR compartilha muitas características com a morte observada pelo fenótipo da ativação da via DCD/NRP em interações incompatíveis de soja com *Pseudomonas syringae* pv tomato (Carvalho et al., 2014b; Rodrigues et al., 2021). A PCD em animais depende da atividade da caspase protease, e, em plantas, a enzima de processamento vacuolar (VPE), está implicada na PCD durante HR, na patogênese e no desenvolvimento com propriedades enzimáticas semelhantes à caspase-1 animal (Hatsugai et al., 2015). Tem sido demonstrado que a deficiência de VPE previne a morte celular hipersensível induzida por vírus em plantas de tabaco, e não interfere com a produção de proteínas relacionadas à patogênese (PR) (proteínas de defesa) (Hatsugai et al., 2004). Estes resultados indicam que HR envolve dois processos independentes, PCD, regulada por VPE, e indução de proteínas de defesa (Hara-Nishimura et al., 2005). VPE aparece rapidamente no início de HR induzida pelo TMV e diminui antes do aparecimento das lesões. Assim, as plantas desenvolveram uma estratégia regulada de suicídio celular que, ao contrário de PCD dos animais, é mediada por VPE e pelo vacúolo celular (Hatsugai et al., 2004). Estas descobertas mostram que VPE exibindo atividade semelhante à caspase-1 é essencial para uma etapa da morte celular hipersensível induzida por vírus (Kuriyama & Fukuda, 2002; Lam, 2004; Van Doorn et al., 2005). Os resultados dessa

investigação indicam que provavelmente VPE esta também envolvida em HR na interação soja: *P. pachyrhizi*.

A proteína BiP-D atua na regulação de diversos processos celulares de plantas. A superexpressão de BiP em plantas transgênicas de tabaco e soja aumenta a tolerância a estresse hídrico, provoca um atraso no processo de senescência e atenua o estado de estresse do RE causado por tunicamicina, sendo esses fenótipos associados a modulação de BiP na via DCD/NRP (Alvim et al., 2001; Costa et al., 2008; Valente et al., 2009; Reis et al., 2011). Além disso, tem sido demonstrado que BiP exerce um papel relevante na imunidade em plantas (Wang et al., 2005) e no aumento na resistência de plantas de soja e tabaco superexpressando BiP-D à infecção por *Pseudomonas syringae* pv tomato (Carvalho et al., 2014b; Rodrigues et al., 2021). Entretanto, foi observado nesta investigação que a superexpressão de BiP acelerou o processo de infecção do fungo *P. pachyrhizi* em soja, não tendo inibido a indução da via DCD/NRP de morte celular. Nas plantas superexpressando BiP, a expressão de *VPE* em resposta ao fungo foi superior que na linhagem controle (Figura 6). Entretanto, tem sido demonstrado que BiP não somente inibe a indução da expressão dos componentes da via, mas também inibe a atividade de morte celular da via DCD/NRP (Reis et al., 2011). A atividade de morte celular de *NRP-A* e *GmNAC81* foi diminuída quando expressos, sob o controle do promotor constitutivo 35S, em plantas de tabaco superexpressando BiP. Estes resultados indicam que BiP não somente controla expressão mas também atividade dos componentes da via de morte celular, podendo, portanto, estar exercendo controle negativo diretamente na atividade de VPE. Esta interpretação deverá ser confirmada posteriormente com a determinação da atividade de VPE em linhagens superexpressando BiP na ausência e presença do fungo. Provavelmente, o amarelecimento acentuado das folhas inoculadas com o fungo em plantas superexpressando BiP não deve ter uma relação direta com a atividade de VPE. Esta interpretação é consistente com os fenótipos de resistência observada em TGM7262, que desenvolveu eventos de HR, senescência foliar retardada, mas alta expressão de VPE.

Em estudos de análises de expressão em larga escala, a indução temporal de genes é mais relevante que o envolvimento específico de genes únicos para determinar o resultado da interação entre a planta hospedeira e o fungo (van de Mortel et al., 2007). Este fato auxilia a explicar que em plantas supexpressando BiP, que tiveram a indução gradual de *VPE* ao longo do curso da infecção, apresentaram um fenótipo de interação diferente das plantas transformadas com *GmNAC81*, que apresentaram indução de expressão de genes da via DCD/NRP em apenas alguns pontos específicos. Schneider e colaboradores (2011) identificaram o tempo 72 h AI como a referência para mudanças dinâmicas no desenvolvimento

de *P. pachyrhizi*, bem como o início da segunda fase das mudanças na expressão de genes da soja; os autores atribuíram essas mudanças influenciadas pelo aparecimento de haustórios. Neste mesmo estudo, utilizando plantas de soja contendo o gene de resistência *Rpp3* e inoculadas com isolado HW94-1 houve uma regulação negativa de genes relacionados a fotossíntese (Schneider et al., 2011). Essa regulação foi correlacionada com o aparecimento de lesões RB rodeadas por regiões intensamente cloróticas aos 12 dias após a inoculação. Enquanto nessas mesmas plantas (*Rpp3*), submetidas à inoculação com um isolado que supera a resistência (TW80-2), as lesões TAN que se desenvolveram foram rodeadas por tecido verde ou ligeiramente clorótico. A repressão mais forte de genes relacionados à fotossíntese na interação incompatível (HW94-1) sugere que TW80-2 pode modular a resposta dos genes relacionados à fotossíntese na interação compatível ou simplesmente não provocou mudanças em sua expressão. Tremblay et al. (2010) observaram regulação negativa significativa de genes relacionados à fotossíntese na resposta compatível em soja à *P. pachyrhizi*, observando tecidos cloróticos em grande parte, com possibilidade de morte celular em resposta à senescência examinada em estágios posteriores do desenvolvimento da infecção. Essas observações podem explicar o fenótipo de amarelecimento em plantas superexpressando BiP em que o fungo pode ter interferido em alguma modulação de genes relacionados à fotossíntese, o que ainda precisa ser verificado para confirmar essa hipótese.

