

JANAÍNA ROBERTA ALVES

**REGULAÇÃO DO PROMOTOR GmNAC081 DURANTE O
DESENVOLVIMENTO DE *Nicotiana tabacum* E EM RESPOSTA A
ESTRESSES ABIÓTICOS**

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
2014

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

T

A474
2014

Alves, Janaina Roberta, 1981-

Regulação do promotor GmNAC081 durante o desenvolvimento de *Nicotiana tabacum* e em resposta a estresses abióticos / Janaina Roberta Alves. – Viçosa, MG, 2014.
x, 45f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inchi anexo.

Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.33-37.

1. Células e tecidos vegetais. 2. Soja. 3. *Nicotiana tabacum*.
4. Fatores de transcrição. 5. Estresses abióticos. 6. Senescência.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 581.17

JANAÍNA ROBERTA ALVES

**REGULAÇÃO DO PROMOTOR DE *GmNAC081* DURANTE O
DESENVOLVIMENTO DE *Nicotiana tabacum* E EM RESPOSTA A ESTRESSES
ABIÓTICOS**

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: 22 de Setembro de 2014.



Edgard Augusto de Toledo Picoli



Giselle Camargo Mendes



Elizabeth Pacheco Batista Fontes

(Orientador)

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo
e nunca se arrepende”

Leonardo da Vinci

Aos meus pais, João e Marlene,
ao meu irmão, Caíque,
a irmã que a vida me deu, Denise,
ao meu grande amor, Daniel,
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço de forma muito especial a Deus pela presença em minha vida! Por ter me guiado, me protegido e concedido tudo e todos em meu caminho.

Agradeço a meus pais João e Marlene e ao meu “irmãozinho” Caíque, minhas razões para prosseguir sempre! Obrigada Família! Vovó Judith, Vovô Ormino, Tia Neusa, Nitinha, Joa, Tia Cré, à minha querida “sogramamãe” Cidinha, ao meu cunhado preferido Wilson Neto e a Gleyci con-cunhada preferida também! Obrigada por estarem perto mesmo de longe!

Ao meu grande amor e companheiro Daniel, minha alegria! Obrigada, pelo amor, pela força, boas energias, puxões de orelha, e pela enorme paciência!!!

A todos os amigos de jornada! Lidioca, Mandinha, Quequel, Dora, Paty, Lucas, Alinão, Kbeça, Ju Padula, De, Su e Ju (bizonhento)! A todos! Em especial a Denaise pela torcida, pelo carinho e por estar sempre ao meu lado em todos os momentos!

Ao Glauco Vieira Miranda, pelo incentivo! Muito Obrigada!

À minha orientadora professora Elizabeth Fontes pela oportunidade, confiança, aprendizado e pelos verdadeiros conhecimentos transmitidos.

Ao Professor Edgard Augusto de Toledo Picoli pela co-orientação, apoio e toda atenção a este trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas pelos momentos de aprendizado que sempre encontrei! Priscilaide! minha admiração por sua dedicação e profissionalismo! Por ser um verdadeiro anjo em minha vida! Mai companheira!! Obrigada pela força!! E pelos papos nos melhores e nos mais difíceis momentos!!! Gigi espírito iluminado! pelo alto astral e pela incrível presença profissional e amiga! Bibi pela generosidade e doçura! Fábria grande coração! Anésia pelo apoio e pela garra que nos inspira! Joãozinho pelo amparo, carinho e pelos “causos” da vida! Pedro Augusto pelo sistema bruto e rústico = pode contar comigo! Nívea alma biruta gêmea! Lucas padrinho nota 10! Welisson pela sempre disposição

em ajudar e acrescentar! Iara, Cris e Humberto estamos com saudade! Virgílio artista! Pelas pranchas da histoquímica e pelo *rock and roll*!! Rafinha Neves, ou melhor, Rafinha Salvador Della Porta! Michi, Ju e Humberto Ramos pela atenção sempre! Moniquinha sempre carinhosa e eficiente! Otávio pelas inúmeras gentilezas, pelas análises de bioinformática, estatística, e de astronomia! Cleysinho pelas boas idéias e contribuição valiosa! Naiara pela afinidade!! Bruninho pelo carinho!!! Hanna e Flaviane pelo agradável convívio! À Marlene, Glaucia, Wellington e ao Adriano, pelo auxílio precioso! Laura e Marco sejam bem vindos. Ao ilustre Rosado (2012) pelos objetos de estudo desta investigação!! Aos funcionários do BIOAGRO em especial ao Sr. Paulo da portaria pelo bom dia nosso de cada dia!! Obrigada a todos! Meu carinho e respeito por vcs!

Ao Dudu da Secretaria de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola! O melhor secretário!!

A todos do Laboratório de Anatomia Vegetal e Morfogênese pela acolhida para a realização dos cortes histológicos! Em especial à Ana Cláudia pela disposição, boa vontade e auxílio, o que em muito contribuiu para a realização deste trabalho! Aos vizinhos do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais pela ajuda sempre generosa!! Aos colegas do Laboratório de Infectologia Molecular Animal (LIMA) pelas portas abertas (no sentido amplo e generoso da palavra!) para a realização das leituras de fluorescência, essenciais para este trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa pela excelente qualidade e estrutura.

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

Ao Chicão (meu Tititio), à Marieta (minha mocinha) e à Lua (minha pequeninha zanazana) por fazerem meu coração mais feliz!

A todos digo com satisfação: **MUITO OBRIGADA!**

ÍNDICE

| | |
|------------------------------------|-----|
| RESUMO | vii |
| ABSTRACT | ix |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 4 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 7 |
| 4. CONCLUSÕES | 32 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 33 |

RESUMO

ALVES, Janaína Roberta, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2014. **Regulação do promotor de *GmNAC081* durante o desenvolvimento de *Nicotiana tabacum* e em resposta a estresses abióticos.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

Os membros da família de fatores de transcrição NAC (acrônimo de NAM, ATAF e CUC) são específicos de plantas e são conhecidos por atuarem tanto no desenvolvimento quanto na regulação da resposta a estresse. Dentre os genes NAC envolvidos em respostas contra estresses bióticos e abióticos já identificados em soja (Pinheiro *et al.*, 2009, Le *et al.*, 2011), o gene *GmNAC081* é induzido pela expressão de NRPs (Faria *et al.*, 2011) e por diferentes condições de estresses fisiológicos (Pinheiro *et al.*, 2009) portanto, é possível que elementos em *cis* presentes no seu promotor promovam a integração de diferentes sinais que resultem em morte celular mediada por *GmNAC081*. A presente investigação teve como objetivos principais confirmar a presença de domínios discretos no promotor do gene *GmNAC081* responsivos a estresses osmótico, induzido por PEG, e do retículo endoplasmático, induzido por tunicamicina e avaliar a expressão basal e tecido-específica do promotor em condições de cultivo *in vitro* e em casa de vegetação. Além disso, foi avaliado a atividade do promotor *GmNAC081* durante o desenvolvimento. Para isso, foram utilizadas plantas transgênicas contendo o promotor *GmNAC081* na extensão de 1000 pb, 750 pb e 500 bp fusionadas ao gene repórter GUS. Análises fluorimétricas quantitativas de GUS revelaram a presença de elementos em *cis* responsivos a PEG na região contida pelas posições -1000 a -750. Pelo menos dois elementos responsivos a tunicamicina devem estar contidos nas regiões -1000 a -750 e -750 a -500. Os resultados da presente investigação revelaram que a atividade do promotor de 1000pb de *GmNAC081* está relacionada às condições de cultivo de plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum*, sendo fortemente induzido durante a senescência. Estes resultados foram confirmados por meio de análises histoquímicas. De fato, a região 5' de -1000pb que flanqueia o gene *GmNAC081* é induzível por estresses osmótico e do retículo endoplasmático em diferentes órgãos e tecidos (Rosado, 2012). As sequências de 1000pb do promotor de *GmNAC081* foram

capazes de direcionar a expressão de GUS no tecido vascular em plantas cultivadas *in vitro*. Além disso, as análises histoquímicas de atividade de GUS confirmaram que o promotor de *GmNAC081* é fortemente induzido em tecidos em estádios avançados de desenvolvimento. Coletivamente, estes resultados demonstram que a indução do gene *GmNAC081* por estresses e durante a senescência ocorre no nível transcricional por meio de elementos cis-regulatórios presentes em regiões discretas do promotor. Além disso, os resultados de atividade do promotor *GmNAC081* substanciam o argumento de que *GmNAC081* esteja envolvido em resposta a estresse e no processo de senescência natural.

ABSTRACT

ALVES, Janaína Roberta, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September , 2014. **GmNAC081 promoter regulation in response to abiotic stresses and during development of *Nicotiana tabacum*.** Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

The members of the NAC (NAM, ATAF and CUC acronyms) family are plant-specific transcriptional factors, which are involved in development and stress responses. Among the abiotic and biotic stress response NAC genes already identified in soybean, *GmNAC081* is induced by NRP expression and different conditions of physiological stresses; hence it is possible that cis-regulatory elements on its promoter cause the integration of different stimuli that result in *GmNAC081* mediated cell death. The present investigation aimed at confirming the presence of discrete domains on the *GmNAC081* promoter, which are responsive to osmotic stress, induced by PEG, and endoplasmic reticulum stress, induced by tunicamycin as well as at evaluating the basal and tissue-specific expression of the promoter under *in vitro* and greenhouse growth conditions. In addition, the *GmNAC081* promoter activity was evaluated during development under greenhouse conditions. For this, we used transgenic plants harboring different extensions (up to positions -1000, -750 and -500) of the *GmNAC081* promoter fused to the GUS reporter gene. Quantitative fluorometric analyses of GUS revealed the presence of cis-elements responsive to PEG in the region delimited by the positions -1000 to -750. At least two responsive cis-elements to tunicamycin may be present in the regions -1000 to -750 and -750 to -500. The results of the present investigation also revealed that the *GmNAC081* promoter (1000bp) activity is related to the cultivation conditions of *Nicotiana tabacum* transgenic plants and it is strongly induced during natural senescence. These results were further confirmed through histochemical analyses. In fact, the 1000-bp 5' flanking sequences of *GmNAC081* is induced by osmotic stress and reticulum endoplasmic stress in different organs and tissues. The 1000-bp sequences of the *GmNAC081* promoter were capable of directing GUS expression in the vascular tissue of *in vitro* cultivated plants. Furthermore, the histochemical analyses of GUS activity confirmed a strong induction of the *GmNAC081* promoter in tissues under advanced stages of development. Taken together, these results demonstrate that the induction of *GmNAC081* expression by stresses and during senescence

occurs at the transcriptional level through positive cis-regulatory elements presents in discrete regions of the promoter. In addition, the pattern of the GmNAC081 promoter activity substantiates the argument that *GmNAC081* is involved in the process of natural senescence.

1. INTRODUÇÃO

As plantas são organismos altamente susceptíveis às variações e adversidades ambientais. Condições abióticas e bióticas de estresse geram restrições na produtividade de culturas agronomicamente relevantes como a soja, resultando em perdas econômicas significativas para o produtor. Entretanto, diante de sua natureza sésil, as plantas desenvolveram um conjunto de respostas adaptativas aos mais diversos tipos de estresses impostos por seu ambiente (Tran *et al.*, 2010).

A resposta imune em plantas ocorre por meio de cascatas de sinalização que são desencadeadas desde a percepção inicial do estresse até a expressão de genes específicos responsivos a esta condição (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Frente a condições ambientais restritivas a maquinaria celular vegetal passa por uma reprogramação da expressão gênica governada por fatores de transcrição (Chen *et al.*, 2013). Deste modo, os fatores de transcrição (Transcriptions Factors – TFs) são conhecidos como reguladores essenciais da expressão gênica e dos mecanismos de defesa em plantas. Em geral, os TFs medeiam respostas celulares através do reconhecimento de sequências *cis*-regulatórias específicas presentes nos promotores de genes alvo (Franco-Zorrilla *et al.*, 2014).

Os membros da família de fatores de transcrição NAC (acrônimo de NAM, ATAF e CUC) são específicos de plantas e são conhecidos por atuarem na regulação da resposta a estresse (Pinheiro *et al.*, 2009; Faria *et al.*, 2011; Mendes *et al.*, 2013, Wang *et al.* 2013). Proteínas NAC são multi-funcionais e desempenham importantes funções no desenvolvimento, senescência e no controle da resposta a estresse em plantas (Nakashima *et al.*, 2014). Estudos recentes de redes de interação proteína-proteína em respostas a estresse e senescência também tem revelado novos aspectos para o papel biológico e os mecanismos moleculares dos transfatores NAC. Tais estudos evidenciam a auto-regulação destes transfatores tanto no nível de RNA, como por meio de interações proteína-proteína e modificações pós-traducionais. A compreensão detalhada dessas redes moleculares é um pré-requisito para a engenharia de fatores de transcrição NAC, os quais potencialmente representam um próspero futuro para a agricultura (Jensen & Skriver, 2014).

Dentre os genes NAC envolvidos em respostas contras estresses bióticos e abióticos já identificados em soja (Pinheiro *et al.*, 2009, Le *et al.*, 2011) destaca-se o gene *GmNAC081* (anteriormente designado *GmNAC6*), recentemente caracterizado como componente de uma via de sinalização adaptativa mediada por NRPs (“N-rich proteins”) que transduz um sinal de morte celular numa resposta que integra sinais de estresses osmótico e do retículo endoplasmático (RE) (Faria *et al.*, 2011). A literatura relata que fatores de transcrição podem atuar de modo sinérgico em vias de sinalizações aparentemente diferentes, isto de acordo com seus respectivos perfis de expressão em condições de estresse (Nuruzzaman *et al.*, 2013). Recentemente, Mendes *et al.* (2013) isolaram uma nova proteína de soja que contém domínio NAC, *GmNAC30*, e exibe uma interação específica com a proteína *GmNAC081* numa via que integra sinais de estresse osmótico e do retículo endoplasmático e induz morte celular mediada pelas proteínas NRPs.

Sabe-se que o gene *GmNAC081* é induzido pela expressão de NRPs (Faria *et al.*, 2011) e por diferentes condições de estresses fisiológicos (Pinheiro *et al.*, 2009), portanto, é possível que elementos em *cis* presentes no seu promotor promovam a integração de diferentes sinais que resultem em morte celular mediada por *NAC081*. Diversos elementos regulatórios com o potencial de influenciar a indução do promotor de *GmNAC081* em condições de estresse foram recentemente apontados por nosso grupo de pesquisa.

As sequências que flanqueiam o gene *GmNAC081* até a posição -1000 possuem elementos funcionais de um promotor eucariótico induzido por estresses. Além disso, possuem sítios conservados de promotores basais (TATA box e CCAAT box), corretamente posicionados em relação ao putativo sítio de início de transcrição (Pinheiro *et al.*, 2009; Faria *et al.*, 2011). Estas sequências foram capazes de direcionar a expressão do gene repórter GUS em resposta a diversos estímulos, como tratamento com indutores de estresse no retículo endoplasmático (TUN) e osmótico (PEG), indutores de morte celular, e hormônios como AS, AJ e ABA. Possivelmente, a indução do promotor do gene *GmNAC081* a diferentes estresses ocorre no nível transcricional por meio de *cis*-elementos regulatórios presentes em seu promotor (Rosado, 2012). Entretanto, os módulos de regulação do promotor de *GmNAC081* são ainda desconhecidos.

O conhecimento de mecanismos moleculares subjacentes a tolerância a estresses é de extrema relevância para o melhoramento genético de plantas (Cenci *et al.*, 2014). Conseqüentemente, identificar elementos que regulem a atividade do promotor de *GmNAC81* em condições de estresse, bem como, avaliar a indução do promotor de *GmNAC81* em plantas sob diferentes condições de cultivo e estádios de desenvolvimento constituem objetivos primordiais deste trabalho. Além disso, propõe-se analisar a atividade do promotor de *GmNAC081* durante a senescência, uma vez que já foi demonstrado que *GmNAC081* é um indutor de morte celular programada, sendo altamente expresso em folhas de soja durante a senescência (Faria *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2014).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

As linhagens transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) pNAC081-1000::GUS, pNAC081-750::GUS and pNAC081-500::GUS, utilizadas neste trabalho, já foram previamente descritas (Rosado, 2012). Elas contém extensões do promotor do gene *GmNAC081* de 1000, 750 e 500 bp, respectivamente, fusionadas ao gene repórter GUS. Assim também, a linhagem pCambia::GUS, contendo o vetor binário de expressão em plantas pCAMBIA1381z, já foi descrita (Rosado, 2012). As linhagens transgênicas e não transformada (WT) foram cultivadas *in vitro* e mantidas em câmara de crescimento a 22°C, com fotoperíodo de 16 horas. Sementes de transformantes pNAC081-1000::GUS, pNAC081-750::GUS, pNAC081-500::GUS, pCambia::GUS e WT, gerações T1 e T2, foram obtidas em casa de vegetação.

