

GUILHERME LUIZ PINHEIRO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL DE
TRANSFATORES DA FAMÍLIA NAC DE SOJA (*Glycine max*)

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2007

GUILHERME LUIZ PINHEIRO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL DE
TRANSFATORES DA FAMÍLIA NAC DE SOJA (*Glycine max*)**

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

APROVADA: 14 de dezembro de 2007.

Prof. Luciano Gomes Fietto
(Co-Orientador)

Prof. Marcelo Ehlers Loureiro
(Co-Orientador)

Profa. Juliana Lopes Rangel Fietto

Claudine Márcia Carvalho

Prof.^a Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Orientadora)

Ao meu avô Domiciano Soares Bandeira, exemplo de força e caráter.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as oportunidades que tive ao longo da minha vida e por iluminar meus passos em todos os momentos.

Aos meus pais, pelo amor, educação e apoio durante toda a minha vida. Sem o apoio de vocês, mesmo a distância, tudo seria mais difícil. Devo a vocês essa nova conquista.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização de uma Pós-Graduação gratuita e de excelente qualidade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, professores e funcionários pela boa convivência e ensinamentos. Ao secretário Eduardo, pela presteza.

À professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes pela orientação, oportunidade de crescimento profissional e confiança em meu trabalho.

Ao professor Luciano Gomes Fietto (DBB), por ter acompanhado de perto a realização de todo o trabalho, com sugestões valiosas, ajuda nos experimentos e sobretudo pela amizade.

Ao professor Marcelo Ehlers Loureiro (DBV) pela co-orientação e disponibilidade de uso de seu laboratório.

Ao professor Wagner Otoni, pela boa vontade e sugestões nos experimentos com protoplastos.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas e do Laboratório de Proteômica pelo agradável convívio, amizade e colaboração para

obtenção dos resultados. Em especial a Anete, Dani, João, Rejane, Carol, Max e Pedro pela ajuda e pelos momentos de distração. À Claudine, muito obrigado pela dedicada e valiosa ajuda nos experimentos de confocal.

Aos estudantes Caroline e Lucas, pela boa convivência e ajuda direta na condução dos experimentos, principalmente nos últimos meses.

Aos funcionários Serafim, Marlene e Renata, pela presteza. Ao Wellington, pela boa convivência e por cuidar das plantas de tabaco. A todos os funcionários do BIOAGRO que indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos amigos de Viçosa, principalmente aos “Doenças”, pela amizade e momentos agradáveis ao longo desses 6 anos.

A todos os amigos e familiares que, de alguma forma, contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal. A todos que eu não tenha citado, mas que contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
1- Aspectos gerais sobre os fatores de transcrição NAC.....	6
2- Organização estrutural das proteínas NAC.....	7
3- Estrutura tridimensional do domínio NAC.....	10
4- Especificidade de ligação ao DNA.....	12
5- Funções biológicas em processos de desenvolvimento vegetal.....	13
6- Resposta a estresses bióticos e abióticos.....	15
7- Proteínas NAC e regulação da senescência.....	18
8- Regulação transcricional de genes NAC.....	20
9- Regulação pós-transcricional.....	22
10- Regulação pós-traducional	23
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
1-Células de soja em suspensão e tratamentos.....	26
2- Material vegetal e tratamentos	26
3- Clonagem molecular do cDNA completo do gene <i>GmATAF</i>	27
4- Construções de DNA.....	28
5- Extração de RNA e síntese de cDNA.....	32
6- RT-PCR em Tempo Real (qRT-PCR).....	32
7- Expressão transiente em protoplastos de soja.....	35
8- Transformação transiente de plantas de tabaco.....	36
9- Localização subcelular das proteínas NAC.....	37

10- Análise de transativação em leveduras.....	37
11- Análise do padrão de expressão dos genes NAC em órgãos de soja.....	38
12- Análises de bioinformática.....	39
13- Agrupamento hierárquico.....	39
14- Técnicas de Biologia Molecular.....	40
IV- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
1- Isolamento e análises <i>in silico</i> de um novo membro da família NAC em soja, denominado <i>GmATAF</i>	41
2- A expressão transiente de <i>GmATAF</i> em protoplastos reprime genes co-regulados por estresse no RE e estresse osmótico.....	47
3- Agrupamento hierárquico sugere diversidade e relevância funcionais para proteínas NAC de soja.....	51
4- As proteínas GmNAC estão localizadas no núcleo.....	56
5- Proteínas GmNAC como ativadores transcricionais.....	59
6- Os genes GmNAC são diferencialmente expressos em órgãos de soja	63
7- A regulação dos genes <i>GmATAF</i> , <i>GmNAC2</i> e <i>GmNAC6</i> por indutores da UPR ocorre via um novo ramo de sinalização de estresses no retículo endoplasmático.....	67
8- Cinética de indução de genes GmNAC por tunicamicina.....	70
9- Genes NAC de soja são diferencialmente expressos em resposta a estresses abióticos.....	72
10- Os genes <i>GmATAF</i> , <i>GmNAC1</i> e <i>GmNAC6</i> são induzidos por indutores de morte celular e reprimidos por inibidores de senescência.....	77
11- Expressão transiente dos genes <i>GmNAC1</i> , <i>GmNAC5</i> e <i>GmNAC6</i> em folhas de tabaco induz senescência.....	79
V- CONCLUSÕES	87

VI- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
-------------------------------------	----

RESUMO

PINHEIRO, Guilherme Luiz, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2007. **Caracterização molecular e funcional de transfatores da família NAC de soja (*Glycine max*)**. Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-orientadores: Luciano Gomes Fietto e Marcelo Ehlers Loureiro.

A identificação de vias de sinalização de resposta a diferentes estresses constitui um dos interesses majoritários de pesquisas na área de interações das plantas com o meio ambiente. Recentemente, foram identificados por nosso grupo genes de soja co-regulados por estresse osmótico e estresse no retículo, que possivelmente fazem parte de uma via integrativa inédita em plantas. Dentre os genes identificados, destacam-se *GmATAF2* e *GmNAM*, que codificam transfatores da família NAC, cujos representantes estão envolvidos em eventos de desenvolvimento vegetal e na resposta a estresses bióticos e abióticos. Nesta investigação, foi demonstrado que as ESTs de *GmATAF2* e *GmNAM* correspondem a regiões distintas de um mesmo gene, homólogo a *ATAF1* e *ATAF2* de *Arabidopsis* e denominado *GmATAF*. Além disso, a expressão transiente de *GmATAF* em protoplastos de soja resultou na repressão de genes da via integrativa e de genes especificamente induzidos por estresse hídrico e do retículo, sugerindo que *GmATAF* seja um repressor de vias de resposta a diferentes estresses em soja. Diante do potencial dos transfatores NAC como alvos para estratégias de resistência engenheirada, foram, além de *GmATAF*, isolados e caracterizados outros 6 genes NACs de soja (*GmNAC1-GmNAC6*). Os 7 genes *GmNACs* puderam ser filogeneticamente separados em 6 subgrupos: *ATAF1*, *ATAF2*, *NAP*, *ANAC*, *NAM* e *TERN*, constituindo possivelmente genes NACs funcionalmente não-redundantes. Ensaios de expressão transiente em tabaco revelaram que todas as proteínas *GmNAC* localizam-se no núcleo,

consistentemente com a atuação como fatores de transcrição. Além disso, as proteínas GmNAC2, GmNAC3 e GmNAC5 exibiram capacidade de ativação transcricional em leveduras. Consistentemente com a heterogeneidade funcional sugerida pelo agrupamento filogenético, a análise do padrão de expressão dos genes *GmNACs* revelou uma expressão diferencial em órgãos de soja. Utilizando plantas transgênicas defeituosas na ativação da via de resposta a proteínas mal dobradas no RE (via UPR), foi demonstrado que a ativação dos genes *GmATAF*, *GmNAC2* e *GmNAC6* é sinalizada por estresses no RE por meio de uma via distinta da UPR. Os genes *NACs* de soja também estão envolvidos na resposta a outros estresses abióticos. Foi demonstrado que *GmATAF*, *GmNAC2*, *GmNAC3* e *GmNAC4* são fortemente induzidos por estresse osmótico, mas possivelmente em vias distintas, pois enquanto *GmNAC3* e *GmNAC4* são também induzidos pelo hormônio ABA, a indução de *GmATAF* e *GmNAC2* durante o estresse osmótico parece ser independente de ABA. *GmNAC3* e *GmNAC4* são induzidos também por estresse salino e por ácido jasmônico, mas não por baixas temperaturas. Consistentemente com o envolvimento em morte celular, os genes *GmATAF*, *GmNAC1* e *GmNAC6* são induzidos por indutores de morte celular e reprimidos por inibidores de senescência. Além disso, a expressão transiente de *GmNAC1*, *GmNAC5* e *GmNAC6* em folhas de tabaco resultou em morte celular e ativou a expressão do gene marcador de senescência *CP1*. A análise da expressão gênica em folhas de soja senescentes sugere que, enquanto *GmNAC1* está associado à progressão da senescência, *GmNAC5* e *GmNAC6* induzem outras formas de morte celular, como as que ocorrem durante o desenvolvimento do embrião e na resposta hipersensível. Coletivamente, estes resultados indicam que os genes *NACs* caracterizados constituem fatores de transcrição envolvidos na resposta a estresses abióticos e participam em eventos de morte celular em soja.

ABSTRACT

PINHEIRO, Guilherme Luiz, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December of 2007. **Molecular and functional characterization of the NAC transfactor family from soybean (*Glycine max*)**. Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-Advisers: Luciano Gomes Fietto and Marcelo Ehlers Loureiro.

The identification of cell signaling pathways in response to different stresses has become a major focus for understanding the molecular bases of plant-environment interactions. We have previously identified a set of soybean genes co-regulated by ER- and osmotic stresses, which possibly constitute a novel integrative pathway in plants. Among the identified genes, *GmATAF2* and *GmNAM* encode transcription factors from the NAC-family, whose representatives are involved in events of plant development and response to biotic and abiotic stresses. In this study, we demonstrated that the ESTs of *GmATAF2* and *GmNAM* correspond to different regions of the same gene, homologous to *Arabidopsis ATAF1* and *ATAF2* and named *GmATAF*. Furthermore, *GmATAF* transient expression in soybean protoplasts resulted in the repression of the integrative genes and genes specifically induced by dehydration and ER stress, suggesting that *GmATAF* is a repressor of different stress-responsive pathways in soybean. Given the potential of NAC transactors as targets for strategies of engineered resistance, in addition to *GmATAF*, we isolated and characterized other 6 soybean NAC genes (*GmNAC1*- *GmNAC6*). The 7 *GmNAC* genes could be phylogenetically separated into 6 subgroups: ATAF1, ATAF2, NAP, ANAC, NAM and TERN, possibly representing non-redundant NAC genes. Transient expression experiments in tobacco plants revealed that all *GmNAC* proteins were located in the nucleus, consistent with their roles as transcription factors.

Moreover, GmNAC2, GmNAC3 and GmNAC5 proteins exhibited transcriptional activity in yeast. Consistent with a functional diversity suggested by the phylogenetic analysis, the *GmNAC* genes displayed a differential expression pattern in soybean organs. Using transgenic plants defective for the unfolded protein response (UPR) activation, we demonstrated that activation of *GmATAF*, *GmNAC2* and *GmNAC6* genes occurs via an ER-stress signaling pathway distinct from the UPR. The *NAC* soybean genes are also involved in the response to other abiotic stresses. We demonstrated that *GmATAF*, *GmNAC2*, *GmNAC3* and *GmNAC4* are strongly induced by osmotic stress, though possibly through different pathways. While *GmNAC3* and *GmNAC4* are also induced by the hormone ABA, the induction of *GmATAF* and *GmNAC2* during osmotic stress seems to be ABA-independent. *GmNAC3* and *GmNAC4* are also induced by salinity and jasmonic acid, but not by low temperatures. Consistent with an involvement in cell death programs, *GmATAF*, *GmNAC1* and *GmNAC6* genes were up-regulated by cell death inducers and repressed by senescence inhibitors. Furthermore, the transient expression of *GmNAC1*, *GmNAC5* and *GmNAC6* in tobacco leaves resulted in cell death and enhanced the expression of the senescence gene marker *CP1*. Gene expression analysis of senescent soybean leaves suggests that *GmNAC1* is associated with senescence progression, while *GmNAC5* and *GmNAC6* is more likely to be involved in other forms of cell death, such as embryo development-induced cell death and the hypersensitive response. Collectively, these results indicate that the characterized *NAC* genes consist of transcription factors involved in response to different abiotic stresses and take part in cell death events in soybean.

I - INTRODUÇÃO

As plantas são constantemente expostas a uma diversidade de condições ambientais adversas, tais como baixas temperaturas, salinidade, seca, inundações, estresse oxidativo, toxicidade por metais pesados, ataques de patógenos e herbívoros. Esses fatores restringem profundamente o crescimento da planta e a produtividade agrícola, além de limitar a abrangência geográfica de áreas cultiváveis. Os estresses abióticos constituem a principal causa de prejuízos na agricultura em todo o mundo, diminuindo a média de lucros para os principais cultivares em mais de 11% (Bray *et al.*, 2000), o que corresponde à perda de centenas de milhões de dólares todo ano.

A capacidade das plantas em lidar com estresses abióticos depende de uma defesa rápida e coordenada. Alterações moleculares complexas operam para aumentar a tolerância contra essas condições restritivas e são críticas para garantir a sobrevivência das plantas em geral (Mahajan & Tuteja, 2005). Essas alterações englobam a indução da expressão de genes específicos e a ativação de vias de sinalização, que agem cooperativamente na tentativa de aliviar o efeito deletério do estresse e estabelecer o retorno à homeostasia celular.

O desenvolvimento de plantas mais tolerantes é uma abordagem extremamente importante para superar os danos causados por esses estresses. Quando os genes de interesse encontram-se fora do pool gênico primário da espécie, ou deseja-se manipular a expressão de algum gene endógeno, a engenharia genética oferece as ferramentas básicas para identificar, selecionar, isolar e transferir genes específicos para um amplo

espectro de seres vivos (Binsfeld, 2000). Nesse caso, a maior dificuldade consiste em identificar e caracterizar genes alvos para a transformação de plantas. Recentemente, com a análise em escala genômica do transcriptoma diferencialmente regulado por estresses em diferentes espécies de plantas (Kawasaki *et al.*, 2001; Seki *et al.*, 2002; Rabbani *et al.*, 2003; Bray, 2004; Vogel *et al.*, 2005), vários genes importantes em vias de resposta a estresses abióticos foram identificados. A identificação desses genes é essencial para o entendimento dos mecanismos de tolerância e fornece alvos para a manipulação genética direcionada, tendo como objetivo a obtenção de variedades mais tolerantes a estresses ambientais.

As estratégias para resistência engenheirada em plantas têm se baseado na manipulação da expressão de fatores de transcrição e outros genes regulatórios (Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998; Hsieh *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2006), uma vez que eles governam a expressão de vários genes alvo envolvidos na resposta a um determinado estresse. Entretanto, também tem sido descrito o aumento da tolerância por meio da manipulação da expressão de um único gene, geralmente envolvido diretamente em mecanismos de proteção celular (Bartels, 2001; Zhu, 2001; Valliyodan & Nguyen, 2006). Esta classe inclui genes (1) cujos produtos atuam funcionalmente em vias de desintoxicação de produtos gerados em condições de estresses, tais como genes relacionados com o sistema antioxidativo (Amaya *et al.* 1999); (2) que codificam enzimas para biossíntese de osmoprotetores (Kishor *et al.*, 1995); (3) envolvidos na homeostase iônica intracelular, como o gene que codifica o antiporte vacuolar Na^+/H^+ (Apse *et al.*, 1999) e (4) envolvidos em vias de reparo

de proteínas e estruturas celulares, como genes que codificam chaperones moleculares (Badawi *et al.*, 2004, Rodrigues *et al.*, 2006).

Os chaperones moleculares são definidos como proteínas que facilitam o correto dobramento das proteínas *in vivo* e são induzidos por uma variedade de estresses fisiológicos (Hammond & Helenius, 1995). Os chaperones moleculares do retículo endoplasmático (RE) são induzidos pelo acúmulo de proteínas mal dobradas no lúmen do RE (Fontes *et al.*, 1992; Figueiredo *et al.*, 1997; Cascardo *et al.*, 2000). Estresses no RE podem ativar a via de resposta a proteínas mal dobradas (*Unfolded Protein Response - UPR*). A UPR é uma via de transdução de sinal que ativa a transcrição coordenada de um conjunto de genes envolvidos no restabelecimento da homeostasia no RE, tanto pelo aumento da capacidade de dobramento das proteínas como pelo decréscimo da demanda destes dobramentos (Urade, 2007).

Recentemente foi demonstrada uma possível comunicação entre a via UPR e o estresse hídrico, por meio da caracterização de uma isoforma do chaperone molecular BiP de soja que é induzida por tunicammina (um potente ativador da via UPR) e também por estresse hídrico, em vias de sinalização distintas (Cascardo *et al.*, 2000). Com a finalidade de investigar a comunicação entre a via UPR e vias responsivas a estresse osmótico, e elucidar o potencial do chaperone molecular BiP em manter o turgor da folha sob déficit hídrico (Bertolotti *et al.*, 2000; Alvim *et al.*, 2001) recentemente foram identificados por nosso grupo genes co-regulados por estes estresses (Irsigler *et al.* 2007). Os resultados sugerem a ativação de uma via inédita de sinalização que parece integrar as duas respostas de defesa da planta, potencializando os mecanismos de defesa a diversas condições de estresses (Figura 1). Dentre os

genes co-regulados identificados em soja, destacam-se 2 transfatores, *GmATAF2* e *GmNAM*, cujas ESTs codificam proteínas da família NAC. Genes NAC constituem uma grande família de fatores de transcrição específicos de plantas que está representada em *Arabidopsis* por mais de 100 genes (Riechmann *et al.*, 2000). Os representantes desta família estão envolvidos em diversos eventos de desenvolvimento da planta, diferenciação celular, sinalização hormonal, embriogênese, senescência e tolerância a diversos tipos de estresse (Olsen *et al.*, 2005).

O presente trabalho teve como objetivo primordial caracterizar molecular e funcionalmente os transfatores NAC (*GmATAF2* e *GmNAM*) co-regulados pelo estresse no RE e estresse osmótico, em virtude de seu provável papel regulatório nessa via inédita de integração (Figura 1). Além disso, levando em consideração as diversas funções dos genes NAC e diante do potencial desses transfatores como alvos para estratégias de resistência engenheirada, foram isolados outros membros dessa família em soja e o padrão de expressão desses genes na resposta a diversos tipos de estresse foi avaliado.

A convergência entre vias de resposta a estresse osmótico e do retículo endoplasmático promove ativação gênica

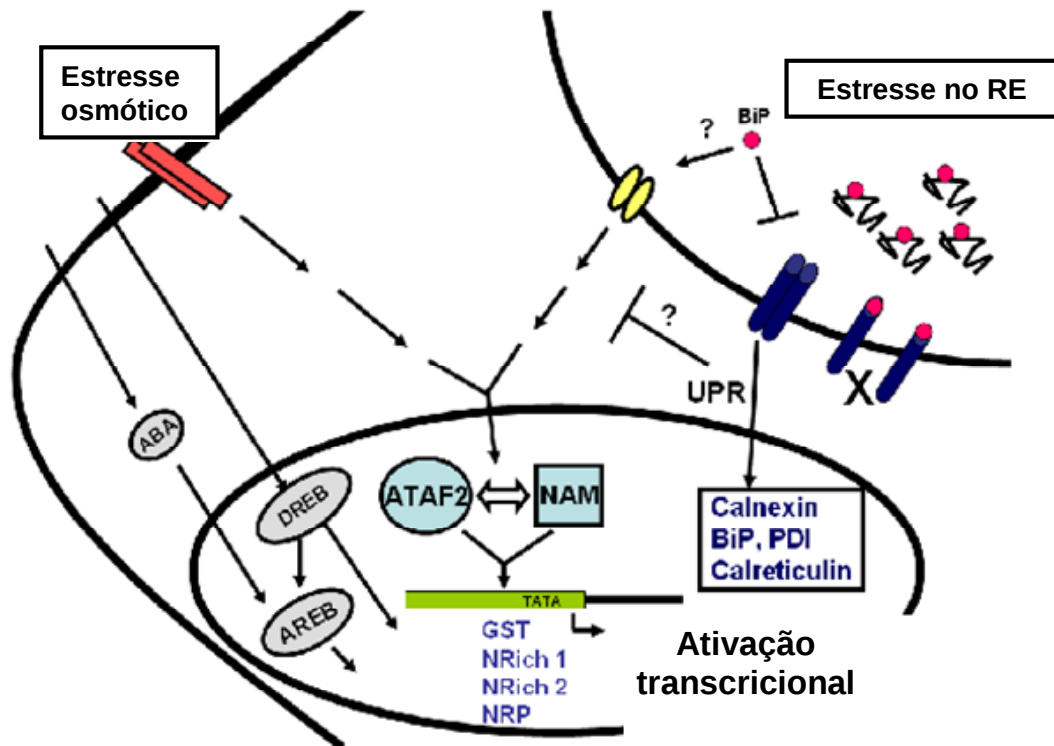


Figura 1 - Integração entre as vias de sinalização induzidas em resposta ao estresse osmótico e ao estresse do retículo endoplasmático (RE). Estresse originado no RE por acúmulo de proteínas mal dobradas ativa uma via de sinalização que integra ao sinal osmótico de uma maneira convergente no nível de ativação dos genes *ATAF2*, *NAM*, *GST*, *NRich1* e *NRich2*. No modelo, é destacada a via UPR, ativada por um receptor transmembrana do RE que é regulado por concentrações de BiP no RE e resulta na ativação dos genes que codificam chaperones moleculares tais como: calreticulina, BiP e calnexina. Em destaque, também, as vias de resposta à seca dependente do hormônio ABA ou mediada por DREB. Figura retirada, com modificações, de Costa *et al.*, 2007.

II - REVISÃO DE LITERATURA

1 - Aspectos gerais sobre os fatores de transcrição NAC

Processos vitais nos diferentes organismos dependem de um grande número de fatores de transcrição que regulam a expressão de genes importantes para o desenvolvimento e para a adaptação a variações no ambiente. As proteínas NAC (acrônimo de NAM, ATAF1,2 e CUC2) foram descritas pela primeira vez há pouco mais de uma década (Souer *et al.*, 1996) e constituem uma das maiores famílias de fatores de transcrição específicos de plantas (Riechmann *et al.*, 2000), sendo que foram encontrados 111 genes no genoma de *Arabidopsis thaliana* e 142 genes em *Oryza sativa* (<http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v1.0/>).

Embora apenas uma parcela das proteínas NAC tenha sido caracterizada até o momento, tem sido demonstrado que essa família está envolvida em diversos processos do desenvolvimento vegetal, incluindo manutenção do meristema apical (Souer *et al.*, 1996; Aida *et al.*, 1997; Weir *et al.*, 2004); morfogênese dos órgãos florais (Sablowski & Meyerowitz 1998); controle da época de floração em resposta a estresses (Yoo *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007b); desenvolvimento embrionário (Duval *et al.*, 2002); sinalização hormonal (Xie *et al.*, 2000; Che *et al.*, 2002; Fujita *et al.*, 2004); regulação da síntese da parede celular secundária em fibras (Zhong *et al.*, 2006; Ko *et al.*, 2007; Zhong *et al.*, 2007); defesa contra vírus e fungos (Xie *et al.*, 1999; Ren *et al.*, 2000; Collinge & Boller, 2001; Hegedus *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2005); resposta a diferentes estresses abióticos (Tran *et al.*, 2004; Fujita *et al.*, 2004;

Hu *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2006; Nakashima *et al.*, 2007; Irsigler *et al.*, 2007); controle do ciclo celular (Kim *et al.*, 2006) e regulação da senescência foliar (John *et al.*, 1997; Guo & Gan, 2006; Uauy *et al.*, 2006).

2 - Organização estrutural das proteínas NAC

Os transfatores NAC apresentam uma configuração geral que consiste em uma região N-terminal extremamente conservada de ligação ao DNA (domínio NAC) e uma região C-terminal altamente divergente em sequência e extensão, que não contém nenhum domínio conhecido (Ooka *et al.*, 2003). A maioria dos genes NAC contém três éxons e 2 íntrons. Os primeiros dois éxons de todos os membros dessa superfamília codificam o domínio NAC conservado, enquanto que o último éxon codifica o domínio divergente de transativação (Duval *et al.*, 2002).

O domínio NAC compreende aproximadamente 160 resíduos de aminoácidos, onde blocos conservados se intercalam com blocos de aminoácidos heterogêneos ou *gaps*, definindo cinco subdomínios (A-E) dentro do grande domínio NAC, conforme designado por Kikuchi *et al* (2000) e Ooka *et al* (2003) (Figura 2). Os dois subdomínios N-terminais (A e B) exibem uma carga líquida negativa, enquanto os outros subdomínios são positivamente carregados (Xie *et al.*, 1999). Os subdomínios A, C e D são altamente conservados em proteínas NAC de diferentes espécies, já os subdomínios B e E são mais divergentes (Ooka *et al.*, 2003). Ensaios de ligação ao DNA de diversos mutantes deletoriais de *AtNAM* em leveduras mapearam o domínio de ligação ao DNA aos subdomínios D e E (Duval *et al.*, 2002). Análises de

seqüência identificaram sinais bipartidos de localização nuclear (NLS) no subdomínio D das proteínas NAC1 e ANAC de *Arabidopsis*, e em concordância com isso, as respectivas proteínas foram localizadas exclusivamente no núcleo (Xie *et al.*, 2000; Greve *et al.*, 2003).

Ensaio em leveduras e células de plantas têm demonstrado que as regiões C-terminais de diversas proteínas NAC funcionam como domínios de ativação transcricional (Xie *et al.*, 2000; Ren *et al.*, 2000; Duval *et al.*, 2002; Hegedus *et al.*, 2003; Tran *et al.*, 2004; Fujita *et al.*, 2004). A divergência na região C-terminal é a principal causa da grande variação em tamanho das proteínas NAC que, por exemplo, em soja, variam de 279 resíduos de aminoácidos na proteína GmNAC1 para 397 resíduos na proteína GmNAC5 (Meng *et al.*, 2007). Outra característica comum da região C-terminal é a ocorrência de repetições simples de aminoácidos e de regiões ricas em serina e treonina, prolina e glutamina, ou ricas em resíduos ácidos (Kikuchi *et al.*, 2000; Duval *et al.*, 2002; Meng *et al.*, 2007). A divergência de seqüências e a presença dessas regiões são características comuns de domínios de transativação em plantas (Liu *et al.*, 1999). Análises *in silico* da região C-terminal do gene *SsNAC23* (*Saccharum sp.* NAC) revelaram motivos comuns (regiões ricas em serinas, aminoácidos acídicos e hidrofóbicos) entre proteínas pertencentes à sub-família ATAF de monocotiledôneas e dicotiledôneas, sugerindo que estas regiões são conservadas em paralelo com o domínio NAC (Nogueira *et al.*, 2005).