Em um estudo com cevada (interação incompatível) e soja (interação compatível), *P. pachyrhizi* levou ao desenvolvimento de lesões necróticas nas folhas de cevada, enquanto nas folhas de soja apresentaram regiões cloróticas ao redor da urédia (Hoefle et al., 2008). Na cevada, o crescimento fungo não foi interrompido pela morte celular, mesmo sendo uma reação incompatível, as hifas de penetração atravessaram a célula morta e o fungo continuou a crescer no mesófilo. A superexpressão transitória ou estável do supressor de morte celular em cevada, inibidor de BAX-1 (BI-1), reduziu a morte celular epidérmica e o sucesso da penetração do fungo. Os autores sugerem que *P. pachyrhizi* provoca uma morte celular programada para evitar reações de defesa da planta, facilitando a entrada do fungo nas células epidérmicas. De modo que a célula morta pode não ser mais capaz de elicitar respostas, facilitando a colonização do fungo pelos espaços intercelulares. Entretanto, a superexpressão de BI-1 impediu essa morte provocada pelo fungo. Não se sabe se, ou como, o fungo induz ativamente PCD na planta, mas a via NRP/DCDs pode estar envolvida. Estudos com inibidores de caspase-1, VPE, poderão responder esta questão diretamente.

A inoculação de esporos de *P. pachyrhizi* em *Arabidopsis thaliana* mostra a ativação de genes responsivos aos hormônios jasmonato e etileno, semelhante à resposta à infecção de um

patógeno necrotrófico, não tendo sido observada a ativação de genes responsivos a ácido salicílico, o que era esperado visto que *P. pachyrhizi* é um patógeno biotrófico (Campe et al., 2014). AS ativa a expressão de genes PR (*PR1*, *PR2* e *PR5*) (Thomma et al., 1998), o que não ocorreu, após o tratamento com esporos de *P. pachyrhizi*, em folhas de *A. thaliana*. Estes resultados indicam que a defesa mediada por AS não é induzida ou suprimida nos estágios iniciais da infecção (12 h AI) na interação incompatível *Arabidopsis thaliana*: *P. pachyrhizi* (Campe et al., 2014). Em contraste, na presente investigação foi observado indução de *PR1* e *PR5* nos cultivares suscetíveis, podendo ser um resultado para interações compatíveis neste momento da infecção. NPR3 e NPR4 atuam como receptores de AS e regulam as funções de NPR1. NPR1 regula diretamente *PR1*, que resulta na produção e secreção da proteína PR1 para o apoplasto, onde exerce sua atividade antimicrobiana sobre os patógenos em proliferação. NPR1 também regula positivamente a expressão de *TBF1* e, por sua vez, promove a expressão de *BiP2* dependente de AS (Pajerowska-Mukhtar et al., 2012). Em plantas, a proteína BiP₂ liga-se ao transdutor da UPR, bZIP28, para prevenir a ativação da UPR na ausência de estresse biótico (Srivastava et al., 2013). No entanto, após a indução de estresse do RE, as proteínas BiP se dissociam das proteínas ligadas à membrana para auxiliar no dobramento da proteína (Wang et al., 2005). Sob estresse severo e falha da UPR em restaurar a homeostase celular, a via DCD/NRP pode ser ativada e levar a célula sob estresse a morte celular pelo colapso do vacúolo, o que pode ocorrer na presença do fungo na presente investigação.

Para sobreviver com sucesso sob condições de estresse biótico e abiótico, as plantas desenvolveram vias de comunicação cruzada altamente sofisticadas entre diferentes fitormônios. O ajuste fino dessa complexa rede permite respostas balanceadas das plantas aos estímulos ambientais e de desenvolvimento. O equilíbrio ou desequilíbrio de fitormônios, como ácido jasmônico (JA), etileno (ET), ácido abscísico (ABA), auxina (IAA) e ácido salicílico (SA), resultam em resposta específica a estímulos específicos. No entanto, *P. pachyrhizi* pode contornar os mecanismos e alterar o metabolismo do hospedeiro (Ökmen & Doehlemann, 2014). Em interação incompatível de soja contendo o gene de resistência *Rpp3* submetidas à infecção com um isolado de *P. pachyrhizi* que causa lesão RB, foi ativada a sinalização por meio das vias do ácido salicílico, ácido jasmônico e ácido abscísico. No mesmo genótipo de soja (*Rpp3*) submetidas à infecção com um isolado virulento que causa lesão tipo TAN, ou seja, capaz de superar a resistência, houve acúmulo apenas de ácido salicílico (Schneider et al., 2011). Assim, AS, JA e ABA foram relatados em interações compatíveis e incompatíveis de soja com o fungo.