2.2 Localização histoquímica *in situ* de GUS em órgãos de tabaco

Plantas transformadas com as construções pNAC081-(500, 750 e 1000)::GUS, pCambia::GUS e *wild types* (WT) foram usadas para análise histoquímica conforme descrito por McCabe *et al.* (1988), a fim de avaliar a expressão tecido-específica do promotor de *GmNAC081* mediante a estímulos de estresse osmótico e no retículo endoplasmático. Linhagens transgênicas pNAC081-1000::GUS também foram avaliadas sob diferentes condições de cultivo (*in vitro* e em casa de vegetação). Para as análises histoquímicas foram utilizados três transformantes independentes, sendo que plantas transformadas com a construção pCambia::GUS e plantas não transformadas (*wild types*) foram utilizadas como controle negativo. Plantas contendo a construção pNAC081-1000::GUS foram utilizadas como controle positivo para as análises envolvendo as demais regiões do promotor.

Além de discos foliares e de raízes inteiras, foram avaliados cortes histológicos de folha apical (secção transversal), meristema apical (secção longitudinal) e de caule (secção transversal). Para a realização dos cortes histológicos utilizou-se um micrótomo de mesa LPC (Rolemberg & Bhering Comércio e Importação Ltda). Os cortes foram imediatamente embebidos em tampão de ensaio da enzima GUS [NaH₂PO₄.H₂O 100 mM (pH 7,0), K₄Fe(CN)₆.3H₂O 0,5 mM,

Na₂EDTA.2H₂O 10 mM, Triton X-100 0,1% (v/v)], contendo 1 mM de substrato 5-bromo-4-chloro-3-indolil-β-D glucuronideo (X-Gluc) e incubados a 37°C, por 4 horas, sob a proteção da luz. Os pigmentos foliares foram removidos dos tecidos corados por meio de várias lavagens com solução de metanol:acetona (3:1). Os tecidos clarificados foram armazenados em solução de glicerol 50% (v/v) e posteriormente fixados em lâminas histológicas para foto documentação. As imagens digitais foram obtidas em um microscópio Olympus AX-70, acoplado a câmera digital de mesma marca.

2.3 Determinação da atividade de GUS

O ensaio fluorimétrico para avaliar a atividade da β-glucuronidase foi conduzido segundo o protocolo de Jefferson *et al.*, (1987), utilizando-se methylumbelliferone (MU) como padrão. Amostras de três transformantes independentes e dos respectivos controles, foram trituradas e homogeneizadas em 500μl de tampão GUS [NaH₂PO₄ pH 7.0, 100mM, EDTA 10mM, sarcosil 0,1% (p/v), Triton X-100 0,1% (v/v)]. Para a reação de atividade da enzima, 50μl do extrato foram adicionados a 50μl do tampão GUS contendo como substrato 2mM de 4-methylumbelliferil-β-D-glucuronideo (MUG). A mistura então foi incubada a 37°C por 30 minutos e a atividade de GUS mensurada utilizando o Lector Multi-Modal de Microplacas Synergy HT (BioTek). A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

2.4 Indução de estresses em plântulas transgênicas

Visando determinar a possível ativação de regiões truncadas do promotor de *GmNAC081* pelos elicitores de estresse osmótico – Polietilenoglicol (PEG) e do retículo endoplasmático – Tunicamicina (TUN) foram conduzidos experimentos com 3 transformantes independentes. Plântulas inteiras em estágio vegetativo V3 (30-40 dias após o procedimento de isolamento de gemas de plantas adultas mantidas *in vitro*; e após a emergência da primeira gema em plantas germinadas a partir de sementes em casa de vegetação) contendo diferentes extensões do promotor de *GmNAC081* (posições de -1000, -750, -500 em relação ao códon ATG de iniciação de tradução) fusionado ao gene repórter GUS foram expostas a condições de estresses por PEG e TUN. Para isso, as plântulas foram antes aclimatadas por 120 hrs e após incubadas em meio MS básico líquido com os seguintes tratamentos:

Tunicamicina (10 µg/mL) , que induz estresse no retículo endoplasmático (Cascardo *et al.*, 2000; 2001) por 8hrs e com polietilenoglicol (PEG-8000 10 %) composto que simula os efeitos de estresse osmótico (Hasegawa *et al.*, 1984; Cascardo *et al.*, 2000) por 36 hrs. Após a incubação sob os estresses citados, diferentes tecidos foram coletados e submetidos a ensaio histoquímico e de atividade de GUS (análises fluorimétricas).

2.5 Análises estatísticas e de bioinformática

As análises estatísticas foram realizadas no programa R (<http://cran.r-project.org>) usando o teste F para verificar a homogeneidade da variância e o teste t para verificar a diferença das médias. Os respectivos testes foram aplicados na comparação entre plantas sob condição de estresse e plantas na ausência de estímulos de estresse (NS). Também, análises estatísticas foram realizadas no programa R (<http://cran.r-project.org>) usando o método de análise de variância (ANOVA) no desenho fatorial e no delineamento inteiramente casualizado (DIC). Para comparar as médias utilizou-se o teste de comparação múltipla de médias TukeyHSD (Tukey Honest Significant Differences).

O promotor 1 Kb de *GmNAC081*, *upstream* ao ATG , foi submetido aos programas Place (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) e PlantPan (http://plantpan.mbc.nctu.edu.tw/seq_analysis.php). Através do enriquecimento pela distribuição binomial com p-value < 0,01 foram encontrados 25 prováveis motivos de ligação ao DNA associados a fatores transcricionais (tabela S2).

2.6 Técnicas de biologia molecular

Todas as técnicas de Biologia Molecular que não estão descritas detalhadamente, como preparação de géis de agarose, extração de DNA genômico, ampliações por reação em cadeia de polimerase (*Polymerase Reaction Chain - PCR*), preparação de soluções estoque foram conduzidas exatamente segundo protocolos contidos em Sambrook *et al.*, (1989).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sequências entre -1000 a -750 são necessárias para a indução do promotor de *GmNAC081* em condições de estresse osmótico e entre -750 a -500 em condições de estresse no retículo endoplasmático

Como componente da via de sinalização de morte celular mediada pelas proteínas NRPs e induzida por estresses, *GmNAC081* é induzido por estresses osmótico e do RE (Faria *et al.*, 2011). Tem sido demonstrado que a indução da expressão de *GmNAC081* (*GmNAC6*) por estes estresses ocorre no nível transcricional (Rosado, 2012). Com a finalidade de delimitar domínios cis-regulatórios no promotor de *GmNAC081* envolvidos na indução do promotor em resposta a estresses osmótico e no retículo endoplasmático, foram feitas uma série de deleções progressivas do promotor de *GmNAC081*, a partir de sua extremidade 5' (Rosado, 2012). Foi previamente demonstrado que a deleção da região delimitada pelas posições -1000 a -750 não causou perda da inducibilidade do promotor em resposta à tunicamicina o que, somente foi observado ao se deletar a região de -750 a -500 (Rosado, 2012). Estes resultados indicaram que a região delimitada pelas posições -750pb a -500pb, em relação ao ATG, pode conter algum cis-elemento de resposta a tunicamicina. Com relação à inducibilidade à PEG, as deleções sucessivas não causaram perda de função do promotor até a posição -250 bp, quando a atividade em resposta à PEG se tornou significativamente similar ao controle, indicando uma possível região regulatória entre as posições -500 a -250 pb (Rosado, 2012).

Para confirmar os domínios cis-regulatórios funcionais delimitados no promotor *GmNAC081* e identificar os elementos cis-regulatórios correspondentes, inicialmente, o efeito das deleções progressivas do promotor de *GmNAC081* foi re-avaliado, na presente investigação, por análises fluorimétricas (atividade de GUS) de plantas expostas aos tratamentos com polietilenoglicol (PEG), indutor de estresse osmótico, e com tunicamicina (TUN), que induz estresse no retículo endoplasmático.

O ensaio fluorimétrico é um método muito sensível, utilizado para identificar e quantificar a atividade da β -glucuronidase (GUS) em extratos de tecidos de plantas transgênicas ou de explantes, para a análise de expressão transiente. O substrato utilizado é o 4-metilumbelilferil β -glucuronídeo (MUG), que é hidrolisado pela

enzima, resultando em ácido glucorônico o qual apresenta fluorescência em pH alcalino (Jefferson, 1987). Em biologia molecular de plantas o gene *gus*, que codifica a enzima GUS, é o gene repórter mais utilizado para estudar a atividade de promotores em plantas transformadas (Fior *et al.*, 2009).

Os ensaios fluorimétricos foram conduzidos utilizando-se linhagens transgênicas de *Nicotiana tabacum* contendo as regiões de 750pb (pNAC081-750::GUS) e 500pb (pNAC081-500::GUS) do promotor de *GmNAC081* fusionadas ao gene repórter GUS, plantas não transformadas (WT) e plantas contendo o vetor binário de expressão em planta pCambia 1381z, também fusionado ao gene repórter GUS. Plantas contendo a região promotora de 1000pb (pNAC081-1000::GUS) foram adotadas como controle positivo, uma vez que a indução desta região por PEG e TUN foi previamente demonstrada (Rosado, 2012). Análises fluorimétricas também foram conduzidas a fim de verificar a indução do promotor de 1000pb de *GmNAC081* em linhagens transgênicas de *Nicotiana tabacum* em diferentes estádios vegetativos em condições de cultivo *in vitro* e em casa de vegetação.

Plantas transformadas com as construções de 750pb (pNAC081-750::GUS) e de 500pb (pNAC081-500::GUS) do promotor de *GmNAC081*, previamente obtidas por Rosado (2012), foram confirmadas via PCR utilizando-se oligonucleotídeos específicos para as respectivas regiões promotoras (Figuras 1, 2a, 2b, 3a e 3b). Uma vez que os oligonucleotídeos específicos para o promotor truncado de 500bp também amplificam o promotor de 750bp, as plantas transgênicas candidatas pNAC081-500::GUS foram re-confirmadas pela falha dos oligonucleotídeos específicos para o promotor de 750 bp em amplificar as plantas positivas pNAC081-500::GUS (Figura S1). Similarmente, as plantas transgênicas pNAC081-750::GUS foram re-confirmadas pela falha de amplificação quando se utilizaram os oligonucleotídeos específicos para o promotor de 1000 bp (Figure S2).

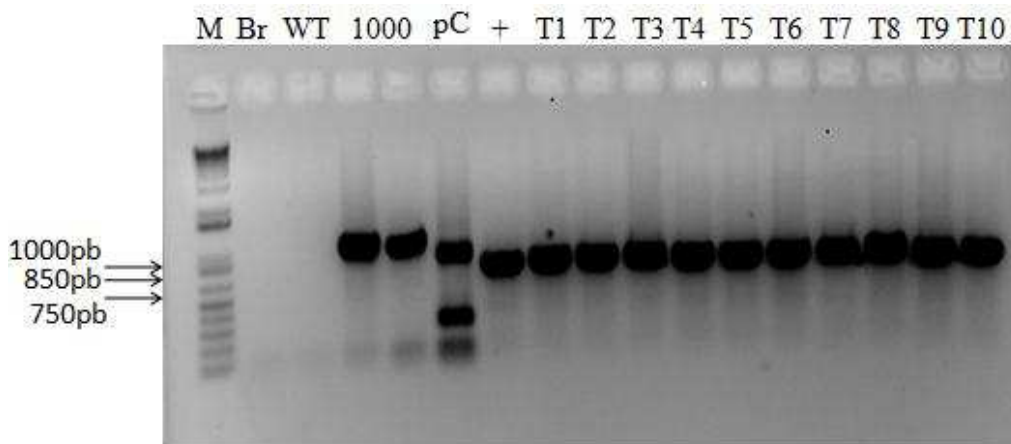


Figura 1 – Diagnóstico molecular de plantas transgênicas baseado em PCR. Gel de confirmação das plantas com promotor de 750pb de *GmNAC081* fusionado a GUS e de linhagens transgênicas pNAC081-1000::GUS e pCAMBIA, utilizadas como controles nos experimentos com PEG e TUN. DNA total foi extraído de plântulas transgênicas pNAC081-750::GUS (T1-T10) e pNAC081-1000::GUS (1000) e a presença do inserto confirmada por PCR, utilizando primers específicos para amplificação da extensão de 1000, e 750bp da extremidade 5' do promotor de *GmNAC081*. pC designa plantas transformadas com o vetor pCAMBIA1381z que foram confirmadas com oligonucleotídeos específicos para o gene *hptII* (850 bp). (+) designa o controle positivo para a presença do inserto de 750pb de *GmNAC081*. Br designa o resultado de uma reação de PCR sem adição de DNA. As setas à esquerda indicam a mobilidade eletroforética do tamanho de 1000pb, 850pb e 750pb, respectivamente. Em todos os ensaios fluorimétricos, foram utilizados sempre três transformantes independentes em triplicata.

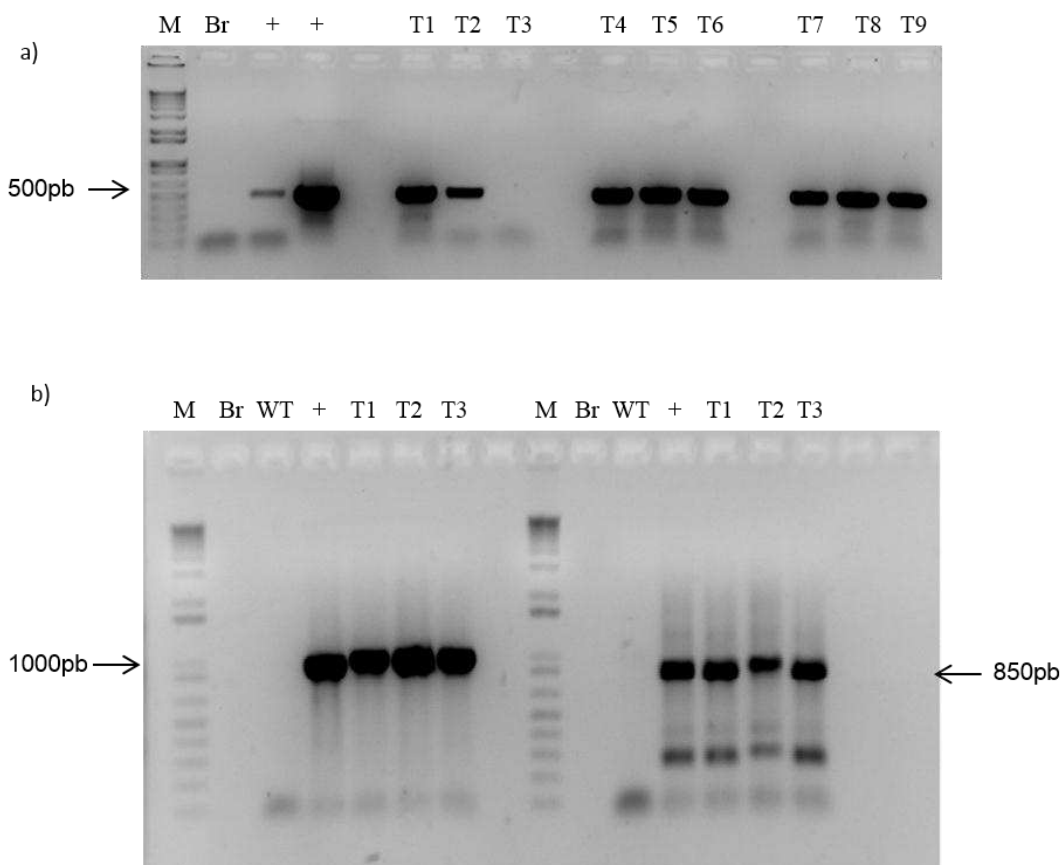


Figura 2 – Diagnóstico molecular de plantas transgênicas baseado em PCR. (a) Gel de confirmação das plantas com promotor de 500pb de *GmNAC081* fusionado a GUS utilizadas nos experimentos com PEG. DNA total foi extraído de plântulas transgênicas pNAC081-500::GUS (T1-T9) e a presença do inserto confirmada por PCR, utilizando primers específicos para amplificação da extensão de 500pb da extremidade 5' do promotor de *GmNAC081*. (b) Diagnóstico das linhagens transgênicas pNAC081-1000::GUS e pCAMBIA, utilizadas como controles. Para pNAC081-1000::GUS a presença do inserto foi confirmada utilizando primers específicos para amplificação da extensão de 1000pb da extremidade 5' do promotor de *GmNAC081* e para pCambia::GUS

utilizando primers específicos para o gene *hptII* (850 bp). Em (a) e (b), (+) designa o controle positivo para a presença dos respectivos insertos e Br designa o resultado de uma reação de PCR sem adição de DNA. A seta à esquerda indica a mobilidade eletroforética do tamanho de 500pb em (a) e de 1000pb em (b). A seta à direita indica a mobilidade eletroforética do tamanho de 850pb em (b). Em todos os ensaios fluorimétricos, foram utilizados sempre três transformantes independentes em triplicata.