A	
ATAF1	-----MSELLQLPPGFRFHPTDEELVMHYLCRKCAS-QSIAVP
GmNAC2	-----MASELELPPGFRFHPTDEELVLHYLCRKCAS-QPIAVP
StNAC	-----MNKGATGNQQLLPAGFRFHPTDELVQHYLCRKAG-QPIAVS
OsNAC6	-----MSGGQDLQLPPGFRFHPTDEELVMHYLCRCAG-LPIAVP
BnNac14	-----MVKAGADLQFPPGFRFHPTDEELVLMYLCRKAS-QPIAAP
GRAB1	--MVMAAAERRDAEALNLPPGFRFHPTDEELVADYLCARAAG-RAPPVP
ANAC019	----MGIQETDPLTQLSLPPGFRFYPTDEELMVQYLCRKAAG-YDFSLLQ
AtNAC1	METEEEMKESSISMVEAKLPPGFRFHPKDELVCDYLMRSLHNNHRPPL
CUC2	--MDIPYYHYDHGGDSQYLPPGFRFHPTDEELITHYLLRKVLGDG-CFSSR
B	
ATAF1	IIAEIDLYKYDPWELPGLALYGEKEWYFFSPRDRKYPNGSRPNRSAGSGY
GmNAC2	IIAEIDLYKYDPWDLPLGLATYGEKEWYFFSPRDRKYPNGSRPNRAAGTGY
StNAC	IITEIDLYKFDPWQLPEKALYGEKEWYFFSPRDRKYPNGSRPNRAAGTGY
OsNAC6	IIAEIDLYKFDPWQLPRMALYGEKEWYFFSPRDRKYPNGSRPNRAAGSGY
BnNac14	IITEIDLYRYDAWDLPLDMALYGEKEWYFFSPRDRKYPNGSRPNRAAGTGY
GRAB1	IIAELDLYRFDPWELPERALFGAREWYFFTPRDRKYPNGSRPNRAAGGGY
ANAC019	LIAEIDLYKFDPWVLPNKALFGEKEWYFFSPRDRKYPNGSRPNRVAGSGY
AtNAC1	VLIQVDLNKCEPWDIPKMACVGGKDWYFYSQRDRKYATGLRTNRRATATGY
CUC2	AIAEVDLNKCEPWQLPGRAKMGEKEWYFFSLRDRKYPTGLRTNRATEAGY
C	
ATAF1	WKATGADKPIGLP---KPVGIKKALVFYAGKAPKGEKTNWIMHEYRLADV
GmNAC2	WKATGADKPIGQP---KPVGIKKALVFYAGKAPKGDKSNWIMHEYRLADV
StNAC	WKATGADKPIVGKP---KTLGIIKKALVFYAGKAPRGIKTNWIMHEYRLANV
OsNAC6	WKATGADKPIVGSP---KPVAIKKALVFYAGKAPKGEKTNWIMHEYRLADV
BnNac14	WKATGADKPIGRP---KPVGIKKALVFYSGKPPRGEKTNWIMHEYRLADV
GRAB1	WKATGADRPVARA--GRTVGIIKKALVFYHGRPSAGVKTDWIMHEYRLAGA
ANAC019	WKATGTDKIISTE--GQRVGIKKALVFYIGKAPKGTKTNWIMHEYRLIEP
AtNAC1	WKATGKDRTILR--KGKLVGMRLKTLVFYQGRAPRGRKTDWVMHEFRLQGS
CUC2	WKATGKDREIFSSKTCALVGMKKTLLVFYKGRAPKGEKSNWVMHEYRLLEGK
D	
E	
ATAF1	DRSVRKKKNSLRLDDWVLCRIYNKK-----
GmNAC2	DRSVRKK-NTLRLDDWVLCRIYNKK-----
StNAC	DRSAGKN-NNLRLDDWVLCRIYNKK-----
OsNAC6	DRSARKK-NSLRLDDWVLCRIYNKK-----
BnNac14	DRSVRKG-NSLRLDDWVLCRIYNKK-----
GRAB1	DGRAAKNGGT LRLDEWVLCRLYNKK-----
ANAC019	SRRN----GSTKLDDWVLCRIYKKQ-----
AtNAC1	HPPNHS-LSSPKEDWVLCRVFHKN-----TEG-----VICRDNM
CUC2	FSYHFIS-RSS-KDEWVISRVFQKTTLASTGAVSEGGGGGATVSVSSGT
ATAF1	-----GATERRGPPPPVVG-----DEIMEE-KPKVT-----
GmNAC2	-----GTIEKLQPSDDVAHSRNIESSEIEDR-KPEILKSG--
StNAC	-----GTLEKHYNVDNKETAS---FGEFDEEIKPKILP----
OsNAC6	-----GGLEKP-PAAAVAAAGMVSSGGGVQR-KPMVGVN---
BnNac14	-----GVIEKRR--SEVANG-----
GRAB1	-----NQWEKMQRQRQEEEEAA-----
ANAC019	-----SSAQKQVYDNGIANAREFSNNGTSST-----
AtNAC1	G-----SCFDET----ASASLPPLMDPYINFQEPSSYLSDDH
CUC2	GPSKKTVPSTISRNYQEPPSSSVSLPPLDPTTTTGLGYTSSCSYDSR
ATAF1	-----EMVMPPPPQQTs--EFAYFD-TSDSVPKLHTTDSS-CSEQVVS
GmNAC2	GGCLPPPAPVPAPPQATAKTDYMYFD-PSDSIPKLHT-DSS-CSEQVVS
StNAC	----TQLAQMPPRPRSTPTNDYFHFE-SSESMTRMHTTNSSSGSEHVLSP
OsNAC6	AAVSSPPEQKPVVAGPAFPDLAAYYDRPSDSMPRLHADSS--CSEQVLSP
BnNac14	-----HVMAP-----VMLNFD-----KPELIGGSSCDQRVVSP
GRAB1	-----AKAAASQSVSWGETRTPESDVNDNPFPELDSLPEFQTANASILP
ANAC019	-----TSSSSHFEVDLDSFHQEIENRNFQFSNPNRISSLRPDLTEQKT
AtNAC1	HY-----INEHVPCFSNLSQNQTLNSNLTNVSELKIPCK---NPNP
CUC2	STNTTVTASAITHEVSCFSTVPTTTTALGLDVNSFSRLPPLGFDFDPFP

ATAF1	EFTSEVQSEP-KWKDWSAVSNDNNNTLDFGFNYIDATV-----DN
GmNAC2	GFASEVQSEP-KWNEW-----EKSLEFPFNYVDATL-----NN
StNAC	-CDKEVQSAP-KWDED-----HRNTLDFQLNYLDGLL-----NE
OsNAC6	EFACEVQSQP-KISEWER-----TFATVGPINPAASIL-----DP
BnNac14	EFRCEAKTEPSRW-----SNALEVPFNYVDAIA-----DN
GRAB1	KEEVQELGND-DWLMG-----ISLDDLQGPGLMLPW-----DD
ANAC019	GFHGLADTSNFDWASFAGNVEHNNVPELGMSHVVPNLEYNCGYLKTEEE
AtNAC1	LFTGGSASAT-----LTGLDSFCSSDQMVLRLALLSQLTKIDG
CUC2	RFVSRNVSTQSNFRSFQE-----NFNQFPYFGSSASTMTSAVN-LPSFQG
ATAF1	AFGG--GG---SSNQMFPLQDMFMYMQKPY-----
GmNAC2	SFMAQFQG---NNQMLSPLQDMFMYWPNKS F----
StNAC	PFETQMQQQSCNFDQFNNFQDMFFYMQKPY-----
OsNAC6	AGSGGLGG-LGGGGSDPLLQDILMYWGKPF-----
BnNac14	EIVSRLLG---GNQMWSTLDPLVVRQRTF-----
GRAB1	SYAASFSL---PVATMKMEQDVSPFFF-----
ANAC019	VESSHGFNNSGELAQKGYGVDSFGYSGQVG GFGFM
AtNAC1	SLGPKEQSQYGESESLLTDIGIPST--- -VWNC
CUC2	GGGVSGMNYWLPATAEENESKVGVLHAGLD CIWNY

Figura 2. **Estrutura primária das proteínas NAC.** A comparação entre seqüências NAC revela um padrão geral de alinhamento, com uma região N-terminal conservada (domínio NAC) e uma região C-terminal divergente (domínio de transativação). As letras (A a E) indicam os subdomínios do domínio NAC. Resíduos em vermelho são idênticos em mais da metade das seqüências, enquanto resíduos em azul são quimicamente similares em mais da metade das seqüências ou similares ao resíduo dominante. O alinhamento foi realizado pelo programa ClustalW. Números de acesso: *A. thaliana* ATAF1 (NP_171677); *Glycine max* GmNAC2 (AAY46122); *Solanum tuberosum* StNAC (CAC42087); *Oriza sativa* OsNAC6 (BAA89800); *Brassica napus* BnNAC14 (AAP35055); *Triticum* sp. GRAB1 (CAA09371); *A. thaliana* ANAC019 (NP_175697); *A. thaliana* NAC1 (AAF21437); *A. thaliana* CUC2 (BAA19529).

3 - Estrutura tridimensional do domínio NAC

Recentemente, a estrutura tridimensional do domínio NAC da proteína ANAC019 foi determinada por cristalografia de raios-X, revelando um dobramento inédito em grupos de transfatores (Ernst *et al.*, 2004). O domínio NAC consiste de uma folha- β antiparalela retorcida que faz contatos com uma α -hélice N-terminal de um lado e uma α -hélice mais curta no lado oposto (Figura 3). Ferramentas para comparação entre estruturas de proteínas não revelaram nenhum homólogo estrutural (Ernst *et al.*, 2004). O domínio NAC

não possui nenhum motivo de ligação a DNA conhecido, mas uma das faces do domínio é rico em cargas positivas. As proteínas NAC são capazes de formar homo e heterodímeros, e a habilidade de dimerização foi localizada no domínio NAC (Xie et al., 2000; Olsen et al., 2004), embora possa ser influenciada por regiões C-terminais (Hegedus et al., 2003). O domínio NAC de ANAC019 forma, preferencialmente, dímeros em solução (Olsen et al., 2004) e no estado cristalino (Ernst et al., 2004). Os contatos do dímero envolvem resíduos localizados na extremidade N-terminal altamente conservada do domínio NAC e consistem de interações hidrofóbicas entre duas fitas- β antiparalelas intercadeia e duas pontes salinas proeminentes (Figura 3). As pontes salinas são formadas pelos resíduos arginina-19 e glutamato-26. Quando esses dois resíduos são mutados para alanina, o domínio NAC de ANAC019 é encontrado exclusivamente em sua forma monomérica, indicando que as pontes salinas são indispensáveis para a dimerização (Olsen et al., 2005).

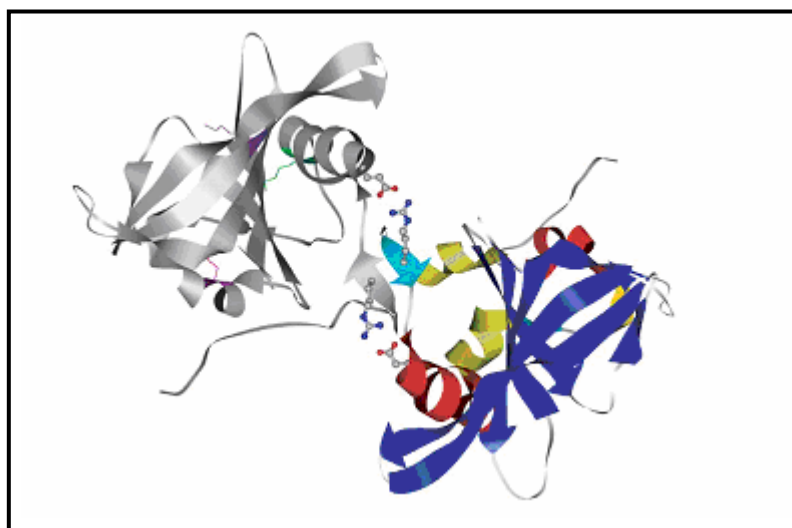


Figura 3. **Estrutura tridimensional do domínio NAC.** Os resíduos Arg19 e Glu26, envolvidos em pontes salinas na interface do dímero de ANAC019, são mostrados em modelo de bola e bastão. Um dos monômeros está colorido, de acordo com a estrutura secundária: as duas α -hélices principais em vermelho, a folha- β principal em azul escuro, e hélices e fitas- β menores em amarelo e azul claro, respectivamente (Ernst et al., 2004).

4 - Especificidade de ligação ao DNA

A habilidade das proteínas NAC de se ligarem ao DNA foi inicialmente sugerida pela ativação da região promotora 35S do vírus do mosaico da couve flor (CaMV) pelas proteínas ATAF1 e ATAF2 de *Arabidopsis* (Xie *et al.*, 1999). Desde então, várias proteínas NAC foram caracterizadas pela propriedade de ligação a este promotor, em uma região que se sobrepõe ao cis-elemento *ocs/as-1*, um sítio de ligação de transfatores bZIP (Xie *et al.*, 2000; Duval *et al.*, 2002; Ernest *et al.*, 2004 e Hegedus *et al.*, 2003).

As proteínas ANAC019, ANAC055 e ANAC072 foram isoladas pela capacidade de ligação a um fragmento de 63 pb do promotor de *ERD1* (*early responsive to dehydration stress*), que contém um cis-elemento MYC-like (CATGTG) envolvido na resposta a estresse hídrico de maneira independente de ABA (Tran *et al.*, 2004). Ensaios com diversas mutações do promotor demonstraram que as seqüências TCNNNNNNNACACGCATGT e CACG constituem o sítio que é reconhecido por proteínas NAC no fragmento do promotor (NACRS) e o núcleo de ligação ao DNA, respectivamente. A região promotora dos genes *ANAC019*, *ANAC055* e *ANAC072* contém vários cis-elementos conservados, inclusive o núcleo CACG de ligação para proteínas NAC, indicando a possibilidade de regulação da expressão de genes NAC por proteínas dessa mesma família, como já sugerido anteriormente (Xie *et al.*, 2000; Vroemen *et al.*, 2003).

Um estudo independente, baseado na seleção *in vitro* de oligonucleotídeos, permitiu a identificação de sítios consenso de ligação ao DNA para duas proteínas NAC de *Arabidopsis*, ANAC019 e ANAC092 (Olsen

et al., 2005b). As seqüências identificadas são similares e ambas contêm o núcleo CGT[GA], seqüência complementar reversa de CACG. Os autores demonstraram também que a capacidade de ligação das proteínas NAC ao promotor 35S de CaMV depende de sítios similares ao NACRS. Ensaio de EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) demonstraram que as proteínas NAC se ligam ao DNA como homo ou heterodímeros e que a dimerização é necessária para a ligação estável ao DNA. Deleções curtas na região amino-terminal impedem não só a ligação ao DNA, mas também a dimerização, sugerindo que o domínio de ligação ao DNA de proteínas NAC é constituído tridimensionalmente após a interação entre dois domínios NAC.

5 - Funções biológicas em processos de desenvolvimento vegetal

O estudo de mutantes nulos para proteínas NAC de *Arabidopsis* sinalizou pela primeira vez a importância desta família de proteínas nos processos biológicos de plantas. A maioria de mutantes *nam* (*no apical meristem*) de petúnia (*Petunia x hybrida*) não possui meristema apical e morrem após o estágio de germinação (Souer *et al.*, 1996). As plântulas mutantes exibem fusão de cotilédones e aquelas que conseguem se desenvolver além desse estágio apresentam desenvolvimento floral anormal. *NAM* foi o primeiro gene NAC a ser caracterizado, seguido pela caracterização do gene *CUC2* (*cup-shaped cotyledon*) de *Arabidopsis* (Aida *et al.*, 1997). Efeitos similares ao fenótipo do mutante *nam* ocorrem com mutações combinadas em *CUC1* e *CUC2*. Dessa forma, foi sugerido que devido aos fenótipos mutantes obtidos e ao padrão de expressão dos genes *NAM*, *CUC1* e *CUC2*, os produtos destes

genes participam da formação do meristema apical. Estudos subsequentes dos genes *CUC* forneceram informações adicionais sobre os papéis de proteínas NAC no desenvolvimento (Takada *et al.*, 2001; Vroemen *et al.*, 2003; Aida *et al.*, 2002; Hibara *et al.*, 2003). O gene *CUC1* codifica uma proteína com alta similaridade de sequência com *CUC2* (Takada *et al.*, 2001). A redundância funcional foi adicionalmente demonstrada após a descoberta de que outro gene NAC de *Arabidopsis*, *CUC3*, está envolvido no estabelecimento dos limites do cotilédono e do meristema apical (Vroemen *et al.*, 2003). *AtNAM* de *Arabidopsis* é um gene cujos transcritos são detectados especificamente na região do meristema apical embrionário, sugerindo sua participação no desenvolvimento do meristema apical do embrião (Duval *et al.*, 2002).

Alguns membros da família NAC estão envolvidos em desenvolvimento floral. A expressão do gene *NAP* (*NAC-like, activated by Apetala3/Pistillata*) é induzida pelo heterodímero *Apetala3/Pistillata*, fatores de transcrição do tipo MADS-Box que participam dos mecanismos de especificação dos órgãos florais (Sablowski & Meyerowitz, 1998). Nesse trabalho foi proposto que *NAP* regula a divisão e a expansão celular durante a determinação da identidade dos órgãos florais. O gene *LOV1* (*long vegetative phase 1*) codifica um transfator NAC de *Arabidopsis* envolvido na regulação da época de floração e na resposta a baixas temperaturas (Yoo *et al.*, 2007). *LOV1* atua como um repressor do desenvolvimento floral ao regular negativamente a transcrição do gene *CO* (*constans*), um indutor de floração que participa em uma via de regulação do fotoperíodo (Samash *et al.*, 2000).

Foi demonstrado que *NAC1* de *Arabidopsis* exerce um papel na formação de raízes laterais, e sua expressão predomina na extremidade da raiz

e nos pontos de iniciação das raízes laterais (Xie *et al.*, 2000). A expressão de *NAC1* é induzida pelo hormônio auxina, que participa da produção de raízes laterais (Xie *et al.*, 2000). Além disso, a superexpressão de *NAC1* aumenta a produção de raízes laterais, enquanto que sua repressão anti-senso diminui a formação das mesmas. Neste estudo também foi demonstrado que *NAC1* ativa especificamente o gene *AIR3* (*auxin-induced in root cultures 3*), que codifica uma protease responsiva a auxina e que enfraquece as conexões celulares, facilitando a emergência da raiz lateral (Neuteboom *et al.*, 1999).

6 - Resposta a estresses bióticos e abióticos

As plantas crescem em um ambiente dinâmico, onde fatores incluindo seca, salinidade, frio e patógenos freqüentemente impõem restrições ao seu crescimento e desenvolvimento, causando prejuízos na agricultura em todo o mundo (Bray *et al.*, 2000). A participação dos transfatores NAC na resposta a estresses abióticos e bióticos foi inicialmente descrita na literatura pela capacidade de várias proteínas NAC de interagirem com outras proteínas de importância biológica nestes processos. Assim, as proteínas GRAB1 e GRAB2 (*Geminivirus RepA Binding*) foram identificadas em trigo (*Triticum sp.*) por sua capacidade de interagir com a proteína RepA de *Wheat dwarf geminivirus* e reprimir a replicação do vírus em células em cultura (Xie *et al.*, 1999). Similarmente, a proteína TIP (*TCV-interacting protein*) foi identificada em *Arabidopsis* por sua interação com a proteína do capsídeo (CP) do vírus TCV (*Turnip crinkle virus*) (Ren *et al.*, 2000). A habilidade do TCV de induzir resposta hipersensível em *Arabidopsis* é dependente da interação entre CP de

TCV e TIP, sugerindo que TIP é essencial à via de resposta e resistência ao TCV (Ren *et al.*, 2000). A proteína SINAC1 (*Solanum lycopersicum* NAC1) interage com a proteína REn (*replication enhancer*) de TLCV (*Tomato leaf curl vírus*) (Selth *et al.*, 2005). REn induz a expressão de *SINAC1*, que por sua vez resulta em aumento do acúmulo do DNA viral. Esses resultados sugerem que, ao contrário de outras proteínas NACs descritas até então, que desempenham funções de defesa contra vírus, SINAC1 desempenha um papel no mecanismo através do qual REn estimula a replicação viral (Selth *et al.*, 2005).

A função de proteínas da família NAC na defesa contra estresses bióticos também foi evidenciada pela indução do gene *StNAC* de *Solanum tuberosum* pela infecção por *Phytophthora infestans* (Collinge & Boller, 2001); de vários genes NAC de *Brassica napus* por ataque de insetos herbívoros e por infecção fúngica (Hegedus *et al.*, 2003); do gene *SsNAC23* de *Saccharum sp.* pelo ataque de insetos herbívoros (Nogueira *et al.*, 2005); do gene *OsNAC19* de *Oriza sativa* por infecção com o fungo *Magnaporthe grisea* (Lin *et al.*, 2007), e pela indução do gene *CaNAC1* de *Capsicum annuum* durante a resposta hipersensível como mecanismo de defesa contra patógenos bacterianos (Oh *et al.*, 2005).

Análises de microarranjos revelaram uma indução rápida e local do gene *ATAF2* de *Arabidopsis* após ferimentos, seguido por um decréscimo até os níveis basais de expressão (Delessert *et al.*, 2004). *ATAF2* também é induzido por metil-jasmonato, ácido salicílico (Delessert *et al.*, 2004) e infecção por patógenos (Hauck *et al.*, 2003), mas não por ABA (Delessert *et al.*, 2005). Interessantemente, plantas superexpressando *ATAF2* apresentam maior susceptibilidade ao fungo patogênico *Fusarium oxysporum*. A análise das

linhagens transgênicas indicou que *ATAF2* atua na repressão de genes relacionados à patogênese (PR-genes). Em particular, o nível de expressão do gene que codifica uma defensina vegetal, *PDF1.2*, e os genes relacionados à patogênese, *PR1* e *PR4*, são reprimidos em plantas com superexpressão de *ATAF2* e reciprocamente induzidos em plantas mutantes nulos para *ATAF2* (Delessert *et al.*, 2005).

A função de proteínas NAC na resposta contra estresses abióticos é evidenciada pela indução de diferentes genes *NAC* de *Brassica napus* (Hegedus *et al.*, 2003) e do gene *SsNAC23* de *Saccharum sp.* (Nogueira *et al.*, 2005) por frio e desidratação. O gene *OsNAC6* de arroz é induzido por ABA, frio, desidratação e salinidade (Ohnishi *et al.*, 2006). Plantas transgênicas superexpressando *OsNAC6* apresentam maior tolerância à desidratação e a estresse salino, e a análise por microarranjos revelou que vários genes responsivos a estresses abióticos são regulados positivamente nessas linhagens (Nakashima *et al.*, 2007). Recentemente, outro gene *NAC* foi isolado e caracterizado em arroz. *SNAC1* (*stress-responsive NAC1*) é induzido por seca, frio, sal e ácido abscísico, predominantemente nas células-guarda dos estômatos (Hu *et al.*, 2006). A superexpressão de *SNAC1* em plantas transgênicas aumenta a tolerância contra estresse hídrico e salino em condições de campo, sem contudo afetar o crescimento e a produtividade da planta em condições normais, o que torna esse gene um alvo interessante para resistência engenheirada em arroz (Hu *et al.*, 2006).

Plantas transgênicas superexpressando 3 diferentes genes *NACs* de *Arabidopsis* (*ANAC019*, *ANAC055* e *ANAC072*) mostraram um significativo aumento da tolerância à seca (Tran *et al.*, 2004). Os três genes são induzidos

por ácido abscísico (ABA), seca e estresse salino. Esses transfatores ligam-se especificamente à seqüência CATGTG do promotor de *ERD1* (*early responsive to dehydration 1*) e regulam vários genes induzidos por estresse. Em outro estudo, observou-se que plantas superexpressando *ANAC072* (referido como *RD26*) são altamente sensíveis a ABA, enquanto plantas com *ANAC072* silenciado não respondem ao hormônio (Fujita *et al.*, 2004). Os resultados sugerem que *RD26* participa de uma nova via de sinalização a estresse dependente ABA (Fujita *et al.*, 2004).

O gene *ATAF1* de *Arabidopsis* é fortemente induzido por ferimentos (Collinge & Boller, 2001), desidratação e ácido abscísico (Lu *et al.*, 2006). Após crescimento sob condições de estresse hídrico, linhagens mutantes *ataf-1* apresentam uma taxa de recuperação cerca de 7 vezes maior do que a de plantas selvagens (Lu *et al.*, 2006). O fenótipo *ataf1* coincide com a expressão aumentada de genes marcadores de resposta a estresse, tais como *COR47*, *ERD10*, *KIN1*, *RD22* e *RD29A*, em condições de déficit hídrico. Tais evidências sugerem que *ATAF1* atua com um regulador negativo de vias de reposta a estresse hídrico, através da repressão de genes responsivos a estresse.

7 - Proteínas NAC e regulação da senescência

A senescência constitui o estágio final do desenvolvimento da folha e é crítico para as funções normais da planta, uma vez que a translocação de nutrientes das folhas para as sementes em desenvolvimento é realizada através desse processo (Lim *et al.*, 2007). A senescência foliar envolve ações celulares e moleculares coordenadas por um programa genético altamente

regulado, mas que pode ser acelerado por fatores ambientais, incluindo seca, limitação nutricional, temperaturas extremas, estresse oxidativo, infecção por patógenos e falta de luz (Kong *et al.*, 2006). A alteração inicial e mais significativa na estrutura celular durante a senescência é o colapso do cloroplasto, a organela que contém até 70% da proteína foliar (Noodén, 1998). Do ponto de vista metabólico, a assimilação de carbono é substituída pelo catabolismo da clorofila e de macromoléculas, como proteínas, lipídeos de membrana e RNA (Woolhouse, 1984). Nos estágios finais da senescência, sintomas típicos de morte celular programada (PCD), tais como colapso vacuolar, condensação da cromatina e fragmentação do DNA em escadas são detectados em uma variedade de plantas (Yen & Yang, 1998; Simeonova *et al.*, 2000). Posteriormente, ocorre desintegração da membrana plasmática e vacuolar, tendo como consequência a quebra da homeostasia celular e morte da célula. Estas observações implicam que a senescência foliar envolve mecanismos que eventualmente levam à PCD (Lim *et al.*, 2007).

A expressão gênica diferencial desempenha importante papel durante a senescência. Numa folha senescente, muitos genes que são expressos em folhas verdes, incluindo os genes envolvidos na fotossíntese, são reprimidos, enquanto que um subconjunto de genes, geralmente referidos como genes associados à senescência (SAGs), são ativados. Estudos recentes do transcriptoma de folhas senescentes levaram à identificação de milhares de SAGs em potencial (Andersson *et al.*, 2004; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2004; Lin & Wu, 2004). Uma análise da alteração da expressão global de genes durante a senescência em *Arabidopsis* levou à identificação de mais de 800 genes que exibem um aumento significativo da expressão, dentre

os quais 96 correspondem a fatores de transcrição (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005).

Um total de 20 transfatores NAC estão presentes no banco de dados de ESTs (dbEST) de folhas senescentes de *Arabidopsis* (Guo *et al.*, 2004), o que representa 20% dos 111 membros da família NAC preditos para essa espécie (Riechman *et al.*, 2000). Além disso, a expressão de genes NAC durante a senescência foliar tem sido relatada por vários grupos (John *et al.*, 1997; Andersson *et al.*, 2004; Lin & Wu, 2004; Guo *et al.*, 2004; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). Recentemente foi isolado um transfator NAC de trigo (*NAM-B1*) que estimula a senescência e aumenta a remobilização de nutrientes das folhas para os grãos em desenvolvimento (Uauy *et al.*, 2006). O gene *AtNAP* exerce importante papel na regulação da senescência foliar em *Arabidopsis* (Guo & Gan, 2006). Sua expressão em folhas está intimamente relacionada ao progresso da senescência. Além disso, a superexpressão induzida de *AtNAP* acarreta senescência precoce, enquanto que em linhagens mutantes há um atraso na senescência.

8 - Regulação transcricional de genes NAC

Os transfatores controlam a expressão de vários genes e podem desencadear respostas de grande amplitude como consequência de pequenas variações em seus níveis. Dessa forma, o controle dos níveis e da atividade de transfatores NAC é de extrema importância e envolve vários mecanismos (Olsen *et al.*, 2005a). A expressão do gene *NAP* (*NAC-like, activated by Apetala 3/Pistillata*) é diretamente ativada pelo heterodímero formado pelas

proteínas *Apetala3* e *Pistillata*, fatores de transcrição essenciais para especificação da identidade dos órgãos florais (Sablowski & Meyerowitz, 1998). O gene *STM* (*shoot meristemless*) codifica um transfator que está envolvido na formação do meristema apical e na separação dos cotilédones (Long *et al.*, 1996; Clark *et al.*, 1996). O padrão espacial da expressão de *CUC1* e *CUC2* em cotilédones é afetado por mutações em *STM* (Aida *et al.*, 1999; Takada *et al.*, 2001) e em *PIN1* (*Pin-Formed 1*), *PID* (*Pinoid*) e *MP* (*Monopteros*), genes envolvidos na sinalização mediada por auxinas (Aida *et al.*, 2002; Furutani *et al.*, 2004). A transcrição de *NAC1* de *Arabidopsis* é ativada por *TIR-1* (*Transport Inhibitor Response 1*), um gene envolvido na degradação de repressores transcricionais por proteólise em resposta a auxina (Zenser *et al.*, 2001) e pelo próprio *NAC1* (Xie *et al.*, 2000); enquanto a transcrição de *CUC3* parece ser estimulada por *CUC1* e *CUC2*, pois a ativação do promotor de *CUC3* é bastante reduzida em mutantes duplos *cuc1/cuc2* (Vroemen *et al.*, 2003).

Trabalhos recentes têm fornecido outros exemplos interessantes de regulação transcricional. Estudos sobre a transição entre células foliares e protoplastos sugerem que a aquisição de pluripotência envolve a ativação de vários genes NAC previamente silenciados, por meio de processos de descondensação da cromatina em regiões teloméricas (Avivi *et al.*, 2004; Grafi, 2004). Outro exemplo de controle por silenciamento é o gene *nrp-1* (*nam-related protein-1*) de milho, que é expresso exclusivamente no endosperma triplóide da semente e é regulado por *imprinting* genômico (Guo *et al.*, 2003). Nesse caso, os alelos maternos de *nrp-1* são expressos, enquanto o alelo

paterno é silenciado, permitindo o controle materno do desenvolvimento do endosperma da semente.