Sendo a via de sinalização de morte celular mediada por DCD/NRP induzida pelos hormônios ácido abscísico (ABA) e ácido salicílico (AS), foi também investigado o acúmulo desses hormônios em plantas infectadas. A resposta hormonal de plantas superexpressando *GmBiP* e *GmNAC81* parece estar correlacionada com AS, ABA e JA, em níveis diferentes. Foi observado que plantas superexpressando BiP inoculadas acumularam um nível superior dos hormônios ABA e AS do que as plantas controle conquista, sendo que as plantas transgênicas de BiP apresentam níveis maiores de AS em condições normais (Carvalho et al., 2014b). Provavelmente, o acúmulo acentuado de ABA e AS nas linhagens transgênicas superaram o efeito negativo de BiP na indução da via DCD/NRP.

O acúmulo de ABA foi observado em todos os genótipos 72 h após inoculação, ademais, plantas superexpressando *GmNAC81* apresentam níveis elevados de ABA em condições normais de crescimento (Pimenta et al., 2016). Esse aumento de ABA nas plantas superexpressando *GmNAC81* em condições normais pode ter alterado o fenótipo dessas plantas quando inoculadas com o fungo, atrasando o ciclo do fungo. Foi relatado na literatura que altas concentrações de ABA interferem na resistência contra patógenos controlados pela via de sinalização AS, sendo que efeitos sinérgicos e antagônicos foram relatados para a interação das vias de sinalização ABA e JA (Mauch-Mani & Mauch, 2009). No entanto, no presente estudo com uma interação compatível, não observou esse antagonismo. Precedentes na literatura trazem que sob certas condições de estresse abiótico, como estresse de frio e salinidade, ABA e AS juntos parecem ser capazes de regular positivamente a resposta de tolerância ao estresse (Horváth et al., 2015; Szalai et al., 2011; Wang et al., 2018). Nesse sentido, no presente estudo, a relação ABA e AS sugere estar associada com a regulação da susceptibilidade biótica apresentada. Consistente com essa observação, a regulação pelo ABA tem o potencial de comprometer a resistência a patógenos fúngicos e oomicetos (Mauch-Mani & Mauch, 2005). A concentração de ABA, é importante para o desenvolvimento da susceptibilidade à doença em *Arabidopsis* (Mohr; Cahill, 2003). Entretanto, pouco se sabe sobre as principais causas da susceptibilidade à doença induzida por ABA (Mauch-Mani & Mauch, 2009). Notavelmente, um importante agrupamento de genes que são regulados de forma semelhante por ABA e AS foi identificado em plantas de *Arabidopsis*, sugerindo que as plantas equiparam as respostas transcriptômicas comuns reguladas pela ABA e AS (Kalachova et al., 2016).

AS é um hormônio vegetal relacionado à defesa que desempenha um papel fundamental na resistência a diferentes patógenos microbianos, como vírus, bactérias, fungos e oomicetos (Kunkel & Brooks, 2002; Vlot et al., 2009). Geralmente, o sinal de defesa dependente de AS é conhecido por ser antagônico à sinalização de defesa dependente de JA/ET (Glazebrook, 2005).

JA e AS são sinais produzidos por plantas que ativam genes de defesa por processos que são dependentes de NPR1, supressor de insensibilidade ao ácido salicílico2 (SSI2), fatores de transcrição WRKY e MPK4, havendo uma comunicação substancial entre as vias (Li et al., 2002; Vlot et al., 2009) que podem não ser exclusivamente antagônicas (Robert-Seilaniantz et al., 2011). Esse antagonismo não foi verificado na presente investigação, sendo ambos os hormônios acumulados nas plantas inoculadas, exceto para JA que nas plantas superexpressando BiP mantiveram níveis similares aos das plantas controle não inoculadas.

Os dados transcriptômicos e proteômicos na literatura sobre a interação de *P. pachyrhizi* variam em tempos de amostragem, diferentes genótipos de plantas e isolados de patógenos, portanto, não apresentam respostas claras sobre um hormônio específico controlar os fenótipos observados. Não houve evidência clara de indução de genes dependentes de AS ou JA por *P. pachyrhizi* nos estágios iniciais e posteriores do desenvolvimento do fungo (Campe et al., 2014). Em Panthee et al. (2007), dois genes relacionados a AS mas nenhum envolvido com JA foram induzidos em um tempo de amostragem bastante precoce (72 h AI). Tremblay et al. (2010) indicam a ativação de alguns genes responsivos a AS e JA, bem como de outros genes envolvidos na biossíntese de JA em tempos de amostragem tardios (10 dias AI) em uma planta susceptível. Por fim, Soria-Guerra et al. (2010) encontraram a indução de um gene da biossíntese de JA em um momento de amostragem tardia em *Glycine tomentella*. Em resumo, os dados “ômicos” não fornecem uma imagem clara da indução de vias de defesa específicas na soja em resposta à infecção por *P. pachyrhizi*. Ademais, o número crescente de relatórios que caracterizam as interações antagônicas e sinérgicas entre as respostas ao estresse abiótico e biótico apontam para o ABA como um componente essencial na integração e no ajuste fino das redes de sinalização de resposta ao estresse abiótico e biótico. Entretanto, qualquer mudança que resulte em uma alteração da homeostase do ABA em plantas pode desestabilizar pontualmente o sistema e alterar o equilíbrio das diferentes vias envolvidas e parece que ATAF1 (Mauch-Mani & Flors, 2009), um homólogo de *GmNAC30*, ou seja, a via DCD/NPR pode estar envolvido de forma proeminente neste processo.