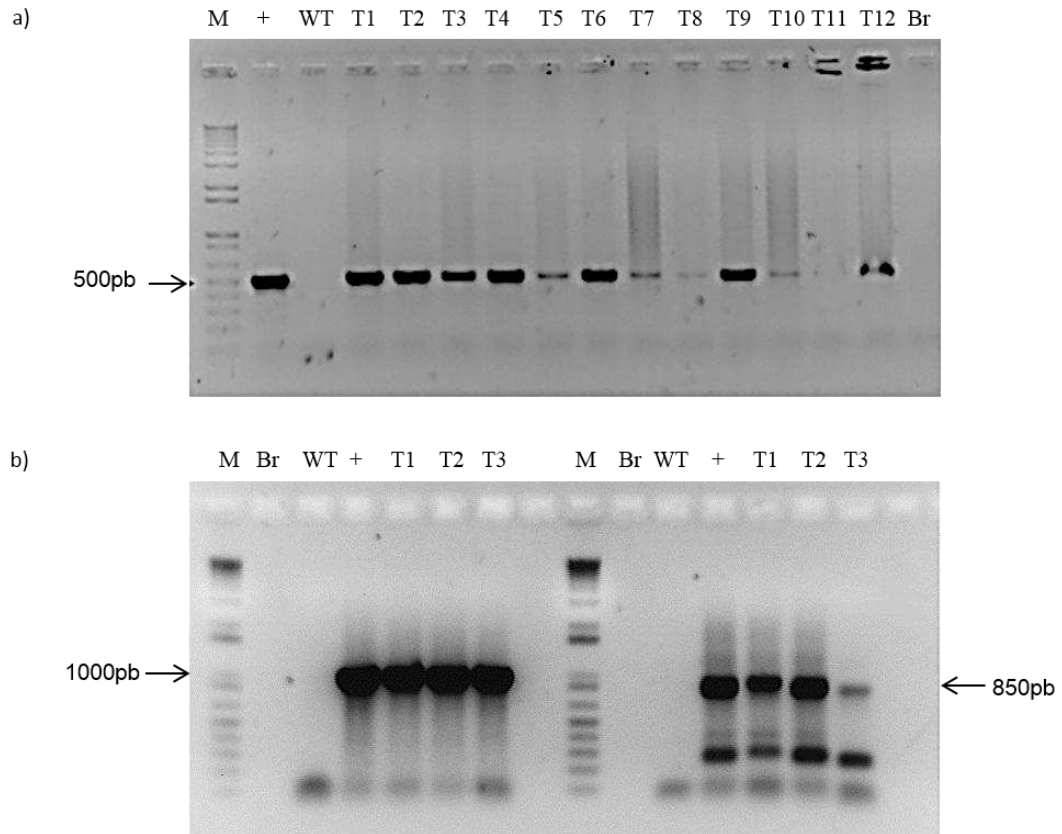


Figura 3 – Diagnóstico molecular de plantas transgênicas baseado em PCR. (a) Gel de confirmação das plantas com promotor de 500pb de *GmNAC081* fusionado a GUS utilizadas nos experimentos com TUN. DNA total foi extraído de plântulas transgênicas pNAC081-500::GUS (T1-T12) e a presença do inserto confirmada por PCR, utilizando primers específicos para amplificação da extensão de 500pb da extremidade 5' do promotor de *GmNAC081*. (b) Diagnóstico das linhagens transgênicas pNAC081-1000::GUS e pCAMBIA, utilizadas como controles. Para pNAC081-1000::GUS a presença do inserto foi confirmada utilizando primers específicos para amplificação da extensão de 1000pb da extremidade 5' do promotor de *GmNAC081* e para pCAMBIA::GUS utilizando primers específicos para o gene *hptII* (850 bp). Em (a) e (b), (+) designa o controle positivo para a presença dos respectivos insertos e Br designa o resultado de uma reação de PCR sem adição de DNA. A seta à esquerda indica a mobilidade eletroforética do tamanho de 500pb em (a) e de 1000pb em (b). A seta à direita indica o tamanho de 850pb em (b). Em todos os ensaios fluorimétricos, foram utilizados sempre três transformantes independentes em triplicata.

As plantas transgênicas confirmadas foram expostas aos estímulos de estresse osmótico, através do indutor PEG, e do retículo endoplasmático, através do indutor TUN. Conforme já demonstrado, tratamento com PEG induziu a atividade do promotor de *GmNAC081* (*GmNAC6*). Com relação à inducibilidade à PEG, foi previamente demonstrado que deleções sucessivas não causaram perda de função do promotor até a posição -250 bp, quando a atividade em resposta à PEG se tornou significativamente similar ao controle, indicando uma possível região regulatória entre as posições -500 a -250 pb (Rosado, 2012).

No entanto, na presente investigação ensaios fluorimétricos mostraram que a atividade específica de GUS de plantas pNAC081-750::GUS tratadas com PEG não diferiu estatisticamente da observada para plantas não estimuladas (NS), (Figura 4). A indução do promotor mostrou-se estatisticamente significativa apenas em transformantes pNAC081-1000::GUS. Portanto, a deleção da região de -1000 a -750 causou a perda da inducibilidade do promotor em resposta a PEG. A expressão de *GmNAC081* em situações de estresse osmótico é relatada na literatura. Recentemente foi demonstrado que plantas de soja superexpressando *GmNAC081* (*GmNAC6*) são mais sensíveis ao tratamento com PEG (Faria *et al.*, 2011). Também, a super expressão de *GmNAC081* (*GmNAC6*) acelerou a senescência e murcha em folhas cotiledonares sob tratamento de PEG e um fenótipo de morte celular induzido após tratamento por PEG foi observado em plântulas de soja, devido à indução do gene *GmNAC081* (Mendes *et al.*, 2013).

Através de ensaio fluorimétrico foi também possível observar que o promotor de 500pb de *GmNAC081* não foi induzido em plantas tratadas com PEG (Figura 5). A atividade do promotor de 500pb de *GmNAC081*, representada pela atividade específica da enzima GUS, não diferiu estatisticamente de plantas pNAC081-500::GUS não estimuladas (NS).

Assim, os resultados apresentados nesta investigação indicam, em contraste com Rosado (2012), que uma provável região regulatória em resposta a estresse osmótico esteja presente entre -1000 a -750 pb no promotor de *GmNAC081*. Desse modo, sequências entre -1000 e -750 seriam essenciais para a indução do promotor de *GmNAC081* em resposta a PEG. Além disso, ao analisarmos os níveis de indução da região de -750pb comparativamente a -500pb, os dados demonstram uma atividade basal do promotor *GmNAC081*, dependente de sequências localizadas entre -750 e -500bp (Figuras 4 e 5).

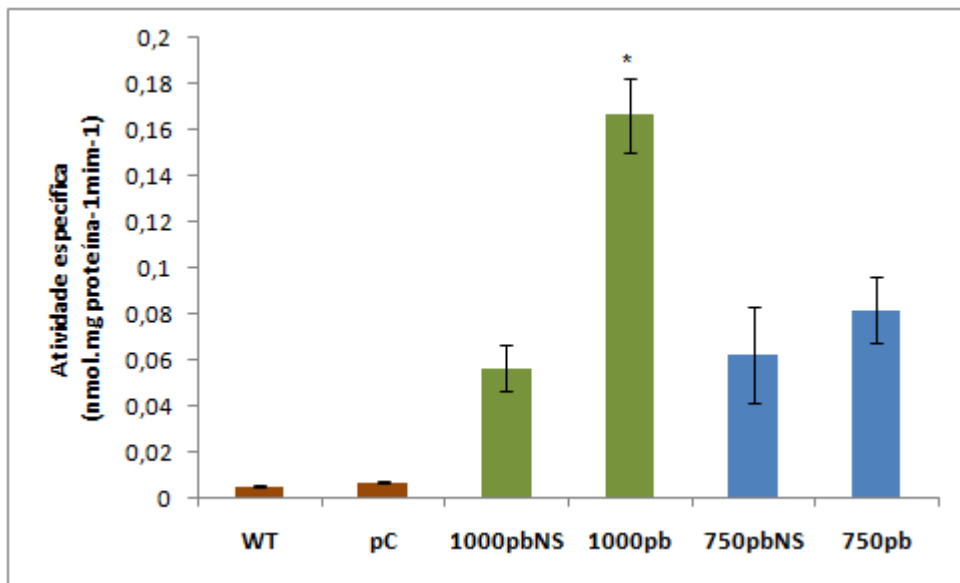


Figura 4 – Análise quantitativa da expressão da enzima GUS das plantas transgênicas pNAC081-750::GUS tratadas com PEG. A atividade específica de GUS foi determinada por ensaio fluorimétrico, (n=9, 3 triplicatas biológicas e 3 transformantes independentes). Asterisco indica diferença significativa pelo teste t (p-valor < 0,05). Plantas WT, pCambia (pC) e não estimuladas (NS) foram usadas como controles negativos e plantas pNAC081-1000::GUS (1000pb) como controle positivo.

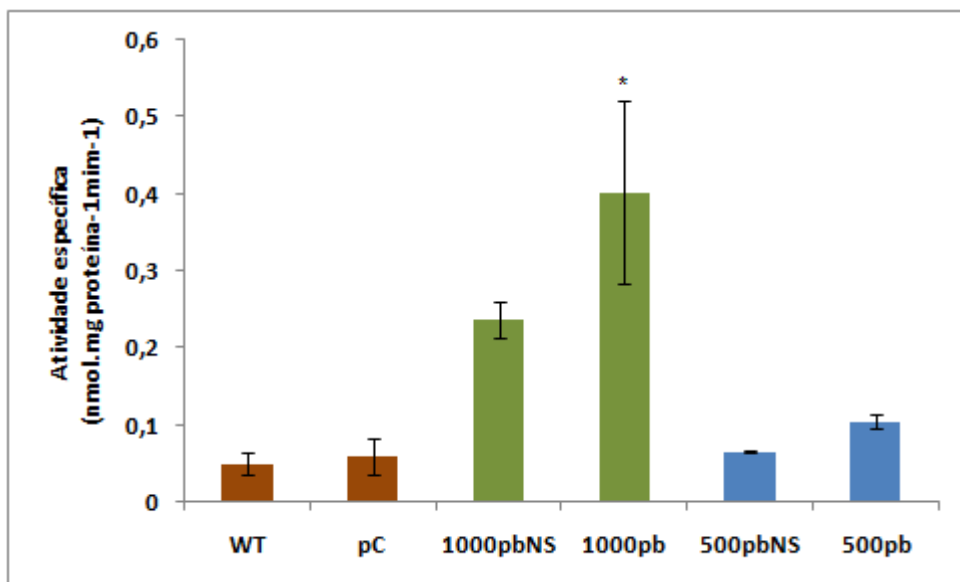


Figura 5 – Análise quantitativa da expressão da enzima GUS nas plantas transgênicas pNAC081-500::GUS tratadas com PEG. A atividade específica de GUS foi determinada por ensaio fluorimétrico, (n=9, 3 triplicatas biológicas e 3 transformantes independentes). Asterisco indica diferença significativa pelo teste t (p-valor < 0,05). Plantas WT, pCambia (pC) e não estimuladas (NS) foram usadas como controles negativos e plantas pNAC081-1000::GUS (1000pb) como controle positivo.

A indução do promotor de *GmNAC081* também foi avaliada pelo ensaio fluorimétrico de GUS em condições de estresse no retículo endoplasmático através do indutor tunicamicina (TUN). Costa et al., (2008) demonstraram que estresse prolongado no retículo endoplasmático leva à morte celular. Neste contexto, ocorre a indução da expressão de *GmNAC081* (*GmNAC6*) (Farial et al., 2011).

O nível de indução do promotor de 500pb de *GmNAC081*, representado pela atividade específica de GUS, não diferiu estatisticamente do observado para plantas pNAC081-500::GUS não estimuladas (NS), assim como dos controles negativos WT e pCambia (Figura 6). A indução do promotor de 1000pb de *GmNAC081* (*GmNAC6*) por tunicamicina já foi relatada (Rosado et al., 2012). Conseqüentemente, podemos inferir que a deleção da região de -750 a -500 causou a perda de inducibilidade do promotor em resposta a TUN. Tal hipótese foi reforçada, uma vez que o promotor de 750 bp foi induzido sob estímulo com TUN (Figura 7). Tais resultados indicam a existência de cis-elementos de resposta a estresse no retículo endoplasmático entre as posições -750 e -500pb do promotor de *GmNAC081*.

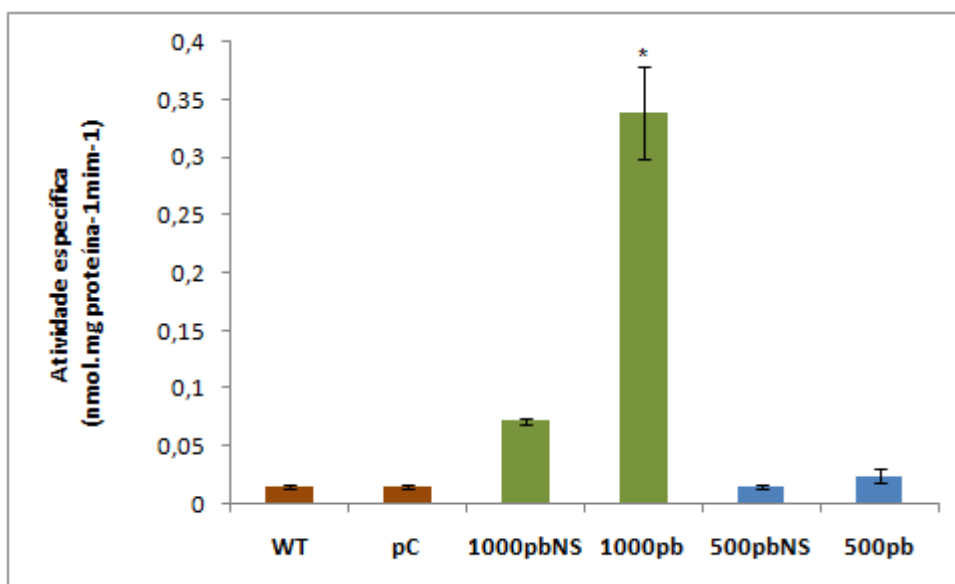


Figura 6 – Análise quantitativa da expressão da enzima GUS nas plantas transgênicas de tabaco pNAC081-500::GUS tratadas com TUN. A atividade específica de GUS foi determinada por ensaio fluorimétrico, (n=9, 3 triplicatas biológicas e 3 transformantes independentes). Asterisco indica diferença significativa pelo teste t (p-valor < 0,05). Plantas WT, pCambia (pC) e plantas não estimuladas (NS) foram usadas como controles negativos e plantas pNAC081-1000::GUS (1000pb) como controle positivo.

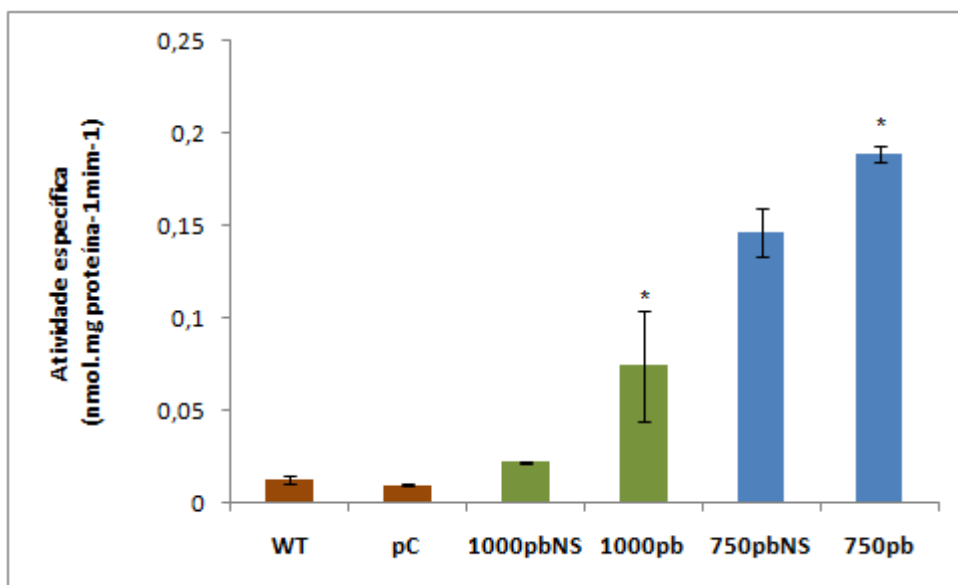


Figura 7 – Análise quantitativa da expressão da enzima GUS sob estresse de TUN nas plantas transgênicas de tabaco pNAC081-750::GUS. A atividade específica de GUS foi determinada por ensaio fluorimétrico, (n=9, 3 triplicatas biológicas e 3 transformantes independentes). Asterisco indica diferença significativa pelo teste t (p-valor < 0,05). Plantas WT, pCambia (pC) e não estimuladas (NS) foram usadas como controles negativos e plantas pNAC081-1000::GUS (1000pb) como controle positivo.