9 - Regulação pós-transcricional

Os miRNAs constituem uma classe de RNAs regulatórios pequenos que pareiam com mRNAs alvos e os direcionam para a degradação, fornecendo um mecanismo de repressão pós-transcricional dos respectivos alvos (Bartels, 2004). Kasschau *et al* (2003) demonstraram que os mRNAs de *CUC1* e *CUC2* são clivados dentro da região complementar ao microRNA da família miR164. Linhagens transgênicas superexpressando *miR164* apresentam número alterado de órgãos florais e fusão de órgãos vegetativos e florais (Mallory *et al.*, 2004; Laufs *et al.*, 2004). Por outro lado, plantas superexpressando versões de *CUC1* (Mallory *et al.*, 2004) e *CUC2* (Laufs *et al.*, 2004) resistentes à clivagem por miR164 são defectivas no desenvolvimento foliar, e no caso de plantas *CUC2*, ocorre um aumento do espaçamento entre sépalas (Laufs *et al.*, 2004). Também foi detectada a clivagem de *NAC1*, At5g07680 e At5g61430, mediada por miR164, demonstrando novamente a importância do controle pós-transcricional de genes NAC específicos (Mallory *et al.*, 2004).

Recentemente foi demonstrado que a clivagem do mRNA de *NAC1* por miR164 *in vivo* tem significado funcional (Guo *et al.*, 2005). Plantas transgênicas superexpressando uma forma de *NAC1* resistente a miR164 apresentam maior número de raízes laterais quando comparadas com plantas transformadas com a versão selvagem de *NAC1*. Experimentos adicionais demonstraram que a indução de *NAC1* por auxina ocorre de forma rápida e

transiente, enquanto *miR164* é induzido de forma tardia. Em conjunto, os dados sugerem que a indução de *miR164* por auxina faz parte de mecanismo auto-regulatório que realiza a degradação dos transcritos de *NAC1* como forma de atenuar o sinal e terminar a sinalização mediada por auxina durante a formação de raízes laterais (Guo *et al.*, 2005).

O transporte por longas distâncias, via floema, do mRNA de *CmNACP* em abóbora (*Cucurbita maxima*) representa outro mecanismo regulatório pós-transcricional. O mRNA de *CmNACP* é transportado de várias regiões do corpo da planta até o ápice caulinar, um mecanismo que pode promover a integração entre processos fisiológicos ocorrendo em órgãos distais com os que ocorrem nos tecidos meristemáticos (Ruiz-Medrano *et al.*, 1999).

10 - Regulação pós-traducional

O repertório de métodos usados para controle da atividade dos transfatores NAC inclui também regulação pós-traducional mediada por proteólise dependente de ubiquitina (Xie *et al.*, 2002). Uma triagem utilizando o sistema duplo híbrido identificou SINAT5 (*SINA of Arabidopsis thaliana 5*) por sua capacidade de interagir com NAC1 (Xie *et al.*, 2002). Esse estudo mostrou que SINAT5 funciona como uma E3 ubiquitina ligase e direciona NAC1 para a degradação proteossômica, como forma de regular negativamente a sinalização por auxinas durante o desenvolvimento de raízes laterais. Outras proteínas NAC podem ser controladas por mecanismos de proteólise. A proteína HSINAC (*HvSPY-Interacting NAC*) de cevada (*Hordeum vulgare*) foi identificada por sua capacidade de interagir com a proteína Spindly (HvSPy),

um regulador negativo de respostas a giberilinas (Robertson, 2004). Baseado em similaridades de seqüência, HvSPY é provavelmente uma enzima da classe das N-acetilglicosaminiltransferases. Isso sugere que a atividade de proteínas NAC pode ser regulada também via modificação covalente por N-acetilglicosamina.

Eventos de clivagem proteolítica atuam não só na degradação de proteínas-alvo, mas também na liberação de fatores de transcrição dormentes seqüestrados em membranas (Hoppe *et al.*, 2001), em um processo denominado proteólise intramembrana regulada (RIP). Quando proteínas NAC são analisadas por ferramentas de bioinformática, diversas seqüências são apontadas pela presença de uma região transmembrana na extremidade C-terminal. O banco de dados de proteínas de membrana ARAMENON (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/>) contém 16 proteínas NAC de *Arabidopsis* e 5 de arroz (*Oriza sativa*). Recentemente, foi caracterizado um transfator NAC ligado a membrana, *NTM1* (*NAC with transmembrane motif 1*), que é ativado por proteólise intramembrana regulada (RIP) e controla a divisão celular em *Arabidopsis* (Kim *et al.*, 2006). A proliferação celular foi significativamente reduzida em mutantes nos quais uma forma transcricionalmente ativa de *NTM1* (desprovida do segmento transmembrana) foi expressa constitutivamente. A forma ativa de *NTM1* desloca-se para o núcleo, induzindo genes repressores da atividade de quinase dependente de ciclinas (CDK) e reprimindo a expressão do gene da histona H4, resultando em diminuição da divisão celular.

Embora a família dos genes NACs tenha sido caracterizada em plantas cuja seqüência genômica é conhecida, como *Arabidopsis* e Arroz, a

caracterização dos genes NACs em soja ainda encontra-se em estágios incipientes (Meng *et al.*, 2007). Assim sendo, os objetivos primordiais dessa investigação foram identificar, clonar e caracterizar molecular e funcionalmente membros da família NAC em soja.

III - MATERIAL E MÉTODOS

1 - Células de soja em suspensão e tratamentos

Cultura de células de soja em suspensão anteriormente preparadas (Cascardo *et al.*, 2001) foram cultivadas em meio MS Soja (Finer & Nagasawa, 1988) mantendo-se o procedimento de subcultivos sucessivos semanais. Os tratamentos foram realizados em culturas de células cinco dias após repicagem.

As células foram tratadas com tunicamicina 10µg/mL, ABA 100 µM (ácido abscísico), JA 100 µM (ácido jasmônico), NaCl 250 mM, cicloheximida 0,5 µg/mL, BAP 10 µM (6-benzilaminopurina) e zeatina 10 µM, pelo período de tempo indicado nas respectivas figuras. Para tratamento por frio, as células foram incubadas a 0°C, em banho de gelo, por 2 horas. Após os tratamentos, as células foram filtradas sob vácuo, lavadas com água destilada e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, para análises subseqüentes.

2 - Material vegetal e tratamentos

Foram utilizadas plantas de soja do cultivar Conquista transformadas com o gene *BiPD* (*soyBiPD*) na orientação senso e plantas do mesmo cultivar não transformadas (WT). As plantas foram inicialmente germinadas em terra na casa de vegetação e após uma semana (ou estágio VC) foram retiradas do solo, procedendo-se a lavagem da raiz e colocadas em solução contendo polietilenoglicol 10% (p/v) (PEG; MW 8000), tunicamicina (Sigma) 10µg/mL, e

os respectivos controles H₂O e DMSO (Sigma), por 8 horas. O material vegetal foi coletado após os tratamentos e imediatamente congelado em nitrogênio líquido, sendo armazenado em *freezer* a -80 °C até o processamento das amostras.

3 - Clonagem molecular do cDNA completo do gene *GmATAF*

A sequência do gene *GmATAF* foi obtida por RACE (**R**apid **A**mplification of **c**DNA **E**nds), utilizando o Gene Racer Kit (Invitrogen). Para o 3'-RACE, inicialmente foi preparado um cDNA a partir de RNA extraído de células de soja tratadas com JA por 2 horas, utilizando transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen) e oligo-dT especial fornecido pelo GeneRacer Kit (Invitrogen), que insere uma sequência conhecida na extremidade 3' do gene. O cDNA resultante foi utilizado como molde para amplificação das extremidades 3', utilizando o oligonucleotídeo *3'-RaceOligo* que ancora nessa sequência-alvo e os oligonucleotídeos *forward* (Tabela 1) correspondentes às ESTs de *ATAF2* e *NAM*, identificadas por nosso grupo por meio de microarranjos (Irsigler *et al.*, 2007).

Para obtenção das extremidades 5' foi utilizado como molde o RNA total extraído de plantas de soja tratadas com PEG por 10 horas, em uma série de reações que promovem a ligação covalente de um adaptador sintético na extremidade 5' de mRNAs contendo CAP, segundo instruções do GeneRacer Kit (Invitrogen). O RNA resultante foi utilizado como molde para síntese de cDNA, utilizando transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen) e oligonucleotídeos específicos para as ESTs de *ATAF2* e *NAM* (Tabela 1), em reações separadas,

segundo recomendações do fabricante. Os cDNAs resultantes foram utilizados como moldes para amplificação das extremidades 5', utilizando o oligonucleotídeo 5'-*RaceOligo*, que ancora na seqüência adaptadora sintética, e os mesmos oligonucleotídeos reversos específicos utilizados para síntese dos cDNAs de *ATAF2* e *NAM*. Os fragmentos obtidos nas reações de amplificação 3'-RACE e 5'-RACE foram clonados no vetor pCR4, segundo instruções do TOPO TA CLONING KIT (Invitrogen), e posteriormente seqüenciados. A análise de seqüências revelou que as ESTs de *ATAF2* e *NAM* correspondem a regiões distintas de um mesmo gene, designado *GmATAF*. Os oligonucleotídeos utilizados no RACE são apresentados na Tabela 1.

4 - Construções de DNA

Para o isolamento do gene *GmATAF* e clonagem de seis membros (*NAC1-NAC6*) da família NAC em soja isolados recentemente (Meng *et al.*, 2007), foram desenhados oligonucleotídeos específicos para amplificação das respectivas regiões codificadoras. As regiões codificadoras de *GmATAF*, *NAC2* e *NAC3* foram inicialmente amplificadas com oligonucleotídeos contendo uma seqüência *attB* parcial na extremidade 5' (Tabela 1), para posterior re-amplificação com extensões de recombinação compatíveis com o sistema Gateway de clonagem (Invitrogen). Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1% (p/v), purificados e inseridos, por recombinação, no vetor de entrada pDONR201, utilizando a BP clonase (Invitrogen). Os clones resultantes pDON-GmATAF (pUFV815), pDON-NAC2 (pUFV831) e pDON-NAC3 (pUFV832) contêm códon de terminação, e foram usados para

transferência dos respectivos cDNAs para o vetor de expressão em leveduras pDEST32 (Invitrogen). Alternativamente, os cDNAs completos foram inseridos por recombinação no vetor de entrada alternativo pDONR207, resultando nos clones pDONR207-GmATAF (pUFV950), pDONR207-NAC2 (pUFV1015) e pDONR207-NAC3 (pUFV1016), que foram utilizados posteriormente para transferência dos respectivos cDNAs para vetores de expressão em plantas.

Para clonagem dos genes *NAC1*, *NAC4*, *NAC5* e *NAC6*, as respectivas regiões codificadoras foram amplificadas com oligonucleotídeos específicos (Tabela 1) e enzima Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen). Os produtos de amplificação resultantes foram inseridos no vetor de entrada pCR8/GW/TOPO segundo informações fornecidas pelo pCR8 TA CLONING KIT (Invitrogen). Os clones resultantes pCR8-NAC1 (pUFV850), pCR8-NAC4 (pUFV862), pCR8-NAC5 (pUFV852) e pCR8-NAC6 (pUFV851) contêm códon de terminação e foram utilizados para a transferência dos respectivos cDNAs para vetores de expressão de plantas e leveduras. As seqüências dos oligonucleotídeos utilizados para as clonagens e diagnósticos dos clones são listadas na Tabela 1.

A transferência dos referidos genes a partir dos vetores de entrada pDONR201 e pCR8/GW/TOPO para o vetor pDEST32, por meio de recombinação mediada por LR Clonase (Invitrogen), deu origem aos clones pBD-GmATAF (pUFV828), pBD-NAC1 (pUFV872), pBD-NAC2 (pUFV841), pBD-NAC3 (pUFV842), pBD-NAC4 (pUFV870), pBD-NAC5 (pUFV873) e pBD-NAC6 (pUFV871). Estas construções permitem a expressão de proteínas fusionadas ao domínio de ligação ao DNA do transfator GAL4 (BD-GAL4) no amino-terminal, e foram utilizadas em ensaios de transativação em leveduras.

Para expressão transiente em folhas de tabaco, os referidos genes foram transferidos dos vetores de entrada pDONR207 e pCR8/GW/TOPO para o vetor binário de transformação de plantas 35S-pYFP-casseteA-NOS-pCambia1300 (cedido gentilmente pelo Dr. Steve Slocombe da Universidade de Leeds, Reino Unido), por meio de recombinação mediada por LR clonase (Invitrogen), dando origem aos clones pYFP-GmATAF (pUFV966), pYFP-NAC1 (pUFV912), pYFP-NAC2 (pUFV1028), pYFP-NAC3 (pUFV1029), pYFP-NAC4 (pUFV913), pYFP-NAC5 (pUFV914) e pYFP-NAC6 (pUFV915). Essas construções permitem a expressão de proteínas fusionadas a YFP (*yellow fluorescent protein*) no amino-terminal em plantas, sob o controle do promotor 35S.

Para a expressão transiente em protoplastos, a região codificadora do gene *GmATAF* foi amplificada utilizando oligonucleotídeos que inserem sítios para as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI* nas extremidades (Tabela 1), e clonada nos sítios correspondentes do vetor pMON921, originando o clone pMON-GmATAF (pUFV814).

Os clones obtidos foram utilizados na transformação de células competentes de *Escherichia coli* da estirpe DH5 α , pelo método do choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989), selecionados com o antibiótico apropriado e diagnosticados por PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos (Tabela 1).

Tabela 1 – Oligonucleotídeos específicos para clonagem em diferentes vetores

Oligonucleotídeo	Seqüência (5' – 3')	Vetor de destino
5'RACE NAM	GAACATGTCCTGCAAGGGCGAGAGCTG	pCR4
3'RACE NAM	AGACTTCAGATTCGGTGCCAAGGTTGC	pCR4
5'RACE ATAF2	AGATCGGTCAACATTGGCGAGGCGATA	pCR4
3'RACE ATAF2	TATTGGAAAGCCACCGGCGCCGATAAG	pCR4
3'-RaceOligo	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG	pCR4
5'-RaceOligo	CGACUGGAGCACGAGGACACUGA	pCR4
Fw-GmATAF/GW	<u>AAAAAGCAGGCTTCACA</u> ATGA AGGGAGAATTAGA	pDONR201/207
GmATAF-Rv/GW	<u>AGAAAGCTGGGTCT</u> CACATCTTCTGTAGGTACAT	pDONR201/207
Fw-GmATAF	CCGGAATTC ATGA AGGGAGAATTAGAGTTG	pMON921
GmATAF-Rv	CGCGGATCCT CACATCTTCTGTAGGTACATG	pMON921
Fw-GmNac1	TTCACA ATGG AGAATAGAACAAAGCTCTG	pCR8/GW/TOPO
GmNac1-Rv	TTATCCTCTTTGATCATACT	pCR8/GW/TOPO
Fw-GmNac2	<u>AAAAAGCAGGCTTCAT</u> GGCATCAGAGCTTGA	pDONR201/207
GmNac2-Rv	<u>AGAAAGCTGGGCTCA</u> AAAGGACTTGTTGGGCCA	pDONR201/207
Fw-GmNac3	<u>AAAAAGCAGGCTTCAT</u> G GGAGTTCCAGAGAG	pDONR201/207
GmNac3-Rv	<u>AGAAAGCTGGGTCTC</u> AGTCCCTAAACCCGA ACTC	pDONR201/207
Fw-GmNac4	TTCACA ATGGG AGTTCCAGAGGAAGA	pCR8/GW/TOPO
GmNac4-Rv	TCAATTCCTGAACCCGAACC	pCR8/GW/TOPO
Fw-GmNac5	TTCACA ATGG AAAACGTTTCGGTTCTT	pCR8/GW/TOPO
GmNac5-Rv	TCAGTAGTTCCACAAGGTAG	pCR8/GW/TOPO
Fw-GmNac6	TTCACA ATGG AAGACATGAACAACATG	pCR8/GW/TOPO
GmNac6-Rv	TCAGTAGA ACTTTAGAATATTGG	pCR8/GW/TOPO

* Nucleotídeos em **negrito** correspondem a *start/stop* códon. Nucleotídeos sublinhados representam *attB* parcial para clonagem via sistema Gateway (Invitrogen). Sítios de enzimas de restrição para clonagem no vetor pMON921 estão representados em *itálico*.

5 - Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), segundo recomendações do fabricante. Para eliminação do DNA contaminante, o RNA total foi tratado com três unidades de DNase livre de RNase (Promega) e purificado com colunas RNeasy Mini Kit (QIAGEN). Após a extração e purificação, o RNA foi quantificado (DU 650 BECKMAN Spectrophotometers) e analisado em gel de agarose desnaturante 1,5 % (p/v), corado com brometo de etídeo 0,1 µg/mL. A síntese de cDNA foi realizada utilizando 4 µg de RNA total, oligo-dT(18) e Transcriptase Reversa M-MLV (Invitrogen), segundo especificações do fabricante.

6 - RT-PCR em Tempo Real (qRT-PCR)

Todo o procedimento de PCR em Tempo Real, incluindo testes, validações e experimentos foram conduzidos seguindo manuais da *Applied Biosystems*. As reações de PCR em tempo real foram conduzidas utilizando o aparelho 7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems), oligonucleotídeos específicos (Tabela 2), cDNAs dos tratamentos e SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). As condições de amplificação foram: 95°C por 10 min, e 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e 60°C por 1 min. Para a quantificação da expressão gênica, foram utilizados os métodos comparativos de Ct: $2^{-\Delta Ct}$ e $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Como controle endógeno para normalização dos dados do qRT-PCR, foi utilizado o *primer* específico para RNA helicase de soja, que apresentou baixa variação de expressão entre os tratamentos.

Tabela 2– Lista dos oligonucleotídeos específicos para qRT-PCR

Oligonucleotídeo	Seqüência (5' – 3')	Gene alvo	Posição de anelamento
NAM Fw	ACGGAGACTTCAGATTCGGTGC	GmATAF	604 a 625
NAM Rv	CATCGTTATTCCACTTGGGGTCGC		701 a 724
Nac1 Fw	GGACTIONCAATAGCCCCAATCA	Nac1	516 a 538
Nac1 Rv	GACCCAAGTAATCCATTTCCAAAAG		610 a 634
Nac2 Fw	GGGTGCTTTGCCGTATTTACAA	Nac2	446 a 467
Nac2 Rv	CTCCTCCGCTTTTCAGAATCTC		559 a 580
Nac3 Fw	GAATGCAGCAATGGGTCATCA	Nac3	535 a 555
Nac3 Rv	ATCCTGCTGGTGCATTGTTCTG		645 a 666
Nac4 Fw	TGACCTCTATGTCCCTGCGTTA	Nac4	831 a 852
Nac4 Rv	CCCCTGTGTGAAATCATTCTGA		945 a 966
Nac5 Fw	CCCCAAAAGTCAAAGAATGAG	Nac5	456 a 477
Nac5 Rv	GTGAGAGGTGGCAAAGCAGAAG		581 a 602
Nac6 Fw	CCAACAAAAGCACTTGTGGCA	Nac6	716 a 736
Nac6 Rv	GGACTATTCAACTGAGCCCCAAAAG		816 a 839
CALN Fw	TGATGGGGAGGAGAAGAAAAAGGC	CALN	* 103 a 126
CALN Rv	CACTTGGGTTTGGGATCTTGGCTC		* 222 a 245
HELIC Fw	TAACCCTAGCCCCTTCGCCT	Helic	* 78 a 97
HELIC Rv	GCCTTGTCGTCTTCCTCCTCG		* 184 a 204
TobActin Fw	AGCAAGGAAATTACCGCATTAGC	Actina	154 a 175
TobActin Rv	ACCTGCTGGAATGTGCTGAGA		789 a 812
TobCystP Fw	GTGGACTGTGCTGGAGCTTTTAAT	CystP	586 a 609
TobCystP Rv	ATAAGCCATTCTTGCCAGTGTATG		695 a 718
TobCP1 Fw	AGCGAACAGTGAGAAGGCTCTATT	CP1	741 a 764
TobCP1 Rv	TTAAGCCAAGTGCTGCATGATC		851 a 872
NRich Fw	TACAGGCATCCAATTTGGCGAACC	NRich1	50 a 73
NRich Rv	TGACTTGAAAGAGTTGATCTCACCCC		155 a 180

Tabela 2 (Continuação) – Lista dos Oligonucleotídeos específicos para qRT-PCR

Oligonucleotídeo	Seqüência (5' – 3')	Gene alvo	Posição de anelamento
NRP Fw	GGCACAAAGACTGGTGCTGAGA	NRP	601 a 622
NRP Rv	CTCTGTATCGTGGAGGCAGACC		739 a 760
GST Fw	CGGTTCTCATCCACAATGGCAAAC	GST	* 38 a 61
GST Rv	CAGCCCAGAATCTAGCCTGAGC		* 151 a 172
PDI1 Fw	TTGGTTGAAGGCGTACAAGGATGG	PDI1	* 231 a 254
PDI1 Rv	ACTCCAGCAGAACATTCTTCCCAG		* 356 a 379
PDI2 Fw	TTTGGTGTCTGATGGAACGGTGG	PDI2	* 90 a 113
PDI2 Rv	CACAGTTCTGACGCACTTTGGGTG		* 193 a 216
PPS Fw	TCAGCCCCTGTTCCCCATTT	PPS	* 45 a 64
PPS Rv	ATTTGCGTGCCTGAGGCAAT		* 176 a 195
SEB Fw	AAGGCAGTATAACATCGAGG	SEB	* 120 a 139
SEB Rv	TGCCATGTTTTACCATCATC		* 221 a 240
Ubiq Fw	AGTCTGGCACAAGGGAACCTCAACT	Ubiq	* 53 a 76
Ubiq Rv	GTGCTGTGAAGTCAACGGCAATGT		* 166 a 189
NoHits1 Fw	ATCAACCTCGTACCAAAGGCATGG	No Hits-1	* 64 a 87
NoHits1 Rv	TTATTCACTCCCTCCACCACCACG		* 175 a 198
PSI Fw	CCCCCTACCTTGATGGTTC	PSI	* 167 a 186
PSI Rv	ACAGCAAGCATGGCCCATCT		* 278 a 297
LTP Fw	CCCATGGCACATGCAGCTAT	LTP	* 122 a 141
LTP Rv	GGCGGCATTGAGGCTCTTC		* 233 a 251

Os asteriscos indicam posições de anelamento tendo como referência o primeiro nucleotídeo das respectivas ESTs, enquanto os demais números correspondem às posições de anelamento nas ORFs completas, tendo como início o primeiro códon. Os oligonucleotídeos foram desenhados utilizando o programa *Primer Express 3.0* (Applied Biosystems).

7 - Expressão transiente em protoplastos de soja

Protoplastos foram preparados em ambiente estéril a partir de células de soja essencialmente como descrito anteriormente (Fontes *et al.*, 1994). Cinco dias após a repicagem, as células foram lavadas duas vezes em tampão de lavagem (manitol 0,6 M; MES 20mM; pH 5,5), centrifugadas a 500 rpm por 2 minutos, ressuspendidas em igual volume de solução enzimática [celulase 0,5% (p/v), macerozima R-10 0,5% (p/v), pectoliase Y23 0,1% (p/v), manitol 0,6M; MES 20 mM; pH 5,5] e incubadas por 3 horas sob agitação de 40 rpm. A digestão foi acompanhada a cada 30 minutos por microscopia. Em seguida, os protoplastos foram filtrados em peneira de 65 μ m e coletados por centrifugação a 500 rpm por 2 minutos, sendo lavados 2 vezes com tampão de lavagem. Os protoplastos foram então novamente coletados por centrifugação por 2 minutos a 500 rpm, ressuspendidos em 2 mL de tampão de lavagem e transferidos para um outro tubo contendo tampão gradiente [sacarose 20% (p/v); manitol 0,6M; MES 20 mM; pH 5,5]. O material foi centrifugado por 5 minutos a 500 rpm, sendo coletada a banda na interface, que corresponde aos protoplastos viáveis. Estes foram lavados 2 vezes com tampão de eletroporação (Hepes-KOH 25mM pH 7,2, KCl 10 mM, MgCl₂ 15 mM, manitol 0,6M) e ressuspendidos em 2 mL do mesmo tampão. Os protoplastos foram contados em microscópio usando uma câmara de Neubauer. Os ensaios de expressão transiente foram conduzidos por meio de eletroporação de 2×10^5 – 5×10^6 protoplastos com 10 μ g de DNA (cassete de expressão) e 30 μ g de DNA carreador de esperma de salmão (ssDNA), em um volume final de 0.8 mL, a 25 μ F de capacitância e 250 volts (Gene Pulser – BIORAD). Os protoplastos recém eletroporados foram

mantidos no gelo por 15 minutos e transferidos para 8 mL de meio MS Soja + 0,6 M de manitol pH 5,5. Para a expressão transiente, os protoplastos foram incubados por 36 horas no escuro. Após esse período, as amostras foram lavadas 2 vezes com tampão de lavagem, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até a extração de RNA.

8 - Transformação transiente de plantas de tabaco

A transformação transiente de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. havana) foi realizada como descrito anteriormente, por meio de agroinoculação (Kotzer *et al.*, 2004). As culturas de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas com os vetores de interesse foram crescidas em 4 mL de meio Rhizo, com antibióticos adequados, a 28°C por 16 horas, e centrifugadas a 8000 RPM por 5 min. O pellet foi lavado 2 vezes com tampão de infiltração (MgCl₂ 10 mM, MES 10 mM pH 5,6 e acetosiringona 10 µM) e ressuspendido em 1 mL do mesmo tampão. Utilizando seringas estéreis sem agulha, folhas jovens de tabaco foram infiltradas com *A. tumefaciens* em uma D.O. de 0,2, por meio de uma gentil pressão através dos estômatos da epiderme inferior. A expressão das proteínas foi confirmada por microscopia confocal, três dias após a agroinoculação. As seções foliares infiltradas que apresentaram sinais visíveis de morte celular foram coletadas, sete dias após a agroinoculação, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80 °C até o processamento das amostras.

9 - Localização subcelular das proteínas NAC

Para a expressão transiente das proteínas fusionadas a YFP, folhas de tabaco foram agroinoculadas com as construções pYFP-GmATAF, pYFP-NAC1, pYFP-NAC2, pYFP-NAC3, pYFP-NAC4, pYFP-NAC5 e pYFP-NAC6, como descrito no item 8. Três dias após a inoculação, as folhas transformadas foram observadas no microscópio LSM 510 META invertido (ZEISS), utilizando a objetiva de imersão de óleo de 40x1,4 e o laser de argônio. A análise foi realizada nas folhas, com explantes de aproximadamente 0,5 cm², montados em água. Para a obtenção de imagens de expressão, YFP foi excitada a 514 nm, e sua emissão coletada a 535-590 nm. A fenda do microscópio foi fixada, fornecendo uma faixa óptica de 1,5 a 2,0 µm. As imagens foram processadas com auxílio do software “LSM Image Browser 4” (ZEISS) e do programa Adobe Photoshop 7.0.1.

10 - Análise de transativação em leveduras

A presença de um domínio de transativação nas proteínas NAC de soja caracterizadas foi avaliada por meio do ensaio de transativação em levedura, conforme Fujita *et al.*, (2004). As regiões codificadoras dessas proteínas foram inseridas no vetor pDEST32, que permite a expressão de proteínas fusionadas ao domínio de ligação ao DNA de GAL4 (BD) em leveduras transformadas. A levedura utilizada foi *Saccharomyces cerevisiae* da linhagem AH109 (MATa, Trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, MEL1 GAL2_{UAS}-GAL_{TATA}::MEL_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ), que é deficiente na

produção de leucina, triptofano e uracila (Trp-, Leu-, Ura-); e contém os genes repórteres *LacZ* e *HIS3*.

Células competentes de AH109 foram transformadas com as construções pBD-GmATAF, pBD-NAC1, pBD-NAC2, pBD-NAC3, pBD-NAC4, pBD-NAC5, pBD-NAC6 e pBD (controle), juntamente com 3 µg de DNA carreador de espermatozoides de salmão (ssDNA), pelo método de acetato de lítio/polietilenoglicol (PEG). Os transformantes foram plaqueados em meio seletivo com deficiência em leucina e histidina, contendo 3-aminotriazol 10 mM (SD, *Synthetic Dropout*, -Leu, -His, +3AT 10mM) e crescidos por três dias a 28°C. Para visualização da atividade de β-galactosidase, os transformantes foram plaqueados em meio SD/-Leu/-His pH 7,0, contendo X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-galactopiranosídeo) e incubados a 28°C por cinco dias.

11 - Análise do padrão de expressão dos genes NAC em órgãos de soja

A expressão dos genes *GmATAF*, *NAC1*, *NAC2*, *NAC3*, *NAC4*, *NAC5* e *NAC6* foi analisada em diferentes órgãos de soja, variedade CAC-1, através de RT-PCR em tempo real (qRT-PCR), utilizando oligonucleotídeos específicos (Tabela 2). O RNA foi extraído a partir de folha fonte, folha dreno, folha senescente, caule e raiz de plantas na fase reprodutiva. Foram também utilizadas sementes em diferentes estádios de desenvolvimento, de acordo com a massa fresca (Lanna, 2002), sendo o primeiro estágio correspondente à semente com até 75 mg; o terceiro estágio, de 151 a 225 mg; o quinto, de 301 a 375 mg; e semente madura superior a 450 mg. A extração de RNA, síntese de cDNA e qRT-PCR foram realizados como descrito nos itens 5 e 6.