5. CONCLUSÃO

A expressão aumentada dos genes da via DCD/NRP nos tempos iniciais da interação compatível entre o fungo *P. pachyrhizi* e as plantas superexpressando *GmBiPD* e *GmNAC81*

sugere que os genes analisados podem estar envolvidos nos processos moleculares de reconhecimento fungo-planta e nas respostas de defesa em interações compatíveis e incompatíveis. Esta investigação forneceu duas linhas de evidência implicando VPE, o efetor de morte celular da via DCD/NRP, em HR induzida pelo fungo, um componente de mecanismos de resistência contra patógenos da planta. Inicialmente, foi demonstrado que o genótipo resistente TGM7262 exibe ativação constitutiva da via DCD/NRP que leva a uma expressão constitutiva aumentada de VPE. Neste genótipo, a expressão de VPE alcança níveis significativamente superiores em resposta ao fungo quando comparado com genótipos suscetíveis. Consistente com esta interpretação, a superexpressão do transativador do gene VPE, *GmNAC81*, no genótipo suscetível BR16 aumentou consideravelmente os níveis de VPE em plantas inoculadas e não inoculadas e diminuiu a suscetibilidade ao fungo. A compreensão das relações temporais entre o crescimento de *P. pachyrhizi* e as respostas da planta hospedeira mostraram um importante contexto em que se podem detalhar as redes de interações moleculares durante a infecção.

REFERÊNCIAS

- Akamatsu, H., Yamanaka, N., Soares, R.M., Ivancovich, A.J.G., Lavilla, M.A., Bogado, A.N., Morel, G., Scholz, R., Yamaoka, Y., Kato, M. Pathogenic variation of South American *Phakopsora pachyrhizi* populations isolated from Soybeans from 2010 to 2015. **Japan Agric. Res. Q.** 51:221-232, 2017.
- Akamatsu, H., Yamanaka, N., Yamaoka, Y., Soares, R.M., Morel, W., Ivancovich, A.J.G., Bogado, A.N., Kato, M., Yorinori, J.T., Suenaga, K. Pathogenic diversity of soybean rust in Argentina, Brazil, and Paraguay. **J. Gen. Plant Pathol.** 79:28-40, 2013.
- Alves, M.S. Reis, P.A.B. Dadalto, S.P. Faria, J.A.Q.A. Fontes, E.P.B. Fietto, L.G. 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, 2011.
- Alvim, F.C., Carolino, S.M.B., Cascardo, J.C.M., Nunes, C.C., Martinez C.A., Otoni, W.C., Fontes, E.P.B. Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. **Plant Physiol.** 126:1042-1054, 2001.
- Asselbergh, B., De Vleeschauwer, D., Hofte, M.: Global switches and fine-tuning-ABA modulates plant pathogen defense. **Mol Plant Microbe Interact.** 21:709-719, 2008.

Audenaert, K., De Meyer, G.B., Höfte, M.M. Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. **Plant Physiol.** 2002128:491-501, 2002.

Barros, V.A., Fontesa, P.P., Souza, G.B., Gonçalves, A.B., Carvalho, K., Rincão, M.P., Lopes, I.O.N, Costa, M.D.L, Alves, M.S., Marcelino-Guimarães, F.C., Fiettoe, L.G. *Phakopsora pachyrhizi* triggers the jasmonate signaling pathway during compatible interaction in soybean and GmbZIP89 plays a role of major component in the pathway. **Plant Physiology and Biochemistry**, 151:526-534, 2020.

Boatwright, J.L., Pajerowska-Mukhtar, K. Salicylic acid: an old hormone up to new tricks. **Molecular plant pathology**, 14(6):623-634, 2013.

Boller, T. and Felix, G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. **Annu. Rev. Plant Biol.** 60:379-406, 2009.

Bromfield, K.R. **Soybean Rust**. American Phytopathological Society: St. Paul, M.N, USA, 1984.

Bromfield, K.R. and Hartwig, E.E. Resistance to soybean rust [*Phakopsora pachyrhizi*] and mode of inheritance. **Crop Sci.** 20:254-255, 1980.

Camargos, L.F., Fraga, O.T., Oliveira, C.C., Silva, J.C.F., Fontes, E.P.B., Reis, P.A.B. Development and cell death domain-containing asparagine-rich protein (DCD/NRP): an essential protein in plant development and stress responses. **Theor. Exp. Plant Physiol.** 31:59-70, 2019.

Campe, R., Loehrer, M., Conrath, U., Goellner, K. *Phakopsora pachyrhizi* induces defense marker genes to necrotrophs in *Arabidopsis thaliana*. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** 87:1–8, 2014.

Carvalho, H.H., Brustolini, O.J.B., Pimenta, M.R., Mendes, G.C., Gouveia B.C., Silva, P.A., Silva, J.C.F., Mota, C.S., Soares-Ramos, J.R.L., Fontes, E.P.B. The molecular chaperone binding protein BiP prevents leaf dehydration-induced cellular homeostasis disruption. **PLoS ONE**, 9:86661, 2014a.