Foi demonstrado em plântulas de soja que a expressão do gene *GmNAC081* (*GmNAC6*) é induzida por PEG e TUN (Faria *et al.*, 2011). De acordo com Mendes *et al.*, (2013) plantas super-expressando *GmNAC081* são mais sensíveis ao estresse hídrico, bem como ao estresse osmótico e ao estresse no retículo endoplasmático e ainda, apresentam um fenótipo precoce de senescência. A presença de um elemento de resposta a proteínas mal dobradas (*unfolded protein response element* (UPRE) cccccccccccccccacg (Iwata, 2009) na posição -383 do promotor de *GmNAC081* foi recentemente reportada na literatura (Mendes *et al.*, 2013). Entretanto, analisando-se a sequência promotora de *GmNAC081* -1000pb a montante do sítio de iniciação da tradução (ATG) duas sequências similares as de elemento ERSE-I foram identificadas adjacentes ao núcleo de ligação de NACs (CACG), sendo estas localizadas nas posições -249 e -921, a partir do ATG. Nenhum outro cis-elemento que regula atividade de promotores de plantas, como UPRE-1 (ATTGGTCCACGTCATC (Iwata *et al.*, 2008; Liu and Howell, 2010a)), UPRE-II (CATGAACGCGTAC (Hayashi *et al.*, 2013)), UPRE-III (TCATCG ou CGATGA, (Sun *et al.*, 2013)) e ERSE-II (ATTGG-N-CCACG (Yoshida *et al.*, 1998, 2000, 2001; Wang *et al.*, 2000; Kokame *et al.*, 2001; Shen *et al.*, 2001) foi encontrado na região de 1000pb promotor de *GmNAC081*.

Entretanto, a sequência do tipo ERSE-I encontrada na posição -249 difere da sequência ERSE-I funcional cccccccccccccccacg já descrita que possui os

nucleotídeos conservados cc e ccag separados por 12 bp (Yoshida et al., 1998) enquanto que, a sequência encontrada possui apenas 10bp entre os nucleotídeos conservados. Provavelmente, a sequência putativa na posição -249 não corresponde a um elemento ERSE funcional, consistente com os resultados obtidos nesta investigação. É possível que a presença do elemento conservado na posição -921 regule a indução do promotor de 1000pb de *GmNAC081* por TUN, porém outros elementos de resposta a TUN devem estar presentes na posição -750 a -500, sendo responsáveis pela resposta ao estresse no RE. Provavelmente, fatores transcricionais, tais como os da família bZIP, ligam ao cis-elemento UPRE na posição -924 e a outros cis-elementos localizados entre -750 e -500pb no promotor de *GmNAC081* para promover indução do promotor em resposta a TUN. No entanto, experimentos futuros envolvendo a sequência promotora de 1000pb de *GmNAC081* fazem-se necessários para a consolidação desta hipótese.

Cabe ressaltar que, uma vez que já foi demonstrado que o gene *GmNAC081* (*GmNAC6*) é induzido pela expressão das proteínas NRPs (Faria et al., 2011), é possível que a indução do promotor de *GmNAC081* por tunicamicina seja indireta através da indução da expressão de NRPs. Em nossas análises a atividade do promotor -1000 de *GmNAC081* foi superior à -500 tanto para PEG quanto para TUN. Foi também significativamente superior em relação à -750 quando o estímulo foi o PEG e inferior quando estas foram receberam o estímulo pela TUN. Tais resultados são consistentes com os observados por Rosado (2012). Portanto, os dados apresentados nesta investigação demonstraram que sequências entre -1000 a -750 são essenciais para a indução do promotor de *GmNAC081* em condições de estresse osmótico e entre -750 a -500 em condições de estresse no retículo endoplasmático.

A atividade do promotor de 1000pb de *GmNAC081* está relacionada às condições de cultivo de plantas transgênicas de *Nicotiana Tabacum*

Uma vez que todas as plantas modelo (*Nicotiana Tabacum*) transgênicas pNAC081::GUS e não transgênicas, utilizadas nos experimentos que avaliaram a indução de regiões do promotor de *GmNAC081* em condições de estresse osmótico (PEG) e do retículo endoplasmático (TUN), foram provenientes de cultivo *in vitro* (*iv*), tornou-se relevante avaliar se esta condição de cultivo apresentaria fatores intrínsecos que culminassem na indução do promotor de *GmNAC081*. Assim, com o propósito de avaliar se a atividade do promotor de -1000pb de *GmNAC081* estaria relacionada às condições de cultivo, análises histoquímicas e fluorimétricas (quantitativas de GUS) foram realizadas em plantas transgênicas pNAC081-1000::GUS obtidas e cultivadas *in vitro* (*iv*) em comparação com plantas transgênicas obtidas e crescidas em casa de vegetação (*cv*).

Plântulas em estágio *seedlings* e plantas em estágio intermediário foram utilizadas em nossas análises sob as diferentes condições de cultivo. Em função da dificuldade de encontrar na literatura uma escala fenológica específica para a cultura do tabaco, o presente trabalho utilizou a escala proposta por Dubou & Grasel (2011) (Tabela S2). Na presente investigação, o estágio VT foi denominado *seedlings*, o estágio EC de intermediário, o estágio FA foi denominado de florescimento e por fim, o estágio 1C caracterizou a senescência.

Os transformantes contendo a construção pNAC081-1000pb::GUS foram regenerados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), contendo 50 mg.L⁻¹ de higromicina e mantidas *in vitro* (Rosado, 2012). Assim, todos transformantes provenientes do cultivo *in vitro* foram obtidos a partir sementes pNAC081-1000::GUS germinadas em meio MS contendo o antibiótico de seleção para o gene *hptII* higromicina. Já as plantas obtidas em casa de vegetação foram monitoradas via PCR para a seleção de transformantes a serem utilizadas experimentalmente (Figuras 8a, 8b, 9a e 9b)

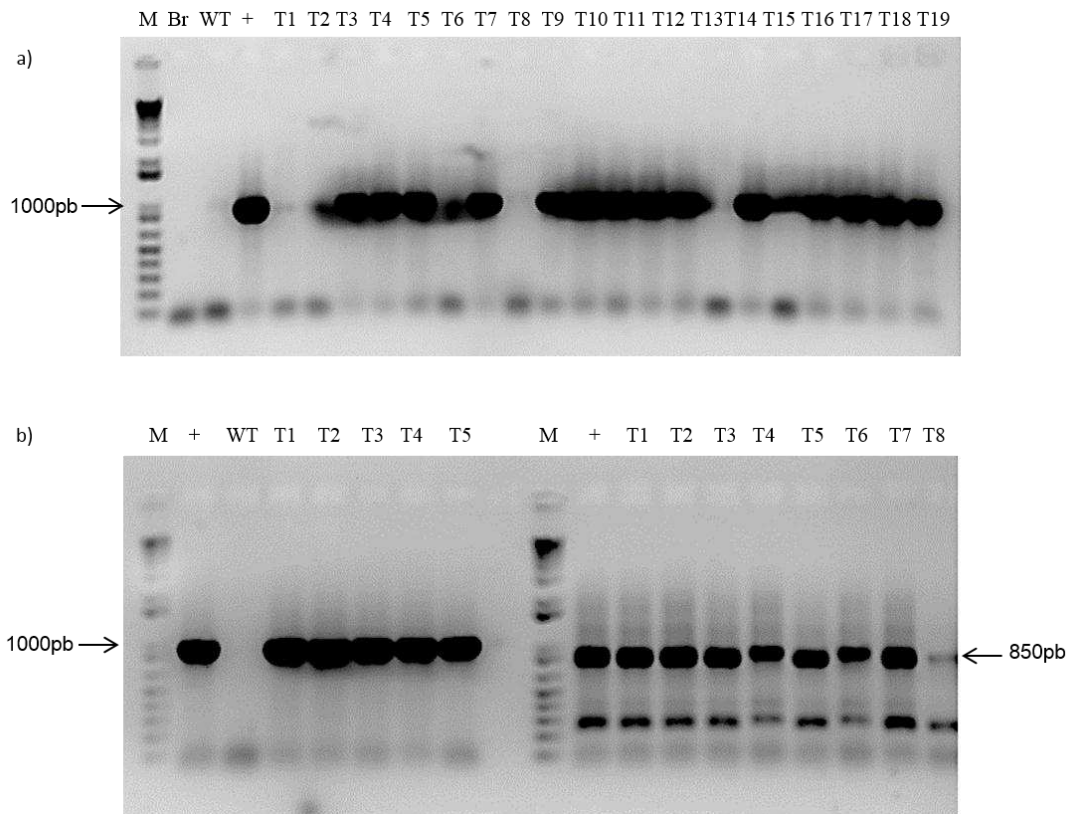


Figura 8 – Diagnóstico molecular de plantas transgênicas baseado em PCR. (a) Gel de confirmação das plantas pNAC081-1000::GUS , em estágio *seedlings* obtidas em casa de vegetação (*cv*). DNA total foi extraído de plântulas transgênicas e a presença do inserto confirmada por PCR, utilizando primers específicos para amplificação da extensão de 1000bp da extremidade 5' do promotor de *GmNAC081*. A seta à esquerda indica a mobilidade eletroforética do tamanho de 1000pb. (b) Bandas à direita na figura mostram o diagnóstico das linhagens transgênicas pCAMBIA, utilizadas como controle. Em pCAMBIA, a amplificação do transgene foi feita utilizando-se primers que amplificam o gene *hptII* (850pb). A seta à direita indica o tamanho de 850pb do fragmento de DNA amplificado. Em (a) e (b) , (+) designa o controle positivo para a presença dos respectivos insertos e Br designa o resultado de uma reação de PCR sem adição de DNA. Em todos os ensaios fluorimétricos, foram utilizados sempre três transformantes independentes em triplicata.

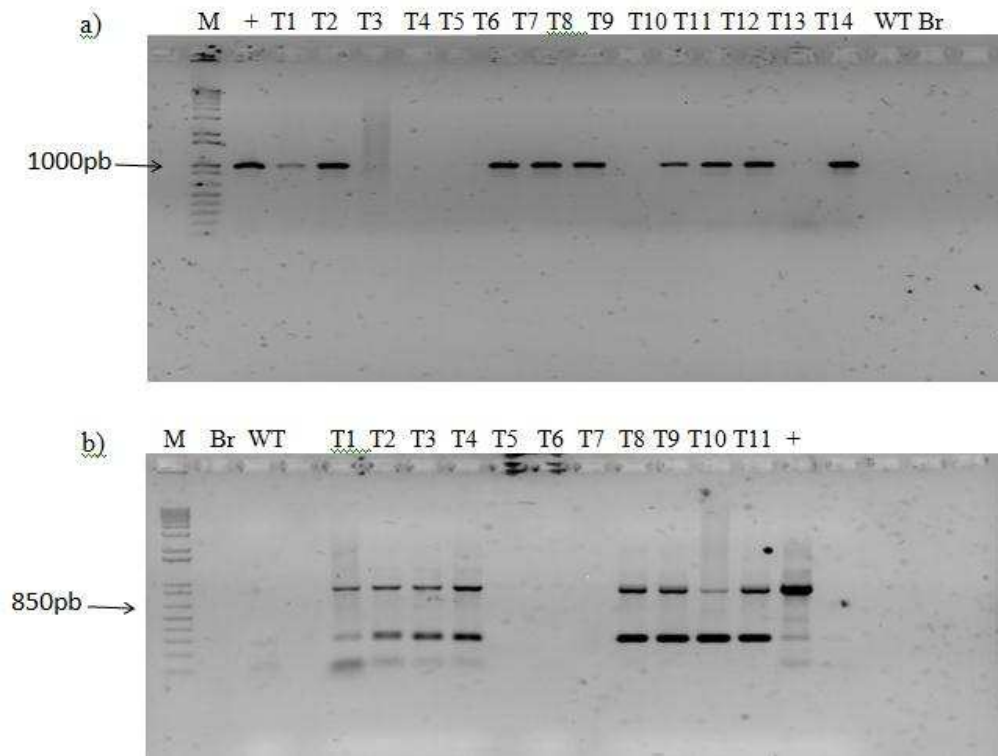


Figura 9 – Diagnóstico de plantas transgênicas baseado em PCR. (a) Gel de confirmação das plantas pNAC081-1000::GUS, em estágio intermediário obtidas em casa de vegetação. DNAtotal foi extraído de plantas transgênicas e a presença do inserto confirmada por PCR, utilizando primers específicos para amplificação da extensão de 1000pb da extremidade 5' do promotor de *GmNAC081*. A seta à esquerda indica a mobilidade eletroforética do tamanho de 1000pb.. (b) Diagnóstico das linhagens transgênicas pCAMBIA, utilizadas como controles. Em pCAMBIA, a amplificação do transgene foi feita utilizando-se primers que amplificam o gene *hptIII*. Em (a) e (b) ,(+) designa o controle positivo para a presença dos respectivos insertos e Br designa o resultado de uma reação de PCR sem adição de DNA. As setas indicam o tamanho do fragmento de DNA amplificado. Em todos os ensaios fluorimétricos, foram utilizados sempre três transformantes independentes em triplicata.

Análises fluorimétricas mostraram que a atividade do promotor de *GmNAC081* foi muito superior em plantas provenientes de cultivo *in vitro* (*iv*) em comparação às plantas provenientes do cultivo em casa de vegetação (*cv*), assim como os controles WT e pCambia. O controle WT* refere-se a plantas segregantes dos transformantes primários, geração T2, que perderam o transgene e reverteram ao genótipo WT. Plantas cultivadas em casa de vegetação não apresentaram indução significativa do promotor quando comparadas a plantas WT, pCambia e à plantas WT*. A atividade do promotor foi significativamente superior para plantas cultivadas *in vitro*, o que manteve-se tanto para o estágio de *seedlings* quanto para plantas em estágio intermediário (Figuras 10 e 11).

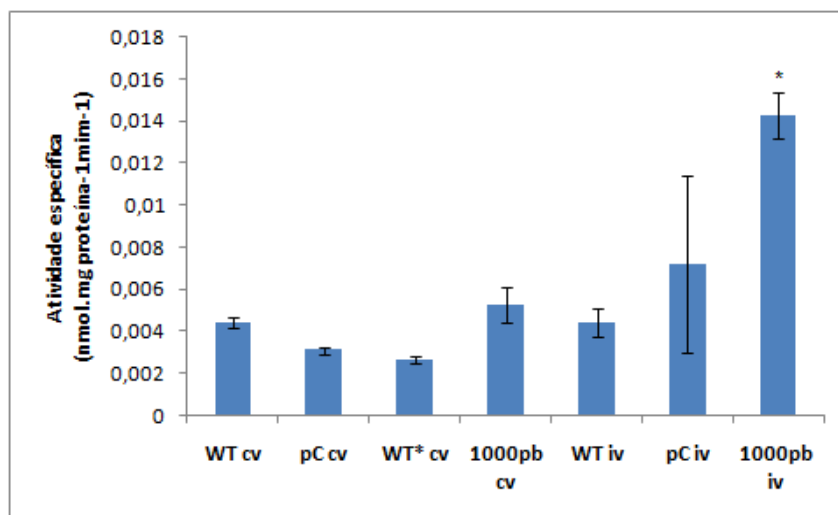


Figura 10 – Análise quantitativa da expressão da enzima GUS em plantas transgênicas pNAC081-1000::GUS, em estágio *seedlings* (VT) cultivadas *in vitro* (iv) e em casa de vegetação (cv). A atividade específica de GUS foi determinada por ensaio fluorimétrico, (n=9, 3 triplicatas biológicas e 3 transformantes independentes). Letras diferentes dos tratamentos em relação ao controle indica diferença significativa pelo teste de TukeyHSD a $P < 0,05$, em relação aos respectivos controles. Plantas WT, WT* e pCambia (pC) foram adotadas como controles negativos.