12 – Análises de bioinformática

Para obtenção da sequência completa do gene *GmATAF*, as seqüências 5' e 3' dos clones obtidos pelo RACE foram agrupadas em *contigs* pelo programa CAP3 (*Contig Assembly Program* - <http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/cap3.html>). Os *contigs* resultantes foram analisados utilizando ferramentas para análise de seqüências de proteínas, contidas no Expasy (www.expasy.ch/tools) e SDSC Biology Workbench (<http://workbench.sdsc.edu>). Buscas por similaridade e análises de homologia foram realizadas utilizando o programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990) e ClustalW (<http://clustalw.genome.ad.jp/>). A identificação de possíveis sítios de fosforilação da proteína *GmATAF* foi feita com o auxílio do programa NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>). Seqüências PEST, comuns em proteínas que são direcionadas para degradação proteolítica, foram identificadas com o auxílio do programa PEST-FIND (<http://emb1.bcc.univie.ac.at/toolbox/pestfind/pestfind-analysis-webtool.htm>). A busca por regiões transmembrana em *GmATAF* foi feita utilizando ferramentas contidas no banco de dados de proteínas de membrana ARAMENON (http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/resrc_view).

13 - Agrupamento hierárquico

Diversas proteínas NAC descritas na literatura e as proteínas NAC de soja caracterizadas neste trabalho foram utilizadas na construção do agrupamento hierárquico de seqüências. O alinhamento múltiplo foi realizado

pelo programa ClustalW (<http://clustalw.genome.ad.jp/>) e o agrupamento foi construído utilizando-se o programa MEGA3 (Kumar *et al.*, 1994), que construiu a árvore como resultado de um consenso de 2000 replicatas, pelo método UPGMA. Os números de acesso das seqüências utilizadas são fornecidos na figura correspondente.

14 - Técnicas de Biologia Molecular

Todas as técnicas de Biologia Molecular, como preparação de plasmídeos, transformação de bactérias, clivagem de DNA por enzimas de restrição, reações de ligação, amplificações por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), extração de RNA, síntese de cDNA, dentre outras foram conduzidas segundo protocolos fornecidos pelos fabricantes ou contidos em Sambrook *et al.* (1989).

IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 - Isolamento e análises *in silico* de um novo membro da família NAC em soja, denominado *GmATAF*

Com a finalidade de investigar a comunicação entre a via UPR e vias de resposta a estresse osmótico, foram identificados por nosso grupo vários genes co-regulados por estes estresses em plantas de soja (Irsigler *et al.* 2007). Dentre os genes identificados, incluem *GmATAF2* e *GmNAM*, cujas denominações foram baseadas na homologia de seqüências das respectivas ESTs com os genes *ATAF2* de *Arabidopsis thaliana* e *NAM* de *Petunia x hybrida*, que codificam transfatores da família NAC. Análises de comparação das ESTs *ATAF2* e *NAM*, utilizando o programa BLAST, mostraram que ambas as seqüências estavam incompletas, sem as respectivas extremidades 5' e 3'. Para a obtenção das seqüências completas, foi empregada a metodologia de RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*). A análise das seqüências obtidas revelou que as ESTs *ATAF2* e *NAM* (Figura 4) na verdade correspondem a regiões distintas e não sobrepostas do mesmo gene, denominado a partir daqui de *GmATAF* (*Glycine max* *ATAF*). A proteína deduzida contém 295 resíduos de aminoácidos, uma massa molecular estimada de 34.173,54 Da e pI 6,10 (Figura 5).

ATTTAGTTGGCCGCGAAATCGCCCTTCGACTGGAGCACGAGGACACTGACATGGACTGAA
 GGAGTAGAAAATACGTTTCAAGTCGCAGAGCAAAGCAAAGCAGAGCCAACAACAAGAAGA
 ACAAACCAACATCAACAACCACAAGAAGAAGAAGCTTGCAAATTAGAAGAATCTTCAGT
 TGAAGGGAAGAACAACAAGAACAAGAAGAGAGGAAGAAACGCGA**ATG**AAGGGAGAATTAG
 AGTTGCCACCAGGGTTCAAGATTTACCCCACTGATGAAGAATTGGTGAATCACTACTTGT
 GTAGGAAGTGCGCGGGTCAACCAATCGCGTTCCCATCATCAAAGAGGTCGATTTGTACA
 AGTTTGATCCATGGCAGCTTCCAGAAATTGGCTACTACGGCGAGAAAGAATGGTACTTCT
 TTTCTCCTCGGGATCGGAAATACCCGAACGGTTCACGGCCGAACCGTGCCGCCGGAAGCG
 GC**TATTGGAAAGCCACCGGCGCCGATAAG**GCGATCGGAAACCGAAAGCGCTAGGGATCA
 AGAAAGCTCTGGTTTTTTACGCCGGAAGGCCCAAGGAGTGAAAACCAATTGGATCA
 TGCACGA**TATCGCTCGCCAATGTTGACCGATCT**GCCTCCAAGAAAAACAACAAC
 TTGAGGCTTGATGATTGGGTGTTGTGTGCGAATCTACAACAAGAAAGGGAAGATTGAGAAA
 TACAACACGACCGCACCGAAGATGAATCTTGAAATGATTCATAGTTTTGAGCACGAGAAC
 GAGACGAAGCCTGAGATTCATAAGCTTGGAATGAGCAATTGTTGTACACGGAGACTTCA
 GATTCCGGTGCCAAGGTTGCACGCGGACTCGAGCAGCTCGGAGCACGTGGTTTCGCCCGAT
 GTGAGGTGCGAGAGGGAAGTGCAGAGCGACCCCAAGTGAATAACGATGATTATGATCTG
 GGCCTACAGCTAGAAAACGCGTTTGATTTTCAAGTTTAATTACTCGGACGATAATAACCTT
 TCCGTCGACGATGACCCCTTGGCACTGTTCACTACCAAATGGGT**CAGCTCTCGCCCTTG**
CAGGACATGTTTCATGTACCTACAGAAGATGTAAAACGATACGTTTTTTTGGACAAGAT
 GATGGGACCCGCAAATATCTTTATTACTTTTTTTGTAGTAAAAGTCAGCATTTGTGTGCAA
 TTGCATTGCACCTAACATTTTGTGGACTAGGCCAAGCTTAGTAAACTATTCTTATTCTTT
 GTTCTAGAGAGATCAGGGAATGTGGAATTCGGTTGAAATGAGCTAGTATTTGGATTGGAT
 CTTGGTGTAAGAGAGACAAAAA

ATAF2

NAM

Figura 4 - Sequência de nucleotídeos de *GmATAF* obtida pela técnica de RACE. A região demarcada em verde corresponde à região da EST de ATAF2, já a região demarcada em azul representa a EST de NAM. As seqüências realçadas com as cores correspondentes indicam as regiões de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados no RACE (Tabela 1). Os códons de iniciação e término estão destacados em vermelho e delimitam a ORF, em negrito. As seqüências não traduzidas do mRNA de *GmATAF* estão representadas em itálico.

MKGELELPPG**R**FHPTDEELVNHYLC**RK**CAGQPIAVPII**KE**VDL**Y**KFDPWQLPEIGYYGE**KEW****Y**FF**S**PRD
 RK**Y**PNGSRPNRAAGSGYW**K**ATGAD**KA**IG**KPK**ALGI**KK**ALVFYAG**KAPKGV**KTNWIMHEYRLANVDRS**SK**

 KNNNNLRLDDWVLCRIYNKKGKIEKY**N**TTAPKMNLEMIHSFEHE**N**ETKPEIHKLGNEQLLYTETSD**S**VPR

 LHTD**SSS**EHVV**S**PDVRCEREVQSDPKWNDD**Y**DLGLQLENAFDFQFNYYLDDNNL**S**VDDDPFGTVQYQMG
 QLSPLQDMFMYLQKM

Figura 5 – Sequência de aminoácidos deduzida de *GmATAF*. A região sublinhada corresponde ao domínio NAC, enquanto que os resíduos básicos conservados deste domínio estão realçados em vermelho. A marcação em cinza delimita o sinal bipartido de localização nuclear não usual predito para proteínas NACs. Os resíduos de serina e tirosina com potencial de fosforilação acima de 80% estão demarcados em verde, enquanto os sítios de N-glicosilação estão em azul. Os asteriscos indicam regiões de baixa complexidade.

A análise da sequência de aminoácidos utilizando ferramentas como PredictNLS não revelou a presença de nenhum sítio de localização nuclear clássico, entretanto GmATAF contém uma região (¹⁰⁵IKKALVFYAGKAPKGVKTN¹²³ - Figura 5) de alta similaridade com uma sequência detectada nas proteínas AtNAC1 e ANAC e que foi predita como um sítio de localização nuclear bipartido não usual de proteínas NAC (Xie *et al.*, 2000; Greve *et al.*, 2003). Embora essa sequência tenha sido detectada adicionalmente em várias proteínas NACs descritas recentemente (Fujita *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2007), sua função na localização nuclear desses transfatores ainda não foi confirmada experimentalmente.

A comparação da sequência de aminoácidos de GmATAF com outras proteínas NACs conhecidas revelou a presença de características estruturais típicas, como a presença de 5 subdomínios conservados (A-E) presentes na região N-terminal de 160 resíduos de aminoácidos que compõe o domínio NAC (Figura 6), confirmando que GmATAF constitui um membro da família NAC. Como esperado para membros dessa família, a região C-terminal de 135 resíduos de aminoácidos codificada por GmATAF possui baixíssima similaridade de sequência com outras proteínas NACs. Além da presença do domínio NAC, foram evidenciados, por meio de bioinformática, prováveis sítios de fosforilação e glicosilação na sequência de GmATAF (Figura 5), tal como evidenciado em outras proteínas NAC (Meng *et al.*, 2007), sugerindo a existência de mecanismos pós-traducionais na regulação da atividade desses transfatores.

[illegible]

GmNAC6	HVLKKESETEDMVVPKQEK-----ITNQLVLKDTN-----
GmNAC5	NINISINSN TLYGVSSNHSFYNTQGVQLQAPPTLPLPSSSNHYLRAFLEN
GmNAC4	LLDWTNPSVLNSVDFVSGNNNNHNLVQDQTQGMVYNACNDLYVP---A
GmNAC3	FSDWVNSTDLDSEFESG-----CQTQRMVNY-DCNDFVPSLPP
GmNAC2	PKL HTDSSCSEQVVSP --G----- FASEVQSEPK WN-----
GmNAC1	LPDASYNSTFDFQINTANG-----GIDPFVKP-----
GmATAF	PRLHT DSSSE HVVSPDVR-----CEREVQSDPKWNDDYD-----

GmNAC6	-----KSTCGTSLQMPFGKEKLPDLQLPMLSDWTQDTFWAQLNSPWLQN
GmNAC5	QGNGSNMSNNG FEPEREMSVSQKTSLSLTDVKAIESSLGKRHFENQNNPI
GmNAC4	LCHVGTSVPQKMEEEVQSGVRNQRVQNNSWFLQNDFTQGFQNSVDTSGFK
GmNAC3	LGHVDYMVDAPLEEEVQSGVRRRVDGPGHFGPNPDTRLLPGSGDPFGFG
GmNAC2	-----EWEKSLEFPFNYVD---ATLNNSFMAQ---FQGNNQMLSPLQDM
GmNAC1	-----QLVEIPYATDSGKYQVKQNSTINP---TIFVNQVYDQRG--
GmATAF	---LGLQLENAFDFQFNLYLDDNNLSVDDDPFGT---VQYQMGQLSPLQDM

GmNAC6	FTPTNILNFY-----
GmNAC5	ASAAVAPMDLATLWNY
GmNAC4	YPV-QPVGFGFRN----
GmNAC3	FIMGQQVEFGFRD----
GmNAC2	FMYWPNKSF-----
GmNAC1	-----
GmATAF	FMYLQKM-----

Figura 6 – Comparação da sequência de aminoácidos deduzida de GmATAF com proteínas NACs de soja. Os cinco subdomínios (A-E) estão demarcados por linhas acima da sequência. Os resíduos idênticos estão destacados em preto, enquanto que resíduos similares aparecem demarcados em cinza. Os asteriscos marcam os resíduos básicos que são conservados em mais da metade das proteínas NAC de *Arabidopsis*. Os aminoácidos que compõem o sítio bipartido de localização nuclear predito para proteínas da família NAC estão indicados pela letra N. Regiões de baixa complexidade, presentes na região C-terminal, estão em vermelho e dentro de retângulos cinza. Sequências PEST, identificadas em GmNAC2 e GmNAC4, estão demarcadas por retângulos azuis. O alinhamento foi realizado pelo programa ClustalW. Números de acesso: GmNAC6 (AAY46126); GmNAC5 (AAY46125); GmNAC4 (AAY46124); GmNAC3 (AAY46123); GmNAC2 (AAY46122); GmNAC1(AAY46121); GmATAF (ainda não depositado no GenBank).

Além disso, GmATAF contém regiões de baixa complexidade, como por exemplo uma região rica em asparaginas (¹⁴¹KNNNNL¹⁴⁶) no final do domínio NAC e uma região rica em serinas (²¹⁴DSSSSE²¹⁹) na região C-terminal (Figuras 5 e 6). Estas regiões curtas foram identificadas em outros membros da família NAC (Duval *et al.*, 2002; Meng *et al.*, 2007) e podem ser necessárias para ativação transcricional de genes alvo (Duval *et al.*, 2002). Embora recentemente tenham sido descritos membros da família NAC localizados na membrana e liberados por proteólise em resposta a estímulos específicos (Kim *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007a), a pesquisa com ferramentas de bioinformática não revelou nenhum segmento transmembrana na sequência de GmATAF.

Entre os 111 membros da família NAC de *Arabidopsis*, GmATAF compartilha a maior identidade de sequência com as proteínas ATAF1 (62% de identidade e 71% de similaridade) e ATAF2 (61% e 67%). *ATAF1* é induzido por ferimentos, ABA e desidratação, e recentemente foi caracterizado como um regulador negativo de vias de resposta a estresse hídrico (Lu *et al.*, 2006). *ATAF2* está envolvido principalmente na resposta a estresses bióticos, e desempenha um papel modulador na resposta a infecção por patógenos, por meio da repressão transcricional de genes relacionados à patogênese (Delessert *et al.*, 2005). Estendendo a análise para bancos de dados de proteínas de plantas em geral, GmATAF é mais relacionada com *Citrus sinensis* NAC (número de acesso no GenBank ABQ96643, 67% de identidade e 75% de similaridade) e *Petunia x hybrida* nam-like protein 10 (AF509873, 63% e 72%), ambas com funções desconhecidas.

2 – A expressão transiente de *GmATAF* em protoplastos reprime genes co-regulados por estresse no RE e estresse osmótico

Com a finalidade de acessar diretamente o envolvimento de *GmATAF* na regulação da via integrativa de resposta a estresses no RE e estresse osmótico, identificada por nosso grupo recentemente (Figura 1; Irsigler *et al.*, 2007), o cDNA completo de *GmATAF* foi transferido para um plasmídeo de expressão em plantas, onde o gene *GmATAF* foi expresso transientemente sob o controle do promotor 35S em protoplastos de soja, (Figura 7). A fim de avaliar o efeito da superexpressão do transfator *GmATAF* na regulação transcricional de genes da via integrativa, os níveis de expressão desses genes foram avaliados por qRT-PCR em Tempo Real (Figura 8). A expressão transiente de *GmATAF* em protoplastos de soja levou a uma diminuição da expressão de vários genes da via integrativa, em relação à expressão em células controle, transformadas com o vetor pMON921 vazio (Figura 8a).

Entre os genes cuja expressão foi reprimida por *GmATAF* em protoplastos, destaca-se *PSI* (*photosystem I chlorophyll a/b-binding protein*), que codifica uma das subunidades do foto-sistema I da fotossíntese (Irsigler *et al.*, 2007). A inibição da fotossíntese e do crescimento são eventos comuns em plantas submetidas a estresses abióticos e, dessa forma, uma possibilidade seria a participação de *GmATAF* na ativação de mecanismos de resposta a estresses abióticos, sendo um deles a inibição da fotossíntese. Entretanto, *GmATAF* inibiu a expressão de *GST* (*glutathione S-transferase*), provavelmente envolvido em mecanismos de detoxificação de ROS gerados durante estresses abióticos, e a do gene *N-Rich1* (*N-Rich protein B*), cujo

produto induz morte celular em resposta a estresses osmótico e do RE (Costa, 2007). Estas observações sugerem que a inibição desses genes mediada por GmATAF representa uma forma de regulação negativa da via de integração, como um mecanismo auto-regulatório. Consistentemente com essa idéia, os homólogos de *Arabidopsis* que compartilham maior identidade de seqüências com GmATAF são as proteínas ATAF1 e ATAF2, caracterizadas como repressoras de vias de resposta a estresse hídrico e por patógenos, respectivamente (Lu *et al.*, 2006; Delessert *et al.*, 2005).

Além dos genes da via integrativa, houve também a repressão de genes que são especificamente induzidos por tunicamicina, como *PDI1* (*protein disulfide isomerase 1*) (Irsigler *et al.*, 2007) e *NAC6* (*GmNAC6*, ver figura 15); ou por PEG, como *LTP* (*lipid transfer protein*) e *PDI2* (*protein disulfide isomerase 2*) (Irsigler *et al.*, 2007), o que corrobora ainda mais a hipótese de que *GmATAF* seja um repressor de vias de resposta a diversos estresses em plantas.

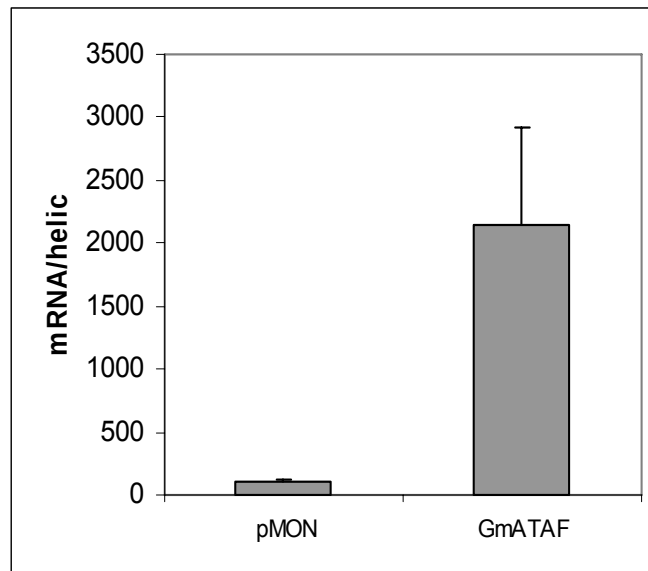


Figura 7 - **Expressão transiente de *GmATAF* em protoplastos.** Após expressão transiente por 36 horas, foi verificada por PCR em tempo real a expressão de *GmATAF* em protoplastos eletroporados com o vetor vazio (pMON) e com o cassete de expressão pMON-*GmATAF*. O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta Ct}$, utilizando como controle endógeno a helicase (+DP, n = 3 réplicas biológicas).

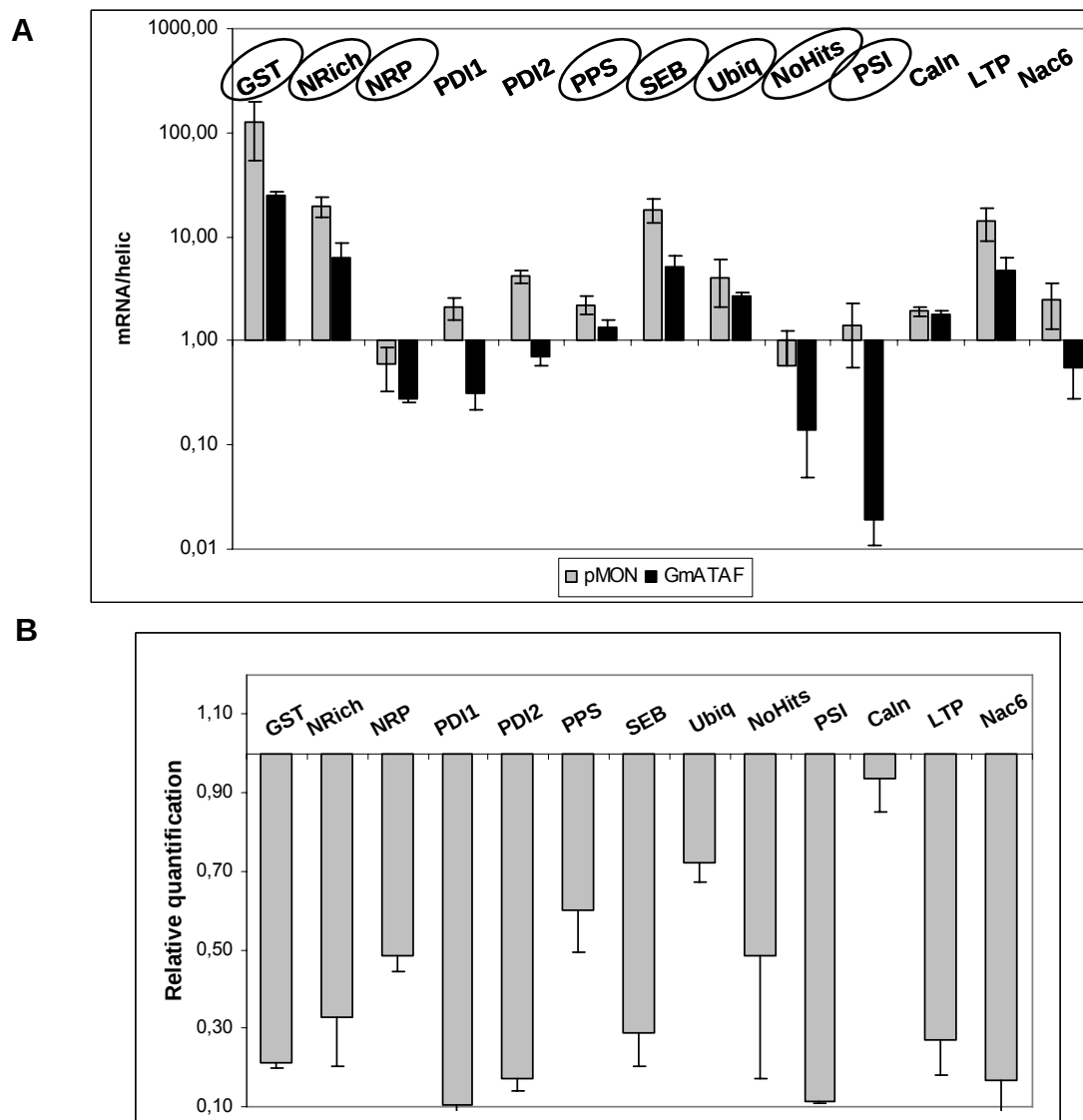


Figura 8 - **Repressão de genes da via integrativa pela superexpressão de GmATAF.** A expressão dos genes *GST* (glutathione S-transferase, número de acesso: AW472161), *NRich* (N-Rich protein B - AI973541), *NRP* (N-Rich protein A - AJ875407), *PDI1* (protein disulfide isomerase 1 - AW567827), *PDI2* (protein disulfide isomerase 2 - AW568784), *PPS* (pepsin A like - AW568189), *SEB* (selenium binding protein - AW101647), *Ubiq* (ubiquitin-associated protein - AW508375), *No Hits 1* (função desconhecida - AW508115), *PSI* (photosystem I chlorophyll a/b-binding protein - AW397435), *Caln* (Calnexina - AW508066), *LTP* (lipid transfer protein - AW185914) e *Nac6* (GmNAC6 - DQ028774) foi determinada em protoplastos transformados com o vetor vazio (pMON921) ou com o cassete de expressão GmATAF (pMON-GmATAF), por qRT-PCR em tempo real. (A) Valor de expressão calculado usando o método $2^{-\Delta Ct}$, utilizando como controle endógeno a helicase (+DP, n = 2 réplicas biológicas). Os círculos indicam os genes da via integrativa. (B) Representação da expressão relativa utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, sendo que os valores representam quantas vezes cada gene no tratamento pMON-GmATAF é mais expresso do que no controle (pMON).

3 - Agrupamento hierárquico sugere diversidade e relevância funcionais para proteínas NACs de soja

As proteínas da família NAC constituem uma das maiores famílias de fatores de transcrição específicos de plantas e exibem uma ampla atuação em diversos processos fisiológicos durante o desenvolvimento vegetal e na resposta a estresses bióticos e abióticos (Olsen *et al.*, 2005a). Embora tenham sido encontrados 111 genes NAC no genoma de *Arabidopsis thaliana* e 142 genes em *Oryza sativa* (<http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v1.0/>), poucos membros dessa família foram identificados em outras espécies de plantas agronomicamente relevantes. Recentemente, 6 genes NAC foram isolados em soja (Meng *et al.*, 2007). Embora esse tenha sido o primeiro relato da clonagem molecular de genes NAC nessa cultura de importância mundial, a caracterização funcional desses genes não foi realizada e constitui um dos objetivos dessa investigação.

Com o intuito de estabelecer inferências funcionais para as proteínas NAC de soja identificadas até o momento (GmATAF, GmNAC1-GmNAC6), foi realizado um agrupamento hierárquico entre essas proteínas e diversos membros da família NAC cujas funções foram previamente caracterizadas na literatura (Figura 9). Para facilitar a correlação entre os subgrupos e função biológica, é apresentada também uma compilação dos dados de padrão de expressão dos genes NAC em resposta a diversas condições (Figura 9b). O agrupamento revelou que os membros da família NAC de soja em estudo podem ser classificados em diferentes subgrupos, de acordo com Ooka *et al.*, 2003.