Carvalho, H.H., Silva, P.A., Mendes, G.C., Brustolini, O.J.B., Pimenta, M.R., Gouveia, B.C. et al. The endoplasmic reticulum binding protein BiP displays dual function in modulating cell death events. **Plant Physiol**, 164:654-670, 2014b.

Childs, S.P., King, Z.R., Walker, D.R., Donna, K., Harris K. F., Pedley, J.W., Buck, H., Roger, B., Zenglu L. Discovery of a seventh Rpp soybean rust resistance locus in soybean accession PI 605823. **Theor. Appl. Genet.** 131:27-41, 2018.

Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., Staskawicz, B. J. Hostmicrobe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. **Cell** 24:803-814,2006.

- Choi, J.J., Alkarouf, N.W., Schneider, K.T., Matthews, B.F., Frederick R.D. Expression patterns in soybean resistant to *Phakopsora pachyrhizi* reveal the importance of peroxidases and lipoxygenases. **Funct Integr Genomics**, 8:341-359, 2008.
- Costa, M.D.L., Reis, P.A.B., Valente, M.A.S., Irsigler, A.S.T., Carvalho, C.M., Loureiro, M.E., et al. 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, 2008.
- Coutinho, F.S., Santos, D.S., Lima, L.L., Vital, C.E., Santos, L.A., Piment,a M.R., Silva, J.C., Ramos, J.R.L.S., Metha, A., Fontes, E.P.B., Ramos, H.J.O. Mechanism of the drought tolerance of a transgenic soybean overexpressing the molecular chaperone BiP. **Physiol. Mol. Biol. Plants**. 1:1-16, 2019.
- Crocoll, C., J. Kettner, J., K. Dörffling, K. Abscisic acid in saprophytic and parasitic species of fungi. **Phytochemistry**, 30(4):1059-1060, 1991.
- Dodds, P.N. and Rathjen, J.P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. **Nat. Rev. Genet**. 11:539-548, 2010.
- Dörffling, K., Petersen, W., Sprecher, E., Urbasch, I., Hanssen, H.P. Abscisic acid in phytopathogenic fungi of the genera botrytis, ceratocystis, fusarium, and rhizoctonia. **Z. Naturforsch**, 39:683-684, 1984.
- Faria, J.A. Reis, P.A. Reis, M.T. Rosado, G.L. Pinheiro, G.L. Mendes, G.C. et al. 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, 2011.
- Ferreira, D. O., Fraga, O. T., Pimenta, M. R., Caetano, H. D., Machado, J. P. B., Carpinetti, P. A., Otávio J. B. Brustolini, O.J.B., Quadros, I. P. S., Reis, P. A. B., Fontes, E. P. *GmNAC81* inversely modulates leaf senescence and drought tolerance. **Frontiers in Genetics** 11:1441, 2020.
- Garcia, A., Calvo, É.S., Souza-Kiihl, R.A., Harada, A., Hiromoto, D.M., Vieira, L.G.E. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. **Theor. Appl. Genet**. 117:545-553, 2008.
- Glazebrook, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annu Rev Phytopathol**. 43:205-227, 2005.
- Goellner, K., Loehrer, M., Langenbach, C., Conrath, U. W. E., Koch, E., Schaffrath, U. *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of asian soybean rust. **Molecular plant pathology**, 11(2):169-177, 2010.
- Goellner, K., Loehrer, M., Langenbach, C., Conrath, U.W.E., Koch, E., Schaffrath, U. *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. **Mol Plant Pathol**, 11:69-177, 2010.

Greenberg, J.T. and Yao, N. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. **Cell Microbiol.** 6:201-211, 2004.

Hara-Nishimura, I., Hatsugai, N., Nakaune, S., Kuroyanagi, M., Nishimura, M. Vacuolar processing enzyme: an executor of plant cell death. **Curr Opin Plant Biol** 8:404-408, 2005.

Hartman, G.L., Sikora, E.J., Rupe, J.C. Rust. In: Hartman, G.L., Rupe, J.C., Sikora, E.J., Domier, L.L., Davis, J.A., Steffey, K.L. (Ed.). **Compendium of soybean diseases and pests.** 5. ed. Saint Paul: APS Press, 56-59, 2015.

Hatsugai N., Yamada K., Goto-Yamada S., Hara-Nishimura I. Vacuolar processing enzima in plant programmed cell death. **Fronte. Plant Sci.** 6:234, 2015.

Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Yamada, K., Meshi, T., Tsuda, S., Kondo, M., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. **Science**, 305:855-858, 2004.

Heath, M. Hypersensitive response-related death. **Plant Mol. Biol.** 44:321-334, 2000.

Heath, M.M.C. Signalling between Pathogenic Rust Fungi and Resistant or Susceptible Host Plants. **Annals of Botany**, 80(6):713-720, 1997.

Hirschburger, D., Müller, M., Voegelé, R. T., Link, T. Reference genes in the pathosystem *Phakopsora pachyrhizi*/soybean suitable for normalization in transcript profiling. **International Journal of Molecular Sciences**, 16(9):23057-23075, 2015.

