

GUSTAVO LEÃO ROSADO

**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
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

R788i
2012

Rosado, Gustavo Leão, 1981-

Indução do promotor GmNAC6 por elicitores de estresses e mapeamento de regiões reguladoras / Gustavo Leão Rosado. – Viçosa, MG, 2012.
xi, 70f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 65-70

1. Plantas - Efeito do stress. 2. Stress (Fisiologia). 3. Soja.
4. Biologia molecular. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 22. ed. 632.1

GUSTAVO LEÃO ROSADO

**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*.

APROVADA: 23 de fevereiro de 2012.

Marília Contin Ventrella

Elisa Cristina S. de Carvalho

Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Orientadora)

“Solidão não é estar só, solidão é estar vazio”

Cecília Meireles

*Aos meus pais Sebastião e
Maria das Graças, aos meus irmãos
Luciana e Rodrigo e a futura esposa
Cláudia.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser infinito em amor, bondade e presença constante na minha vida, tendo sido fiel até hoje em todos os momentos, nunca me deixando enfraquecer ou perder o foco dos meus objetivos.

Aos meus pais, Bastião e Gracinha, pelo amor, incentivo e pelo fuscão, João de barro. Ao meu grande irmão, Rodrigo, por ser um rapaz muito desagradável. A minha querida irmã, Luciana, por encher minha paciência; amo vocês.

À minha querida presente e futura “esposinha”, por ter uma enorme paciência e consideração com uma pessoa extremamente chata e que tem as piores piadas do mundo. Te amo demais.

À Professora Elizabeth Fontes por todo conhecimento transmitido, ensinamentos, paciência durante meu processo de aprendizado, dedicação, orientação no sentido genuíno da palavra e por confiar em mim desde a época de IC e no decorrer dos trabalhos.

Ao laboratório de anatomia vegetal – DBV – principalmente a professora Luzimar, por conceder muitas ajudas e um bom ambiente de trabalho.

A professora Juliana Ramos pela amizade e companheirismo.

Ao professor Luciano Gomes Fietto pela amizade e pela primeira bolsa.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de concluir o curso de mestrado e por poder vivenciar o ensino e a pesquisa.

Ao Departamento de Bioquímica pela possibilidade de participar do programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

A todos do LBMP, que conseguiram conviver diariamente com quem vos fala, por ter tirado e criado muitas dúvidas, por ter deixado sobrar uma canaleta no gel, tirado o PCR, aguçado minhas plantas, cortado “rolopack”, roubado meu LB e placas na geladeira; obrigado por tudo isso – AMO VCS.

Um grande abraço ao João Paulo (padrinho), Pedro, Gisa, Cris, Mai, Kênia

A Elisa por ter ajudado tanto nos meus experimentos e ensinamentos de vida.

Marlene, Glaucia, Zé gatão (Adriano) e Wellinton aquele abraço...

A Daniele, da anatomia, que me ajudou demais nos cortes histológicos, até nos finais de semana.

Aos Amigos de Viçosa, Vitor, Guigão e Dani (bandido) por excelentes papos nos finais de semana.

Aos amigos que sinto muita falta, Túlio, Tiaguinho de Ponte Nova, Fanta, Queridão e Hugo.

A todos que passaram pela minha vida e que me ajudaram a crescer;

A todos que ajudaram direta e indiretamente na obtenção deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	3
Soja: O grão mais importante da nossa balança comercial.....	3
Promotores: A regulação começa aqui.....	5
Elicitores de estresse.....	9
Fatores de transcrição.....	12
Fatores de transcrição da família NAC.....	13
NAC e o estresse biótico.....	15
NAC e o estresse abiótico.....	16
NAC6, estresse abiótico e envolvimento em morte celular mediada pelas proteínas NRPs.....	17
MATERIAL E MÉTODOS.....	20
Isolamento e análise <i>in silico</i> da região promotora de NAC6.....	20
Obtenção da construção do promotor NAC6 fusionado ao gene repórter GUS.....	21
Transformação de plantas de tabaco.....	21
Indução de estresses em plântulas transgênicas.....	22
Ensaio de atividade de GUS.....	23
Análise histoquímica do padrão de resposta da expressão de GUS em plantas de tabaco transgênicas.....	24
Análise da indução do promotor de NAC6 por NRPs.....	25
RT-PCR em tempo real (qRT- PCR).....	26
Técnicas de biologia molecular.....	27
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
A região 5´ de -1000pb que flanqueia o gene gmNAC6 é induzível por estresses em todos os tecidos analisados.....	29

Esquema de regiões truncadas do promotor utilizadas para transformar tabaco e diagnóstico molecular das plantas transgênicas.....	44
Regiões discretas do promotor NAC6 contêm os cis-elementos responsivos aos estímulos testados.....	46
O promotor de <i>GmNAC6</i> é induzido por proteínas envolvidas na via de morte celular induzida pela integração dos sinais a estresses osmótico e do RE.....	56
CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

RESUMO

ROSADO, Gustavo Leão, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Indução do promotor *GmNAC6* por elicitores de estresses e mapeamento de regiões reguladoras.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Coorientadores: Juliana Rocha Lopes Soares Ramos, Luciano Gomes Fietto e Anésia Aparecida dos Santos.

As proteínas que contém o domínio NAC são específicas de plantas e são representadas por uma família gênica grande de fatores transcricionais implicados em diversos aspectos de desenvolvimento e respostas a estresses. A proteína *GmNAC6* foi recentemente identificada como componente downstream da via de sinalização de morte celular mediada pelas proteínas NRPs (N-rich proteins) e induzida por estresses no retículo endoplasmático (RE) e osmótico. Este trabalho teve como objetivo principal caracterizar a atividade do promotor de *GmNAC6* em respostas a diferentes estímulos bióticos e abióticos, focando na identificação de possíveis cis-elementos regulatórios que controlam a expressão do gene em resposta a diferentes estresses. Para tanto, a região promotora do gene *GmNAC6* (1Kb) foi isolada do banco de dados e fusionada com o gene repórter *GUS*. Essas construções foram integradas no genoma de plantas de tabaco por meio de transformação mediada por *Agrobacterium* a fim de avaliar a ativação transcricional do gene *GmNAC6* tecido-específica e induzida por diferentes estímulos. Os transformantes primários foram monitorados por PCR e expostos a diferentes hormônios e tratamento de estresses, como tunicamicina, polietileno glicol, cicloheximida, BAP, ácido salicílico, ácido jasmônico e ácido abscísico. Em seguida, a atividade do gene repórter foi avaliada qualitativamente por análise histoquímica e quantitativamente por análise fluorimétrica. Exceto por PEG que não induziu o promotor nos tecidos vasculares do caule, os demais estímulos induziram um padrão uniforme de atividade do promotor NAC6. Contudo o nível de expressão variou com o tipo

de tecido. Consistente com o envolvimento de *GmNAC6* em morte celular, a atividade de GUS foi mais pronunciada em tecidos mais velhos, exceto por tratamento com ABA que induziu altos níveis de atividade do promotor em folhas jovens. Similarmente, o nível relativo de expressão de GUS pareceu significativamente mais alto em tecidos sob diferenciação.