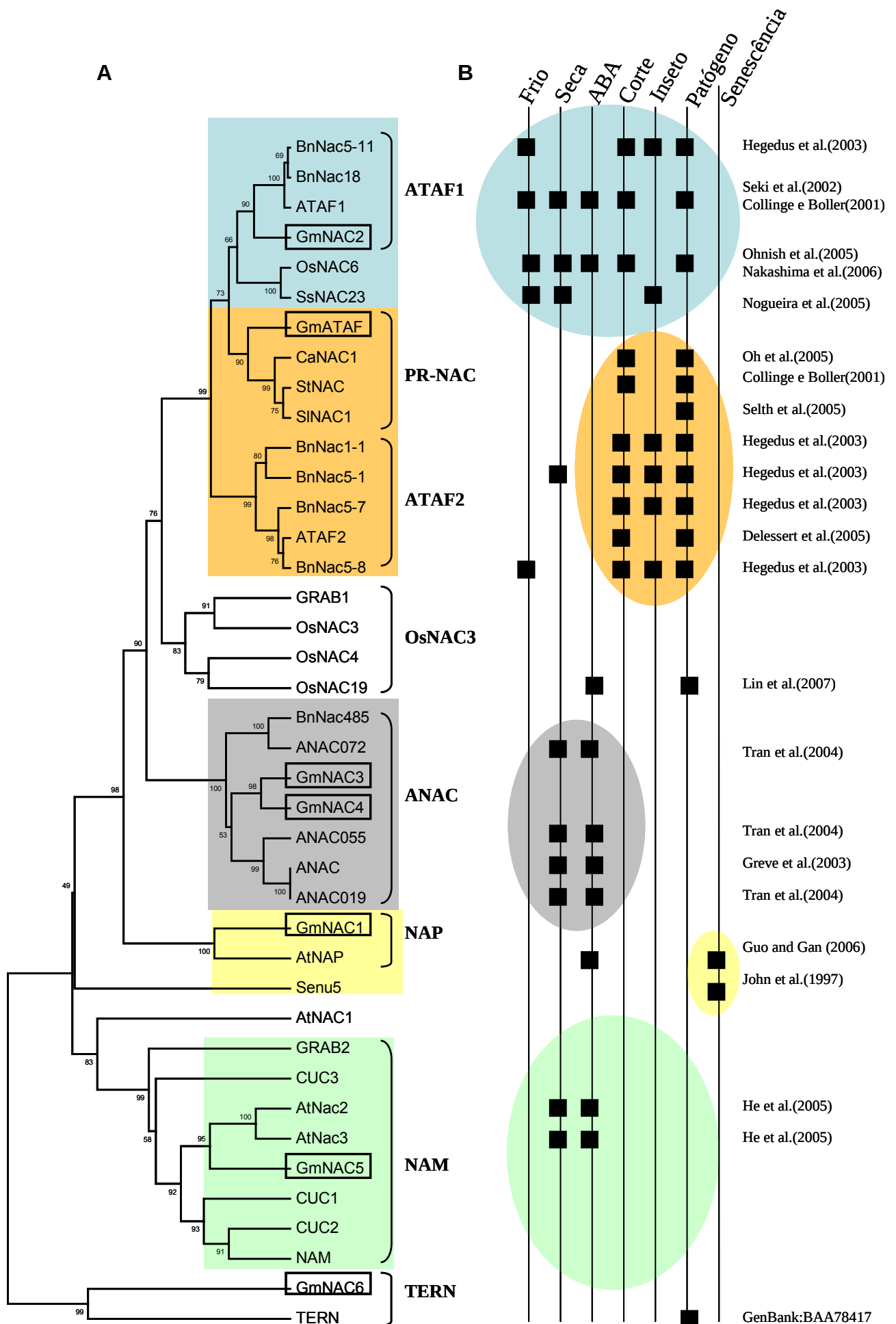


Figura 9 - Agrupamento hierárquico e padrão de expressão de genes da família NAC. (A) Agrupamento hierárquico de GmATAF com proteínas NAC de diferentes espécies, considerando a sequência completa de aminoácidos. Os genes NAC de soja caracterizados neste trabalho são demarcados por retângulos. As subfamílias dentro da grande família NAC (Ooka *et al.*, 2003) estão indicadas por chaves. As subfamílias cujos membros apresentam um perfil de expressão similar estão destacadas pelos retângulos coloridos. O alinhamento múltiplo foi realizado pelo programa ClustalW e o agrupamento foi construído utilizando-se o programa MEGA3, que construiu a árvore como resultado de um consenso de 2000 replicatas, pelo método UPGMA. Os números nos nós da árvore representam valores de *bootstrap*. (B) Comparação do perfil de expressão dos genes NAC utilizados no agrupamento e as respectivas referências. Os quadrados pretos representam indução em nível transcricional em resposta às condições listadas no topo da figura. Números de acesso das sequências utilizadas no agrupamento: BnNAC5-11 (AAP35053); BnNac18 (AAP35054); ATAF1 (NP_171677); GmNAC2 (AAY46122); OsNAC6 (BAA89800); SsNAC23 (AAW62955); CaNAC1 (AAW48094); StNAC (CAC42087); SINAC1 (AAR88435); BnNac1-1 (AAP35048); BnNac5-1 (AAP35050); BnNac5-7 (AAP35051); ATAF2 (NP_680161); BnNac5-8 (AAP35052); GRAB1 (CAA09371); OsNAC3 (BAA89797); OsNAC4 (BAA89798); OsNAC19 (AAT02360); BnNac485 (AAP35056); ANAC072 (NP_001078452); GmNAC3 (AAY46123); GmNAC4 (AAY46124); ANAC055 (NP_188169); ANAC (AAM51299); ANAC019 (NP_175697); GmNAC1 (AAY46121); AtNAP (NP_564966); Senu5 (CAA99760); AtNAC1 (AAF21437); GRAB2 (CAA09372); CUC3 (AAP82630); AtNac2 (AAO41710); AtNAC3 (AAP42729); GmNAC5 (AAY46125); CUC1 (BAB20598); CUC2 (BAA19529); NAM (CAA63102); GmNAC6 (AAY46126); TERN (BAA78417). A sequência de GmATAF (descrito pela primeira vez nesse trabalho) ainda não foi depositada no banco de dados.

De acordo com esta classificação, GmATAF pertence ao subgrupo ATAF. No entanto, esse subgrupo é relativamente extenso e nossa análise mostrou que ele pode ser seguramente dividido em 3 subgrupos menores (ATAF1, PR-NAC e ATAF2), tendo em vista os valores de *bootstrap* superiores a 80 (Figura 9a). Dessa forma, GmATAF pertence ao subgrupo aqui denominado PR-NAC (*Pathogen Responsive NAC*), composto por *CaNAC1*, *StNAC* e *SINAC1*, genes cuja expressão é induzida por ferimentos e infecções por patógenos. Estas análises de seqüências sugerem que, além da indução de *GmATAF* por estresses do RE e estresse hídrico (Irsigler *et al.*, 2007), esse gene pode estar envolvido também na resposta a estresses bióticos. A conexão entre vias de resposta iniciadas por estresses distintos é um tema recorrente em plantas, e pode ser exemplificado dentro do contexto da família NAC tendo em vista *ATAF1*, que é induzido por patógenos, ferimentos, estresse hídrico e ABA (Collinge & Boller, 2001).

GmNAC1 é membro do subgrupo NAP, cujo principal representante é a proteína NAP de *Arabidopsis*, diretamente envolvida na ativação da senescência foliar (Guo & Guan, 2006) e que compartilha com GmNAC1 67% e 79% de identidade e similaridade, respectivamente. Buscas utilizando o programa *Blast* revelaram que GmNAC1 possui 63% de identidade de seqüência com a proteína NAM-B2, envolvida na regulação da senescência em trigo (Uauy *et al.*, 2006). Estas observações sugerem o envolvimento de GmNAC1 na regulação da senescência em soja. GmNAC2 pertence ao subgrupo ATAF1, cujos membros estão envolvidos na resposta a diversos tipos de estresses bióticos e abióticos (Figura 9b, círculo azul). As proteínas GmNAC3 e GmNAC4 são altamente relacionadas e compartilham entre si 67%

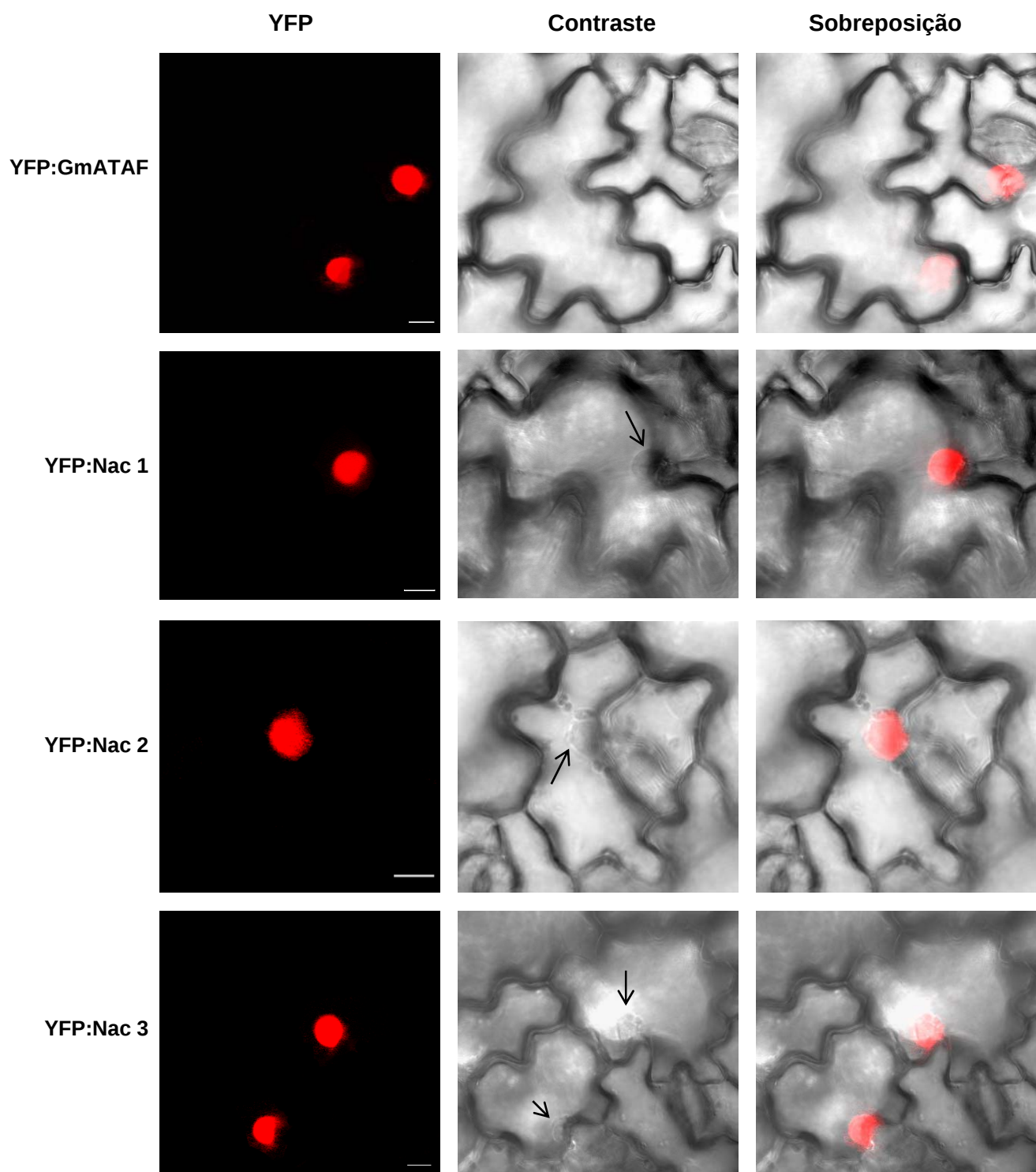
de identidade e 93,3% de similaridade de sequência, sendo ambas classificadas dentro do subgrupo ANAC. Esse grupo abriga também *ANAC019*, *ANAC055* e *ANAC072*, genes induzidos por ABA, seca e estresse salino e que aumentam a tolerância de plantas transgênicas à seca (Tran *et al.*, 2004). Portanto, os genes *GmNAC3* e *GmNAC4* podem estar envolvidos em vias de resposta a estresse osmótico e representar potenciais alvos em estratégias de aquisição de tolerância em plantas transgênicas.

GmNAC5 pertence ao subgrupo NAM e compartilha maior similaridade de sequência com *CUC1*, *CUC2* e *NAM*, genes envolvidos em processos de desenvolvimento, manutenção do meristema apical e separação dos cotilédones (Olsen *et al.*, 2005a). *GmNAC6* é um membro do subgrupo TERN (*Tobacco elicitor-responsive gene encoding NAC-domain protein*), nome de um gene induzido por elicitores de resposta a patógenos. Os demais membros desse subgrupo ainda não foram caracterizados funcionalmente (Ooka *et al.*, 2003).

Coletivamente, as observações acima sugerem a participação das proteínas NAC de soja em diversos processos relevantes, tais como a resposta a diversos estresses, eventos de desenvolvimento do vegetal e senescência. Com o objetivo de caracterizar em maiores detalhes a função dos genes NAC de soja, foram desenhados oligonucleotídeos específicos para a clonagem dos 7 genes NAC em diversos vetores de expressão em plantas e em leveduras. Além disso, foi avaliado o padrão de expressão desses genes em resposta a diferentes tipos de estresse e o envolvimento em eventos de senescência e morte celular.

4 - As proteínas GmNAC estão localizadas no núcleo

A análise de sequência revelou a presença de um sítio de localização nuclear predito para outras proteínas NACs (Xie *et al.*, 2000; Greve *et al.*, 2003) em todas as proteínas GmNACs em estudo (Figura 6), sugerindo que elas sejam direcionadas para o núcleo. Diversas proteínas NACs investigadas em estudos anteriores foram localizadas no núcleo (Xie *et al.*, 2000; Greve *et al.*, 2003; Fujita *et al.*, 2004; Nogueira *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2006; Nakashima *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2007), indicando que a localização nuclear é compartilhada pela maioria dos membros dessa família, embora tenha sido descritas também proteínas NACs ancoradas a membranas e que são translocadas para o núcleo em resposta a estímulos específicos (Kim *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007a). Para determinar experimentalmente a localização subcelular dessas proteínas, os respectivos genes foram transientemente expressos como proteínas quiméricas fusionadas a YFP no N-terminal e a localização celular determinada por microscopia confocal em folhas de tabaco (Figura 10). Todas as proteínas YFP-GmNACs foram detectadas no núcleo das células, consistentemente com a atuação dessas proteínas como fatores de transcrição.



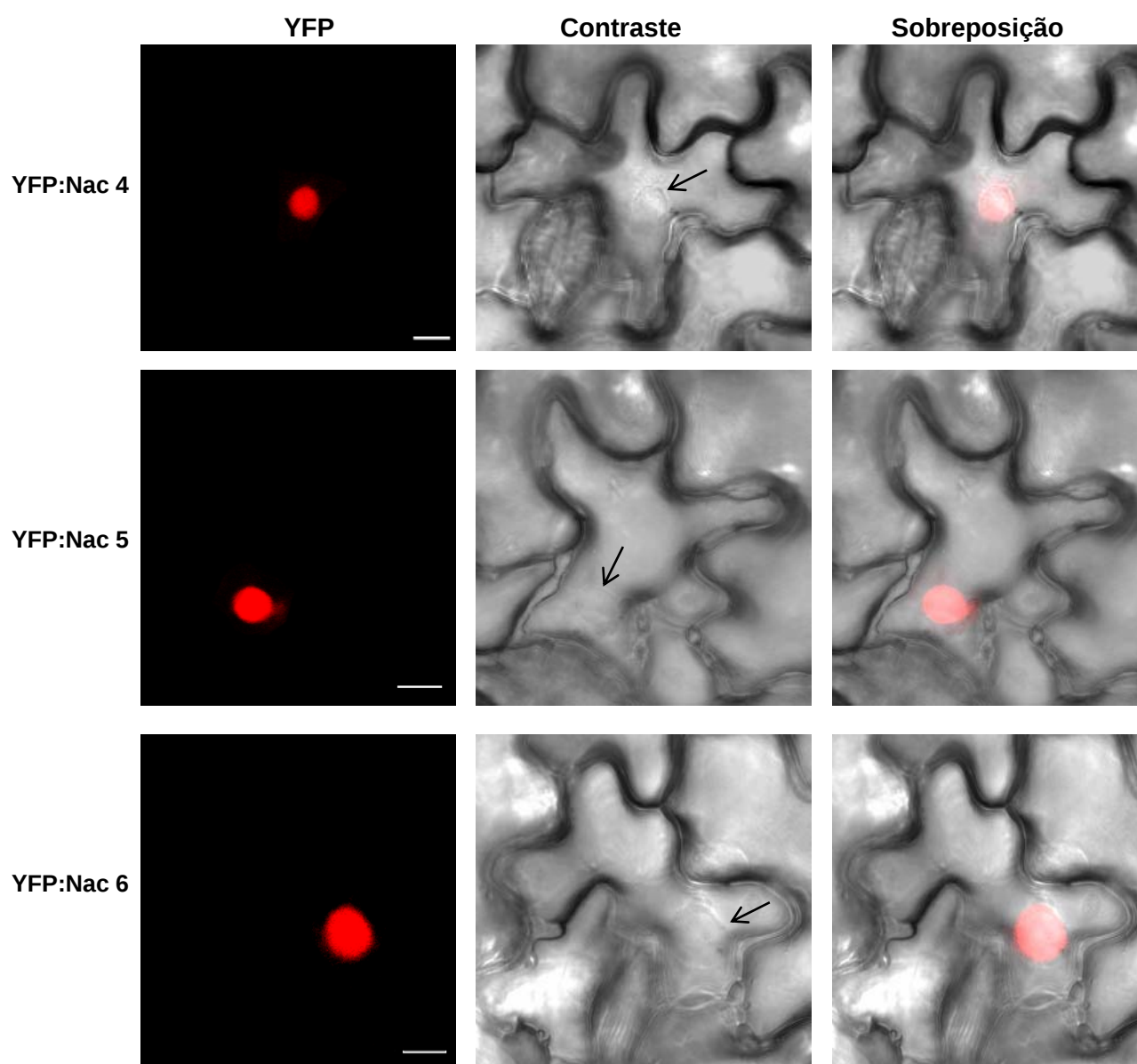


Figura 10 **Localização nuclear de proteínas NAC de soja.** As proteínas NAC fusionadas a YFP (*yellow fluorescent protein*) foram expressas em folhas de tabaco, por meio de agroinoculação. A expressão das proteínas foi monitorada pela fluorescência emitida por YFP, por meio de microscopia confocal, 3 dias após a agroinoculação com os vetores binários. As setas pretas indicam o núcleo das células, visualizados por contraste de fase. Barra = 10 μ m.

5 - Proteínas GmNAC como ativadores transcrpcionais

A evidência de que todas as proteínas NACs, caracterizadas neste estudo, possuem NLS e são localizadas no núcleo sugere a atuação desses genes como fatores de transcrição. De fato, foi proposto que vários membros da família NAC atuam como ativadores transcrpcionais (Aida *et al.*, 1999; Duval *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 1999; 2000; Olsen *et al.*, 2005a). A presença de um domínio de transativação nas proteínas GmATAF, GmNAC1, GmNAC2, GmNAC3, GmNAC4, GmNAC5 e GmNAC6 foi investigada por meio do sistema mono-híbrido em leveduras. Inicialmente, a região codificadora de cada uma dessas proteínas foi fusionada com o domínio de ligação ao DNA do transfator GAL4 (BD-GAL4) e as construções resultantes introduzidas em *S. cerevisiae* AH109, que contém os genes repórteres *His3* e *LacZ* sob o controle do promotor *GAL1*, reconhecido pelo BD-GAL4 (Figura 11a). Em seguida, as proteínas de fusão (BD-GmNACs) foram ensaiadas quanto à habilidade de ativar a transcrição dos genes repórteres *His3* e *LacZ* e promover, respectivamente, o crescimento das leveduras em meio sem histidina e a síntese de β -galactosidase (Figura 11b).

Foi observado que a habilidade de transativação variou entre as diferentes proteínas GmNAC. As linhagens expressando as proteínas de fusão BD-NAC2 e BD-NAC3 foram as que exibiram crescimento mais pronunciado em meio SD -Leu-His, mesmo na presença de 10mM de 3-AT (um análogo da histidina), além de apresentaram atividade de β -galactosidase facilmente detectável (Figura 11). Estes resultados, juntamente com a localização nuclear

(Figura 10), fornecem evidências de que GmNAC2 e GmNAC3 são ativadores transcricionais.

A linhagem BD-NAC5 também ativou a expressão do gene repórter *LacZ*, mas exibiu menor crescimento em meio seletivo contendo 10mM 3-AT, em relação às linhagens BD-NAC2 e BD-NAC3. Estes resultados sugerem que GmNAC5 exibe uma atividade de transativação inferior àquela de GmNAC2 e GmNAC3, pelo menos em leveduras, ou que a proteína quimérica BD-NAC5 acumulou em níveis inferiores nas leveduras transformadas. Entretanto, estes resultados não permitem descartar a possibilidade de que a atividade desses transfatores seja modulada por modificações pós-traducionais e por interações com outros transfatores. Esta argumentação é sustentada pela existência de vários sítios de fosforilação preditos para proteínas NAC e pela habilidade de heterodimerização de algumas dessas proteínas (Meng *et al.*, 2007; Hegedus *et al.*, 2003; Tran *et al.*, 2007).

Ao contrário do que se esperava, as linhagens BD-ATAF, BD-NAC1 e BD-NAC6 não cresceram em meio seletivo e nem apresentaram atividade de β -galactosidase. Já a linhagem BD-NAC4 exibiu um crescimento modesto em meio seletivo, mas não ativou a expressão do gene *LacZ*. Embora a ativação transcricional em leveduras seja compartilhada por vários membros da família NAC (Olsen *et al.*, 2005a), as proteínas BnNAC5-1, BnNAC14 e AtNAC1 não exibiram atividade de transativação detectáveis (Hegedus *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2000).

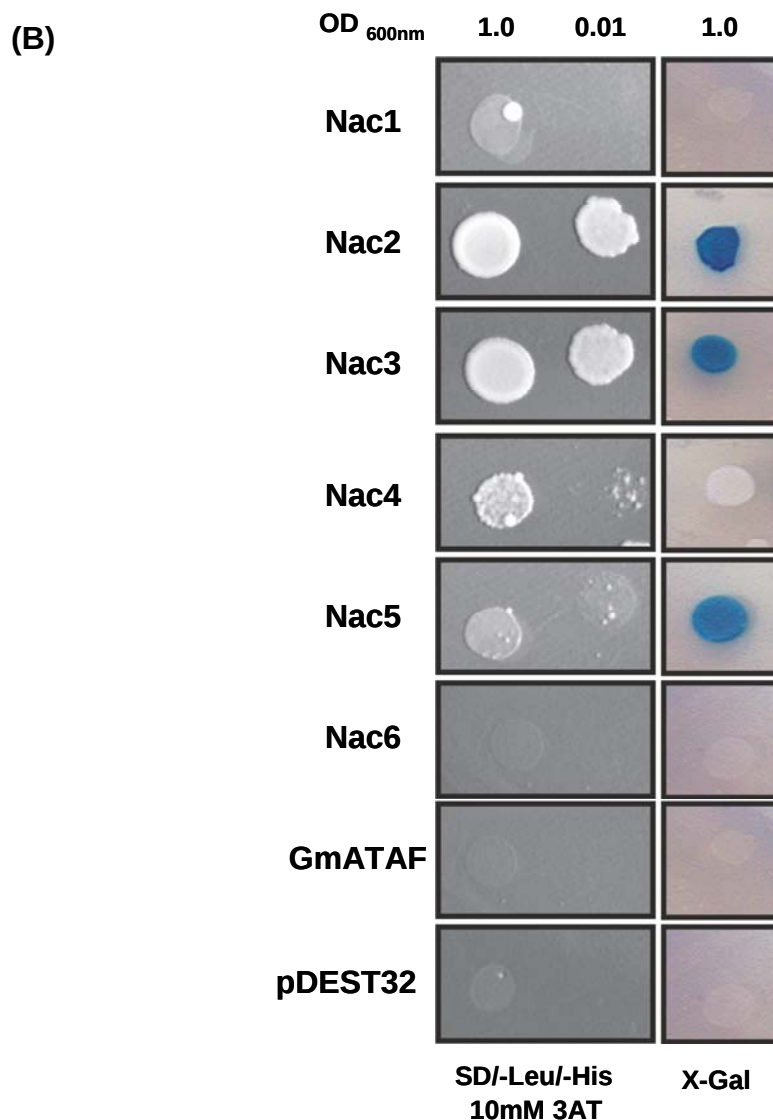
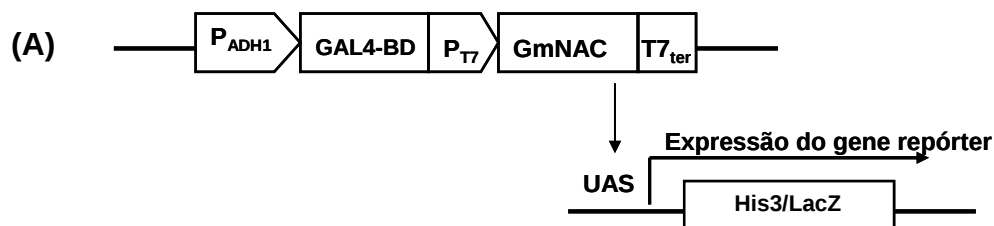


Figura 11 - **Atividade de transativação das proteínas GmNACs.** (A) Esquema das construções usadas para expressão das proteínas em fusão com o domínio de ligação ao DNA do transfator GAL4 (GAL4-BD), no vetor pDEST32 (Invitrogen). Os plasmídeos contendo as fusões e o vetor vazio (pDEST32) foram introduzidos, separadamente, em leveduras da estirpe AH109. Os transformantes foram incubados por 3 dias a 28 °C em placas SD/-Leu/-His (esquerda) contendo 10mM de 3-aminotriazol (3AT); e por 5 dias a 28°C em placas SD/-Leu/-His contendo X-Gal (direita), para visualização da atividade de β -galactosidase. Os valores no topo da figura 2B indicam os valores de OD_{600nm} das culturas plaqueadas.

Interessantemente, quando apenas a região C-terminal de AtNAC1 foi expressa em leveduras, a proteína de fusão BD-AtNAC1 truncada foi um potente transativador (Xie *et al.*, 2000), indicando que a atividade de transativação da região C-terminal pode ser influenciada negativamente pelo domínio NAC N-terminal. Dessa forma, no caso de GmATAF, GmNAC1, GmNAC4 e GmNAC6, a ausência de transativação pode ser devido a interações desfavoráveis entre a região C-terminal e o domínio NAC. Além disso, é possível que essas proteínas dependam da interação com outros transfatores específicos de plantas, na forma de heterodímeros, para ativarem a transcrição de seus genes alvo. Consistentemente com essa hipótese, foi demonstrado recentemente que a ativação transcricional do gene *ERD1* depende da atuação conjunta dos transfatores ANAC019 e ZFHD1, provavelmente na forma de heterodímeros (Tran *et al.*, 2007). Existe ainda a possibilidade de as proteínas GmATAF, GmNAC1, GmNAC4 e GmNAC6 realmente não atuarem como ativadores transcricionais, mas sim como repressores. Resultados anteriores desse trabalho forneceram evidências de que GmATAF atua como um repressor da expressão de genes da via integrativa (Figura 8). Outros genes NAC, *ATAF1* e *ATAF2* de *Arabidopsis*, foram caracterizados como repressores de vias de resposta a estresse hídrico e por patógenos, respectivamente (Lu *et al.*, 2006; Delessert *et al.*, 2005).

6 - Os genes *GmNACs* são diferencialmente expressos em órgãos de soja

Neste trabalho, a expressão dos 7 genes NAC foi analisada em diferentes tecidos de soja (*Glycine max*), variedade CAC-1, e em diferentes estádios de desenvolvimento da semente, sob condições normais de crescimento, por meio de qRT-PCR em Tempo Real (Figura 12). Os genes NAC avaliados foram diferencialmente expressos nos órgãos analisados e, com exceção de *GmNAC1* e *GmNAC3*, que apresentaram um padrão de expressão similar, cada gene apresentou um padrão único. Além disso, observou-se que, enquanto os genes *GmNAC1*, *GmNAC3*, *GmNAC4*, *GmNAC5* apresentam baixos níveis de expressão em relação ao controle endógeno (Helicase), *GmATAF*, *GmNAC2* e *GmNAC6* são expressos em maiores quantidades, mesmo na ausência de estresse. Isso sugere que os genes *GmATAF*, *GmNAC2* e *GmNAC6* podem estar funcionalmente envolvidos também em processos celulares básicos e constitutivos.

Também foi de destaque a diferença de expressão entre folhas fonte e folhas dreno. Por exemplo, para os genes *GmNAC1*, *GmNAC3* e *GmNAC6*, embora haja expressão em folhas fonte, a expressão é nula nas folhas dreno. É possível que essa diferença esteja relacionada com a idade biológica da folha e processos de senescência, uma vez que 20% dos genes NAC preditos para *Arabidopsis* estão presentes no banco de dados de folhas senescentes (Guo *et al.*, 2004).

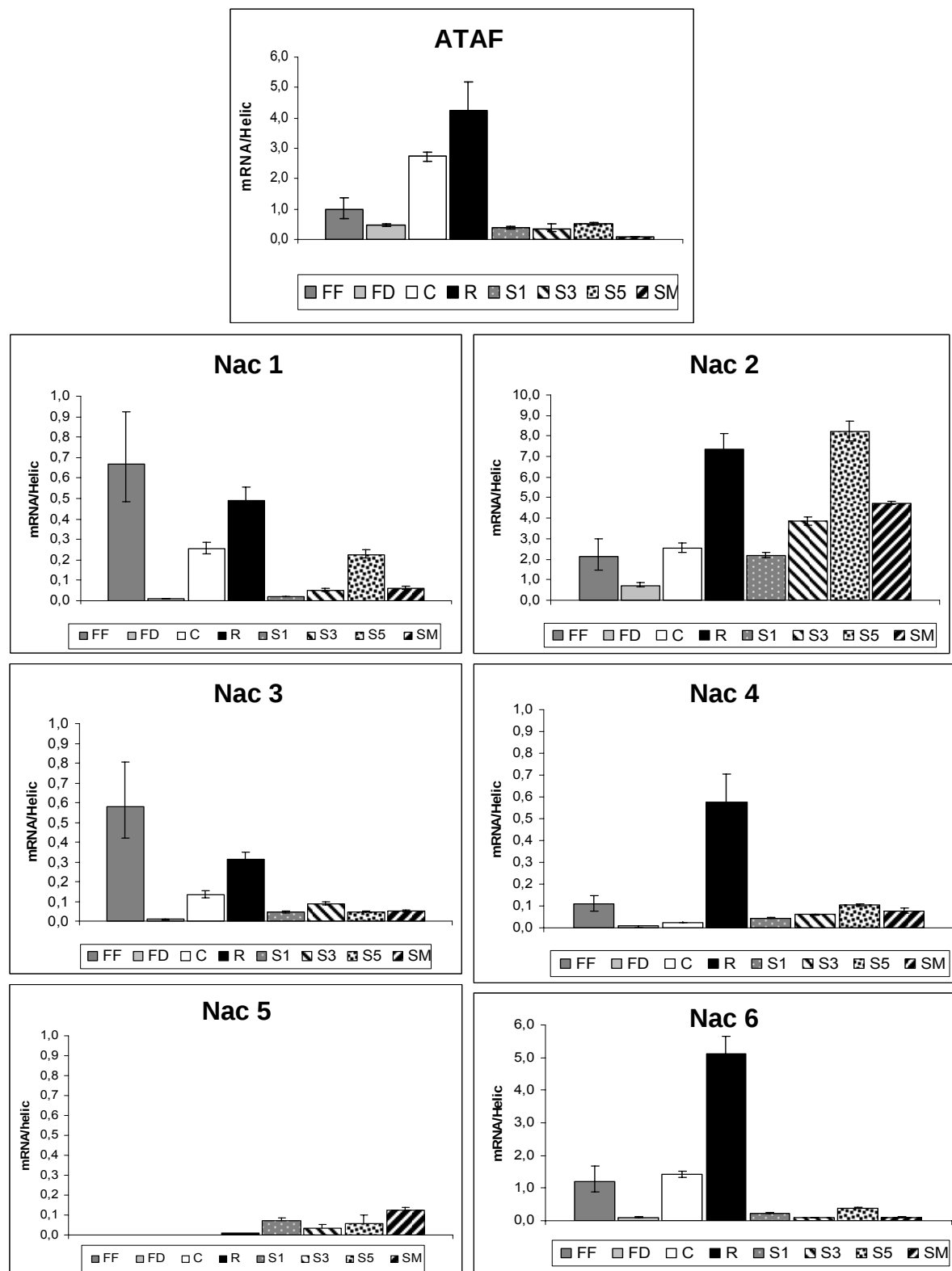


Figura 12. **Padrão de expressão de genes NAC em órgãos de soja.** A expressão dos genes NAC em diferentes órgãos de soja, sob condições normais de crescimento, foi avaliada por meio de RT-PCR em tempo real. O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta Ct}$, utilizando como controle endógeno a helicase. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de um pool de 4 réplicas biológicas (+DP, n = 2 réplicas manuais). FF: folha fonte, FD (folha dreno), C (caule), R (raiz), S1 (semente no primeiro estágio), S3 (terceiro estágio), S5 (quinto estágio), SM (semente madura).