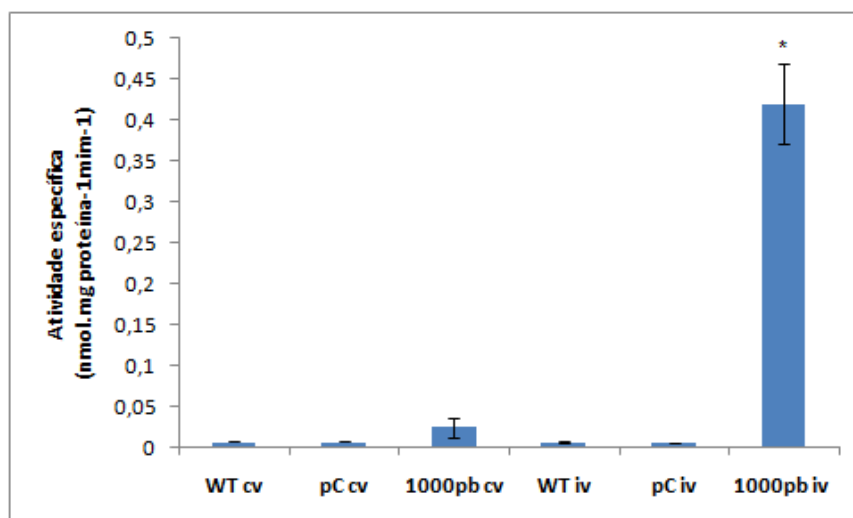


Figura 11- Análise quantitativa da expressão da enzima GUS em plantas transgênicas de tabaco contendo o promotor de 1000pb do gene NAC081, fusionado diretamente a GUS, em estágio intemediário (EC) cultivadas *in vitro* (iv) e em casa de vegetação (cv). A atividade específica de GUS foi determinada por ensaio fluorimétrico, (n=9, 3 triplicatas biológicas e 3 transformantes independentes). Letras diferentes dos tratamentos em relação ao controle indica diferença significativa pelo teste de TukeyHSD a $P < 0,05$, em relação aos respectivos controles. Plantas WT, WT* e pCambia (pC) foram adotadas como controles negativos.

Conjuntamente, os dados demonstram que a atividade do promotor de 1000pb de *GmNAC081* está relacionada às condições de cultivo de plantas transgênicas de *Nicotiana Tabacum*. Pinheiro (2007) analisando a expressão de genes NAC em diferentes órgãos de soja observou que *GmATAF*, *GmNAC2* e *GmNAC081* (*GmNAC6*) foram expressos em maiores quantidades, mesmo na ausência de

estresse. Assim sendo, sugeriu que os genes *GmATAF*, *GmNAC2* e *GmNAC081* (*GmNAC6*) possam estar funcionalmente envolvidos também em processos celulares básicos e constitutivos.

A atividade do promotor de 1000pb de *GmNAC081* está relacionada ao processo de senescência em plantas transgênicas de *Nicotiana Tabacum*

Os fatores de transcrição da família NAC são proteínas multi-funcionais e estão envolvidos, além de em respostas a estresse, em diversos processos biológicos tais como desenvolvimento de plantas e raiz lateral, floração, espessamento da parede celular secundária, senescência e qualidade de sementes (Tran *et al.*, 2010). Assim, com a finalidade de avaliar se a indução do promotor de *GmNAC081* estaria relacionada a diferentes estádios de desenvolvimento, plantas de tabaco transgênicas pNAC081-1000::GUS foram cultivadas em casa de vegetação e avaliadas quanto a atividade do promotor, através de ensaios fluorimétricos (quantitativo de GUS), em diferentes estágios de desenvolvimento sendo estes: *seedlings* (plântulas), intermediário, florescimento e senescência. Plantas pNAC081-1000::GUS em estágio de senescência (estádio fenológico 1C de acordo com Dubou & Grasel, (2011) (Tabela S2), selecionadas para os ensaios experimentais são mostradas na Figura S3.

Os resultados apresentados na Figura 12 demonstram que o promotor de *GmNAC081* não foi significativamente induzido durante os estádios *seedlings* e florescimento, uma vez que a atividade do promotor, representada pela atividade específica de GUS não diferiu estatisticamente dos respectivos controles. Entretanto, uma forte indução do promotor de *GmNAC081* foi observada no estágio de senescência. A atividade específica do promotor na senescência foi significativamente superior à de plantas WT, WT* e pCambia no mesmo estágio adotadas como controle, e por conseguinte superou a atividade observada para todos os transformantes nos demais estádios analisados.

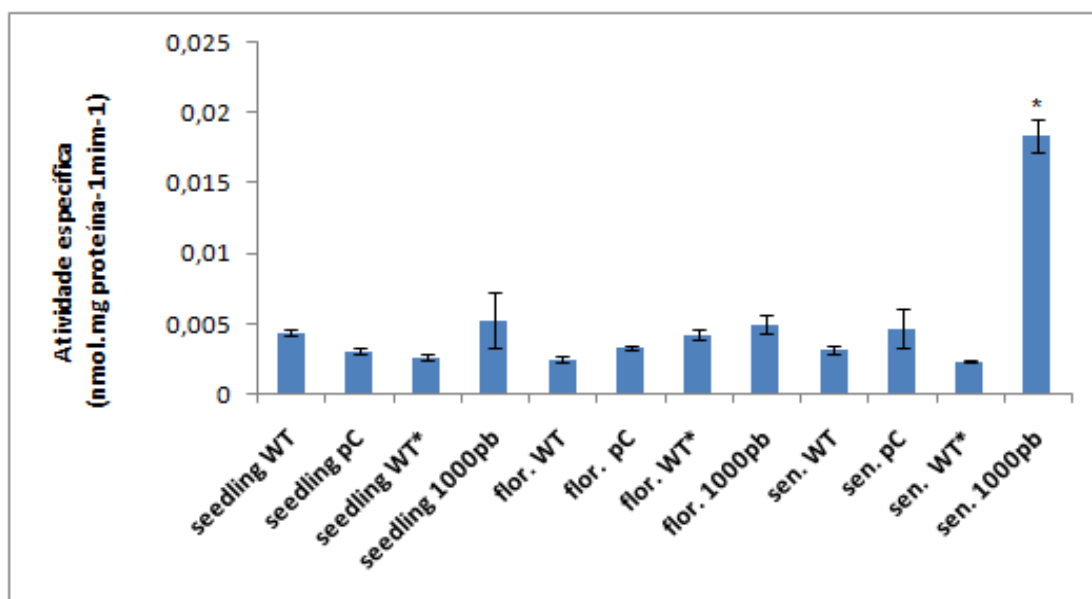


Figura 12 – Análise quantitativa da expressão da enzima GUS em plantas transgênicas de tabaco contendo o promotor de 1000pb do gene NAC081, fusionado diretamente a GUS, em estágio seedlings (VT), intermediário (EC), florescimento (FA) e senescência (1C) cultivadas em casa de vegetação (cv). A atividade específica de GUS foi determinada por ensaio fluorimétrico, (n=9, 3 triplicatas biológicas e 3 transformantes independentes). Letras diferentes dos tratamentos em relação ao controle indica diferença significativa pelo teste de TukeyHSD a $P < 0,05$, em relação aos respectivos controles. Plantas WT, WT* e pCambia (pC) foram adotadas como controles negativos.

A senescência é caracterizada pelo amarelecimento visível de folhas e está correlacionada com uma série de alterações bioquímicas, tais como a perda do teor de clorofila, a degradação de proteínas e de RNA, e um declínio na atividade fotossintética. Todas estas mudanças substanciais estão associadas a alterações na expressão gênica. Muitos genes associados à senescência (SAGs) são transcricionalmente regulados positivamente durante a senescência de folhas. A identificação e caracterização de SAGs é fundamental para a compreensão dos processos bioquímicos e fisiológicos na senescência foliar (Li & Guo, 2014).

Análises do efeito da superexpressão de *GmNAC081* ao longo do desenvolvimento em linhagens transgênicas de soja demonstraram que a superexpressão de *GmNAC081* não alterou o crescimento de linhagens na fase vegetativa de desenvolvimento e, tampouco, no período de florescimento (Mendes, 2013). Alterações fenóticas nas linhagens transgênicas só foram observadas durante o processo natural de senescência foliar. Tais resultados, indicaram que o processo acelerado de senescência foliar, observado nas linhagens transgênicas, não foi decorrente de uma dinâmica de aceleração do desenvolvimento global mediado por *GmNAC081*, mas sim o resultado da atuação do transgene durante senescência. Estas observações favoreceram a hipótese de que *GmNAC081* atua como regulador positivo do processo de senescência foliar, sob condições normais de

desenvolvimento (Mendes *et al.*, 2013). A família de fatores de transcrição NAC também desempenha papel importante nas redes de proteínas reguladoras em resposta a estresse e a senescência em espécies como *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* (Jensen & Skriver, 2014). Os resultados obtidos na presente investigação revelaram que a atividade do promotor de 1000pb de *GmNAC081* está relacionada ao processo de senescência em plantas transgênicas de *Nicotiana Tabacum*. Assim, oferecem incremento à literatura acerca da atuação de transfatores NAC durante a senescência em plantas.

Atividade tecido-específica do promotor GmNAC081 em resposta a estresses osmótico e no retículo endoplasmático

O promotor de 1000pb *GmNAC081* (*GmNAC6*) foi induzível por estímulos de estresse em diferentes tecidos. Exceto para PEG, todos os demais estímulos analisados foram capazes de induzir a expressão da enzima GUS em todos os órgãos analisados, com relativa similaridade de intensidade da coloração do produto obtido. Estes resultados indicaram que a diferença no nível de indução da atividade do promotor de *GmNAC081* (*GmNAC6*) em resposta aos diferentes estímulos não se deve a diferenças no padrão de expressão tecido-específico do promotor (Rosado, 2012). A fim de avaliar se os diferentes níveis de indução do promotor *GmNAC081* observados no presente estudo estava relacionado com tecido-especificidade de expressão, a atividade de GUS foi também analisada através de ensaio histoquímico em diferentes tecidos da folha, caule, ápice caulinar (região do meristema) e raiz, utilizando três transformantes independentes de cada construção. A localização histoquímica da atividade do gene GUS, dirigida por diferentes regiões do promotor de *GmNAC081*, ocorre através da reação entre a enzima β -glucuronidase (GUS) com o substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucoronideo (X-Gluc). Como produto desta reação é originado um precipitado de cor azul no sítio de atividade da enzima, possibilitando assim a detecção de sua atividade *in situ* (Jefferson, 1987).

Para confirmar se sequências de -500pb do promotor de *GmNAC081* eram capazes de dirigir a expressão em diferentes tecidos de folha quando estimuladas por indutores de estresse osmótico (PEG) e do retículo endoplasmático (TUN), análises histoquímicas foram realizadas em transformantes pNAC081-500::GUS, previamente identificados via PCR (Figuras 1a,1b, 2a e 2b). Para este fim, cortes

histológicos transversais e discos foliares de folhas apicais de plantas pNAC081::GUS, após 40 dias de co-cultivo cultivadas *in vitro* foram utilizados (Figura S5).

Consistente com os resultados fluorimétricos, as análises histoquímicas não demonstraram atividade de GUS em tecidos de folha de plantas pNAC081-500:GUS tratadas tanto com PEG quanto com TUN. O mesmo foi observado para as plantas não transformadas (WT) e plantas pCambia::GUS adotadas como controle. Em contraste, as plantas pNAC81-1000:GUS, não estimuladas (NS) pelo tratamento apresentaram atividade de GUS basal que se intensificou em resposta a PEG e TUN (Figuras 13E, 13K e 14E e 14K).

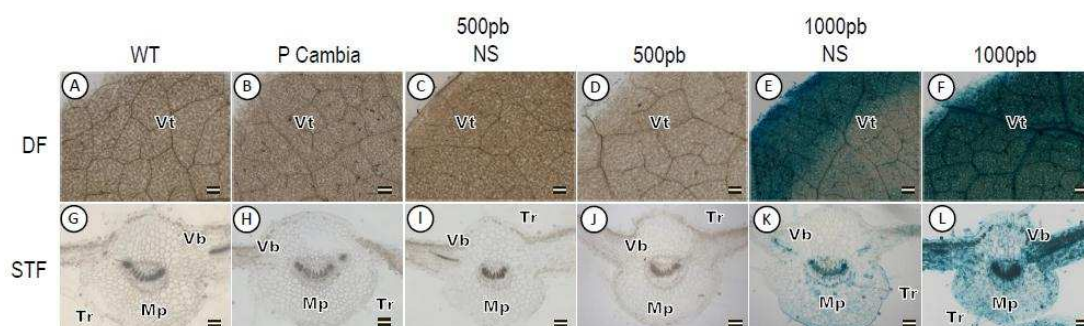


Figura 13 – Análise histoquímica da regulação tecido-específica do promotor de 500pb do gene *GmNAC081*, fusionado a GUS em discos foliares (A, B, C, D, E, F) e das secções transversais das folhas (G, H, I, J, K, L) de plantas de tabaco cultivadas *in vitro* seguido do tratamento com PEG. **Linhagens:** A e G - WT; B e H - pCambia; C e I - 500 pb não estimuladas (NS); D e J - 500pb tratadas com PEG; E e K - 1000pb não estimuladas (NS); F e L - 1000pb tratadas com PEG. Tecido vascular, Vt; tricoma, Tr; mesofilo, Mp; feixe vascular Vb. Barras = 100µM.

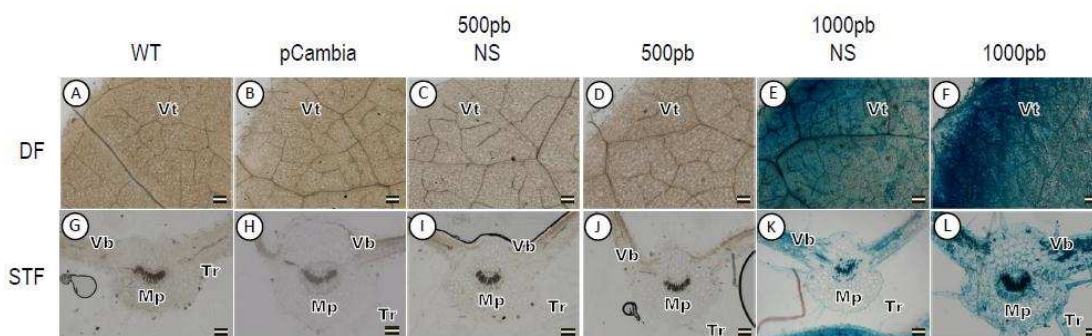


Figura 14 – Análise histoquímica da regulação tecido-específica do promotor de 500pb do gene *GmNAC081*, fusionado a GUS em discos foliares (A, B, C, D, E, F) e das secções transversais das folhas (G, H, I, J, K, L) de plantas de tabaco cultivadas *in vitro* seguido do tratamento com tunicamicina, TUN. **Linhagens:** A e G - WT; B e H - pCambia; C e I - 500 pb não estimuladas (NS); D e J - 500pb tratadas com PEG; E e K - 1000pb não estimuladas (NS); F e L - 1000pb tratadas com PEG. Tecido vascular, Vt; tricoma, Tr; mesofilo, Mp; feixe vascular Vb. Barras = 100µM.

A análise da distribuição espacial da atividade de GUS em plantas pNAC081-1000::GUS estimuladas por PEG ilustrou um padrão de expressão tecido-específico em regiões de folhas transversais similar entre os tratamentos com PEG e TUN. Em

ambos os casos uma expressão mais acentuada foi observada na região do xilema (Figuras 13L e 14L) em plantas estimuladas, sendo que em plantas não estimuladas a expressão neste mesmo tecido foi menos acentuada (Figuras 13K e 14K). Entretanto, uma indução mais uniforme na região do mesofilo e direcionada ao tecido vascular foi observada na expressão do gene repórter em discos foliares de plantas tratadas com PEG (Figura 13F). Já em plantas tratadas com TUN, a expressão no disco foliar foi menos uniforme na região do mesofilo e mais acentuada na região da borda do disco (Figura 14F).

Já foi demonstrado que *GmNAC081* (*GmNAC6*) é induzido por ferimento (Faria *et al.*, 2011). Portanto, uma vez que os discos foliares obtidos para as análises foram mecanicamente excisados das folhas, o padrão de expressão mais acentuada em regiões de borda, possivelmente está relacionado à indução do promotor de *GmNAC081* em resposta a estresse mecânico. Tal padrão foi claramente observado nos discos foliares dos transformantes pNAC081-1000::GUS de plantas controle não estimulados (NS) com PEG (Figura 13E) e recorrente nos discos foliares dos transformantes pNAC081-1000::GUS de plantas controle não estimulados (NS) com TUN, porém de forma menos intensa (Figura 14E).

Os resultados histoquímicos para a indução do promotor de *GmNAC081* em resposta a PEG e TUN corroboram com dados da literatura que mostram que o promotor de 1000pb de *GmNAC081* é induzido em plantas tratadas com PEG e TUN, individualmente (Rosado (2012)). Além disto, nossos resultados mostraram que o promotor de 1000pb de *GmNAC81* exibe uma atividade basal na ausência dos elicitores de estresse, mas em condições de cultivo *in vitro* (Figuras 13E, 13K, 14E e 14K). Além disso, reforçaram os resultados do presente trabalho para as análises fluorimétricas (quantitativas de GUS) envolvendo os transformantes pNAC081-500::GUS e pNAC081-1000::GUS. Consequentemente, pode-se inferir que a região 5' de -1000 que flanqueia o gene *GmNAC081* é induzível por estresses osmótico e no retículo endoplasmático.