Por meio de deleções de regiões do promotor e análise *in sílico* de putativos cis-elementos responsivos a estímulos em promotores de plantas, foi possível delimitar módulos discretos no promotor de NAC6 contendo vários elementos regulatórios positivos e negativos com o potencial de influenciar a indução do promotor aos estímulos testados. O promotor em estudo foi induzido por todos os estresses testados, sendo induzido mais fortemente por hormônios que regulam a senescência e a resposta biótica, como ataque de patógenos e ferimento. Foi demonstrado também que o promotor é induzido pelas proteínas NRPs, evidenciando a participação na via integrativa que vai culminar em morte celular. O promotor também foi induzido por NAC32, uma proteína da mesma família NAC e que foi identificada previamente por meio de sua capacidade de interagir com NAC6. Coletivamente esses resultados indicam que a indução do gene NAC6 a diferentes estresses e hormônios ocorre no nível transcricional por meio de módulos discretos do promotor que contem cis-elementos regulatórios positivos e negativos. Além disso, os presentes resultados confirmam a participação de NAC6 como componente da via de resposta a estresses no RE e osmótico, mediada pelas proteínas NRPs.

ABSTRACT

ROSADO, Gustavo Leão, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Induction of the promoter *GmNAC6* by elicitors of stress and mapping of regulatory regions.** Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-advisers: Juliana Rocha Lopes Soares Ramos, Luciano Gomes Fietto and Anésia Aparecida dos Santos.

NAC domain-containing proteins are unique to plants and comprise a large gene family of transcriptional factors implicated in diverse aspects of plant development and stress responses. The *GmNAC6* was recently identified as a downstream component of the ER (endoplasmic reticulum) stress- and osmotic stress-induced NRP (N-rich proteins)-mediated cell death signaling pathway. This investigation aimed at characterizing the *GmNAC6* promoter activity in response to different biotic and abiotic stimuli, focusing on the identification of possible cis-regulatory elements that control *GmNAC6* expression. For this, 1-kb 5' flanking sequences of *GmNAC6* gene were isolated from the soybean genome, fused to the β -glucuronidase (GUS) reporter gene and introduced in *N. tabacum* by *Agrobacterium*-mediated transformation in order to study tissue-specific and stress-induced transcriptional activation of *GmNAC6* gene. Primary transformants were monitored by PCR and exposed to different hormones and stress treatments, such as tunicamycin, polyethylene glycol, cycloheximide, BAP, salicylic acid, jasmonic acid and abscisic acid. Gene reporter activity was monitored qualitatively by histochemical analyses and quantitatively by fluorometry. Except for PEG that failed to induce promoter activity in the vascular tissues of stems, all the other treatments promoted a systemic induction of promoter activity in all tissues analyzed, displaying a ubiquitous pattern of cell staining. Nevertheless, the level of expression varied with tissue type. Consistent with the involvement of *GmNAC6* in cell death, GUS staining was more prominent in older tissues, except for treatment with ABA that displayed higher levels of promoter activity in young leaves. Likewise, the relative level of GUS expression appeared significantly higher in tissues under differentiation.

Deletions of the promoter and *in silico* analysis of putative cis-elements responsive to stimuli from plant promoters allow the identification of discrete modules on NAC6 promoter harboring putative positive and negative cis-elements potentially capable of interfering with promoter induction. All the tested stimuli induced promoter activity, displaying the highest level of induction to hormones that control senescence and biotic response to pathogens and wounding. Furthermore, the promoter was also induced by NRPs, substantiating the argument that *GmNAC6* participates in the ER stress and osmotic stress integrative pathway those results in cell death. *GmNAC32*, another NAC transfactor identified through interaction with *GmNAC6*, also induced NAC6 promoter. Taken together, these results indicate that the NAC6 gene is transcriptionally induced by different stresses and hormones through discrete regulatory modules on the promoter that harbor positive and negative cis-elements. Furthermore, the present data confirm that NAC6 acts downstream of NRPs in the cell death stress-induced signaling pathway.

INTRODUÇÃO

As plantas estão sujeitas a um ambiente dinâmico e adverso que constantemente impõe condições limitantes de crescimento e desenvolvimento. Embora compartilhem mecanismos fundamentais de sobrevivência com outros organismos eucariotos, devido a sua imobilidade, adquiriram com a evolução sistemas distintos de adaptação ambiental (Hao *et al.*, 2010). Em se tratando de cultivares agronomicamente relevantes, como a soja que ocupa lugar de destaque no cenário nacional e internacional, esta restrição na produtividade agrícola pode resultar em perdas econômicas significativas. Entre as principais adversidades abióticas e bióticas, destacam-se os extremos de temperatura, deficiência de água, alta salinidade, herbivoria e ataque de patógenos. A base genética da tolerância ao estresse é complexa e desconhecida. Contudo, todos os organismos, nesse caso especificamente as plantas, a fim de lidarem com as adversidades, que variam com a localização geográfica e com as estações do ano, ativam uma série de mecanismos de defesa. Esses mecanismos de defesa têm como funções aumentar a tolerância às condições desfavoráveis impostas por essas limitações (Tran *et al.*, 2010).

Este processo de adaptação ou aclimação induzida evoluiu em todo o reino vegetal e é fundamental para a sobrevivência de todas as plantas. Além do mais, o evento de adaptação ao estresse ambiental vai desde a percepção dos sinais à subsequente transdução dos mesmos que, por sua vez, pode ser dependente ou independente de hormônios específicos, levando à ativação de

respostas fisiológicas e metabólicas (Tran *et al.*, 2010). As respostas adaptativas envolvem uma reprogramação da expressão gênica na qual resulta na ativação de uma série de genes promovendo tolerância ao estresse. Embora a vasta maioria desses genes responsivos a estresse possua funções desconhecidas, muitos dos genes envolvidos nas vias de transdução de sinal, desde sua percepção até a expressão de genes, têm sido descritos, principalmente, os fatores de transcrição e cis-elementos regulatórios envolvidos.

Entre os fatores de transcrição caracterizados, particularmente de interesse nesse trabalho de pesquisa, está o gene *GmNAC6* que é induzido pela via de sinalização que integra os sinais de estresses no RE e osmótico, resultando em uma resposta de morte celular. Tais processos de resposta celular e molecular aos estímulos ambientais têm sido exaustivamente estudados por nosso grupo de pesquisadores, devido à relevância dessa via de sinalização integrativa em acomodar respostas adaptativas. Entretanto, os mecanismos de ativação dos genes *GmNAC6* são totalmente desconhecidos e, conseqüentemente, a identificação de cis-elementos que regulam a atividade do promotor de *GmNAC6* constitui o objetivo primordial desse projeto. Uma maior compreensão de como os fatores de transcrição NACs atuam sob diversas situações de estresses pode fornecer subsídios para o desenvolvimento de estratégias moleculares para melhorar a produtividade e reduzir perdas econômicas de importantes cultivares sob condições de estresses.

REVISÃO DE LITERATURA

- **SOJA: O GRÃO MAIS IMPORTANTE DA NOSSA BALANÇA COMERCIAL**

A soja é um grão muito versátil que dá origem a produtos e subprodutos usados pela agroindústria, indústria química e de alimentos. Na alimentação humana, a soja faz parte da composição de vários produtos embutidos, em chocolates, temperos para saladas, entre outros produtos. Seu uso mais conhecido, no entanto, é como óleo refinado, obtido a partir do óleo bruto e, mais recentemente, a soja vem crescendo também como fonte alternativa de combustível. O biodiesel de soja está sendo testado por instituições de pesquisa, além de já ser usado em várias agroindústrias (EMBRAPA, 2011).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja atrás apenas dos EUA. Na safra 2010/2011, a cultura ocupou uma área de 24,2 milhões de hectares, o que totalizou uma produção de 75 milhões de toneladas. A produtividade média da soja brasileira foi de 3106 kg por hectares (CONAB, 2011; Soystats, 2011) (Figura 1).