A expressão de *GmATAF* é maior na raiz, seguido pela expressão no caule e folhas (Figura 12). Os transcritos de *GmNAC1* e *GmNAC3* foram, embora em baixos níveis, predominantemente expressos em folhas fonte, e em menor quantidade nas raízes. *GmNAC2* é expresso em todos os tecidos, mas destacam-se os elevados níveis de expressão detectados em raízes e sementes S5. Além disso, observa-se uma alteração dos níveis dos transcritos de *GmNAC2* ao longo dos diferentes estádios de desenvolvimento da semente, o que sugere sua participação em eventos de desenvolvimento e diferenciação. O gene *GmNAC4*, embora compartilhe com *GmNAC3* 93,3% de similaridade de sequência, apresentou um padrão de expressão diferente, sendo expresso apenas nas raízes. Nossos resultados indicam que *GmNAC5* não é expresso em tecidos vegetativos, mas sua expressão pôde ser detectada, embora em baixíssimos níveis, em vários estágios de desenvolvimento da semente. *GmNAC5* pertence ao subgrupo NAM (Figura 9), cujos membros estão envolvidos na manutenção do meristema apical do embrião e em processos de diferenciação de órgãos (Souer *et al.*, 1996; Aida *et al.*, 1997; Duval *et al.*, 2002). É provável que *GmNAC5* seja expresso apenas em algumas células do embrião da semente, controlando processos de diferenciação, o que explica os baixos níveis detectados quando se analisa a semente inteira. *GmNAC6* é expresso em maior quantidade nas raízes, e em baixos níveis em folhas fonte e caule.

Os diferentes padrões de expressão dos genes NAC, juntamente com os dados do agrupamento hierárquico de sequências (Figura 9), sugerem que seus produtos estejam envolvidos em processos distintos durante o desenvolvimento da planta.

Recentemente, a expressão tecido-específica dos genes NACs de soja *GmNAC1-GmNAC6* foi avaliada por RT-PCR semi-quantitativo (Meng *et al.*, 2007). Os transcritos de *GmNAC1* foram detectados apenas em raízes e flores. *GmNAC2* foi fortemente expresso nas folhas, caule e semente, e em baixos níveis nas raízes. Em concordância com nossos resultados, a expressão de *GmNAC3* foi predominante nas folhas, e em menor quantidade no caule e raiz. Ao contrário do indicado por nossos resultados, *GmNAC4* foi predominantemente expresso nas folhas e sementes, mas não em raízes. Os transcritos de *GmNAC5* foram detectados em sementes e em menor quantidade nas flores, enquanto que *GmNAC6* foi expresso constitutivamente em todos os órgãos analisados. A divergência parcial entre nossos resultados e os obtidos por Meng *et al.* (2007) é provavelmente devido às diferentes metodologias empregadas. Esses autores utilizaram RT-PCR semi-quantitativo, enquanto que nossos resultados foram obtidos por RT-PCR em Tempo Real. Por apresentar maior sensibilidade, essa metodologia é mais adequada para quantificar a expressão de genes expressos em baixos níveis, tais como os que codificam fatores de transcrição.

7 - A regulação dos genes *GmATAF*, *GmNAC2* e *GmNAC6* por indutores da UPR ocorre via um novo ramo de sinalização de estresses no retículo endoplasmático

O gene *GmATAF* foi previamente identificado pela sua co-regulação por indutores da via UPR (tunicamicina e AZC) e por estresse osmótico (Irsigler *et al.*, 2007). O antibiótico tunicamicina inibe a enzima UDP-N-acetil-glicosamina-dolicol fosfato N-acetilglicosamina-1-fosfato transferase (GPT), que catalisa o passo inicial da biossíntese de oligossacarídeos ligados a dolicol (Lehrman, 1991). Dessa forma, o tratamento com tunicamicina inibe a N-glicosilação, o que resulta no acúmulo de proteínas mal dobradas no lúmen do retículo endoplasmático e na ativação de via UPR (Urade, 2007). Com a finalidade de avaliar se a regulação de *GmATAF* e dos outros genes NAC de soja (*GmNAC1-GmNAC6*) é sinalizada por componentes da via UPR, a indução desses genes por tunicamicina foi avaliada sob condições que previnem a ativação da via UPR. Tanto em células de mamíferos quanto em células de plantas, tem sido demonstrado que expressão ectópica de BiP inibe a ativação da via UPR (Bertolotti *et al.*, 2000; Okamura *et al.*, 2000). Plantas jovens de soja superexpressando o gene *soyBiPD* foram tratadas com tunicamicina e a ativação da via UPR avaliada por RT-PCR em tempo real, utilizando os marcadores específicos *BiPD* e *calnexina* (Figura 13). Expressão ectópica de *BiP* em soja atenua a ativação da via UPR, conforme demonstrado pela diminuição da indução dos genes *BiPD* e *calnexina*, em condições que promovem estresse no retículo (compare WTTun com TTun). Em contraste, inibição da via UPR por superexpressão de *BiP* não inibe a indução dos genes

GmATAF, *GmNAC2* e *GmNAC6* por tunicamicina. Interessantemente, a indução de *GmNAC6* é superior nas plantas transgênicas do que em plantas WT, sugerindo que a inibição da via UPR é compensada com a ativação de uma via de estresse no RE independente, potenciando a expressão de *GmNAC6*. Os genes *GmNAC3* e *GmNAC4* são apenas ligeiramente induzidos por tunicamicina, enquanto que *GmNAC1* é reprimido.

Esses resultados indicam que a indução de *GmATAF*, *GmNAC2* e *GmNAC6* por tunicamicina ocorre por uma via de sinalização distinta da UPR.

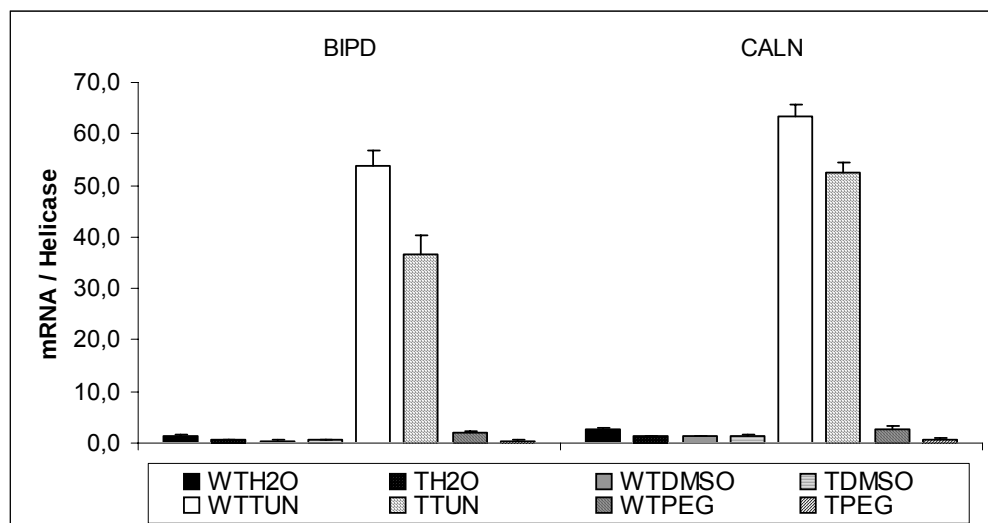


Figura 13 - Ativação dos genes controle. Após tratamento das plântulas de soja, foi verificada por PCR em tempo real a expressão dos genes controles. O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta Ct}$, utilizando como controle endógeno a Helicase. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de um pool de 7 réplicas biológicas devidamente validadas individualmente (+DP, n = 2 réplicas manuais). WT: planta não transformada; T: planta transgênica superexpressando BiP. TUN: tunicamicina. BIPD corresponde ao chaperone molecular endógeno BiP, isoforma D. CALN corresponde à Calnexina. (Figura retirada de Costa, 2007).

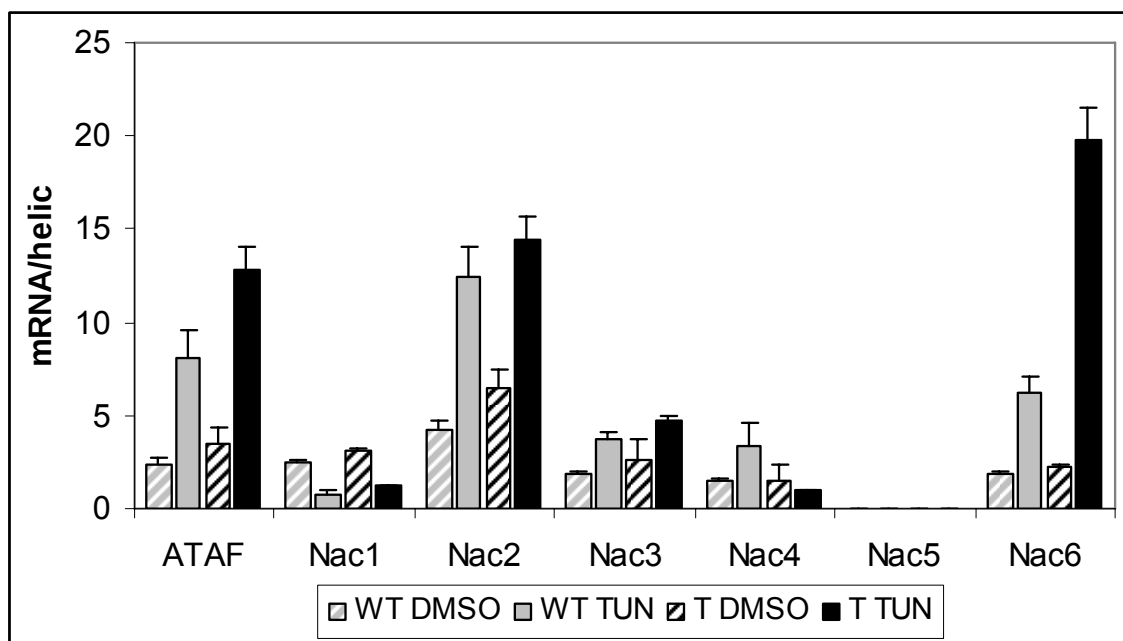


Figura 14 - **Regulação da expressão dos genes GmNAC por tunicamicina.** Após o tratamento das plântulas de soja, a expressão dos genes foi medida por RT-PCR em tempo real. O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta Ct}$, utilizando como controle endógeno a helicase. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de um pool de 7 réplicas biológicas devidamente validadas individualmente (+DP, n = 2 réplicas manuais). WT: planta não transformada; T: planta transgênica superexpressando BiP.

8 - Cinética de indução de genes GmNACs por tunicamicina

Para entender melhor a participação dos genes GmNAC na resposta ao estresse originado no RE, células de soja foram tratadas com tunicamicina e a indução dos genes, em diferentes intervalos de tempo, avaliada por RT-PCR em tempo real. A cinética de indução revelou que os genes *GmATAF* e *GmNAC6* são rapidamente induzidos, 1 hora após o tratamento com tunicamicina (Figura 15). Isso indica que eles sejam genes precoces em vias de sinalização, podendo regular a expressão de genes efetores da resposta ao estresse no RE. Além disso, enquanto que os transcritos de *GmATAF* retornam aos níveis basais dentro de 8 horas, a indução de *GmNAC6* se mantém, embora em menor intensidade, até pelo menos 12 horas após o tratamento. Ao analisar em detalhe a cinética de indução de *GmNAC6*, nota-se que ocorre um pico de indução inicial com 1 hora, seguido de uma nova indução a partir de 8 horas de tratamento (Figura 15). Sabe-se que a ativação prolongada da via UPR pode desencadear processos de morte celular (Rao *et al.*, 2002; Zhang & Kaufman, 2004; Zuppini *et al.*, 2004). Dessa forma, seria interessante avaliar se *GmNAC6* está envolvido em mecanismos de morte celular e se sua indução tardia por tunicamicina está ligada a sinais de morte originados no RE.

Os genes *GmNAC2*, *GmNAC3* e *GmNAC4* apresentaram uma leve e rápida indução, enquanto que *GmNAC1* e *GmNAC5* não responderam ao tratamento com tunicamicina.

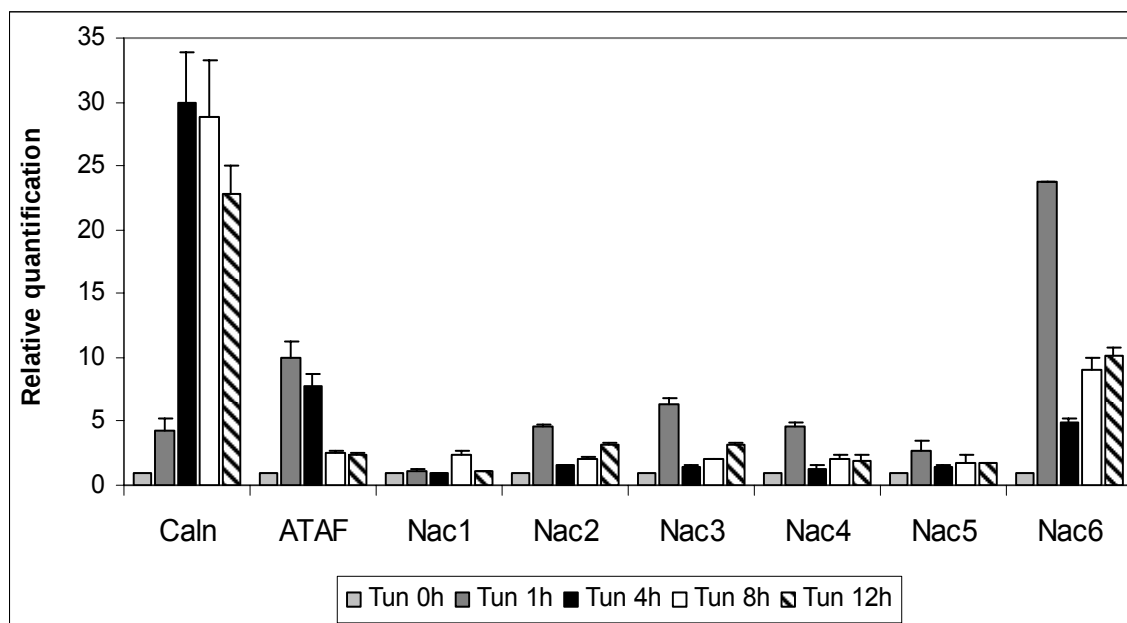


Figura 15 - **Cinética de indução por tunicamicina.** Foi medida a expressão dos genes por RT-PCR em tempo real em células de soja em suspensão tratadas com tunicamicina, nos tempos indicados na figura. O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando como controle endógeno a helicase, e normalizando com o tratamento controle (Tun 0h). Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de um pool de 2 réplicas biológicas (+DP, n = 2 réplicas manuais). Caln: gene controle, calnexina.

9 - Genes NAC de soja são diferencialmente expressos em resposta a estresses abióticos

O gene *GmATAF* foi previamente identificado pela sua co-regulação por indutores da via UPR (tunicamicina e AZC) e por estresse osmótico (Irsigler *et al.*, 2007). Além disso, diversos genes NAC estão envolvidos em vias de resposta e aumento da tolerância a diversos tipos de estresses abióticos, como seca, frio e salinidade (Tran *et al.*, 2004; Fujita *et al.*, 2004; Nogueira *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2006, Nakashima *et al.*, 2007). Com a finalidade de avaliar se os genes *GmNAC1-GmNAC6* são induzidos por estresse osmótico, plantas jovens de soja selvagens e superexpressando o gene *soyBiPD* foram submetidas a estresse osmótico mediado por PEG e a expressão dos genes avaliada por qRT-PCR (Figura 16). O tratamento com PEG induziu fortemente a expressão de *GmNAC4*, *GmNAC3*, *GmATAF* e *GmNAC2* (valores de *Fold Variation* 59, 33, 10 e 5, respectivamente). Em contraste, não houve indução significativa dos genes *GmNAC1*, *GmNAC5* e *GmNAC6*, indicando que eles não estão envolvidos na resposta a estresse osmótico.

Recentemente, tem sido demonstrado que plantas de soja superexpressando o gene *soyBiPD* são mais tolerantes a estresse hídrico (Valente A.S. & Fontes E.P.B., comunicação pessoal). Notavelmente, em condições normais, a expressão dos genes *GmATAF*, *GmNAC2*, *GmNAC3* e *GmNAC4* é maior em plantas superexpressando *BiP* (Figura 16, compare WTH₂O com TH₂O), embora sob condições de estresse osmótico não haja diferença entre a indução dos genes NAC em plantas WT e transgênicas (Figura 16). A indução moderada dos genes NAC em condições que

antecedem o estresse pode ser um dos mecanismos que conferem maior tolerância às plantas superexpressando *BiP*. Níveis aumentados de transfatores NAC nessas plantas levariam à expressão constitutiva e basal de genes efetores das respostas defensivas da planta contra estresses, de maneira que quando ela for submetida a condições desfavoráveis, o aparato molecular de defesa esteja parcialmente montado, gerando uma resposta mais rápida e eficiente.

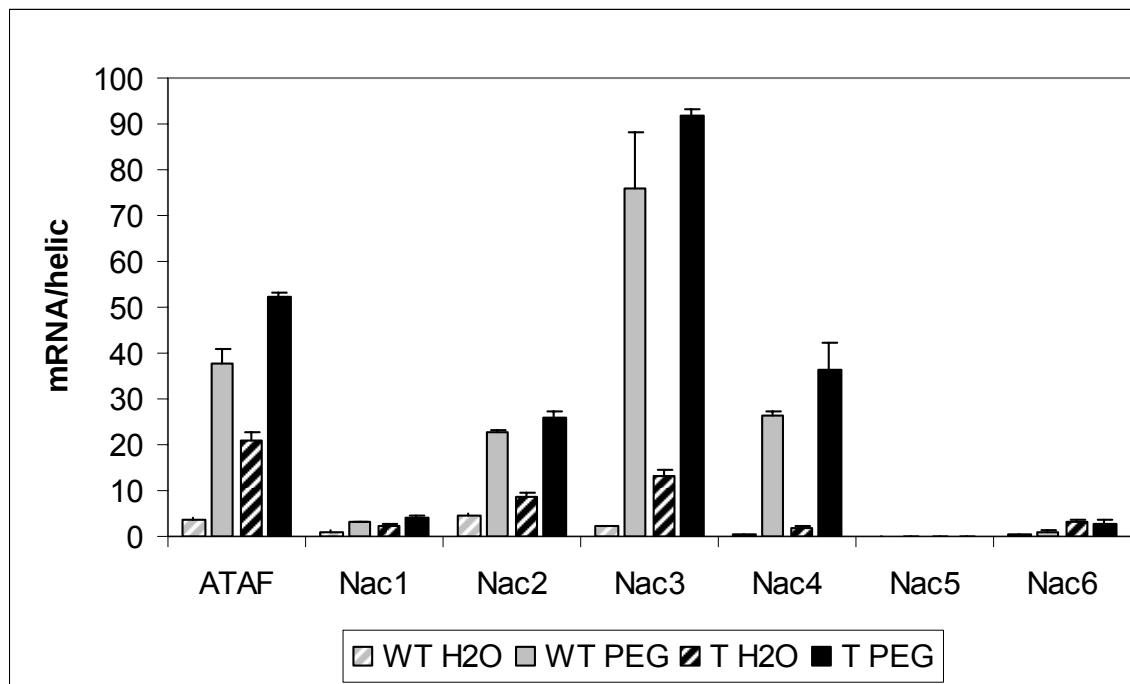


Figura 16 - **Regulação da expressão de genes NAC por estresse hídrico mediada por PEG.** Após o tratamento das plântulas de soja, a expressão dos genes foi medida por RT-PCR em tempo real. O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta Ct}$, utilizando como controle endógeno a helicase. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de um pool de 7 réplicas biológicas devidamente validadas individualmente (+DP, n = 2 réplicas manuais). WT: planta não transformada; T: planta transgênica superexpressando BiP.

Uma vez que os genes *GmATAF*, *GmNAC2*, *GmNAC3* e *GmNAC4* são induzidos por estresse osmótico, foi de interesse avaliar se esta regulação é dependente de vias de sinalização mediadas pelo hormônio ácido abscísico (ABA), envolvido em várias respostas da planta a estresses abióticos (Mahajan & Tuteja, 2005). O tratamento de células de soja em suspensão com ABA induziu fortemente a expressão de *GmNAC3* e *GmNAC4*, mesmo com apenas 1 hora após adição do hormônio, sugerindo que a indução desses genes por estresse osmótico é dependente de ABA (Figura 17). Em contraste, a expressão dos genes *GmATAF* e *GmNAC2* não foi alterada pelo hormônio, sugerindo que eles participam de vias de resposta a estresse osmótico independentes de ABA. O gene *GmNAC1*, embora tenha sido apenas ligeiramente induzido por estresse osmótico em plantas (Figura 16), apresentou uma cinética de indução lenta por ABA em células de soja (Figura 17). Novos experimentos são necessários para acessar a relevância funcional de *GmNAC1* em vias de resposta a estresse osmótico.

Também foi verificada a indução desses genes em resposta a estresse salino e ao hormônio ácido jasmônico (JA) envolvido na resposta das plantas a ferimentos e infecções por patógenos (Creelman & Mullet, 1995). A análise da expressão por RT-PCR em tempo real revelou que *GmNAC3* e *GmNAC4* são altamente induzidos por JA e estresse salino (Figura 18). A indução conjunta desses genes por estresse osmótico, ABA, JA e salinidade sugere que eles estejam envolvidos em respostas gerais a estresses abióticos e bióticos, sendo potenciais alvos em estratégias de resistência engenheirada em plantas. Interessantemente, os genes *GmATAF* e *GmNAC2* são induzidos por estresse osmótico (Figura 16), mas não por estresse salino (Figura 18).

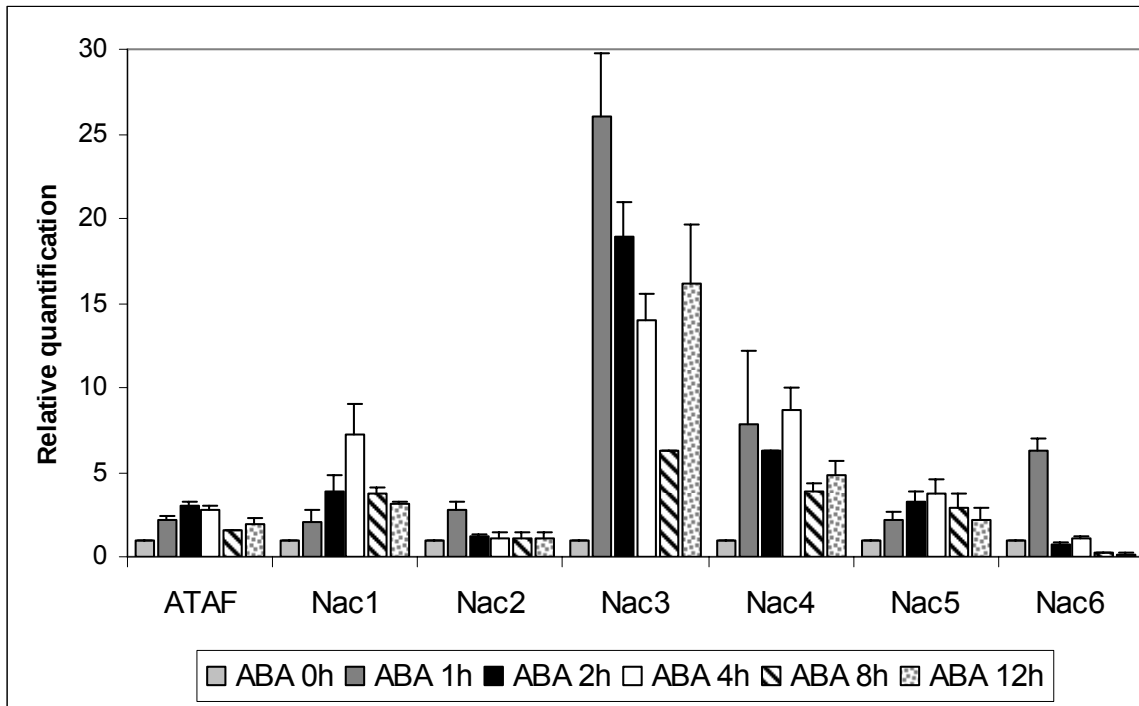


Figura 17 - **Cinética de indução dos genes NAC por ABA.** Foi medida a expressão dos genes por RT-PCR em tempo real em células de soja em suspensão tratadas com ABA, nos tempos indicados na figura. O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando como controle endógeno a helicase, e normalizando com o tratamento controle (ABA 0h). Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de um pool de 2 réplicas biológicas (n = 2 réplicas manuais).

Como o dano causado por baixas temperaturas é consequência da desidratação que freqüentemente acompanha esse tipo de estresse (Mahajan & Tuteja, 2005), foi de interesse avaliar se os genes NAC responsivos a estresse osmótico eram também induzidos por frio. Ao contrário do esperado, o tratamento das células de soja em suspensão com baixas temperaturas provocou apenas uma leve indução de *GmNAC3*, não havendo indução dos demais genes NAC (Figura 18). Esse resultado não foi devido à ineficácia do tratamento, pois houve indução significativa do gene marcador SMP (da família Lea, dado não mostrado), que é induzido por frio e desidratação (Nishida & Murata, 1996; Chandler & Robertson, 1994).

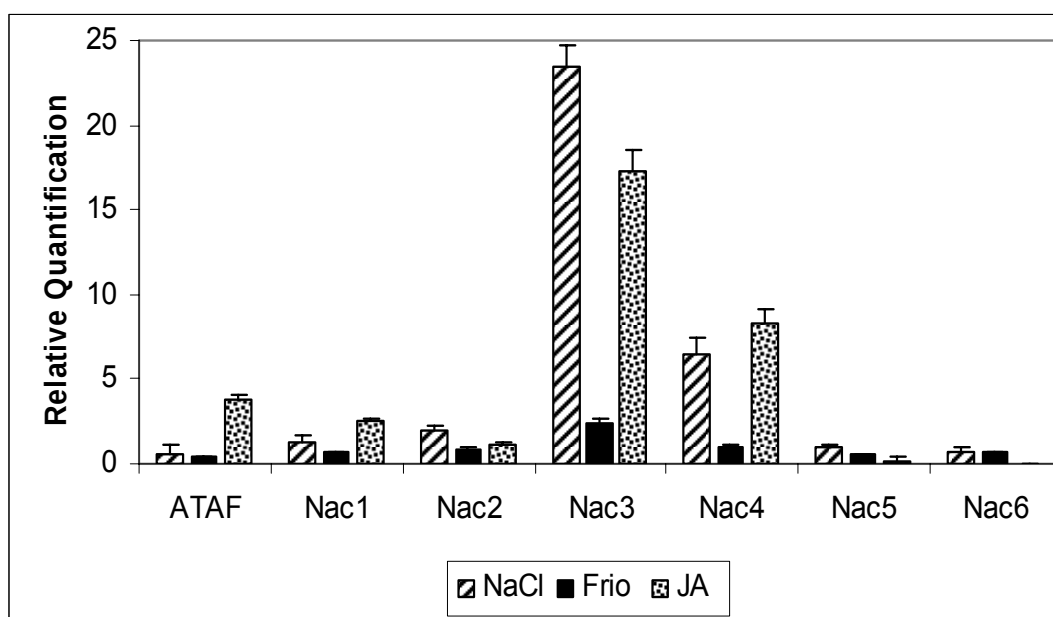


Figura 18 - **Ativação de genes NAC em resposta a estresse salino, frio e JA.** Células de soja em suspensão foram tratadas com ácido jasmônico (JA), ou submetidas a estresse salino (NaCl) ou por baixas temperaturas (Frio), pelo tempo de 2 horas. A expressão dos genes foi avaliada por RT-PCR em tempo real. O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando como controle endógeno a helicase, e normalizando com o tratamento controle (H₂O, não mostrado). Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de um pool de 2 réplicas biológicas.