Sequências a -1000pb do promotor de *GmNAC081* são capazes de direcionar a expressão no tecido vascular em plantas cultivadas *in vitro*

Até a presente investigação a atividade do promotor de 1000pb de *GmNAC081* foi investigada apenas a partir de plantas transgênicas pNAC081::GUS obtidas e cultivadas *in vitro*. No entanto, foi de interesse nesta pesquisa avaliar a indução do promotor de *GmNAC081* a partir de transformantes sob diferentes condições de cultivo e estádios de desenvolvimento. Deste modo, pode-se observar experimentalmente através de ensaios fluorimétricos (quantitativos da atividade de GUS), que a atividade do promotor de 1000pb de *GmNAC081* está relacionada às condições de cultivo de plantas transgênicas de *Nicotiana Tabacum* (dados apresentados na Figura 11).

A fim de verificar se a atividade do promotor nas diferentes condições de cultivo testadas (*in vitro* (*iv*) e em casa de vegetação (*cv*)) seriam capazes de influenciar a indução do promotor de *GmNAC081* de maneira tecido específica análises histoquímicas foram realizadas utilizando-se três transformantes independentes pNAC81-1000::GUS em diferentes estádios de desenvolvimento (*seedlings*, intermediário), nas condições de cultivo *in vitro* (*iv*) e de casa de vegetação (*cv*). Todos transformantes provenientes de casa de vegetação utilizados nas análises histoquímicas foram monitorados via PCR (Figuras 8 e 9).

Devido ao pequeno porte e à grande sensibilidade plantas em estágio *seedlings* provenientes de cultivo *in vitro* e de casa de vegetação (*cv*) estas foram avaliadas livres de procedimentos de cortes histológicos, e portanto, não foi possível identificar um caráter tecido específico para a expressão de *GmNAC081* em *seedlings*. A Figura 15 mostra clara diferença de atividade da enzima GUS entre plantas provenientes do cultivo *in vitro* (*iv*) e de casa de vegetação (*cv*). A indução do promotor de 1000pb de *GmNAC081*, representada pela atividade da enzima GUS, foi marcadamente superior em *seedlings* provenientes do cultivo *in vitro* tanto em comparação com plantas WT e pCambia, também provenientes de cultivo *in vitro*, quanto com *seedlings* provenientes de casa de vegetação (Figura 15). Aliando tais observações aos resultados correspondentes obtidos para as análises fluorimétricas desta investigação, pode-se inferir que as condições de cultivo induzem a expressão do promotor de *GmNAC081*.

Cabe ressaltar, que uma indução mais acentuada pode ser observada nas folhas mais basais e na raiz de *seedlings iv* (Figura 15F), enquanto em *seedlings cv*

uma fraca indução foi observada para os mesmos locais (Figura 15C). Por outro lado, a expressão da enzima GUS em seedlings (cv) permitiu a visualização de uma expressão marcada no tecido vascular das folhas basais e da raiz, condizente com dados recentes da literatura que tratam da importância de transfatores NAC para a adaptação das plantas na terra, uma vez que estes constituem elementos de regulação chaves para o desenvolvimento inicial de tecidos vasculares como o xilema (Bo *et al.*, 2014). Entretanto, para maiores inferências a cerca de uma expressão tecido específica dirigida pelo promotor de 1000pb de *GmNAC081* em *seedlings* experimentos futuros, endereçados para uma visualização microscópica de tecidos em *seedlings*, tornam-se necessários.

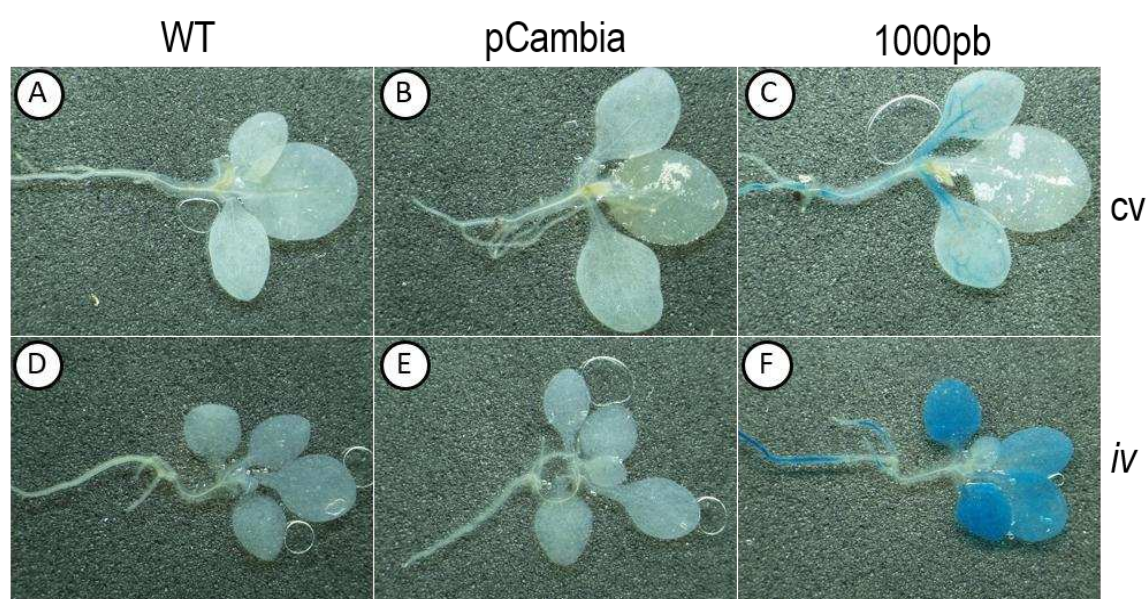


Figura 15 – Análise histoquímica da regulação tecido-específica do promotor de 1000pb do gene NAC081, fusionado a GUS em seedlings cultivados em casa de vegetação (A, B, C); seedlings cultivados *in vitro* (D, E, F). **Linhagens:** WT: A e D **pCambia:**B e E **1000pb:**C e F.

As análises histoquímicas para averiguar se a indução do promotor de 1000pb de *GmNAC081* apresentaria caráter tecido-específico sobre o efeito de diferentes condições de cultivo de plantas pNAC081-1000::GUS em estágio intermediário foram realizadas em diferentes órgãos da planta, sendo estes ápice caulinar, caule, folha e raiz. Os resultados demonstraram que a expressão do promotor de *GmNAC081*, representada pela atividade de GUS, foi mais acentuada em plantas pNAC081-1000::GUS provenientes do cultivo *in vitro* para todos os órgãos analisados, tanto em relação aos seus respectivos controles WT e pCambia quanto em relação às plantas pNAC081-1000::GUS provenientes de casa de vegetação (Figuras 16 e 17).

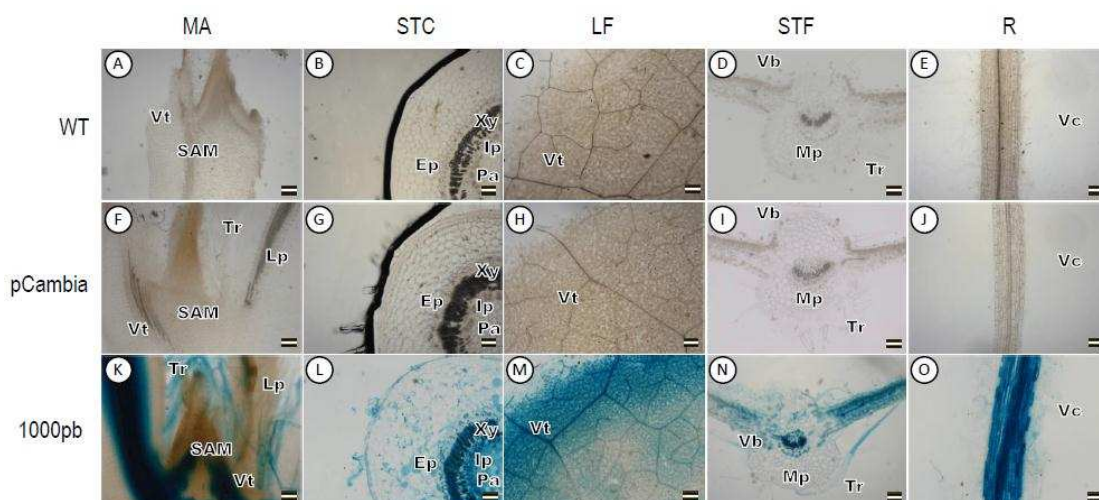


Figura 16 – Análise histoquímica da regulação tecido-específica do promotor de 1000pb do gene *GmNAC081*, fusionado a GUS em plantas cultivadas *in vitro* em estágio intermediário. Meristemas apicais (A, F, K); seção transversal do caule (B, G, L); disco foliar (C, H, M); seção transversal das folhas (D, I, N); raízes (E, J, O) de plantas de tabaco. **Linhagens:** WT: A, B, C, D, E; **pCambia:** F, G, H, I, J; **1000pb:** K, L, M, N, O. Meristema apical caulinar, **SAM**; primórdio foliar, **Lp**; tecido vascular, **Vt**; tricoma, **Tr**; floema externo, **Ep**; floema interno, **Ip**; parênquima, **Pa**; xilema, **Xy**; mesofilo, **Mp**; feixe vascular **Vb**; cilindro vascular, **Vc**. Barras = 100 μ M.

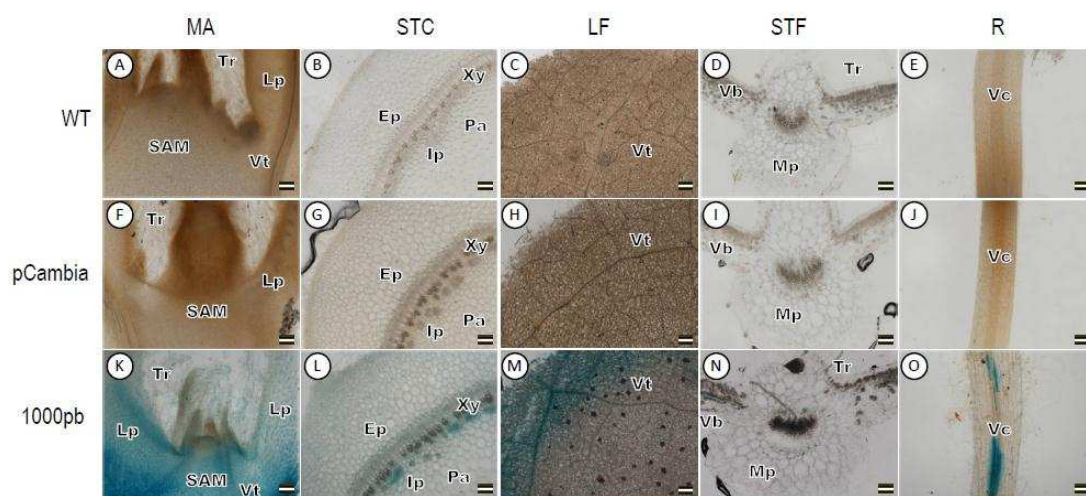


Figura 17 – Análise histoquímica da regulação tecido-específica do promotor de 1000pb do gene *GmNAC081*, fusionado a GUS em plantas cultivadas em casa de vegetação em estágio intermediário. Meristemas apicais (A, F, K); seção transversal do caule (B, G, L); disco foliar (C, H, M); seção transversal das folhas (D, I, N); raízes (E, J, O) de plantas de tabaco. **Linhagens:** WT: A, B, C, D, E; **pCambia:** F, G, H, I, J; **1000pb:** K, L, M, N, O. Meristema apical caulinar, **SAM**; primórdio foliar, **Lp**; tecido vascular, **Vt**; tricoma, **Tr**; floema externo, **Ep**; floema interno, **Ip**; parênquima, **Pa**; xilema, **Xy**; mesofilo, **Mp**; feixe vascular **Vb**; cilindro vascular, **Vc**. Barras = 100 μ M.

A atividade do promotor em plantas pNAC081-1000::GUS provenientes de cultivo *in vitro* foi mais intensa no tecido vascular no meristema e nas regiões de xilema e floema de folhas transversais e do caule, sendo que neste último uma forte expressão parece ter ocorrido também no tecido parenquimático associado ao floema interno (Figura 16L e N). Já nas raízes, uma forte expressão constitutiva foi observada, sendo ainda mais acentuada no tecido vascular (Figura 16O). Já nos

discos foliares, uma expressão mais acentuada foi marcada nas regiões de borda, o que possivelmente está ligado a expressão de *GmNAC081* em condições de estresse mecânico (Figura 16 M) (Faria *et al.*, 2011).

Em plantas pNAC081-1000::GUS provenientes de casa de vegetação, a expressão do promotor de 1000pb de *GmNAC081* não foi observada de maneira consistente em nenhum dos órgãos analisados (Figura 17). A região meristemática apresentou uma fraca e difusa expressão da enzima GUS, não sendo possível determinar uma especificidade de atividade do promotor (Figura 17K). Uma expressão suave destaca-se na região do floema interno do caule, porém não se mostrou consistente (Figura 17L). No disco foliar, a atividade do promotor foi evidente apenas na região de borda podendo, portanto, ser considerada característica de resposta a estresse mecânico (Figura 17M). A expressão do promotor na folha (corte transversal) restringiu-se fracamente a uma pequena região do limbo e não foi observada nem no mesofilo nem nos tecidos vasculares da nervura central (Figura 17N). Na raiz, apresentou-se de maneira inconsistente, não sendo possível afirmar a especificidade de expressão no tecido vascular (Figura 17O).

Por fim, o conjunto dos dados expostos acima, juntamente com as análises fluorimétricas também apresentadas neste trabalho, permitem concluir que a atividade do promotor de 1000pb de *GmNAC081* está relacionada às condições de cultivo de plantas transgênicas de *Nicotiana Tabacum*. E ainda, que sequências a -1000pb do promotor de *GmNAC081* são capazes de direcionar a expressão no tecido vascular em plantas cultivadas *in vitro*.

O promotor de *GmNAC081* é fortemente induzido em tecidos em estádios avançados de desenvolvimento

Os fatores de transcrição da família NAC são conhecidos por atuarem, além de em respostas a estresse, em diversos processos biológicos tais como desenvolvimento de plantas e raiz lateral, floração, espessamento da parede celular secundária, senescência e qualidade de sementes (Tran *et al.*, 2010).

Com o intuito de avaliar se o promotor de 1000pb de *GmNAC081* seria capaz de dirigir a expressão do gene repórter GUS de maneira tecido específica em estádios avançados de desenvolvimento, como florescimento e senescência, ensaios histoquímicos foram realizados. Plantas de *Nicotiana Tabacum* transgênicas pNAC081-1000::GUS foram cultivadas em casa de vegetação desde a germinação

até a senescência e avaliadas quanto a atividade do promotor, em diferentes tecidos durante a senescência. Exceto para as regiões meristemáticas que se transformaram no botão floral, os demais tecidos analisados para a fase seedlings e intermediária, também foram analisados em florescimento e senescência. Especificamente a análise histoquímica do botão floral das plantas transgênicas pNAC081-1000::GUS é mostrada na Figura S5 sendo observado uma pequena atividade de GUS na região do estame, o que não ocorreu com os botões florais das plantas testemunhas WT e pCambia.

Os resultados das análises histoquímicas obtidos para o estágio de florescimento das plantas pNAC081-1000::GUS em casa de vegetação são apresentados na Figura 18. Semelhantemente aos resultados obtidos para o estágio intermediário (Figura 17), a atividade do promotor GmNAC081 durante o florescimento mostrou-se fraca e inconsistente em todos os órgãos analisados.