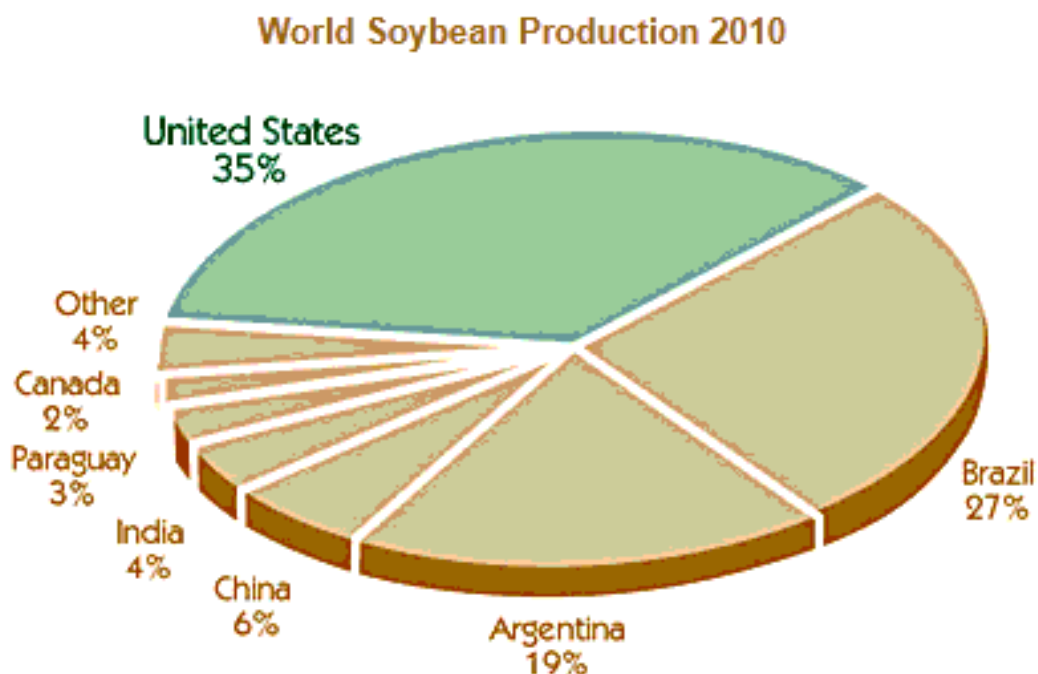


Figura 1. Produção mundial de soja em 2010 (Fonte: Soystats – 2011)

Com este elevado índice de produtividade, o Brasil vem batendo recordes de produção de soja a cada ano. Sendo assim a soja ocupa lugar de destaque no que se refere ao agronegócio do Brasil, contribuindo consideravelmente para o superávit da balança comercial. Diante desses dados, torna-se de suma importância delimitar estratégias moleculares para que possamos melhorar este cenário tão promissor e uma abordagem neste sentido seria o estudo de estresse ambiental, principal fator que restringe o aumento da nossa fronteira agrícola.

- **PROMOTORES: A REGULAÇÃO COMEÇA AQUI**

O promotor é o processador central da regulação de um gene, uma vez que contém os sítios de ligação para os complexos protéicos das RNA polimerases, responsáveis pela transcrição gênica (Baumann *et al.*, 2010). Um promotor possui uma região proximal denominada promotor-núcleo que está situada próxima ao sítio de início da transcrição.

O promotor-núcleo é a mínima região de DNA contíguo suficiente para direcionar precisamente o início da transcrição através da maquinaria da RNA polimerase II. Em geral, o promotor-núcleo pode se localizar numa região que se estende por ~40 nucleotídeos, tanto na direção posterior quanto anterior ao sítio de início de transcrição. Há vários elementos conservados num promotor-núcleo, como o TATAbox, o iniciador (Inr), o elemento de reconhecimento ao TFIIB (BRE) e o elemento do promotor posterior (DPE), mas, em muitos outros casos, não há conservação dessas regiões, de modo que aparentemente não existem elementos universais no promotor-núcleo (Baumann *et al.*, 2010).

O TATA-box foi o primeiro elemento de promotor-núcleo identificado em eucariotos (Goldberg, 1979; Breathnach e Chambon, 1981) e se localiza tipicamente entre 25-30 nucleotídeos acima do ponto de início de transcrição. A sequência consenso se apresenta como “TATAAA”, muito embora, variações de um ou dois nucleotídeos em relação à sequência consenso, e de posição relativa ao sítio de início de transcrição sejam observados.

O promotor-núcleo não pode ser considerado um elemento passivo tendo como função única, direcionar o acoplamento correto da maquinaria de

transcrição da RNA polimerase II. Esse atua também como uma região de elementos *cis*-regulatórios atuante que determinam a especificidade para um complexo transcricional distinto e para outros elementos regulatórios mais distais, como os enhancers (Baumann *et al.*, 2010).

Em eucariotos, o promotor núcleo serve como plataforma para integrar todos os estímulos ou proteínas repressoras que estão envolvidas na atividade da regulação transcricional. Além do promotor núcleo, sequências *cis*-reguladoras de DNA contribuem para a regulação da expressão gênica, como os elementos proximais, “enhancers”, “silencers” e isoladores, ao qual contem sequência específicas de ligação ao DNA para ligação de fatores de transcrição. Esses elementos podem estar situados em diversas distâncias, podendo estar a 100kb em mamíferos (Figura 2; Gershon e Kadonaga, 2010).

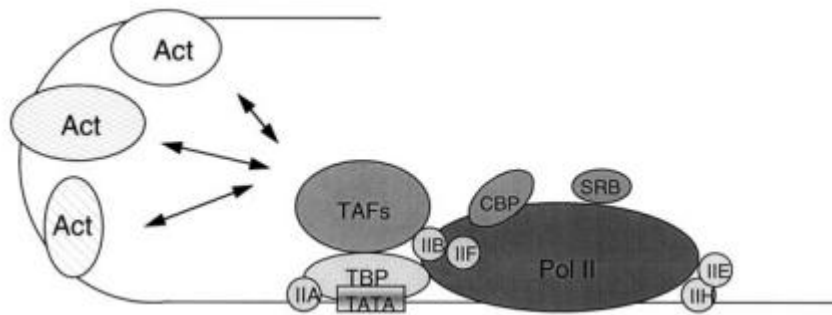


Figura 2. Esquema mostrando a formação do promotor núcleo e ativadores (Sing,1998).

No entanto, em células eucarióticas, o DNA genômico está complexado com grupos de proteínas para formar a cromatina. Um dos maiores papéis da cromatina é facilitar o empacotamento do DNA no núcleo, mas a estrutura formada leva a uma supressão da atividade gênica. Logo, para que a transcrição ocorra, a cromatina próxima do gene deve ser remodelada para

permitir o acesso de fatores de transcrição e o recrutamento da polimerase II para a formação do complexo de iniciação (CI). Esses fatores de transcrição têm papéis essenciais na regulação da expressão gênica, como o remodelamento da cromatina, recrutamento e estabilização do CI (Kaufmann *et al.*, 2010). Para que os fatores de transcrição encontrem os cis-elementos alvos, através do remodelamento, diversos tipos de regulação são necessários. A principal e mais estudada é a acetilação de histonas. Inicialmente proposta em 1964, a acetilação ocorre nos resíduos de lisina na cauda amino-terminal que se projetam a partir da superfície do nucleossomo. A função da acetilação é neutralizar as cargas positivas das caudas das histonas provocando assim uma diminuição da afinidade dessas caudas pelo DNA. Contudo a acetilação está correlacionada com a atividade transcricional, enquanto que a desacetilação de histonas está correlacionada com a repressão transcricional (Singh, 1998).