10 - Os genes *GmATAF*, *GmNAC1* e *GmNAC6* são induzidos por indutores de morte celular e reprimidos por inibidores de senescência

A participação direta das proteínas AtNAP e NAM-B2 (Guo & Gan, 2006; Uauy *et al.*, 2006) na regulação da senescência foliar e a indução de *GmNAC6* durante estresses prolongados no RE (Figura 15) levantaram a possibilidade de esse gene estar envolvido em mecanismos de morte celular. Além disso, análises da alteração global da expressão gênica com o uso de microarranjos revelaram a indução de genes da família NAC durante morte celular programada (PCD) em plantas (Gechev *et al.*, 2004; Vandenabeele *et al.*, 2004). Para avaliar se os genes NAC de soja estão envolvidos em processos de morte celular, inicialmente foi determinada a variação da expressão gênica por qRT-PCR em condições de estresse causado por cicloheximida, um indutor de morte celular em células de soja em suspensão (Wertz & Hanley, 1996); e pelo tratamento com as citocininas antagonistas BAP e zeatina, potentes inibidores de senescência (Singh *et al.*, 1992).

O tratamento com cicloheximida induziu fortemente a expressão de *GmNAC6* e resultou em um aumento significativo nos níveis de transcritos de *GmATAF* e *GmNAC1* (Figura 19). Em contraste, os hormônios BAP e zeatina reprimiram fortemente a expressão de todos os genes NAC. Esses resultados sugerem que os genes *GmATAF*, *GmNAC1* e *GmNAC6* estejam envolvidos em mecanismos de morte celular programada.

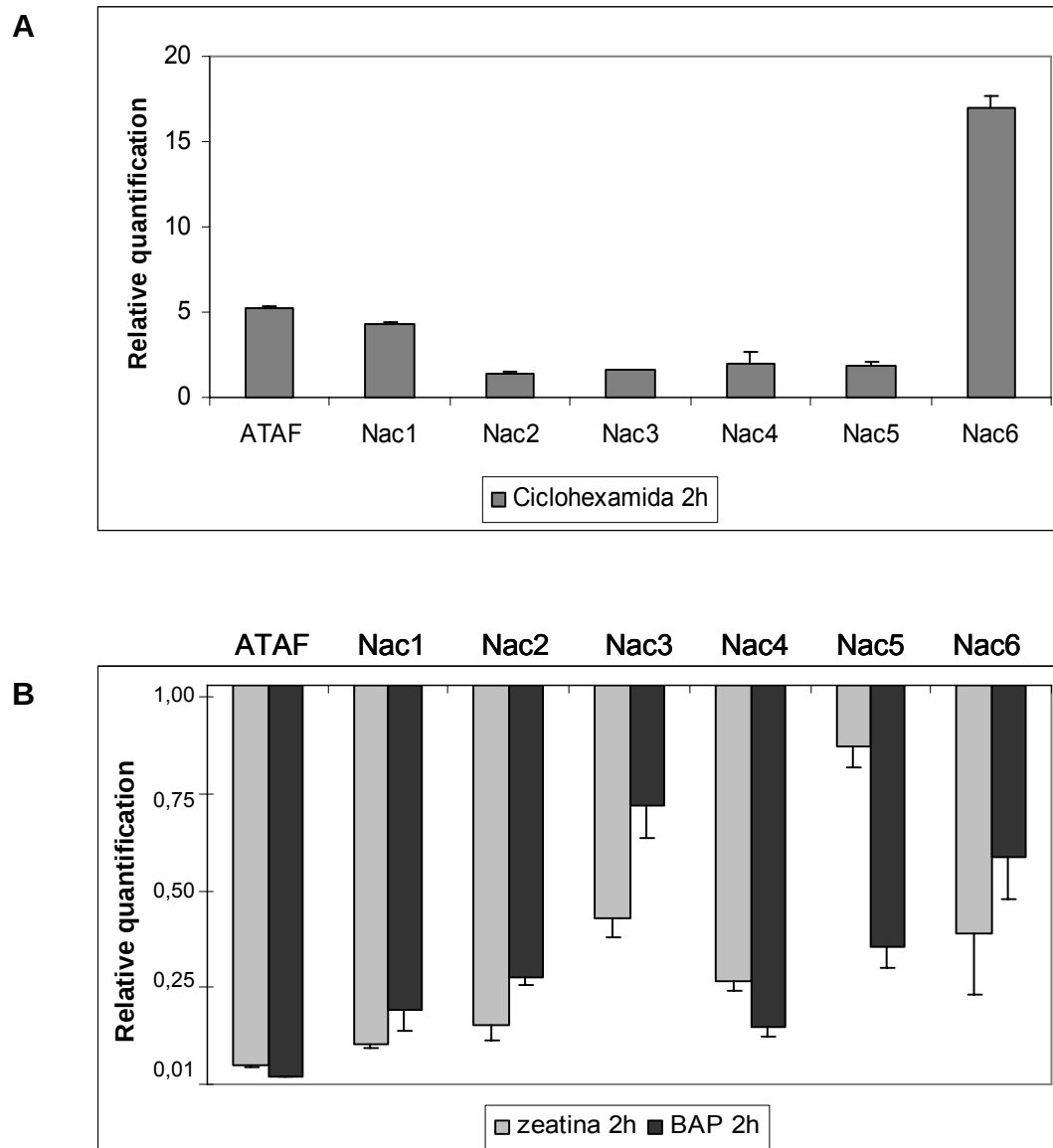


Figura 19 - Indutores de morte celular e inibidores de senescência ativam e reprimem os genes NAC, respectivamente. Foi medida a expressão dos genes por RT-PCR em tempo real em células de soja em suspensão tratadas com (A) cicloheximida, (B) BAP e zeatina por 2 horas. O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando como controle endógeno a Helicase, e normalizando com o tratamento controle (DMSO). Os valores na ordenada representam quantas vezes cada gene no tratamento é mais expresso do que no controle (não representado). Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de um pool de 2 réplicas biológicas (n = 2 réplicas manuais).

11 - Expressão transiente dos genes *GmNAC1*, *GmNAC5* e *GmNAC6* em folhas de tabaco induz senescência

Com a finalidade de avaliar *in planta* o envolvimento dos genes NAC em fenômenos de morte celular, os respectivos cDNAs foram transferidos para vetores binários de transformação de plantas mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, e a expressão transiente dos genes foi induzida por agroinoculação em folhas de tabaco (Figura 20). Após sete dias, as seções foliares agroinfiltradas com as construções pYFP-NAC1 (seção 1), pYFP-NAC5 (seção 5) e pYFP-NAC6 (seção 6) apresentaram o fenótipo de clorose característico de senescência foliar que é associada à diminuição do teor de clorofila e, conseqüentemente, amarelecimento das folhas. Esse fenótipo evoluiu de maneira progressiva, e em apenas 15 dias após a agroinfiltração, as seções infiltradas apresentaram intensa degeneração, como conseqüência de morte celular maciça (Figura 21). O desenvolvimento de clorose e morte celular nas seções infiltradas foi resultado direto da expressão das proteínas e não devido à presença de agrobactéria, uma vez que na seção infiltrada com um cassete de expressão não-relacionado (pK7WG2-NIG, controle) não ocorreu nenhuma alteração. Além disso, esse fenômeno não é uma resposta inespecífica da planta à superexpressão de transfatores da família NAC, uma vez que a expressão transiente das proteínas YFP-GmATAF, YFP-NAC2, YFP-NAC3 e YFP-NAC4 não resultou em morte celular (Figura 20).

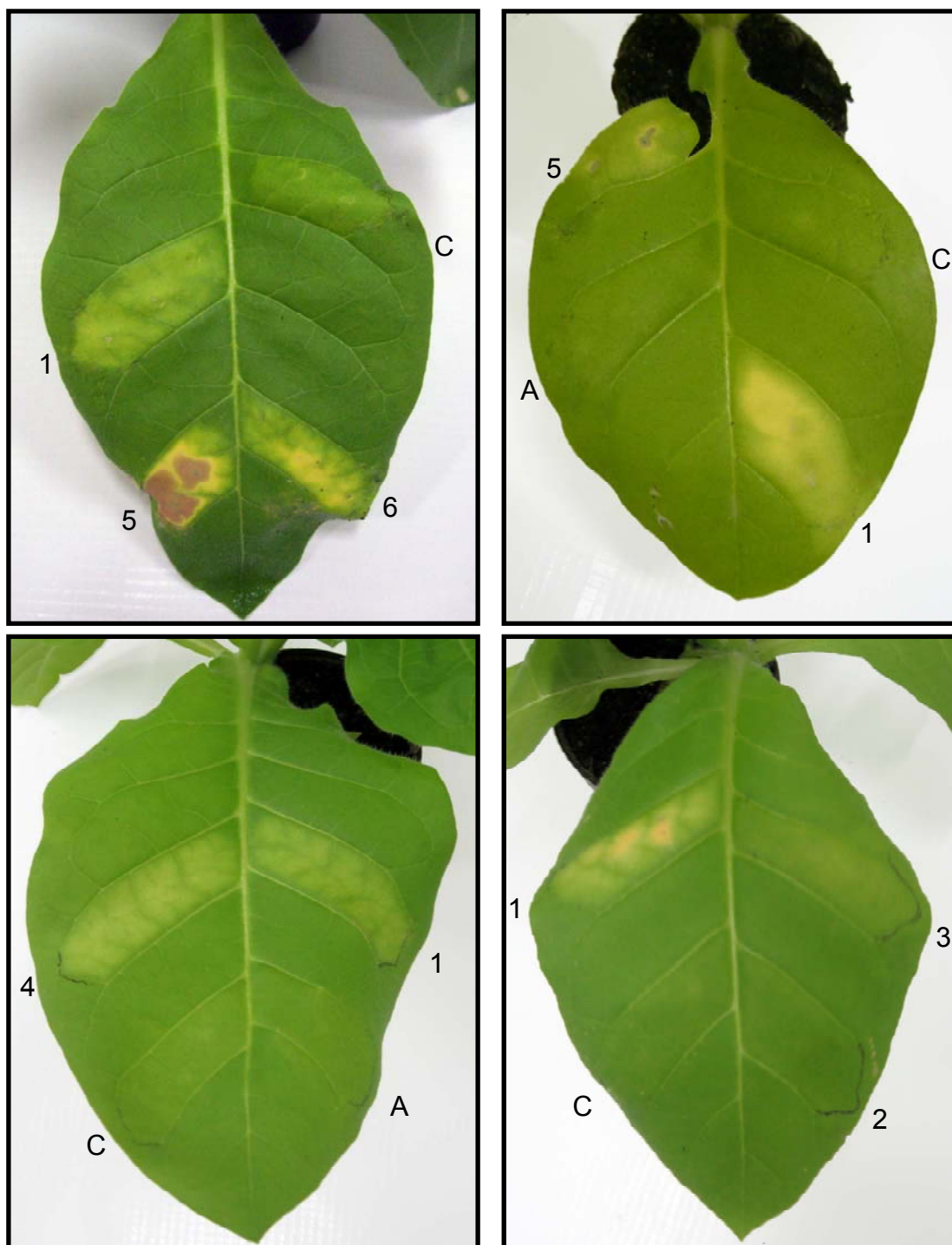


Figura 20. **Expressão transiente de genes NAC de soja em folhas de tabaco.** Folhas de tabaco foram agroinoculadas com as construções: C: pK7FWG2-NIG (controle); A: pYFP-GmATAF; 1: pYFP-NAC1; 2: pYFP-NAC2; 3: pYFP-NAC3; 4: pYFP-NAC4; 5: pYFP-NAC5 e 6: pYFP-NAC6. As fotografias foram tiradas 7 dias após a agroinoculação.

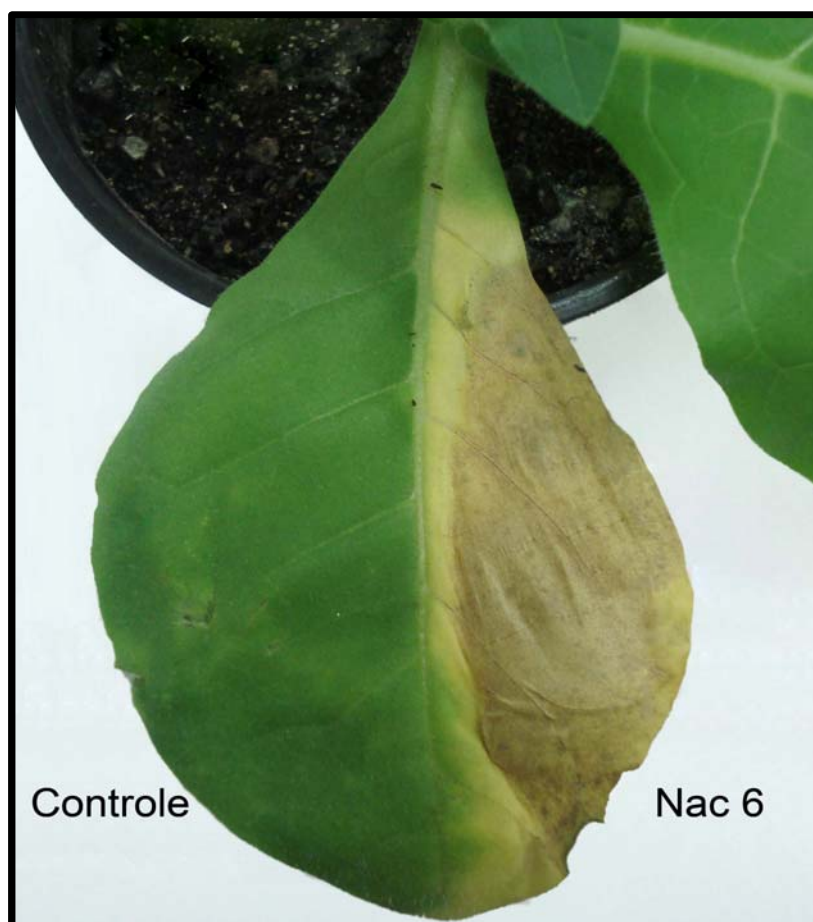


Figura 21 - **Expressão transiente de GmNAC1, GmNAC5 e GmNAC6 causa morte celular em tabaco.** Folhas de tabaco foram infiltradas com agrobactérias transformadas com as construções: C: pK7FWG2-NIG (controle negativo) e 6: pYFP-NAC6. As fotografias foram tiradas 15 dias após a agroinoculação. Esse fenótipo de morte celular foi observado também em folhas agroinoculadas com as construções pYFP-NAC1 e pYFP-NAC5.

Vários genes que codificam enzimas da classe das cisteíno-proteases são induzidos durante a senescência foliar como parte do programa de remobilização de nutrientes que ocorre nesse processo (Lim *et al.*, 2007) sendo, dessa forma, utilizados como marcadores de senescência. Com a finalidade de avaliar se a morte celular causada pela expressão transiente de YFP-NAC1, YFP-NAC5 e YFP-NAC6 é precedida pela indução desses marcadores, foram medidos nas seções foliares agroinoculadas os níveis dos transcritos de duas cisteíno-proteases induzidas em folhas senescentes, CystP (Ueda *et al.*, 2000) e CP1 (AY881011), por qRT-PCR (Figura 22). O resultado revelou uma potente indução do gene *CP1* nas seções foliares agroinoculadas, em relação a seções infiltradas com uma proteína não-relacionada (controle). A expressão transiente de YFP-NAC6, por exemplo, resultou em um aumento de mais de 1000 vezes nos níveis dos transcritos de *CP1*. Com base nesses resultados, é possível que as proteínas GmNAC1, GmNAC5 e GmNAC6 estejam envolvidas na ativação de mecanismos de morte celular programada que ocorrem durante a senescência foliar. Entretanto, sabe-se que as cisteíno-proteases não são induzidas apenas durante a senescência, mas também em outros tipos de PCD, como a que ocorre durante a resposta hipersensível (HR) e embriogênese (Heath, 2000; Bozhkov *et al.*, 2005). Para determinar se a morte celular causada pela superexpressão das proteínas GmNAC1, GmNAC5 e GmNAC6 está especificamente associada ao processo normal de senescência, foi avaliada a ativação desses genes em folhas de soja senescentes, por qRT-PCR (Figura 23).

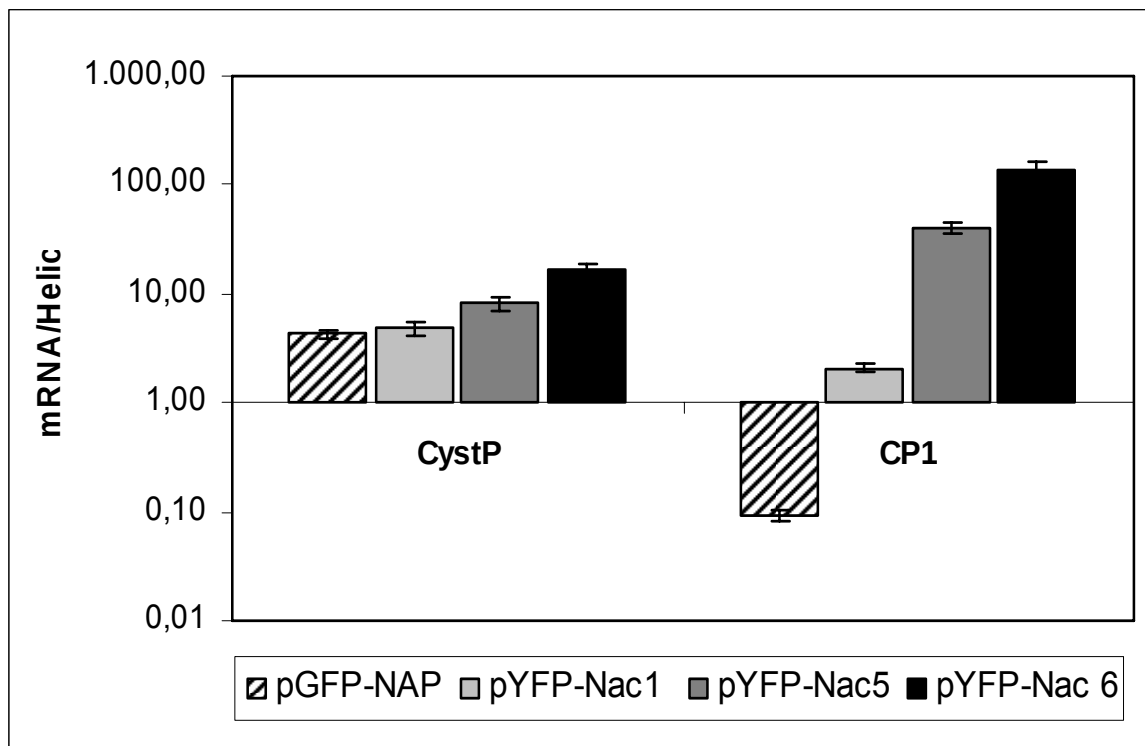


Figura 22. **A expressão transiente de GmNAC1, GmNAC5 e GmNAC6 induz marcadores de senescência de tabaco.** Sete dias após a agroinoculação das folhas de tabaco com as construções pK7FWG2-NIG (controle); pYFP-NAC1, pYFP-NAC5 e pYFP-NAC6, a expressão dos marcadores de senescência *CystP* e *CP1* foi avaliada nas seções foliares agroinfiltradas, por RT-PCR em tempo real. O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta Ct}$, utilizando como controle endógeno a actina. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de um pool de 2 réplicas biológicas (n = 2 réplicas manuais).

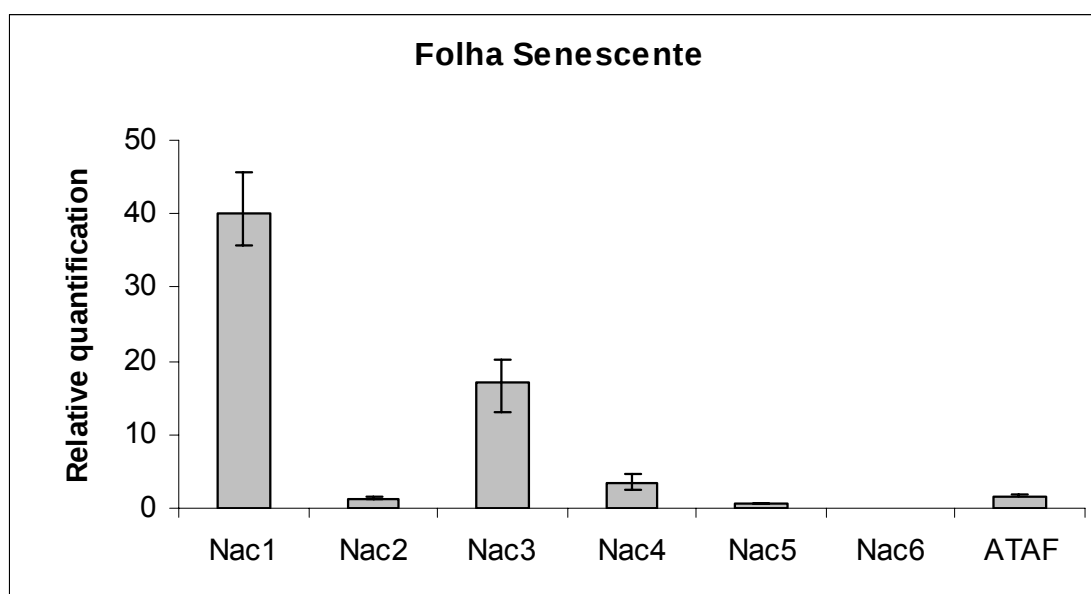


Figura 23 - **A expressão de *GmNAC1* e *GmNAC3* é induzida durante senescência foliar.** A análise da expressão dos genes em folhas de soja foi avaliada por meio de RT-PCR em tempo real. O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando como controle endógeno a helicase. Os valores indicam a expressão relativa de cada gene em folhas senescentes, em relação à expressão em folhas jovens. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de um pool de 3 réplicas biológicas (n = 2 réplicas manuais).

Os resultados dessas análises revelaram uma potente indução do gene *GmNAC1* nas folhas em senescência, enquanto que, surpreendentemente, os níveis dos transcritos de *GmNAC5* e *GmNAC6* permaneceram inalterados em relação a folhas jovens. Além disso, embora a expressão transiente de *GmNAC3* em folhas de tabaco não tenha promovido amarelecimento foliar, sua expressão parece estar diretamente relacionada com a progressão da senescência, o que é evidenciado pelo acúmulo do respectivo transcrito durante esse evento (Figura 23).

Estes resultados substanciam a hipótese de que *GmNAC1* é um regulador da senescência em folhas de soja. Em primeiro lugar, a análise filogenética revelou que *GmNAC1* é membro do subgrupo NAP, cujo principal representante é a proteína NAP de *Arabidopsis*, diretamente envolvida na ativação da senescência foliar (Guo & Guan, 2006) e que compartilha com *GmNAC1* 67% de identidade. Em segundo lugar, *GmNAC1* é induzido por cicloheximida, um indutor clássico de morte celular, e reprimido pelos inibidores de senescência BAP e zeatina. Terceiro, a expressão de *GmNAC1* em folhas de tabaco acelerou o processo de senescência, como evidenciado pelo aparecimento de clorose acentuada, além de ativar a expressão do gene marcador *CP1*. Por último, o aumento da expressão de *GmNAC1* está associado ao processo normal da senescência em folhas de soja.

Enquanto a morte celular causada pela superexpressão de *GmNAC1* está intimamente relacionada à progressão da senescência, nossos resultados sugerem que *GmNAC5* e *GmNAC6* atuam como promotores de morte celular em outros processos. A PCD pode ser induzida por vários programas de desenvolvimento de um organismo, ocorrendo em plantas durante os

processos de senescência, embriogênese, desenvolvimento do tecido vascular e durante o processo de interação da planta com um patógeno (Pennell & Lamb, 1997; Danon *et al.*, 2000). *GmNAC5* pertence ao subgrupo NAM, cujos membros estão envolvidos na manutenção do meristema apical e desenvolvimento embrionário (Olsen *et al.*, 2005a). Embora *GmNAC5* não seja expresso em tecidos vegetativos, foi possível a detecção de baixíssimos níveis de seus transcritos em diversos estádios de desenvolvimento da semente (Figura 12). Isso sugere que *GmNAC5* seja expresso apenas em células específicas do embrião da semente, atuando como ativador da PCD que ocorre nos processos de diferenciação embrionária.

GmNAC6, da mesma forma que *GmNAC1*, é induzido por cicloheximida, reprimido pelas citocininas BAP e zeatina e provoca morte celular quando expresso em folhas de tabaco. No entanto, sua expressão não é induzida durante a senescência. *GmNAC6* pertence ao subgrupo TERN (*Tobacco elicitor-responsive gene encoding NAC-domain protein*), cujo gene homônimo foi identificado pela indução por elicitores de patógenos. Dessa forma, seria interessante avaliar se *GmNAC6* está envolvido em eventos de PCD que ocorrem durante a resposta hipersensível (HR), um mecanismo de defesa das plantas contra patógenos (Heath, 2000).

V - CONCLUSÕES

A primeira parte do trabalho descreveu a clonagem do cDNA completo do gene *GmATAF*, identificado previamente por nosso grupo pela sua co-regulação por estresse osmótico e do retículo (Irsigler *et al.*, 2007). A análise de seqüência mostrou que *GmATAF* pertence à família de transfatores NAC, envolvidos em processos de desenvolvimento, senescência e resposta a estresses (Olsen *et al.*, 2005a, Guo & Gan, 2006). Coletivamente, os resultados dessa investigação indicam que *GmATAF* atua como um repressor transcricional, regulando negativamente vias de resposta a estresse hídrico e do retículo. Em primeiro lugar, entre os 111 membros da família NAC de *Arabidopsis*, *GmATAF* compartilha a maior identidade de seqüência com as proteínas ATAF1 e ATAF2, caracterizadas previamente como repressores de vias de resposta a estresse hídrico e por patógenos, respectivamente (Lu *et al.*, 2006; Delessert *et al.*, 2005). Segundo, embora YFP-*GmATAF* tenha sido localizada no núcleo de células de tabaco, essa proteína não exibiu atividade de transativação em leveduras. Finalmente, foi demonstrado que a expressão transiente de *GmATAF* em protoplastos de soja resultou na repressão transcricional de vários genes co-regulados por estresse hídrico e do retículo.

A segunda parte do trabalho estendeu a caracterização funcional para outros membros da família NAC de soja (*GmNAC1-GmNAC6*), isolados recentemente (Meng *et al.*, 2007). Nossos resultados forneceram evidências conclusivas de que as proteínas NAC de soja caracterizadas constituem fatores de transcrição funcionalmente não-redundantes, envolvidos na resposta a diferentes tipos de estresse. Inicialmente, análises *in silico* revelaram que os

genes NAC caracterizados podem ser separados em diferentes subgrupos da família NAC, de acordo com a classificação de Ooka *et al.*, 2003. Esta diversidade funcional sugerida pelo agrupamento de seqüências foi adicionalmente substantiada pela expressão diferencial dos genes NACs observada em órgãos de soja e pela análise do padrão de expressão desses genes de soja em resposta a diferentes tipos de estresse, o que está sumarizado na Figura 24.

Previamente, análises de microarranjos revelaram a indução de genes da família NAC durante morte celular programada (PCD) em plantas (Gechev *et al.*, 2004; Vandenabeele *et al.*, 2004). Consistentemente com esta observação, os genes NACs de soja foram induzidos por cicloheximida, indutor de morte celular em células de soja em suspensão, e reprimidos pelos inibidores de senescência, BAP e zeatina. Nesta investigação, foram fornecidas, pela primeira vez, evidências diretas da atuação de proteínas NAC na ativação de morte celular, por meio dos ensaios de expressão transiente em folhas de tabaco. Entre os genes NACs cuja expressão transiente em tabaco induziu morte celular, foi proposto que *GmNAC1*, *GmNAC5* e *GmNAC6* atuam em eventos diferentes de morte celular em plantas. Enquanto a indução de *GmNAC1* está associada à progressão da senescência, *GmNAC5* e *GmNAC6* não são induzidos durante esse evento. Baseado na homologia de seqüência com genes NACs conhecidos e no padrão de indução gênica, provavelmente os genes *GmNAC5* e *GmNAC6* participam de morte celular que ocorre durante o desenvolvimento do embrião e na resposta hipersensível, respectivamente.