Hoefle, C., Loehrer, M., Schaffrath, U., Frank, M., Schultheiss, H., Hükelhoven, R. Transgenic suppression of cell death limits penetration success of the soybean rust fungus *Phakopsora pachyrhizi* into epidermal cells of barley. **Phytopathology**, 99(3):220-226, 2009.

Horváth, E., Csiszár, J., Gallé, Á., Poór, P., Szepesi, Á., Tari, I. Hardening with salicylic acid induces concentration-dependent changes in abscisic acid biosynthesis of tomato under salt stress. **J Plant Physiol.** 183:54-63, 2015.

Hossain, M.Z., Ishiga, Y., Yamanaka, N., Ogiso-Tanaka, E., Yamaoka, Y. Soybean leaves transcriptomic data dissects the phenylpropanoid pathway genes as a defence response against *Phakopsora pachyrhizi*. **Plant Physiol. Biochem.**, 132:424-433, 2018.

Hükelhoven, R. Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. **Annu. Rev. Phytopathol.** 45:101-127, 2007.

Hyten, D.L., Hartman, G.L., Nelson, R.L., Frederick, R.D., Concibido, V.C., Narvel, J.M., Cregan, P.B. Map location of the Rpp1 locus that confers resistance to soybean rust in soybean. **Crop Sci.** 47:837-838, 2007.

Jiang, C.J., Shimono, M., Sugano, S., Kojima, M., Yazawa, K., Yoshida, R., Inoue, H., Hayashi, N., Sakakibara, H., Takatsuji, H. Abscisic acid interacts antagonistically with salicylic acid signaling pathway in rice-*Magnaporthe grisea* interaction. **Mol Plant-Microbe Interact.** 23:791-798, 2010.

- Jones, J.D.G. and Dangl, J.L. The plant immune system. **Nature**, 444:323-329, 2006.
- Kalachova, T., Puga-Freitas, R., Kravets, V., Soubigou-Taconnat, L., Repellin, A., Balzergue, S., Zachowski, A., Ruelland, E. The inhibition of basal phosphoinositide-dependent phospholipase C activity in Arabidopsis suspension cells by abscisic or salicylic acid acts as a signalling hub accounting for an important overlap in transcriptome remodelling induced by these hormones. **Environ Exp Bot.** 123:37-49, 2016.
- Kelly, H.Y., Dufault, N.S., Walker, D.R., Isard, S.A., Schneider, R.W., Giesler, L.J., Wright, D.L., Marois, J.J., Hartman, G.L. From select agent to an established pathogen: The response to *Phakopsora pachyrhizi* (soybean rust) in North America. **Phytopathology** 105:905-916, 2015.
- Keogh, R.C., Deverall, B.J., McLeod, S. Comparison of histological and physiological responses to *Phakopsora pachyrhizi* in resistant and susceptible soybean. **Trans. Br. Mycol. Soc.** 74:329-333, 1980.
- King, Z.R., Harris, D.K., Pedley, K.F., Song, Q., Wang, D., Wen, Z., Buck, J.W., Li, Z., Boerma, H.R. A novel *Phakopsora pachyrhizi* resistance allele (Rpp) contributed by PI 567068A. **Theor. Appl. Genet.** 129:517-534, 2016.
- Kunkel, B.N., Brooks, D.M. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. **Curr Opin Plant Biol.** 5:325-331, 2002.
- Kuriyama, H., Fukuda, H. Developmental programmed cell death in plants. **Curr Opin Plant Biol.** 2002, 5:568-573, 2002.
- Lam, E. Controlled cell death, plant survival and development. **Nat Rev Mol Cell Biol** 5:305-315, 2004.
- Li, H.Y., Guo, Z.F., Zhu, Y.X. Molecular cloning and analysis of a pea cDNA that is expressed in darkness and very rapidly induced by gibberellic acid. **Mol Gen Genet.** 259:393-397, 1998.
- Li, S., Smith, J.R., Ray, J.D., Frederick, R.D. Identification of a new soybean rust resistance gene in PI 567102B. **Theor. Appl. Genet.** 125:133-142, 2012.
- Li, X., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R. Jasmonate and salicylate induce expression of herbivore cytochrome P450 genes. **Nature** 419:712-715, 2002.
- Loehrer, M., Langenbach, C., Goellner, K., Conrath, U., Schaffrath, U. Characterization of nonhost resistance of Arabidopsis to the Asian soybean rust. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 21(11):1421-1430, 2008.
- Ma, W. and Berkowitz, G.A. The grateful dead: Calcium and cell death in plant innate immunity. **Cell. Microbiol.** 9:2571-2585, 2007.
- Magnani, E.B.Z., Alves, E., Araújo, D.V. Eventos dos processos de pré-penetração, penetração e colonização de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 156-160, 2007.