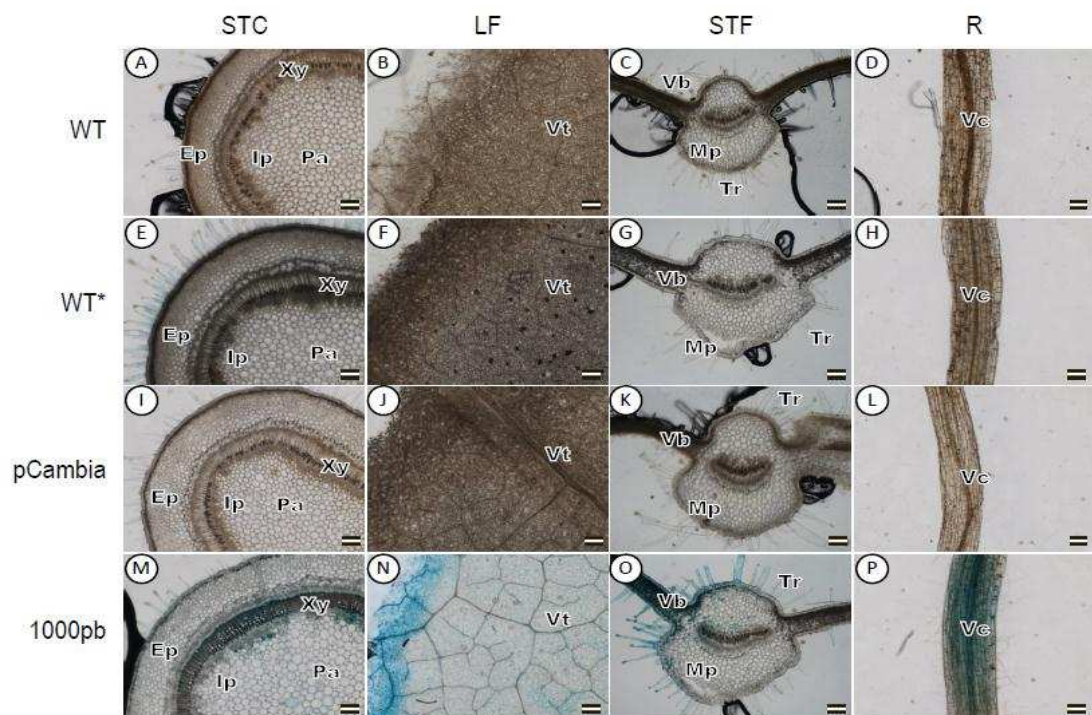


Figura 18 –Análise histoquímica da regulação tecido-específica do promotor de 1000pb do gene *GmNAC081*, fusionado a GUS em plantas cultivadas em casa de vegetação em estágio de florescimento. Secção transversal do caule (A, E, I, M); disco foliar (B, F, J, N); secção transversal das folhas (C, G, K, O); raízes (D, H, L, P). **Linhagens:** WT: A, B, C, D; WT*: E, F, G, H; pCambia: I, J, K, L; 1000pb: D, H, L, P. floema externo, Ep; floema interno, Ip; parênquima, Pa; xilema, Xy; tecido vascular, Vt; tricoma, Tr; mesofilo, Mp; feixe vascular Vb; cilindro vascular, Vc. Barras = 100µM.

No caule, observa-se uma pequena atividade em células do xilema e em células próximas ao floema interno, porém não consistente (Figura 18M). Assim como no estágio intermediário, a expressão de GUS foi mais acentuada na região de

borda do disco foliar, possivelmente como resultado do estresse mecânico ali ocorrido (Figura 18N). O corte transversal de folha em estágio intermediário não revelou atividade do promotor em regiões do mesofilo e do tecido (Figura 18O). Já na raiz, foi observado uma atividade um pouco mais acentuada porém, difusa e não concentrada no tecido vascular (Figura 18P).

Plantas pNAC081-1000::GUS em processo de senescência revelaram atividade de GUS em todos os órgãos analisados (Figura 19).

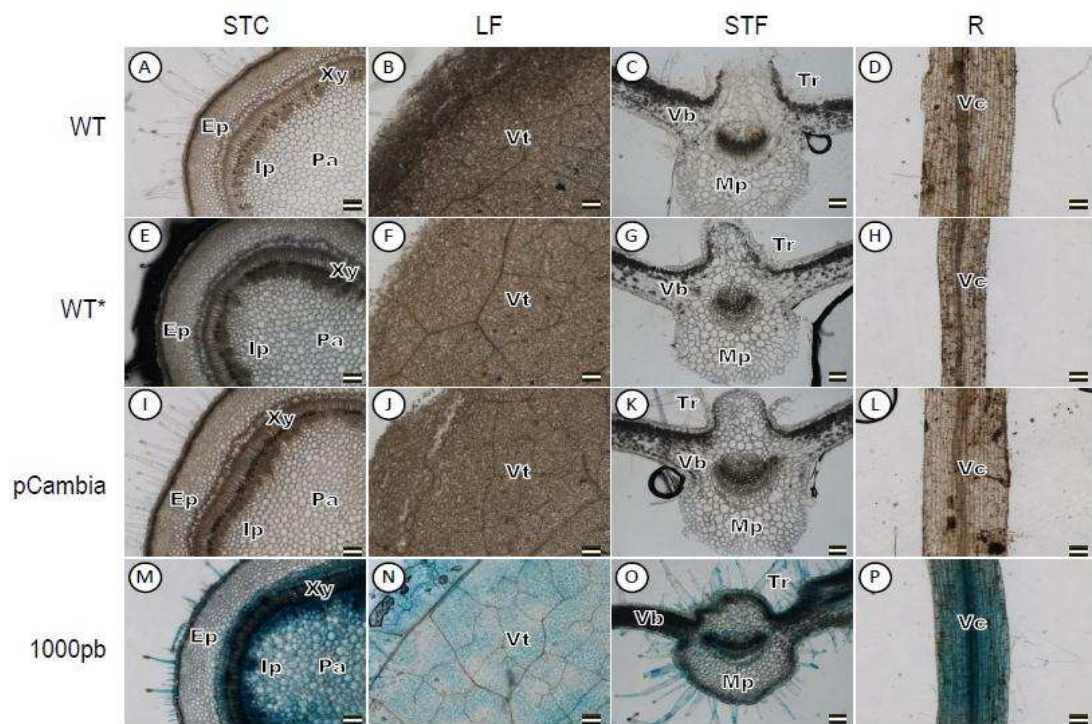


Figura 19 – Análise histoquímica da regulação tecido-específica do promotor de 1000pb do gene *GmNAC081*, fusionado a GUS em plantas cultivadas em casa de vegetação em estágio de senescência. Secção transversal do caule (A, E, I, M); disco foliar (B, F, J, N); secção transversal das folhas (C, G, K, O); raízes (D, H, L, P). **Linhagens:** WT: A, B, C, D; WT*: E, F, G, H; **pCambia:** I, J, K, L; **1000pb:** D, H, L, P. floema externo, **Ep**; floema interno, **Ip**; parênquima, **Pa**; xilema, **Xy**; tecido vascular, **Vt**; tricoma, **Tr**; mesofilo, **Mp**; feixe vascular **Vb**; cilindro vascular, **Vc**. Barras = 100µM.

Em tecidos do caule, uma forte atividade foi observada em células do xilema, floema interno e externo e também na região do parênquima (Figura 19M). Uma atividade acentuada também foi observada na região de tecidos vasculares, xilema e floema em folhas transversais (Figura 19O). A raiz de plantas pNAC081-1000::GUS em senescência também demonstrou uma forte atividade de GUS especialmente no tecido vascular (Figura 19P). Apenas nos discos foliares a atividade mostrou-se mais fraca e difusa e praticamente não foi observada no tecido vascular (Figura 19N).

GmNAC081 atua como regulador positivo do processo de senescência foliar, sob condições normais de desenvolvimento (Mendes *et al.*, 2013). A família de fatores de

transcrição NAC também desempenha papel importante nas redes de proteínas reguladoras em resposta a estresse e a senescência em outras espécies, como *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* (Jensen & Skriver, 2014).

Nesta investigação análises histoquímicas e fluorimétricas demonstraram que o promotor de 1000pb de *GmNAC081* foi fortemente induzido em tecidos em estádios avançados de desenvolvimento. Coletivamente, estes resultados confirmam a natureza regulatória de *GmNAC081* em eventos de morte celular.

5. CONCLUSÕES

Através de análises fluorimétricas quantitativas de GUS, os resultados da presente investigação mostraram que sequências entre -1000 a -750 e entre -750 a -500 são necessárias para a indução do promotor de *GmNAC081* em condições de estresse osmótico e no retículo endoplasmático. Também revelaram que a atividade do promotor de 1000pb de *GmNAC081* está relacionada às condições de cultivo de plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum*. E ainda, consistente com o papel de do gene *GmNAC081* em vias de morte celular e senescência (Faria et al., 2011, Reis et al., 2011, Mendes et al., 2013) a presente investigação demonstrou que a atividade do promotor de 1000pb de *GmNAC081* está relacionada ao processo de senescência em plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum*.

Através de análises histoquímicas o presente trabalho também pode verificar que a região 5' de -1000pb que flanqueia o gene *GmNAC081* é induzível por estresses osmótico e no retículo endoplasmático em diferentes orgaos e tecidos. Sendo que, sequências a -1000pb do promotor de *GmNAC081* foram capazes de direcionar a expressão no tecido vascular em plantas cultivadas *in vitro*. Além disso, nossos resultados demonstraram que o promotor de *GmNAC081* é fortemente induzido em tecidos em estádios avançados de desenvolvimento. Assim sendo, coletivamente os resultados da presente investigação contribuíram fortemente para a elucidação da natureza regulatória de *GmNAC081* em eventos de morte celular.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, M. S., Reis, P. a B., Dadalto, S. P., Faria, J. a Q. a, Fontes, E. P. B., & Fietto, L. G. (2011). A novel transcription factor, ERD15 (Early Responsive to Dehydration 15), connects endoplasmic reticulum stress with an osmotic stress-induced cell death signal. *The Journal of biological chemistry*, 286(22), 20020–30. doi:10.1074/jbc.M111.233494
- Alves, M. S., Reis, P. a B., Dadalto, S. P., Faria, J. a Q. a, Fontes, E. P. B., & Fietto, L. G. (2011). A novel transcription factor, ERD15 (Early Responsive to Dehydration 15), connects endoplasmic reticulum stress with an osmotic stress-induced cell death signal. *The Journal of biological chemistry*, 286(22), 20020–30. doi:10.1074/jbc.M111.233494
- Bradford M (1976) Photometric methods for protein determination. Procedures and analysis. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Carvalho, H. H., Brustolini, J. B., Pimenta, M. R., Mendes, G. C., Gouveia, B. C., Silva, P. A. Silva, C. F., Mota, C. S., Mota, C., Ramos, J. L. S., Fontes, E. P. B. (2014). The Molecular Chaperone Binding Protein BiP Prevents Leaf Dehydration-Induced Cellular Homeostasis Disruption, 9(1). doi:10.1371/journal.pone.0086661
- Cascardo, J. C. M., Almeida, R. S., Buzeli, R. A. A., Sônia, M. B., Otoni, W. C., Elizabeth, P., & Fontes, B. (2000). POST-TRANSLATION MODIFICATION AND DEGRADATION: The Phosphorylation State and Expression of Soybean BiP Isoforms Are Differentially Regulated following Abiotic Stresses The Phosphorylation State and Expression of Soybean BiP Isoforms Are Differentially Regulated following Abiotic Stresses *. doi:10.1074/jbc.275.19.14494
- 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.
- Cenci, A., Guignon, V., Roux, N., & Rouard, M. (2014). Genomic analysis of NAC transcription factors in banana (*Musa acuminata*) and definition of NAC orthologous groups for monocots and dicots. *Plant molecular biology*, 85(1-2), 63–80. doi:10.1007/s11103-013-0169-2
- Chen, M.-X., Lung, S.-C., Du, Z.-Y., & Chye, M.-L. (2013). Engineering plants to tolerate abiotic stresses. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(1), 81–87. doi:10.1016/j.bcab.2013.09.010
- Costa, M. D. L., Reis, P. a B., Valente, M. A. S., Irsigler, A. S. T., Carvalho, C. M., Loureiro, M. E., Aragão, F. J. L., et al. (2008). A new branch of endoplasmic

reticulum stress signaling and the osmotic signal converge on plant-specific asparagine-rich proteins to promote cell death. *The Journal of biological chemistry*, 283(29), 20209–19. doi:10.1074/jbc.M802654200

- Dubou, V., & Grasel, L. F. (2011). CARACTERIZAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DA CULTURA DO TABACO. Apresentado no XVII Congresso Brasileiro de Agrometeorologia – 18 a 21 de Julho de 2011 – SESC Centro de Turismo de Guarapari, Guarapari - ES.
- Faria, J. A. Q. A., Reis, P. A. B., Reis, M. T. B., Rosado, G. L., Pinheiro, G. L., Mendes, G. C., & Fontes, E. P. B. (2011). The NAC domain-containing protein , GmNAC6 , is a downstream component of the ER stress- and osmotic stress-induced NRP-mediated cell-death signaling pathway. *BMC Plant Biology*, 11(1), 129. doi:10.1186/1471-2229-11-129
- Fior, S., Vianelli, A., & Gerola, P. D. (2009). A novel method for fluorometric continuous measurement of β -glucuronidase (GUS) activity using 4-methyl-umbelliferyl- β -d-glucuronide (MUG) as substrate. *Plant Science*, 176(1), 130–135. doi:10.1016/j.plantsci.2008.10.001
- Franco-Zorrilla, J. M., López-Vidriero, I., Carrasco, J. L., Godoy, M., Vera, P., & Solano, R. (2014). DNA-binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(6), 2367–72. doi:10.1073/pnas.1316278111
- Hasegawa PM, Bressan RA, Handa AK (1984) Cellular mechanisms of tolerance to water stress. *Hortscience*, 19: 371-377.
- Hayashi, S., Takahashi, H., Wakasa, Y., Kawakatsu, T. and Takaiwa, F. (2013) Identification of a cis-element that mediates multiple pathways of the endoplasmic reticulum stress response in rice. *Plant J.* 74, 248-257.
- Irsigler, A. S. T., Costa, M. D. L., Zhang, P., Reis, P. a B., Dewey, R. E., Boston, R. S., & Fontes, E. P. B. (2007). Expression profiling on soybean leaves reveals integration of ER- and osmotic-stress pathways. *BMC genomics*, 8, 431. doi:10.1186/1471-2164-8-431
- Iwata, Y., Fedoroff, N.V. and Koizumi, N. (2008) Arabidopsis bZIP60 is a proteolysis-activated transcription factor involved in the endoplasmic reticulumstress response. *Plant Cell*, 20, 3107-3121.
- Jefferson, R. A. (1987). Assaying Chimeric Genes in Plants : The GUS Gene Fusion System. *PLANT MOLECULAR BIOLOGY REPORTER*, 5(1), 387–405.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., & Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: ,B-glucuronidase. *The EMBO Journal*, 6(13), 3901–3907.

- Jensen, M. K., & Skriver, K. (2014). NAC transcription factor gene regulatory and protein-protein interaction networks in plant stress responses and senescence. *IUBMB life*, (13), 1–11. doi:10.1002/iub.1256
- Kokame, K., Kato, H. and Miyata, T. (2001) Identification of ERSE-II, a new cis-actin element responsible for the ATF6-dependent mammalian unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* 276, 9199–9205.
- Le, D. T., Nishiyama, R., Watanabe, Y., Mochida, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., & Tran, L.-S. P. (2011). Genome-wide survey and expression analysis of the plant-specific NAC transcription factor family in soybean during development and dehydration stress. *DNA research: an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*, 18(4), 263–76. doi:10.1093/dnares/dsr015
- Li, W., & Guo, Y. (2014). Transcriptome , transcription factors and transcriptional regulation of leaf senescence. *Journal of Bioinformatics and Comparative Genomics*, 1, 1–4.
- Liu, J.X. and Howell, S.H. (2010a) bZIP28 and NF-Y transcription factors are activated by ER stress and assemble into a transcriptional complex to regulate stress response genes in Arabidopsis. *Plant Cell*, 22, 782–796.
- Mccabe DE, Swain WF, Martinell BJ, Christou P (1988) Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle bombardment. *Biotechnology*, 6: 923-926.
- Mendes, G. C., Reis, P. a B., Calil, I. P., Carvalho, H. H., Aragão, F. J. L., & Fontes, E. P. B. (2013). GmNAC30 and GmNAC81 integrate the endoplasmic reticulum stress- and osmotic stress-induced cell death responses through a vacuolar processing enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(48), 19627–32. doi:10.1073/pnas.1311729110
- Mori, K., Kawahara, T., Yoshida, H., Yanagi, H. and Yura, T. (1996) Signalling from endoplasmic reticulum to nucleus: transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway. *Genes Cells*, 1, 803–817.
- Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2014). The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. *Frontiers in plant science*, 5(May), 170. doi:10.3389/fpls.2014.00170
- Nuruzzaman, M., Sharoni, A. M., & Kikuchi, S. (2013). Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. *Frontiers in microbiology*, 4(September), 248. doi:10.3389/fmicb.2013.00248

- Pinheiro, G. L. (2007). 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.
- Pinheiro, G. L., Marques, C. S., Costa, M. D. B. L., Reis, P. a B., Alves, M. S., Carvalho, C. M., Fietto, L. G., et al. (2009). Complete inventory of soybean NAC transcription factors: sequence conservation and expression analysis uncover their distinct roles in stress response. *Gene*, 444(1-2), 10–23. doi:10.1016/j.gene.2009.05.012
- Reis, P. A. B., & Fontes, E. P. B. (2013). Cell Death Signaling From the Endoplasmic Reticulum in Soybean. *INTECH* (pp. 260–271).
- Rosado, G. L. (2012). INDUÇÃO DO PROMOTOR GmNAC6 POR ELICITORES DE ESTRESSES E MAPEAMENTO DE REGIÕES REGULADORAS. 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.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniats T (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Ed.2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Shen, X.H., Ellis, R.E., Lee, K. et al. (2001) Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required for *C. elegans* development. *Cell*, 107, 893–903.
- Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of experimental botany*, 58(2), 221–7. doi:10.1093/jxb/erl164
- Sun, L., Yang, Z.-T., Song, Z.-T., Wang, M.-J., Sun, L., Lu, S.-J., & Liu, J.-X. (2013). The plant-specific transcription factor gene NAC103 is induced by bZIP60 through a new cis-regulatory element to modulate the unfolded protein response in *Arabidopsis*. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 76(2), 274–86. doi:10.1111/tpj.12287
- Tran, L.-S. P., Nishiyama, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2010). Potential utilization of NAC transcription factors to enhance abiotic stress tolerance in plants by biotechnological approach. *GM crops*, 1(1), 32–9. doi:10.4161/gmcr.1.1.10569
- Wang, Y., Shen, J.S., Arenzana, N., Tirasophon, W., Kaufman, R.J. and Prywes, R. (2000) Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. *J. Biol. Chem.* 275, 27013–27020

- Wang, Z., & Dane, F. (2013). NAC (NAM/ATAF/CUC) transcription factors in different stresses and their signaling pathway. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(5), 1397–1408. doi:10.1007/s11738-012-1195-4
- Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T. and Mori, K. (1998) Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J. Biol.Chem.* 273, 33741-33749
- Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M. and Mori, K. (2000) ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y(CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol. Cell. Biol.* 20, 6755-6767.