Os fatores de transcrição regulatórios são divididos em classes baseados no seu tipo de regulação. A principal classe de fatores de transcrição são os ativadores e repressores. Essas proteínas são responsáveis por ligação direta em sítios específicos de regulação contidas no DNA (*cis*-elementos regulatórios) encontrados em determinados promotores alvos e são fundamentais para dar origem ao processo de regulação gênica específica. A segunda classe de fatores de transcrição são os co-ativadores e co-repressores. Essas proteínas medeiam à transcrição de ativadores/repressores específicos, na maioria das vezes por remodelação da cromatina. Considerando que essa classe de fatores de transcrição não são capazes de se ligar ao DNA

por conta própria, eles podem atuar especificamente em promotores definidos através do resultado da interação proteína-proteína com específicos ativadores e repressores.

Uma terceira classe compreende os fatores de transcrição que fazem parte do complexo de iniciação da polimerase II. A quarta classe engloba os fatores de transcrição arquitetônicos, envolvidos na remodelação do DNA, como por exemplo, nas curvas de indução que aproximam proteínas ao promotor ou proteínas a ativadores (Kaufmann *et al.*, 2010).

Já está claro que o principal método de regulação da transcrição é a combinação de diversos tipos de controle. Muitos genes são regulados por múltiplos ativadores de transcrição em virtude de ter um conjunto de proteínas e sítios de ligação em seus promotores. Em um dado momento, um conjunto de fatores de transcrição pode se ligar a esses sítios de regulação para dar origem a um complexo nucleoprotéico que são denominados “enhanceossomo”. As interações específicas que formam o enhanceossomo, bem como a interação da maquinaria transcricional pode levar a cooperatividade de interação com o DNA. A composição do enhanceossomo pode mudar de acordo com os estímulos ambientais, sinais de desenvolvimento e outros. Assim é possível formar um número muito grande de distintos enhanceossomos usando um número discreto de fatores de transcrição em diferentes combinações. Logo, é baseado nessas interações combinatórias que um dado fator de transcrição pode desempenhar varias funções e ajudar a regular vários genes cuja expressão é induzida por sinais distintos.

Em resumo, sabe-se que regiões promotoras de genes induzidos por estresse contêm *cis*-elementos regulatórios envolvidos na expressão em resposta ao estresse e vários transfatores estão envolvidos na regulação desses genes induzíveis. Sendo assim, análises precisas de *cis*-elementos regulatórios e seus fatores de transcrição podem nos fornecer um acurado entendimento de sistemas regulatórios de genes que respondem a diferentes estresses.

- **ELICITORES DE ESTRESSE**

Os elicitores de estresse são compostos químicos com a finalidade de promover, mimetizar ou desencadear uma resposta a qual vai culminar em um determinado tipo de estresse. Sendo assim esses compostos podem imitar intempéries da natureza ou fazer parte de via de transdução de sinal em resposta a determinada situação.

A tunicamicina é um antibiótico produzido principalmente a partir de *Streptomyces clavuligerus* e geralmente conhecido por sua função de inibidor do processo de *N*-glicosilação de proteínas no retículo endoplasmático através do bloqueio da transferência de *N*-acetilglicosamina-1-fosfato a partir de uma uridina. Esse evento evita assim um correto dobramento de proteínas recém sintetizadas promovendo um acúmulo dessas proteínas o que culmina na indução do estresse no retículo endoplasmático (Šereš *et al.*, 2011). A inibição da glicosilação por tunicamicina está associada ao aumento da ubiquitinação e conseqüente degradação de proteínas.

O polietileno glicol (PEG 8000) é um polímero conhecido por sua propriedade de estimular a perda do potencial hídrico nas plantas induzindo assim o processo de estresse osmótico. As principais consequências desse processo são acúmulos de peróxido de hidrogênio e malonaldeídos (MDA), inibição do crescimento da parte aérea e da raiz (Pei *et al.*, 2010).

O ácido salicílico (AS) é um fitorregulador envolvido em várias respostas fisiológicas como termogênese, fechamento dos estômatos e floração. A principal função descrita desse hormônio é de sinalizar a ativação de defesa contra ataque de patógenos microbianos. AS é induzido depois da infecção por muitos patógenos ou por ferimento, podendo operar de maneira conjunta com outros fitorreguladores como ácido jasmônico e etileno por fazer parte de uma rede de sinalização “crosstalk” e sinérgica que determina uma resposta ótima contra determinadas condições ambientais (Fragnière *et al.*, 2011)

A cicloheximida é um antibiótico que engloba papel importante no campo da síntese de proteínas. Em particular, cicloheximida é capaz de inibir passos específicos deste processo, no entanto, seu modo de ação em nível molecular não é totalmente compreendido. Contudo, sabe-se que atua no “congelamento” ou translocação dos polissomos. Como consequência, a cicloheximida é um potente indutor de morte celular. Cicloheximida é o nome genérico para B-[2-(3,5-dimetil-2-oxo-ciclohexil)-2-hidroxietil]-glutarimida, uma substância natural isolada de culturas de *Streptomyces griseus* (Paoletti *et al.*, 2010).

Em plantas intactas, as citocininas são produzidas na raiz e transportadas para toda a planta através do xilema, diminuindo os níveis dessas substâncias de maneira abrupta após colheita. As citocininas como BAP (6-Benzilaminopurina) não são tóxicas para humanos e se tem usado como regulador de crescimento de plantas economicamente importantes. Em nosso estudo, esse hormônio vegetal tem a finalidade de controlar a senescência foliar, pois uma redução nos níveis de BAP causa senescência precoce das folhas, que é o processo natural de envelhecimento em nível celular caracterizado principalmente por menor nível de clorofila das folhas (Xu *et al.*, 2011).

Acido jasmônico é um pequeno lipídeo que é precursor do hormônio jasmonato. Quase todo o seu funcionamento natural está relacionado com a via de sinalização em eventos resultantes da penetração em células vegetais como ferimentos causados por herbívoros, invasão de patógenos, eventos simbióticos e reprodução, podendo assim atuar em conjunto com outros hormônios (Wasternack, 2007)

O hormônio de plantas, ácido abscísico (ABA), desempenha um papel importante na maturação das sementes e germinação, bem como na adaptação a estresses abióticos ambientais. ABA promove o fechamento de estômatos alterando rapidamente o fluxo de íons resguardando assim as células. Outra ação importante de ABA é a reprogramação gênica regulado principalmente por seus cis-elementos regulatórios contidos em diversos promotores de genes que respondem a este hormônio. Durante os estádios vegetativos de crescimento,

ABA aumenta a resistência a condições de estresse hídrico, com isso passa a ser o principal mediador de sinalização contra adversidades climáticas. É sabido também que ABA regula adaptação a outros tipos de estresse. Contudo, plantas deficientes em ABA são deficientes na expressão de diversos genes envolvidos na adaptação a diversos tipos de estresse como seca, frio e salinidade (Cutler *et al.*, 2010).

Uma vez que foi demonstrado previamente que a expressão do *GmNAC6* é induzida por uma variedade de estresses (Pinheiro *et al.*, 2009, Faria *et al.*, 2011) , estes compostos chamados de elicitores de estresse foram utilizados em nosso estudo para avaliar a indução do promotor de *GmNAC6*.

- **FATORES DE TRANSCRIÇÃO (FT)**

Em plantas, aproximadamente 7% do genoma codifica fatores de transcrição (Udvardi *et al.*, 2007). Normalmente, os fatores de transcrição contêm um domínio de ligação ao DNA e uma região de regulação transcricional, que são capazes de reprimir ou ativar a transcrição de múltiplos genes alvos (Nakashima *et al.*, 2009). Os membros individuais de uma mesma família podem responder diferentemente a estímulos diversos de estresse; por outro lado, alguns genes responsivos a estresse podem compartilhar o mesmo fator de transcrição através de cis-elementos regulatórios presente no promotor de genes alvos (Nakashima *et al.*, 2009; Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 2005).