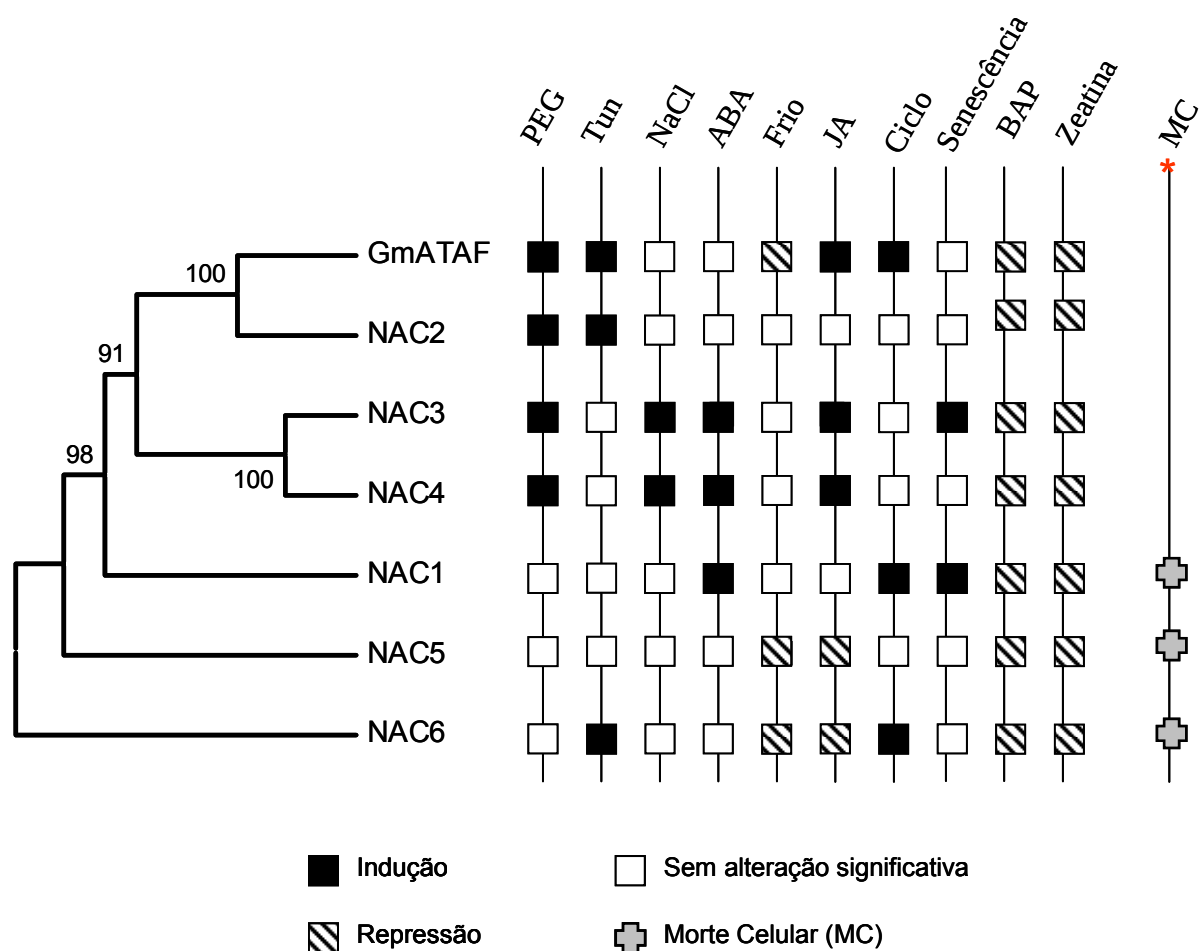


Figura 24 - **Resumo da expressão diferencial dos genes NAC de soja.** Os resultados de expressão dos genes NAC em resposta aos tratamentos avaliados no presente trabalho foram sumarizados em paralelo com o agrupamento hierárquico de seqüências. No item MC, as cruzes indicam o potencial dos genes em causar morte celular em folhas de tabaco agroinoculadas; nos demais itens os quadrados indicam os níveis de alteração da expressão dos genes, de acordo com a legenda acima. O agrupamento hierárquico foi construído utilizando o programa MEGA3. Os números representam valores de *bootstrap*. PEG: polietilenoglicol (estresse hídrico); Tun: Tunicamicina; NaCl: estresse salino; ABA: ácido abscísico; Frio: exposição a 0°C, JA: ácido jasmônico; Ciclo: cicloheximida; Senescência: folhas de soja senescentes; BAP e Zeatina: inibidores de senescência; MC: morte celular observada em folhas de tabaco agroinoculadas.

VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aida M, Ishida T, Fukaki H, Fujisawa H, Tasaka M** (1997) Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*, an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell* 9, 841–857.
- Aida M, Ishida T, Tasaka M** (1999) Shoot apical meristem and cotyledon formation during *Arabidopsis* embryogenesis: interaction among the CUPSHAPED COTYLEDON and SHOOT MERISTEMLESS genes. *Development* 126, 1563–1570.
- Aida M, Vernoux T, Furutani M, Traas J, Tasaka M** (2002) Roles of PIN-FORMED1 and MONOPTEROS in pattern formation of the apical region of the *Arabidopsis* embryo. *Development* 129, 3965–3974.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ** (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 5, 403–410.
- Alvim FC, Carolino SMB, Cascardo JCM, Nunes CC, Martinez CA, Otoni WC, Fontes EPB** (2001) Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. *Plant Physiology* 126, 1042–1054.
- Amaya I, Botella MA, de la Calle M, Medina MI, Heredia A, Bressan RA, Hasegawa PM, Quesada MA, Valpuesta V** (1999) Improved germination under osmotic stress of tobacco plants overexpressing a cell wall peroxidase. *FEBS Letters* 457, 80–84.
- Andersson A, Keskitalo J, Sjodin A, Bhalerao R, Sterky F, Wissel K, Tandré K, Aspeborg H, Moyle R, Ohmiya Y, Bhalerao R, Brunner A, Gustafsson P, Karlsson J, Lundeberg J, Nilsson O, Sandberg G, Strauss S, Sundberg B, Uhlen M, Jansson S, Nilsson P** (2004) A transcriptional timetable of autumn senescence. *Genome Biology* 5, R24.
- Apse MP, Aharon GS, Snedden WA & Blumwald E** (1999) Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter in *Arabidopsis*. *Science* 285, 1256–1258.
- Avivi Y, Morad V, Ben-Meir H, Zhao J, Kashkush K, Tzfira T, Citovsky V, Grafi G.** (2004) Reorganization of specific chromosomal domains and activation of silent genes in plant cells acquiring pluripotentiality. *Developmental Dynamics* 230, 12–22.

- Badawi G, Yamauchi Y, Kawano N, Tanaka K, Tanaka K** (2004) Enhanced tolerance to water deficit and high salt stress by overexpressing superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in tobacco chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 45, S230-S230.
- Bartel, DP** (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–297.
- Bartels D** (2001) Targeting detoxification pathways: an efficient approach to obtain plants with multiple stress tolerance? *Trends in Plant Science* 6, 284-286.
- Bertolotti A, Zhang YH, Hendershot LM, Harding HP, Ron D** (2000) Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature Cell Biology* 2, 326-332.
- Binsfeld, PC** (2000) Análise diagnóstica de um produto transgênico. *Biotecnologia* v 34.
- Bozhkov PV, Suarez MF, Filonova LH, Daniel G, Zamyatnin AAJr, Rodriguez-Nieto S, Zhivotovsky B, Smertenko A** (2005) Cysteine protease mcll-Pa executes programmed cell death during plant embryogenesis. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 40, 14463–14468.
- Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E** (2000) Responses to abiotic stresses, in: W. Gruissem, B. Buchanan, R. Jones (Eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, 2000, pp. 158–1249.
- Bray EA** (2004) Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 55, 2331-41.
- Buchanan-Wollaston V, Earl S, Harrison E, Mathas E, Navabpour S, Page T and Pink D** (2003) The molecular analysis of leaf senescence – a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal* 1, 3–22.
- Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, Breeze E, Lim PO, Nam HG, Lin JF, Wu SH, Swidzinski J, Ishizaki K, Leaver CJ** (2005) Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 42, 567–585.
- Cascardo JCM, Almeida RS, Buzeli RAA, Carolino SMB, Otoni WC, Fontes EPB** (2000) The phosphorylation state and expression of soybean BiP isoforms are differentially regulated following abiotic stresses, *The Journal of Biological Chemistry* 275, 14494-14500.

- Cascardo JCM, Buzeli RAA, Almeida RS, Otoni WC, Fontes EPB** (2001) Differential expression of the soybean BiP gene family. *Plant Science* (Limerick), Elsevier Science Ireland Ltda 160, 273-281.
- Chandler PM, Robertson M** (1994) Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45, 113-141.
- Che P, Gingerich DJ, Sonia L, Howell SH** (2002) Global and hormone-induced gene expression changes during shoot development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14, 2771–2785.
- Clark SE, Jacobsen SE, Levin JZ, Meyerowitz EM** (1996) The CLAVATA and SHOOT MERISTEMLESS loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis*. *Development* 122, 1567–1575.
- Collinge M and Boller T** (2001) Differential induction of two potato genes, Stprx2 and StNAC, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding. *Plant Molecular Biology* 46, 521-9.
- Costa, MDBL** (2007) Estresse osmótico e do retículo endoplasmático induzem morte celular programada de maneira dependente das proteínas NRPs. Viçosa: UFV. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- Creelman RA and Mullet JE** (1995) Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 92, 4114-4119.
- Danon A, Delorme V, Mailhac N, Gallois P** (2000) Plant programmed cell death: A common way to die. *Plant Physiology and Biochemistry* 38, 647-655.
- Delessert C, Wilson IW, Van der Straeten D, Dennis ES, Dolferus R** (2004) Spatial and temporal analysis of the local response to wounding in *Arabidopsis* leaves. *Plant Molecular Biology* 55, 165–181.
- Delessert C, Kazan K, Wilison IW, Van der Straeten D, Manners J, Dennis ES and Dolferus R** (2005) The transcription factor ATAF2 represses the expression of pathogenesis-related genes in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 43, 745-757.
- Duval M, Hsieh T, Kim S, Thomas T** (2002) Molecular characterization of AtNAM: a member of the *Arabidopsis* NAC domain superfamily. *Plant Molecular Biology* 50, 237-248.

- Ernst HA, Olsen AN, Skriver K, Larsen S, Lo Leggio L** (2004) Structure of the conserved domain of NAC, a member of the NAC family of transcription factors. *EMBO* 5, 297-303.
- Figueiredo JEF, Cascardo JCM, Carolino SMB, Alvim F, Fontes EPB** (1997) Water-Stress Regulation and Molecular Analysis of the Soybean BiP Gene Family. *Revista Brasileira Fisiologia Vegetal* 9, 103-110.
- Finer JJ, Nagasawa A** (1988) Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* Merrill.) *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 15, 125–136.
- Fontes EPB, Shank BB, Wrobel RL, Moose SP, Obrian G, Boston RS** (1991) Characterization of an immunoglobulin binding protein in the maize *floury-2* mutant. *The Plant Cell*. 3, 483-496.
- Fontes EPB, Eagle P, Sipes P, Hanley-Bowdoin** (1994) Interaction Between A Geminivirus Replication Protein And Origin DNA Is Essential For Replication. *Journal of Biological Chemistry* 269, 8459-8465.
- Fujita M, Fujita Y, Maruyama K, Seki M, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Tran LP, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozak K** (2004) A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *Plant Journal* 39, 863-76.
- Furutani M, Vernoux T, Traas J, Kato T, Tasaka M, Aida M** (2004) PIN-FORMED1 and PINOID regulate boundary formation and cotyledon development in *Arabidopsis* embryogenesis. *Development* 131, 5021–5030.
- Gechev TS, Gadjev IZ, Hille J** (2004) An extensive microarray analysis of AAL-toxin-induced cell death in *Arabidopsis thaliana* brings new insights into the complexity of programmed cell death in plants. *Cell Molecular Life Science* 61, 1185–1197.
- Grafi G** (2004) How cells dedifferentiate: a lesson from plants. *Developmental Biology* 268, 1-6.
- Greve K, La Cour T, Jensen MK, Poulsen FM, Skriver K** (2003) Interactions between plant RING-H2 and plant-specific NAC (NAM/ATAF1/2/CUC2) proteins: RING-H2 molecular specificity and cellular localization. *Biochemical Journal* 371, 97–108.
- Guo M, Rupe MA, Danilevskaya ON, Yang X, Hu Z** (2003) Genome-wide mRNA profiling reveals heterochronic allelic variation and a new imprinted gene in hybrid maize endosperm. *Plant Journal* 36, 30-44.

- Guo Y, Cai Z and Gan S** (2004) Transcriptome of *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant, Cell and Environment* 27, 521–549.
- Guo HS, Xie Q, Fei JF and Chua NH** (2005) MicroRNA Directs mRNA Cleavage of the Transcription Factor NAC1 to Downregulate Auxin Signals for *Arabidopsis* Lateral Root Development. *The Plant Cell* 17, 1376–1386.
- Guo Y and Gan S** (2006) AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *Plant Journal* 46, 601–12.
- Hammond C and Helenius A** (1995) Quality control in the secretory pathway. *Current Opinion in Cell Biology* 7, 523–529.
- Hauck P, Thilmony R and He SY** (2003) A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 100, 8577–8582.
- Heath, MC** (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44, 321–334.
- Hegedus D, Yu M, Baldwin D, Gruber M, Sharpe A, Parkin I, Whitwill S, Lydiat D** (2003) Molecular characterization of *Brassica napus* NAC domain transcriptional activators induced in response to biotic and abiotic stress. *Plant Molecular Biology* 53, 383–97.
- Hibara K, Takada S, Tasaka M** (2003) CUC1 gene activates the expression of SAM-related genes to induce adventitious shoot formation. *Plant Journal* 36, 687–696.
- Hoppe T, Rape M, Jentsch S** (2001) Membrane-bound transcription factors: regulated release by RIP or RUP. *Current Opinion in Cell Biology* 13, 344–348.
- Hsieh T, Lee J, Charng Y, Chan M** (2002) Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis* CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. *Plant Physiology* 130, 618–626.
- Hu H, Dai M, Yao J, Xiao B, Li X, Zhang Q, Xiong L** (2006) Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 103, 12987–12992.
- Irsigler AST, Costa MDL, Zhang P, Braga PA, Dewey R, Boston RS, Fontes EPB** (2007) Expression profiling on soybean leaves reveals integration of ER- and osmotic-stress pathways. *BMC Genomics* 8, 431.

- Jaglo-Ottosen K, Gilmour S, Zarka D, Schabenberger O, Thomashow M (1998)** *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* 280, 104-106.
- John I, Hackett R, Cooper W, Drake R, Farrell A, Grierson D (1997)** Cloning and characterization of tomato leaf senescence-related cDNAs. *Plant Molecular Biology* 33, 641-651.
- Kasschau KD, Xie Z, Allen E, Llave C, Chapman EJ, Krizan KA, Carrington JC (2003)** P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. *Developmental Cell* 4, 205–217.
- Kawasaki S, Borchert C, Deyholos M, Wang H, Brazille S, Kawai K, Galbraith D, Bohnert HJ (2001)** Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell* 13, 889–905.
- Kikuchi K, Ueguchi-Tanaka M, Yoshida KT, Nagato Y, Matsusoka M, Hirano HY (2000)** Molecular analysis of the NAC gene family in rice. *Molecular and General Genetics* 262, 1047-51.
- Kim YS, Kim SG, Park JE, Park HY, Lim MH, Chua NH, Park CM (2006)** A Membrane-Bound NAC Transcription Factor Regulates Cell Division in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 18, 3132–3144.
- Kim SY, Kim SG, Kim YS, Seo PJ, Bae M, Yoon HK, Park CM (2007a)** Exploring membrane-associated NAC transcription factors in *Arabidopsis*: implications for membrane biology in genome regulation. *Nucleic Acids Research* 35, 203–213.
- Kim SG, Kim SY, Park CM (2007b)** A membrane-associated NAC transcription factor regulates salt-responsive Flowering via FLOWERING LOCUS T in *Arabidopsis*. *Planta* 226, 647–654.
- Kishor PBK, Hong Z, Miao GH, Hu CAA, Verma DPS (1995)** Overexpression of D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology* 108, 1387–1394.
- Ko JH, Yang SH, Park AH, Lerouxel O, Han KH (2007)** ANAC012, a member of the plant-specific NAC transcription factor family, negatively regulates xylary fiber development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 50, 1035–1048.
- Kong Z, Li M, Yang W, Xu W, Xue Y (2006)** A novel nuclear-localized CCCH-type zinc finger protein, OsDOS, is involved in delaying leaf senescence in rice (*Oryza sativa* L.) *Plant Physiology* 141, 1376–88.

- Kotzer AM, Brandizzi F, Neumann U, Paris N, Moore I, Hawes C** (2004) AtRabF2b (Ara7) acts on the vacuolar trafficking pathway in tobacco leaf epidermal cells. *Journal of Cell Science* 117, 6377–6389.
- Kumar S, Tamura K, Nei M** (1994) MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. *Computer Applications in Biosciences*. 10, 189-91.
- Lanna, AC** (2002) Efeito da temperatura sobre a regulação da síntese de ácidos graxos polinsaturados em soja. Viçosa: UFV, 84p. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- Laufs P, Peaucelle A, Morin H, Traas J** (2004) MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in *Arabidopsis* meristems. *Development* 131, 4311–4322.
- Lehrman MA** (1991) Biosynthesis of N-acetylglucosamine-P-P-dolicol, the committed step of asparagine-linked oligosaccharide assembly. *Glycobiology* 1, 553-562.
- Lim PO, Kim HJ, Nam HG** (2007) Leaf Senescence. *Annual Review of Plant Biology* 58,115–36.
- Lin JF, Wu SH** (2004) Molecular events in senescing *Arabidopsis* leaves. *Plant Journal* 39, 612–28.
- Lin R, Zhao W, Meng X, Wang M, Peng Youliang** (2007) Rice gene OsNAC19 encodes a novel NAC-domain transcription factor and responds to infection by *Magnaporthe grisea*. *Plant Science* 172, 120-130.
- Liu L, White MJ, MacRae TH** (1999) Transcription factors and their genes in higher plants. Functional domains, evolution and regulation. *European Journal of Biochemistry* 262, 247–257.
- Long JA, Moan EI, Medford JI, Barton MK** (1996) A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the STM gene of *Arabidopsis*. *Nature* 379, 66–69.
- Lu PL, Chen NZ, An R, Su Z, Qi BS, Ren F, Chen J, Wang XC** (2006) A novel drought-inducible gene, *ATAF1*, encodes a NAC family protein that negatively regulates the expression of stress-responsive genes in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 63, 289-305.
- Mahajan S and Tuteja N** (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444, 139-158.

- Mallory AC, Dugas DV, Bartel DP, Bartel B** (2004) MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. *Current Biology* 14, 1035–1046.
- Meng Q, Zhang C, Gai J, Yu D** (2007) Molecular cloning, sequence characterization and tissue-specific expression of six NAC-like genes in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) *Journal of Plant Physiology* 164, 1002–12.
- Nakashima K, Tran LP, Nguyen DV, Fujita M, Maruyama K, Todaka D, Ito Y, Hayashi N, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2007) Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *The Plant Journal* 51, 617–630.
- Neuteboom LW, Veth-Tello LM, Clijdesdale OR, Hooykaas PJ, van der Zaal BJ** (1999) A novel subtilisin-like protease gene from *Arabidopsis thaliana* is expressed at sites of lateral root emergence. *DNA Research* 6, 13–19.
- Nishida I and Murata N** (1996) Chilling sensitivity in plants and *Cyanobacteria*: the crucial contribution of membrane lipid, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47, 541–568.
- Nogueira FTS, Schlögl PS, Camargo SR, Fernandez JH, De Rosa Jr VE, Pompermayer P, Arruda P** (2005) SsNAC23, a member of the NAC domain protein family, is associated with cold, herbivory and water stress in sugarcane. *Plant Science* 169, 93–106.
- Noodén LD** (1988) The phenomena of senescence and aging. In *Senescence and Aging in Plants*, ed. LD Noodén, AC Leopold, pp. 1–50. San Diego: Academic.
- Oh SK, Lee S, Yu SH, Choi D** (2005) Expression of a novel NAC domain-containing transcription factor (CaNAC1) is preferentially associated with incompatible interactions between chili pepper and pathogens. *Planta* 222, 876–887.
- Ohnishi T, Sugahara S, Yamada T, Kikuchi K, Yoshiba Y, Hirano HY, Tsutsumi N** (2005) OsNAC6, a member of the NAC gene family, is induced by various stresses in rice. *Genes and Genetic Systems*. 80, 135–9.
- Okamura K, Kimata Y, Higashio H, Tsuru A, Kohno K** (2000) Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 279, 445–450.

- Olsen AN, Ernst HA, Lo Leggio L, Johansson E, Larsen S, Skriver K** (2004) Preliminary crystallographic analysis of the NAC domain of ANAC, a member of the plant-specific NAC transcription factor family. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*. 60, 112–115.
- Olsen AN, Ernst HA, Lo Leggio L, Skriver K** (2005a) NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends In Plant Science* 10, 79-87.
- Olsen AN, Ernst HA, Lo Leggio L and Skriver K** (2005b) DNA-binding specificity and molecular functions of NAC transcription factors. *Plant Science* 169, 785-797.
- Ooka H, Satoh K, Doi K, Nagata T, Otomo Y, Murakami K, Matsubara K, Osato N, Kawai J, Carninci P, Hayashizaki Y, Suzuki K, Kojima K, Takahara Y, Yamamoto K, Kikuchi S** (2003) Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA Research* 10, 239–247.
- Pennell RI and Lamb C** (1997) Programmed cell death in plants. *Plant Cell* 9, 1157-1168.
- Rabbani MA, Maruyama K, Abe H, Khan MA, Katsura K, Ito Y, Yoshiwara K, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2003) Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiology* 133, 1755–67.
- Rao RV, Castro-Obregon S, Frankowski H, Schuler M, Stoka V, Rio G, Bredesen DE and Ellerby HM** (2002) Coupling Endoplasmatic reticulum stress to the cell death program. *Journal of Biology Chemistry* 244, 21826-21842.
- Ren T, Qu F, Morris TJ** (2000) HRT gene function requires interaction between a NAC protein and viral capsid protein to confer resistance to turnip crinkle virus. *Plant Cell* 12, 1917-26.
- Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha RR, Creelman R, Pilgrim M, Broun P, Zhang JZ, Ghandehari D, Sherman BK, Yu G** (2000). *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 15, 2105-10.
- Robertson, M** (2004) Two transcription factors are negative regulators of gibberellin response in the HvSPY-signaling pathway in barley aleurone. *Plant Physiology* 136, 1-15.

- Rodrigues SM, Andrade MO, Gomes APS, DaMatta FM, Baracat-Pereira MC, Fontes EPB** (2006) Arabidopsis and tobacco plants ectopically expressing the soybean antiquitin-like ALDH7 gene display enhanced tolerance to drought, salinity, and oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 57, 1909-1918.
- Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cazares B, Lucas WJ** (1999) Phloem long-distance transport of *CmNACP* mRNA: Implications for supracellular regulation in plants. *Development* 126, 4405-4419.
- Sablowski RW and Meyerowitz EM** (1998) A homolog of NO APICAL MERISTEM is an immediate target of the floral homeotic genes APETALA3/PISTILLATA. *Cell* 92, 93-103.
- Samach A, Onouchi H, Gold SE, Ditta GS, Schwarz-Sommer Z, Yanofsky MF, Coupland G** (2000) Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science* 288, 1613–1616.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor.
- Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K** (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant Journal* 31, 279–92.
- Selth LA, Dogra SC, Rasheed MS, Healy H, Randles JW, Rezaiana MA** (2005) A NAC Domain Protein Interacts with *Tomato leaf curl virus* Replication Accessory Protein and Enhances Viral Replication. *The Plant Cell* 17, 311–325.
- Simeonova E, Sikira S, Charzynska M, Mostowska A** (2000) Aspects of programmed cell death during leaf senescence of mono- and dicotyledonous plants. *Protoplasma* 214, 93–101.
- Singh S, Letham DS and Palni LMS** (1992) Cytokinin biochemistry in relation to leaf senescence. VII. Endogenous cytokinin levels and exogenous applications of cytokinins in relation to sequential leaf senescence of tobacco. *Physiology Plantarum* 86, 388-397.
- Souer E, van Houwelingen A, Kloos D, Mol J, Koes R** (1996) The no apical meristem gene of *Petunia* is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell* 85,159-170.

- Takada S, Hibara K, Ishida T, Tasaka M** (2001) The CUP-SHAPED COTYLEDON1 gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation. *Development* 128, 1127–1135.
- Tran LS, Nakashima K, Sakuma Y, Simpson SD, Fujita Y, Maruyama K, Fujita M, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2004) Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell* 16, 2481-98.
- Tran LS, Nakashima K, Sakuma Y, Osakabe Y, Qin F, Simpson SD, Maruyama K, Fujita Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2007) Co-expression of the stress-inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the ERD1 gene in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 49, 46–63.
- Uauy C, Distelfeld A, Fahima T, Blechl A, Dubcovsky J** (2006) A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. *Science* 314, 1298-1301.
- Ueda T, Seo S, Ohashi Y, Hashimoto J** (2000) Circadian and senescence-enhanced expression of a tobacco cysteine protease gene. *Plant Molecular Biology* 44, 649-657.
- Urade R** (2007) Cellular response to unfolded proteins in the endoplasmic reticulum of plants. *The FEBS Journal* 274, 1152-71.
- Valliyodan B and Nguyen HT** (2006) Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 9, 189–195.
- Vandenabeele S, Vanderauwera S, Vuylsteke M, Rombauts S, Langebartels C, Seidlitz HK, Zabeau M, Van Montagu M, Inzé D, van Breusegem F** (2004) Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 39, 45-58.
- Vogel JT, Zarka DG, van Buskirk HA, Fowler SG, Thomashow MF** (2005) Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptoma of *Arabidopsis*. *Plant Journal* 41, 195–211.
- Vroemen CW, Mordhorst AP, Albrecht C, Kwaaitaal MA, de Vries SC** (2003) The Cup-Shaped Cotyledon3 gene is required for boundary and shoot meristem formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15, 1563-1577.

- Weir I, Lu J, Cook H, Causier B, Schwarz-Sommer Z, Davies B** (2004) CUPULIFORMIS establishes lateral organ boundaries in *Antirrhinum*. *Development* 131, 915–922.
- Wertz IE and Hanley MR** (1996) Diverse molecular provocation of programmed cell death. *Trends in Biochemical Sciences* 21, 359-364.
- Woolhouse HW** (1984) The biochemistry and regulation of senescence in chloroplasts. *Canadian Journal of Botany* 62, 2934–42.
- Xie Q, Sanz-Burgos AP, Guo H, Garcia JA, Gutierrez C** (1999) GRAB proteins, novel members of the NAC domain family, isolated by their interaction with a geminivirus protein. *Plant Molecular Biology* 39, 647-56.
- Xie Q, Frugis G, Colgan D, Chua NH** (2000) *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal posterior of TIR1 to promote lateral root development. *Genes and Development* 14, 3024-3036.
- Xie Q, Guo HS, Dallman G, Fang S, Weissman AM, Chua NH** (2002) SINAT5 promotes ubiquitin-related degradation of NAC1 to attenuate auxin signals. *Nature* 419, 167–170.
- Yen CH and Yang CH** (1998) Evidence for programmed cell death during leaf senescence in plants. *Plant Cell Physiology* 39, 922-27.
- Yoo SY, Kim Y, Kim SY, Lee JS, Ahn JH** (2007) Control of Flowering Time and Cold Response by a NAC-Domain Protein in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* 2, e642.
- Zenser N, Ellsmore A, Leasure C, Callis J** (2001) Auxin modulates the degradation rate of Aux/IAA proteins. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 98, 11795-11800.
- Zhang K, Kaufman RJ** (2004) Signaling the Unfolded Protein Response from the Endoplasmatic Reticulum. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 25935-25938.
- Zhong R, Demura T, Ye ZH** (2006) SND1, a NAC Domain Transcription Factor, Is a Key Regulator of Secondary Wall Synthesis in Fibers of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 18, 3158–3170.
- Zhong R, Richardson EA, Ye ZH** (2007) Two NAC domain transcription factors, SND1 and NST1, function redundantly in regulation of secondary wall synthesis in Fibers of *Arabidopsis*. *Planta* 225, 1603–1611.

Zhu J (2001) Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* 6, 66-71.

Zuppini A, Navazio L and Mariani P (2004) Endoplasmatic Reticulum stress-induced programmed cell death in soybean cells. *Journal of Cell Science* 117, 2591-2598.