ANEXO

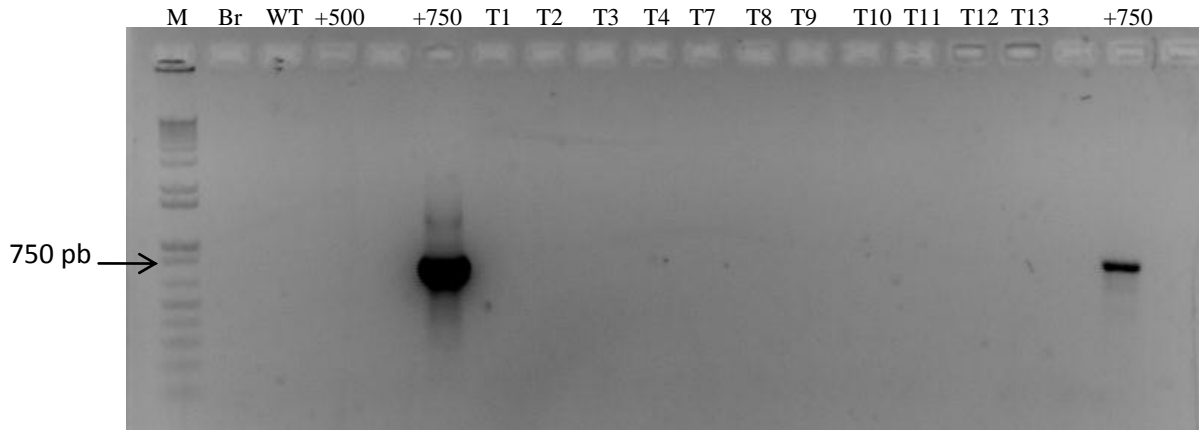


Figura S1 Diagnóstico molecular de plantas transgênicas baseado em PCR. Gel de confirmação das plantas com promotor de 500pb de NAC081 fusionado a GUS e de linhagens transgênicas pNAC081-750::GUS utilizadas como controles na amplificação de fragmentos de 750pb.. As setas à esquerda indicam a mobilidade eletroforética do tamanho de 750pb 750pb.O gel mostra a não amplificação de fragmentos de 500pb que corresponderiam a plantas pNAC081500::GUS utilizadas nos experimentos com PEG e TUN.

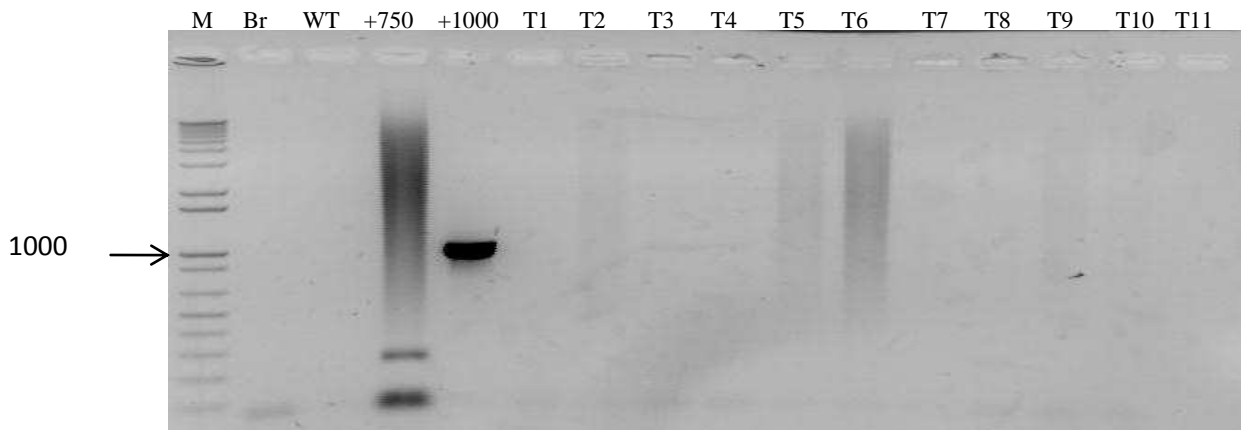


Figura S2 Diagnóstico molecular de plantas transgênicas baseado em PCR. Gel de confirmação das plantas com promotor de 750pb de NAC081 fusionado a GUS e de linhagens transgênicas pNAC081-1000::GUS utilizadas como controles na amplificação de fragmentos de 1000pb.As setas à esquerda indicam a mobilidade eletroforética do tamanho de 1000pb..O gel mostra a não amplificação de fragmentos de 750pb que corresponderiam a plantas pNAC081750::GUS utilizadas nos experimentos com PEG e TUN

Tabela S1 – O promotor do gene *GmNAC081* (1 Kb upstream ao ATG) foi submetido aos programas Place (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) e PlantPam (http://plantpan.mbc.nctu.edu.tw/seq_analysis.php). Através do enriquecimento pela distribuição binomial com p-value < 0,01 foram encontrados 25 prováveis motivos de ligação ao DNA associados a fatores transcripcionais.

| Factor or Site Name | Binding-site | Number of copies | P-value* | Description |
|---------------------|--------------|------------------|-----------|--|
| ARR1AT | NGATT | 6 | 4,16E-03 | "ARR1-binding element" found in Arabidopsis; ARR1 is a response regulator; N=G/A/C/T; AGATT is found in the promoter of rice non-symbiotic haemoglobin-2 (NSHB) gene (Ross et al., 2004); |
| CACTFTPPCA1 | YACT | 16 | 2,48E-006 | Tetranucleotide (CACT) is a key component of Mem1 (mesophyll expression module 1) found in the cis-regulatory element in the distal region of the phosphoenolpyruvate carboxylase (ppcA1) of the C4 dicot <i>F. trinervia</i> ; Y=T/C; |
| CURECORECR | GTAC | 8 | 7,24E-04 | GTAC is the core of a CuRE (copper-response element) found in <i>Cyc6</i> and <i>Cpx1</i> genes in <i>Chlamydomonas</i> ; Also involved in oxygen-response of these genes; For CuRE, see Quin and Merchant, 1995; |
| DOFCOREZM | AAAG | 17 | 2,82E-011 | Core site required for binding of Dof proteins in maize (<i>Z.m.</i>); Dof proteins are DNA binding proteins, with presumably only one zinc finger, and are unique to plants; Four cDNAs encoding Dof proteins, Dof1, Dof2, Dof3 and PBF, have been isolated from maize; PBF is an endosperm specific Dof protein that binds to prolamin box; Maize Dof1 enhances transcription from the promoters of both cytosolic orthophosphate kinase (CyPPDK) and a non-photosynthetic PEPC gene; Maize Dof2 suppressed the C4PEPC promoter; |
| GT1CONSENSUS | GRWAAW | 9 | 2,73E-008 | Consensus GT-1 binding site in many light-regulated genes, e.g., RBCS from many species, PHYA from oat and rice, spinach RCA and PETA, and bean CHS15; R=A/G; W=A/T; For a compilation of related GT elements and factors, see Villain et al. (1996); GT-1 can stabilize the TFIIA-TBP-DNA (TATA box) complex; The activation mechanism of GT-1 may be achieved through direct interaction between TFIIA and GT-1; Binding of GT-1-like factors to the PR-1a promoter influences the level of SA-inducible gene expression; |
| GT1GMSCAM4 | GAAAAA | 3 | 8,19E-005 | "GT-1 motif" found in the promoter of soybean (<i>Glycine max</i>) CaM isoform, SCaM-4; Plays a role in pathogen- and salt-induced SCaM-4 gene expression; See also S000198 (GT-1 consensus); |
| MARTBOX | TTWTWTTWTT | 2 | 1,16E-006 | "T-Box"; Motif found in SAR (scaffold |

| | | | | |
|----------------|----------|---|-----------|---|
| | | | | attachment region; or matrix attachment region, MAR); |
| MYB1AT | WAACCA | 3 | 6,043E-04 | MYB recognition site found in the promoters of the dehydration-responsive gene rd22 and many other genes in Arabidopsis; W=A/T; |
| MYBPLANT | MACCWAMC | 2 | 4,50E-04 | Plant MYB binding site; Consensus sequence related to box P in promoters of phenylpropanoid biosynthetic genes such as PAL, CHS, CHI, DFR, CL, Bz1; Myb305; M=A/C; W=A/T; See S000355; The AmMYB308 and AmMYB330 transcription factors from Antirrhinum majus regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco; |
| NODCON2GM | CTCTT | 5 | 5,02E-005 | One of two putative nodulin consensus sequences; |
| NTBBF1ARROLB | ACTTTA | 3 | 8,19E-005 | NtBBF1(Dof protein from tobacco) binding site in Agrobacterium rhizogenes (A.r.) rolB gene; Found in regulatory domain B (-341 to -306); Required for tissue-specific expression and auxin induction; |
| OSE2ROOTNODULE | CTCTT | 5 | 5,02E-005 | One of the consensus sequence motifs of organ-specific elements (OSE) characteristic of the promoters activated in infected cells of root nodules; |
| P1BS | GNATATNC | 4 | 5,32E-007 | PHR1-binding sequence found in the upstream regions of phosphate starvation responsive genes from several plant species; phr1 (phosphate starvation response 1) gene codes for PHR1 protein related to PSR1 gene in C. reinhardtii; |
| POLASIG1 | AATAAA | 5 | 2,65E-008 | "PolyA signal"; poly A signal found in legA gene of pea, rice alpha-amylase; -10 to -30 in the case of animal genes. Near upstream elements (NUE) in Arabidopsis (Loke et al. 2005); |
| POLASIG3 | AATAAT | 2 | 3,04E-03 | "Plant polyA signal"; Consensus sequence for plant polyadenylation signal; |
| POLLEN1LELAT52 | AGAAA | 9 | 3,64E-010 | One of two co-dependent regulatory elements responsible for pollen specific activation of tomato (L.e.) lat52 gene; Found at -72 to -68 region; See S000246 (POLLEN2LELAT52); AGAAA and TCCACCATA (S000246) are required for pollen specific expression; Also found in the promoter of tomato endo-beta-mannanase gene (LeMAN5) gene (Filichkin et al. 2004); |
| RAV1AAT | CAACA | 3 | 6,69E-03 | Binding consensus sequence of Arabidopsis (A.t.) transcription factor, RAV1; RAV1 specifically binds to DNA with bipartite sequence motifs of RAV1-A (CAACA) and RAV1-B (CACCTG); RAV1 protein contain AP2-like and B3-like domains; The AP2-like and B3-like domains recognize the CAACA and CACCTG motifs, respectively; The expression level of RAV1 were relatively |

| | | | | |
|-----------------|-----------|---|-----------|--|
| | | | | high in rosette leaves and roots; |
| REALPHALGLHCB21 | AACCAA | 2 | 3,04E-03 | "REalpha" found in Lemna gibba Lhcb21 gene promoter; Located at -134 to -129; Binding site of proteins of whole-cell extracts; The DNA binding activity is high in etiolated plants but much lower in green plants; Required for phytochrome regulation; |
| ROOTMOTIFTAPOX1 | ATATT | 5 | 5,02E-005 | Motif found both in promoters of rolD; |
| SEF1MOTIF | ATATTTAWW | 1 | 3,38E-03 | "SEF1 (soybean embryo factor 1)" binding motif; sequence found in 5'-upstream region (-640; -765) of soybean beta-conglucinin (7S globulin) gene; W=A/T; |
| SEF4MOTIFGM7S | RTTTTTR | 2 | 2,25E-03 | "SEF4 binding site"; Soybean (G.m.) consensus sequence found in 5'upstream region (-199) of beta-conglycinin (7S globulin) gene (Gmg17.1); "Binding with SEF4 (soybean embryo factor 4)"; R=A/G; |
| TAAAGSTKST1 | TAAAG | 4 | 6,49E-04 | TAAAG motif found in promoter of Solanum tuberosum (S.t.) KST1 gene; Target site for trans-acting StDof1 protein controlling guard cell-specific gene expression; KST1 gene encodes a K ⁺ influx channel of guard cells; |
| TATABOX5 | TTATTT | 7 | 4,04E-12 | "TATA box"; TATA box found in the 5'upstream region of pea (Pisum sativum) glutamine synthetase gene; a functional TATA element by in vivo analysis; |
| WBOXHVIS01 | TGACT | 3 | 6,69E-03 | SUSIBA2 bind to W-box element in barley iso1 (encoding isoamylase1) promoter; |
| WBOXNTERF3 | TGACY | 5 | 1,09E-03 | "W box" found in the promoter region of a transcriptional repressor ERF3 gene in tobacco; May be involved in activation of ERF3 gene by wounding;(Nishiuchi et al., 2004) Y=C/T; |

Tabela S2 - Escala fenológica da cultura do tabaco. (Dubou & Grasel, 2011)

| Estádio | Descrição |
|----------------|---|
| V0 | Semeadura |
| VT | Transplante: mudas transplantadas para a lavoura; |
| V1 | Planta com 1 folha (maior que 4 cm de comprimento); |
| V2 | Planta com 2 folhas (maiores que 4 cm de comprimento); |
| Vx | Planta com x folhas (maiores que 4 cm de comprimento); |
| EC | Elongação do colmo: espaço entre a inserção de duas folhas consecutivas no colmo superior a 3 cm; |
| SI | Surgimento da inflorescência (torna-se visível); |
| IA | Início da antese (florescimento): abertura da primeira flor da inflorescência; |
| MA | Metade da antese: metade das flores da inflorescência abertas; |
| FA | Final da antese: todas as flores abertas; |
| 1C | Primeira colheita; |
| 2C | Segunda colheita; |
| xC | X colheita |
| xCf | X colheita final (última colheita) |

Obs.: No estágio de VT as plantas normalmente se encontram com 3-5 folhas. A representação da colheita é realizada pelo seu número seguido da letra "C" e, para identificar a última colheita, acrescenta-se a letra "f".



Figura S3- Representação de transformantes pNAC081-1000::GUS em estágio inicial de senescência, selecionadas para os ensaios experimentais de atividade do promotor de -1000pb de GmNAC081 em diferentes fases de desenvolvimento. Da esquerda para a direita: WT, pCambiae WT* e dois transformantes. O controle WT* refere-se a plantas segregantes dos transformantes primários, geração T2, que perderam o transgene e reverteram ao genótipo WT.



Figura S5- Amostra representativa do transformante pNAC081-500::GUS, provenientes de cultivo *in vitro* . Os clones foram multiplicados a partir do isolamento gemas laterais e 40 dias após foram selecionados para ensaio histoquímico de atividade do promotor de *GmNAC081* sob estímulos com PEG e TUN.



Figura S5- Ensaio histoquímico em botão floral de plantas transgênicas pNAC081-1000::GUS provenientes de casa de vegetação utilizadas em ensaios para avaliar a expressão tecido-específica do promotor de 1000pb de *GmNAC081* no estágio de florescimento. Da esquerda para a direita: WT, pCambia, e transformante pNAC0811000::GUS .