- **FATORES DE TRANSCRIÇÃO DA FAMÍLIA NAC**

Os primeiros membros da família NAC, foram descritos há mais de uma década. Desde então, um grande número de fatores de transcrição NAC tem sido identificados e caracterizados funcionalmente em *Arabidopsis*, arroz, soja e trigo (Nakashima *et al.*, 2009; Olsen *et al.*, 2005; Pinheiro *et al.*, 2009).

NACs (acrônimo de NAM, ATAF e CUC) constituem uma grande família de fatores de transcrição específicos de plantas que apresentam o domínio N-terminal de ligação ao DNA extremamente conservado, que dá nome à família, apresentando em media 150 aminoácidos. Essa porção N-terminal pode ser subdividida em 15 subtipos de acordo com seus motivos, que diferem na composição de seus aminoácidos. Além da ligação ao DNA, o domínio NAC apresenta atividade de ligação com outras proteínas (Tran *et al.*, 2010). Há evidências de que sua função, em grande parte, pode ser ditada por interação com terceiros. Xie e colaboradores (2002) mostraram que o domínio NAC de NAC1 interage com SINAT5 (proteína de *Arabidopsis* análoga a SINA em *Drosophila* e SIAH “seven in absentia homolog” em humanos que promove ubiquitinação), resultando na ubiquitinação de NAC1 que leva a sua degradação para atenuação da sinalização de auxina em *Arabidopsis*.

O domínio C-terminal é variável e apresenta a função de regulação, atuando como ativador ou repressor (Tran *et al.*, 2010). A região C-terminal de alguns NACs contém motivos transmembranas que são responsáveis por sua ancoragem na membrana. Esses NACs ancorados na membrana são chamados de FTs NTLs. Esses NTLs associados à membrana são ativados

através de proteases associadas à membrana durante a resposta a estresse no retículo endoplasmático e quando as plantas estão sob estresse ambiental, liberando assim seu domínio TM que vai atuar como fator de transcrição.

Os fatores de transcrição da família NAC são proteínas multi-funcionais e estão envolvidos em diversos processos biológicos como resposta a estresses bióticos e abióticos, desenvolvimento de plantas e raiz lateral, floração, espessamento da parede celular secundária, senescência e qualidade de sementes (revisado em Tran *et al.*, 2010). Em *Arabidopsis*, o sítio de ligação ao DNA dos FT NAC (ANAC19, ANAC55 e ANAC72) que responde a estresses, contem a sequência de reconhecimento NACRS, que possui o núcleo “CACG”. Este cis-elemento regulatório foi identificado por análise do promotor do gene que responde a estresse induzido por seca, ERD1 (“early responsive do dehydration 1”), que codifica uma proteína homologa a CplA de *Escherichia coli*, uma protease dependente de ATP. A análise molecular do promotor de EDR1 mostrou que sua expressão depende da integridade das sequências: “CAC TAA ATT GTC AC” e “ANN NNN TCN NNN NNN ACA CGC ATG T”, que correspondem a sequências NACRS (Tran *et al.*, 2007; Tran *et al.*, 2010).

Similarmente, em arroz, seca induz o FT ONAC que se liga a uma sequência similar a NACRS, encontrado em seu genoma. Estes resultados indicam que essa sequência pode ser conservada no reino vegetal, pelo menos para FTs que respondem ao estresse (Fang *et al.*, 2008).

Estudos contendo uma abrangente análise da família de fatores de transcrição NAC em várias plantas mostraram que existem pelo menos 105

fatores NAC em *Arabidopsis*, 140 em arroz, 205 em soja e 152 em tabaco (Fang *et al.*, 2008; Rushton *et al.*, 2008; Mochida *et al.*, 2009; Pinheiro *et al.*, 2009;).

A identificação e adaptação molecular do TFs, como os FT da família NAC, têm o potencial de superar uma série de limitações importantes envolvidas na geração de plantas transgênicas com rendimento superior sob condições limitantes de estresse.

- **NAC E ESTRESSE BIÓTICO**

A ativação da resposta de defesa das plantas inicia-se com o reconhecimento de moléculas codificadas pelo patógeno denominadas elicitores (peptídeos, proteínas, oligossacarídeos e outros). A interação dos elicitores do patógeno com os receptores do hospedeiro ativa uma cascata de transdução de sinal que envolve a fosforilação de proteínas, o fluxo de íons, a formação de espécies reativas de oxigênio (ROSs) e do sinalizador óxido nítrico (NO) (Huckelhoven, 2007). Os mediadores ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno juntamente com ROSs e NO atuam como amplificadores e mensageiros secundários.

Proteínas NACs foram identificadas em decorrência de suas participações na infecção por patógeno. Acredita-se que esses transfatores estejam envolvidos em respostas de defesa contra estresses bióticos devido ao aumento da expressão dos membros desta família durante a infecção de patógenos e ataque de insetos (Pinheiro *et al.*, 2009). A função de proteínas

NAC na defesa a estresses bióticos também foi evidenciada pela indução do gene *StNAC* de *Solanum tuberosum* na infecção por *Phytophthora infestans* (Collinge & Boller, 2001). Similarmente, o gene *SsNAC23* de *Saccharum sp.* é induzido em resposta ao ataque de herbívoros (Nogueira *et al.*, 2005) e o gene *OsNAC19* de *Oriza sativa*, na presença do fungo *Magnaporthe grisea* (Lin *et al.*, 2007).

- **NAC E ESTRESSE ABIÓTICO**

Em resposta a estresse abiótico, os genes NACs apresentam uma larga diversidade de expressão, sugerindo que eles participam na regulação de um amplo espectro de resposta a diferentes estresses abióticos. A análise em larga escala da resposta a estresse abióticos dos genes NACs de *Arabidopsis*, feita por microarranjo, revelou que 12 genes ANACs são induzidos por ABA e/ou por pelo menos um estresse abiótico (Tran *et al.*, 2010).

Em um recente estudo com soja envolvendo ferramentas de bioinformática, Pinheiro e colaboradores (2009) concluíram que existem 101 membros da família de fatores de transcrição NAC. Entre eles, 31 membros foram clonados e caracterizados em resposta a estresse abiótico por Tran (2009), sendo que nove apresentaram forte indução por estresse hídrico, dos quais seis apresentaram resposta a frio e salinidade, em especial *GmNAC6*.

Evidências correlacionam a presença e o envolvimento direto dos FTs NACs no processo de regulação de resposta a estresse. Três cDNAs de *Arabidopsis* que codificam os fatores de transcrição ANAC019, ANAC055 e

ANAC072 se ligam a sequência NACRS do gene *ERD1* e são induzidos por seca, alta salinidade e ABA (Tran *et al.*, 2010). Recentemente, estudos mostraram que *Arabidopsis* transgênica expressando o gene ONAC063 de arroz, induzido por salinidade, apresentou maior tolerância à alta salinidade e estresse osmótico, similarmente ao observado pela super expressão dos genes ANAC019, ANAC055 e ANAC072 em *Arabidopsis*.

A maioria das vias de transdução de sinal, inclusive a via de NAC, que são ativados em resposta a estresses abióticos foram identificados e elucidados em *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* (Nakashima *et al.*, 2009; Yamaguchi-Shinizaki *et al.*, 2005).

Em resumo, evidências na literatura indicam que os fatores de transcrição NAC regulam um grande número de eventos bioquímicos para proteger as plantas contra diversos processos de estresses. Consequentemente, os fatores de transcrição NACs induzidos por estresses são candidatos promissores para gerar plantas transgênicas tolerantes a estresses e com qualidades agronômicas superiores.