- Mauch-Mani, B. and Flors, V. The ATAF1 transcription factor: at the convergence point of ABA-dependent plant defense against biotic and abiotic stresses. **Cell research**, 19(12):1322-1323, 2009.
- Mauch-Mani, B. and Mauch, F. The role of abscisic acid in plant–pathogen interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, 8(4):409-414, 2005.
- McLean, R.J. and Byth, D.E. Histological studies of the pre-penetration development and penetration of soybeans by rust, *Phakopsora pachyrhizi* Syd, Aust. **J. Agric. Res.** 32:435-443, 1981.
- Mendes, G.C., Reis, P.A.B., Calil, I.P., Carvalho, H.H., Aragão, F.J.L., Fontes, E.P.B. GmNAC30 and GmNAC81 integrate the endoplasmic reticulum stress and osmotic stress-induced cell death responses through a vacuolar processing enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 110:19627-19632, 2013.
- Miles, M.R., Bonde, M.R., Nester, S.E., Berner, D.K., Frederick, R.D., Hartman, G.L. Characterizing resistance to *Phakopsora pachyrhizi* in soybean. **Plant Disease**, 95:577-581, 2011.
- Miles, M.R., Frederick, R.D., Hartman, G.L. **Soybean Rust: Is the U.S. Soybean Crop At Risk?** APSnet Features. Online, 2003. doi: 10.1094/APSnetFeature-2003-0603
- Mohr, P.G. and Cahill, D.M. Abscisic acid influences the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Peronospora parasitica*. **Funct Plant Biol**, 30:461-469, 2003.
- Morales, A.M.A.P., O'Rourke, J.A., van de Mortel, M., Scheider, K.T., Bancroft, T.J., Borém, A., Nelson, R.T., Nettleton, D., Baum, T.J., Shoemaker, R.C., et al. Transcriptome analyses and virus induced gene silencing identify genes in the Rpp4-mediated Asian soybean rust resistance pathway. **Funct. Plant Biol.** 40:1029-1047, 2013.
- Ökmen, B. and Doehlemann, G. Inside plant: biotrophic strategies to modulate host immunity and metabolism. **Curr. Opin. Plant Biol.** 20:19-25, 2014.
- Pajeroska-Mukhtar, K.M., Wang, W., Tada, Y., Oka, N., Tucker, C.L., Fonseca, J.P., Dong, X.. The HSF-like transcription factor TBF1 is a major molecular switch for plant growth-to-defense transition. **Current Biology**, 22(2):103-112, 2012.
- Pandey, A.K. Yang, C. Zhang, C. Graham, M.A. Horstman, H.D. Lee, Y. Zabolina, O.A. Hill, J.H. Pedley, K.F. Whitham, S.A. Functional analysis of the Asian soybean rust resistance pathway mediated by Rpp2. **Mol. Plant Microbe Interact.** 24:194-206, 2011.
- Panthee, D.R., Marois, J.J., Wright, D.L., Narva'ez, D., Yuan, J.S., Stewart, C.N. Jr. Differential expression of genes in soybean in response to the causal agent of Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow) is soybean growth stage-specific. **Theor Appl Genet.**, 118:359–370, 2009.
- Panthee, D.R., Yuan, J.S., Wright, D.L., Marois, J.J., Mailhot, D., Stewart, C.N. Jr. Gene expression analysis in soybean in response to the causal agent of Asian soybean rust

(*Phakopsora pachyrhizi* Sydow) in an early growth stage. **Funct Integr Genomic.**, 7, 291-301, 2007.

Pedley, K.F., Pandey, A.K., Ruck, A., Lincoln, L.M., Whitham, S.A., Graham, M.A. Rpp1 encodes a ULP1-NBS-LRR protein that controls immunity to *Phakopsora pachyrhizi* in soybean. **Mol. Plant Microbe Interact.**, 32:120-133, 2018.

Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., Van Wees, S.C.M.: Networking by small-molecule hormones in plant immunity. **Nat Chem Biol.** 5:308-316, 2009.

Pimenta, M. R., Silva, P. A., Mendes, G. C., Alves, J. R., Caetano, H. D. N., Machado, J. P. B., et al. The stress-induced soybean NAC transcription factor GmNAC81 plays a positive role in developmentally programmed leaf senescence. **Plant Cell Physiol**, 57:1098-1114, 2016.

Reis, P.A.B. and Fontes, E.P.B. N-rich protein (NRP)-mediated cell death signaling: A new branch of the ER stress response with implications for plant biotechnology. **Plant Signal. Behav.** 7:628-632, 2012.

Reis, P.A.B. Rosado, G.L. Silva, L.A.C. Oliveira, L.C. Oliveira, L.B. Costa, M.D.B.L. Alvim, C. Fontes, E.P.B. The Binding Protein BiP Attenuates Stress-Induced Cell Death in Soybean via Modulation of the N-Rich. **Plant Physiol.**157:1853-1865, 2011.

Reis, P.A.B., Carpinetti, P.A., Freitas, P.P.J., Santos, E.G.D., Camargos, L.F., Oliveira, I.H.T., Silva, J.C.F., Carvalho, H.O.H., Dal-Bianco, M., Soares-Ramos, J.R.L., Fontes, E.P.B. Functional and regulatory conservation of the soybean ER stress-induced DCD/NRP-mediated cell death signaling in plants. **BMC Plant Biology**16:156, 2016.

Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., Jones, J.D.G. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. **Annu Rev Phytopathol.** 49:317-343, 2011.

Rodrigues, J.M., Coutinho, F.S., Dos Santos, D.S., Vital, C.E., Ramos, J.R.L.S., Reis, P.B., Oliveira, M. G. A., Mehta, A., Fontes, E. P. B., Ramos, H.J.O (2021). BiP-overexpressing soybean plants display accelerated hypersensitivity response (HR) affecting the SA-dependent sphingolipid and flavonoid pathways. **Phytochemistry** 185:112704, 2021.