- **NAC6, ESTRESSE ABIÓTICO E ENVOLVIMENTO EM MORTE CELULAR MEDIADA PELAS PROTEÍNAS NRPs**

A caracterização funcional do gene NAC6 em soja forneceu evidências da participação destes transfatores no processo de morte celular programada (PCD) induzida por diferentes condições de estresses (Faria *et al.*, 2011). Em estudos recentes, também foi demonstrado que os transfatores NAC

desempenham papel na regulação do processo de senescência foliar, um evento que está estritamente relacionado com o de morte celular programada (Pinheiro *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2007). Recentemente, foi demonstrado que *GmNAC6* participa da via que integra os sinais de estresses osmótico e do retículo endoplasmático, resultando em morte celular programada (PCD). Ativação da expressão dos genes NRPs (“N-rich proteins”) pelo transfator ERD15 (“early responsive to dehydration 15”) resulta na indução do gene *GmNAC6* como efetor de PCD (Isrigler *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2008, Alves *et al.*, 2011, Faria *et al.*, 2011). Assim como NAC6, as proteínas NRPs são induzidas sinergisticamente em resposta a combinação do estresse osmótico e do retículo endoplasmático. Nestas condições de estresses, a proteína ERD15 liga e ativa o promotor de NRPs e o aumento da expressão de NRPs, por sua vez, leva a indução na expressão do gene NAC6 resultando na ativação de morte celular programada. Esta via de sinalização de morte celular induzida por estresses prolongados no RE e osmótico tem sido designada de via de sinalização integrativa mediada pelas proteínas NRPs (Reis *et al.*, 2011).

As proteínas ricas em asparagina (NRPs) identificadas em soja apresentam uma organização estrutural conservada e são representadas por dois genes, NRP-A (Ludwig e Tenhaken, 2001) e NRP-B (Costa *et al.*, 2008) no genoma da soja. Os genes *NRPs* codificam proteínas com dois domínios distintos e característicos: o domínio N-terminal extremamente rico no aminoácido asparagina (25%), e a região C-terminal contendo o domínio relacionado com o desenvolvimento e morte celular específico de plantas,

denominado DCD (Development and Cell Death; Ludwig e Tenhaken, 2001; Tenhaken *et al.*; 2005; Costa *et al.*, 2008). Embora as proteínas NRPs sejam induzidas por tunicamicina, indutor de estresse no retículo endoplasmático, o processo de senescência causado por estresse no RE, mediado pela UPR (Unfolded protein response), e o processo de senescência e morte celular mediado pelas proteínas NRPs parecem ser ativados por vias de sinalização distintas. A via UPR é ativada exclusivamente no RE e inclui chaperones moleculares como primeiros sinalizadores principais (Rutkowski e Hedge; 2010).

Tem sido demonstrado que diversos genes que respondem a estresses são regulados por vias de sinalização distintas por meio de cis-elementos regulatórios, presentes nos promotores dos diferentes genes induzidos por estresses. Assim a interação entre diferentes tipos de cis-elementos funcionam como elemento de comunicação entre diferentes sinais (Yamaguchi-Shinizaki *et al.*, 2005). Sendo o gene NAC6 induzido pela expressão de NRPs (Faria *et al.*, 2011) e por diferentes condições de estresses fisiológicos (Pinheiro *et al.*, 2009), é provável que os elementos em cis presentes no seu promotor promovam a integração de diferentes sinais que resultem em morte celular mediada por NAC6. Assim, torna-se relevante entender e mapear os elementos cis-regulatórios em NAC6 responsivos por condições distintas de estresses.

MATERIAL E MÉTODOS

- **ISOLAMENTO E ANÁLISE *IN SILICO* DA REGIÃO PROMOTORA DE *GmNAC6***

A sequência do promotor do gene *GmNAC6* foi obtida mediante uma busca no banco de dados Phytozome (<http://www.phytozome.net/soybean>). A sequência promotora foi isolada através da Reação em Cadeia da Polimerase utilizando Taq Platinum de alta fidelidade, DNA genômico extraído de folhas de soja e oligonucleotídeos que flanqueiam as extremidades da sequência. Diferentes extensões da região 5' "upstream" do gene *GmNAC6* foram isoladas, utilizando o oligonucleotídeo reverso pNAC6Rv (5'- AGATCTTCCATGGTTGCCATAT -3', que cria um sítio para BglII e que anela na região do sítio de iniciação de tradução) em combinação com oligonucleotídeos que anelam em diferentes posições "upstream" da região promotora. Os oligonucleotídeos pNAC6Fwd utilizados em conjunto com pNAC6Rvs foram: pNAC6Fwd1000 (5'- GAATTCGTCATTTGATTTAAGG -3', que cria um sítio para EcoRI sublinhado e anela à posição aproximada de -1000 pb), pNAC6Fwd750 (5'- GAATTCGCAAATAATACAACTTGTT -3' anelando à posição aproximada de -750 pb), pNAC6Fwd500 (5'- GAATTCCATAAAGTATAAAGTATGGT -3' que anela à posição -500 pb) e pNAC6Fwd250 (5'- GAATTCCTAGGCCTCCACGACCAAG -3', anelando em -250 pb). Os fragmentos de 1000, 750, 500 e 250 pb obtidos foram purificados e clonados no vetor pCAMBIA1381Z, conforme descrito a seguir.

A identificação de possíveis cis-elementos putativos na região promotora de *GmNAC6* foi feita pelo software PLACE – Plant Cis-acting Regulatory DNA elements (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) (Higo *et al.*, 1999). A sequência promotora também foi analisada utilizando PlantPAN–Plant promoter analysis navigator (<http://PlantPAN.mbc.nctu.edu.tw>; Chang *et al.*, 2008).

- **OBTENÇÃO DA CONSTRUÇÃO DO PROMOTOR NAC6 FUSIONADO AO GENE REPÓRTER GUS**

Os fragmentos de 1Kb, 750pb, 500pb e 250pb amplificados do promotor do gene *GmNAC6* foram digeridos com enzimas de restrição apropriadas (EcoRI e BglII) e clonados nos sítios correspondentes do vetor binário de expressão em plantas, pCAMBIA1381z, originando os seguintes clones pNAC61000:GUS (pUFV1296), pNAC6750:GUS (pUFV18013), pNAC6500:GUS (pUFV1812) e pNAC6250:GUS (pUFV1811), respectivamente.

- **TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS DE TABACO**

Os clones gerados pNAC6:GUS e o vetor vazio (pCAMBIA1381z) foram utilizados para transformar plantas de *Nicotiana tabacum*, por meio de transformação de discos foliares mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Alvim *et al.*, 2001). As colônias foram crescidas em meio seletivo, a 28°C, sob agitação. Após 16 horas de crescimento, cada solução contendo as bactérias transformadas foi precipitada por centrifugação a 8.000 x *g* por 5 minutos e, individualmente, ressuspensas em meio MS (Murashige e Skoog, 1962), até

uma DO600 = 0,4 - 0,5. Discos foliares de *N. tabacum* foram incubados sob agitação com as agrobactérias transformadas por 15 minutos. Em seguida, os explantes foram lavados com água estéril e secados em papel de filtro. Os explantes devidamente secos foram transferidos para placas de Petri contendo MS sólido, onde permaneceram por dois dias. Em seguida, eles foram transferidos para placas de Petri contendo meio MS com higromicina (50 mg/L), timentim (500 mg/L) e benzilaminopurina (0,5 mg/L). As placas foram mantidas nessa condição por aproximadamente 15 dias, sendo transferidas a cada duas semanas para placas novas. Os tecidos transformantes e diferenciados em brotos foram transferidos para recipientes contendo meio apropriado para indução de raízes.

As plantas transformadas foram regeneradas em meio MS, contendo 50 mg.L⁻¹ de higromicina (Buzeli *et al.*, 2002). Os regenerantes foram testados pela incorporação dos genes hptII (resistência à higromicina) e pela respectiva sequência promotora de *GmNAC6*. Os transformantes primários (T0) foram mantidos *in vitro* para ensaio de estresses ou transferidos para o solo e crescidos em casa de vegetação para obtenção de sementes.

• INDUÇÃO DE ESTRESSES EM PLÂNTULAS TRANSGÊNICAS

Visando determinar a possível ativação do promotor de *GmNAC6* por diferentes estresses, foram conduzidos experimentos com 3 transformantes independentes, plântulas inteiras de 30-40 dias (estádio vegetativo de desenvolvimento V3) contendo diferentes extensões do promotor de *GmNAC6*

fusionado ao gene repórter GUS. Para isso, as plântulas foram aclimatadas e incubadas em meio MS básico líquido com os seguintes tratamentos por 36h: Tunicamicina (10 µg/mL), que induz estresse no retículo endoplasmático (Cascardo *et al.*, 2000; 2001); polietilenoglicol (PEG-8000 10 %), por simular os efeitos de estresse osmótico (Hasegawa *et al.*, 1984; Cascardo *et al.*, 2000); ácido salicílico (100 µM) e ácido jasmônico (100 µM), hormônios associados a estresse bióticos e ferimento (Ellis *et al.*, 1999); BAP (6-benzilaminopurina, 1µM), inibidor de senescência (Rulcová e Pospíšilová, 2001); ABA (100 µM), regulador da senescência foliar e condições de estresse abiótico (Cascardo *et al.*, 2000; 2001); e cicloheximida (0,5 µg/mL), que induz morte celular (Yuan e Lin, 2008). Após 36 horas de incubação sob todos os estresses citados, diferentes tecidos foram coletados e submetidos ao ensaio histoquímico e de atividade de GUS (análise fluorimétricas).

- **ENSAIO DA ATIVIDADE DE GUS**

O ensaio fluorimétrico para avaliar a atividade da β-glucuronidase foi conduzido segundo Jefferson *et al.*, 1987, utilizando methylumbelliferone (MU) como padrão. As amostras foram trituradas em nitrogênio líquido 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 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).

- **ANÁLISE HISTOQUÍMICA DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DE GUS EM PLANTAS DE TABACO TRANSGÊNICAS**

As plantas transformadas com a construção pNAC61000:GUS foram submetidas ao ensaio histoquímico, conforme McCabe *et al.* (1988), utilizando-se três transformantes independentes de cada construção. Diferentes regiões da planta (folha, caule e ápice caulinar) foram coletados e seccionados, usando um micrótomo de mesa. As seções transversais, bem como raízes inteiras e discos foliares de folhas velhas (basal), folhas jovens (apical) e folhas em estágio intermediário de desenvolvimento, foram embebidas no tampão de ensaio da enzima GUS [$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 100 mM (pH 7,0), $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mM, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mM, Triton X-100 0,1% (v/v)], 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 montados em lâminas histológicas para foto documentação. As imagens digitais foram obtidas em um microscópio Olympus AX-70, acoplado a câmera digital de mesma marca.

- **ANÁLISE DA INDUÇÃO DO PROMOTOR DE NAC6 POR NRPs**

Três transformantes independentes de tabaco, transformados com o vetor recombinante [pNAC61000:GUS (pUFV1296)], foram crescidos em casa de vegetação até atingir o estágio de desenvolvimento correspondente a V3. Em seguida, as folhas foram agroinoculadas com as culturas de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas com as construções pYFP-NRP-A, pYFP-NRP-B (pUFV968 e pUFV969, respectivamente, Costa *et al.*, 2008), pK7F-NAC32 (pUFV1584, Giselle, comunicação pessoal), pYFP-NAC6 (pUFV948, Faria *et al.*, 2011) ou pK7F-L18 (pUFV858, Carvalho *et al.*, 2008). Estas construções de DNA, previamente descritas, permitem a expressão do gene destacado sob controle do promotor 35S. Para agroinoculação, as culturas de agrobactéria foram crescidas em 4 mL de meio com antibióticos adequados, a 28°C por 16 horas, e centrifugadas a 8000 RPM por 5 min. Em seguida, o pellet foi lavado 2 vezes com tampão de infiltração (MgCl 2 10 mM, MES 10 mM pH 5,6 e acetoseringona 10 µM) e ressuspendido em 1 mL do mesmo tampão. Utilizando seringas estéreis sem agulha, folhas jovens de tabaco foram infiltradas com a cultura de *A. tumefaciens* em uma D.O. de 0,2, por meio de uma gentil pressão através dos estômatos da epiderme inferior. Os discos foliares infiltrados foram coletados após 72h, congelados em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C até o processamento das amostras. Os discos foliares das plantas coletados foram utilizados para a extração de RNA total para confirmação da expressão transiente e extração protéica para análises fluorimétricas (Jefferson *et al.*, 1987).

O RNA total foi extraído usando o reagente Trizol (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada utilizando 4 µg de RNA total, oligo dT e a Transcriptase Reversa MMLV (Invitrogen), segundo recomendações do fabricante. Os cDNAs foram confirmados por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para os genes *GmNRP-A*, *GmNRP-B*, *GmNAC32*, *GmNAC6* e *AtL18* (Tabela 1).

- **RT-PCR EM TEMPO REAL (qRT-PCR)**

Todo o procedimento de PCR em Tempo Real, incluindo testes de validações e experimentos foram conduzidos seguindo os manuais da *Applied Biosystems*. As reações de PCR em tempo real foram conduzidas utilizando o aparelho 7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems), oligonucleotídeos específicos (Tabela 2), cDNAs dos tratamentos e SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). As condições de amplificação foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, e 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Para a quantificação da expressão gênica, foram utilizados os métodos comparativos de Ct: $2^{-\Delta Ct}$ e $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Como controle endógeno para normalização dos dados do qRT-PCR das amostras de tabaco, foram utilizados os primers específicos para a actina (Costa *et al.*, 2008).

- **TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR**

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

Tabela 1 – Listagem dos oligonucleotídeos para PCR

Primer	Seqüência 5'-3'	Gene alvo
NRP-B Fw	ATGGAGAATAATAATCAGTCGTT	NRP-B
NRP-B Rv	TTATGCCGGCAAAGCCTTAAAAG	NRP-B
NRP-A Fw	ATGGACAACAACAATGACTTTTG	NRP-A
NRP-A Rv	CTATGCTGGAATGGCTTTGAAA	NRP-A
NAC32 Fw	AAAAAGCAGGCTTCACAATGCCAGGACAACCTCC	NAC32
NAC32 Rv	AGAAAGCTGGGTCTCTCAAATGTCTTTGGTAGG	NAC32
NAC6 Fw	CTATGCTGGAATGGCTTTGAAA	NAC6
NAC6 Rv	CTATGCTGGAATGGCTTTGAAA	NAC6
L18 Fw	AAAAAGCAGGCTTCACAATGGGTGC	L18
L18 Rv	AGAAAGCTGGGTCTTACATGAACAAG	L18

Tabela 2 – Listagem dos oligonucleotídeos para RT-PCR

Primer	Seqüência 5'-3'	Gene alvo
TobActin Fw	AGCAAGGAAATTACCGCATTAGC	Actina
TobActin Rv	ACCTGCTGGAATGTGCTGAGA	Actina
NRP-B Fw	TACAGGCATCCAATTTGGCGAACC	NRP-B
NRP-B Rv	TGACTTGAAAGAGTTGATCTCACCCC	NRP-B
NRP-A Fw	GGCACAAAGACTGGTGCTGAGA	NRP-A
NRP-A Rv	CTCTGTATCGTGGAGGCAGACC	NRP-A
NAC32 Fw	TGACGGAAGCGGGTACT	NAC32
NAC32 Rv	CGGATTTCCGATCGGTTT	NAC32
NAC6 Fw	CCAACAAAAGCACTTGTGGCA	NAC6
NAC6 Rv	GGACTATTCAACTGAGCCCAAAG	NAC6
L18 Fw	GCTCTCCCGACAGAGAAGGA	L18
L18 Rv	GACTTGGCACGAACCTCGTT	L18