Schneider, K.T., van de Mortel, M., Bancroft, T.J., Braun, E., Nettleton, D., Nelson, R.T., Frederick, R.D., Baum, T.J., Graham, M.A., Whitham, S.A. Biphasic gene expression changes elicited by *Phakopsora pachyrhizi* in soybean correlate with fungal penetration and haustoria formation. **Plant Physiol.** 157(1):355-71, 2011.

Silva, D.C., Yamanaka, N., Brogin, R.L., Arias, C.A., Nepomuceno, A.L., Di Mauro, A.O., Pereira, S.S., Nogueira, L.M., Passianotto, A.L., Abdelnoor, R.V. Molecular mapping of two loci that confer resistance to Asian rust in soybean. **Theor. Appl. Genet.**, v. 117, p. 57-63, 2008.

Soria-Guerra, R.E., Rosales-Mendoza, S., Chang, S., Haudenschild, J.S., Padmanaban, A., Rodriguez-Zas, S., et al. Transcriptome analysis of resistant and susceptible genotypes of

Glycine tomentella during *Phakopsora pachyrhizi* infection reveals novel rust resistance genes. **Theor Appl Genet.Theor**, 120:1315-1333, 2010.

Srivastava, R., Deng, Y, Shah, S., Rao A.G., Howell, S.H. BINDING PROTEIN is a master regulator of the endoplasmic reticulum stress sensor/transducer bZIP28 in Arabidopsis. **Plant Cell** 25: 1416–1429, 2013.

Szalai, G., Pál, M., Janda, T. Abscisic acid may alter the salicylic acid-related abiotic stress response in maize. **Acta Biol Szeged**. 55:155-157, 2011.

Thomma, B.P., Eggermont, K., Penninckx, I.A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P., Broekaert, W.F. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.** 95(25):15107-15111, 1998.

Thordal-Christensen, H. Fresh insights into processes of nonhost resistance. **Curr. Opin. Plant Biol.** 6:351-357, 2003.

Tremblay, A., Hosseini, P., Alkharouf, N.W., Li, S., Matthews, B.F. Transcriptome analysis of a compatible response by *Glycine max* to *Phakopsora pachyrhizi* infection. **Plant Science** 179:183-193, 2010.

Tremblay, A., Hosseini, P., Li, S., Alkarouf, N.W., Matthews, B.F. Identification of genes expressed by *Phakopsora pachyrhizi*, the pathogen causing soybean rust, at a late stage of infection of susceptible soybean leaves. **Plant Pathology** 61:773-786, 2012.

Ulferts, S., Delventhal, R., Splivallo, R., Karlovsky, P., Schaffrath, U. Abscisic acid negatively interferes with basal defence of barley against *Magnaporthe oryzae*. **BMC Plant Biol.** 15:7, 2015.

Valente, M.A.S. Faria, J.A.Q.A. Ramos, J.R.L.S. Reis, P.A.B. Pinheiro, G.L. Piovesan, N.D. et al. 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, 2009.

Van de Mortel, M., Recknor, J.C., Graham, M.A., Nettleton, D., Dittman, J.D., Nelson, R.T., Godoy, C.V., Abdelnoor, R.V., Almeida, A.M., Baum, T.J., Whitham, S.A. Distinct biphasic mRNA changes in response to Asian soybean rust infection, **Mol. Plant Microbe Interact.** 20:887-899, 2007.

van Doorn, W.G. and Woltering, E.J.: Many ways to exist? Cell death categories in plants. **Trends Plant Sci**, 10:117-122, 2005.

Vital, C.E., Gómez, J.D., Vidigal, P.M., Barros, E., Pontes, C.S.L., Vieira, N.M., Ramos, H.J.O. Phytohormone profiling by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC/MS). **Protocols.io**. 2019.

Vlot, A.C., Dempsey, D.A., Klessig, D.F. (2009) Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. **Annu Rev Phytopathol** 47:177-206, 2009.

Wang, D., Weaver, N.D., Kesarwani, M., Dong, X. Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance. A indução da via secretora de proteínas é necessária para a resistência adquirida sistêmica. **Science** 308(5724):1036-1040, 2005.

Wang, W., Wang, X., Huang, M., Cai, J., Zhou, Q., Dai, T., Cao, W., Jiang, D. Hydrogen peroxide and abscisic acid mediate salicylic acid-induced freezing tolerance in wheat. **Front Plant Sci.** 2018, 9:1137, 2018.

Wasternack, C. and Song, S. Jasmonates: biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription. **J Exp Bot.** 2017 68:1303-1321, 2017.

Whitham, S.A., Qi, M., Innes, R.W., MA, W., Lopes-Caitar, V., Hewezi, T. Molecular soybean-pathogen interactions. **Annu. Rev. Phytopathol.** 54:443-468, 2016.

Xu, H., Heath, M.C. Role of calcium in signal transduction during the hypersensitive response caused by basidiospore-derived infection of the cowpea rust fungus. **Plant Cell** 10:585-598, 1998.

Zhang, H., Dong, S., Wang, M., Wang, W., Song, W., Dou, X., Zheng, X., Zhang, Z.J. The role of vacuolar processing enzyme (VPE) from *Nicotiana benthamiana* in the elicitor-triggered hypersensitive response and stomatal closure. **J Exp Bot.** 61(13):3799-3812, 2010.