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A região 5' de -1000pb que flanqueia o gene GmNAC6 é induzível por estresses em todos os tecidos analisados

O gene *GmNAC6* é um efetor de morte celular programada (PCD) e já foi demonstrado que é induzido por diversos estímulos como: estresse no retículo endoplasmático (RE, induzido por tunicamicina), estresse osmótico (induzido por PEG), estresses bióticos (em resposta a infestação por fungos e bactérias), ABA (ácido abscísico) e cicloheximida (Pinheiro *et al.*, 2009; Faria *et al.*, 2011). O gene *NAC6* também desempenha uma função no processo de senescência foliar, que está diretamente relacionado com morte celular programada (Pinheiro *et al.*, 2009; Faria *et al.*, 2011) e pode estar envolvido em crescimento celular e desenvolvimento da planta em soja, já que estas funções estão relacionadas com seu análogo *ANAC036* em *Arabidopsis* (Kato *et al.*, 2010).

Com a finalidade de avaliar se a indução por estresses do gene *GmNAC6* é devido à regulação transcricional, a região 5' de 1000 pares de base (posição -1000, a partir do códon de iniciação ATG) foi fusionada ao gene repórter *GUS* em um vetor binário de transformação de plantas. Plantas transgênicas de tabaco foram geradas a partir desta construção, via transformação por *Agrobacterium tumefaciens*. A atividade de *GUS* foi quantificada individualmente em estádios diferenciados de desenvolvimento das

folhas: folha basal (FB), folha mediana (FM) e folha apical (FA), utilizando três transformantes independentes (Figura 3).

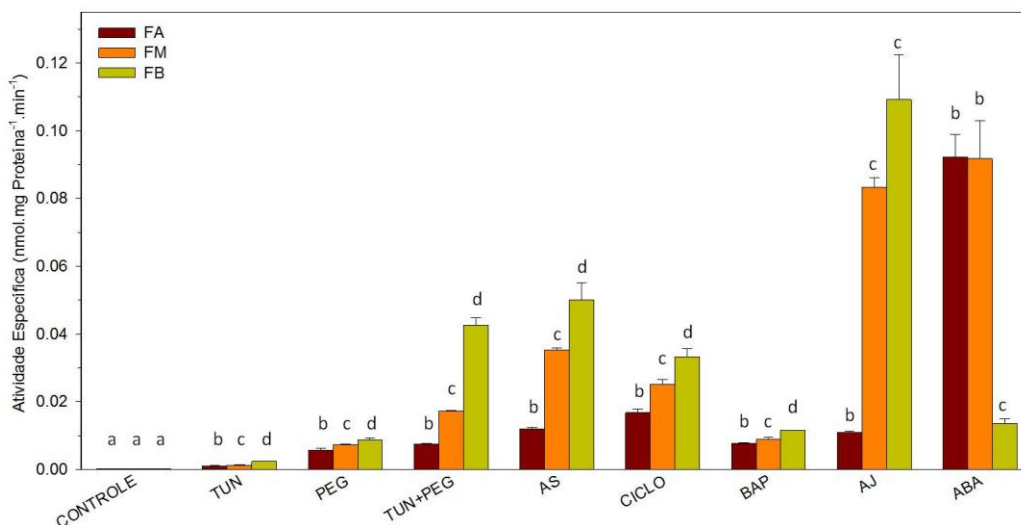


Figura 3 – Análise quantitativa da atividade da enzima GUS em plantas transgênicas de tabaco contendo o promotor de -1000pb do gene NAC6 fusionado diretamente a GUS. A atividade específica de GUS foi determinada por ensaio fluorimétrico, (n=9, 3 triplicatas biológicas e 3 transformantes independentes). Letras diferentes dentro do tratamento indicam diferença significativa por teste “t” de Students a $P < 0,05$ e letras diferentes dos tratamentos em relação ao controle indica diferença significativa por teste “t” de Students a $P < 0,05$. FA, folha apical; FM, folha medial; FB, folha basal.

Sob condições normais de crescimento das plantas, o promotor do gene *GmNAC6* não é ativado nas folhas (controle). Entretanto, tratamento das plantas com indutores de estresses abióticos (tunicamicina e PEG), indutor de morte celular (cicloheximida), inibidor de senescência (BAP, 6-benzilaminopurina) e hormônios (AS, ABA e AJ) promoveram aumento da atividade do promotor com diferentes níveis de indução em resposta aos diferentes tratamentos (Figura 3). Estes resultados indicam que: (i) a região 5' até a posição -1000 em relação ao códon AUG do gene NAC6 contém sequências regulatórias que funcionam como promotor; (ii) existe um forte

componente de regulação do gene *GmNAC6* no nível de transcrição; e (iii) o promotor *GmNAC6* responde diferentemente aos estresses e hormônios analisados. Este resultado corrobora com a função descrita de *GmNAC6* em morte celular (Faria *et al.*, 2011), a resposta a todos os estímulos, exceto ABA, foi diretamente correlacionada com o desenvolvimento da folha, sendo a indução mais forte em folhas mais velhas (FB), seguido de folhas medias (FM) e a indução da atividade do promotor foi menos acentuada em folhas apicais (FA). Uma vez que os tecidos mais velhos apresentam um processo de morte celular mais avançado, estes resultados são perfeitamente compatíveis com a função de *NAC6* no processo de senescência e morte celular programada (PCD; Faria *et al.*, 2011).

A fim de avaliar se os diferentes níveis de indução do promotor *GmNAC6* em resposta aos diferentes estímulos estava relacionada com tecido-especificidade de expressão, a atividade de GUS foi também analisada em diferentes tecidos da folha, caule, ápice caulinar e raiz, utilizando três transformantes independentes de cada construção. Os resultados são apresentados nas Figuras 4-7. 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 indicam que a diferença no nível de indução da atividade do promotor *GmNAC6* em resposta aos diferentes estímulos não se deve a diferenças no padrão de expressão tecido-específico do promotor. Provavelmente, elementos cis-regulatórios responsivos aos estímulos estão

presentes no promotor *GmNAC6* e são responsáveis pela indução do promotor em diferentes níveis e em resposta aos diferentes estímulos testados.

A tunicamicina (TUN) inibe glicosilação de proteínas no retículo endoplasmático e, conseqüentemente, é um forte indutor de estresse no retículo endoplasmático, disparando assim a via de resposta às proteínas mal dobradas (UPR) (Šereš *et al.*; 2011). Já foi demonstrado que estresse prolongado no retículo endoplasmático leva a indução de morte celular (Costa *et al.*, 2008) e induz a expressão do gene *GmNAC6* (Faria *et al.*, 2011). Embora os resultados presentes de indução do promotor *GmNAC6* estejam consistentes com estas observações prévias, o nível de indução do promotor em resposta a tunicamicina foi muito inferior quando comparado com os outros estímulos (Figura 3). Estes dados podem refletir a intensidade dos estímulos aplicados ou diferenças na cinética de indução do promotor em respostas aos diferentes estímulos.

Apesar de ter sido observado uma fraca indução por tunicamicina do promotor *NAC6* quando comparado com os outros estresses (Figura 3), a atividade do promotor *NAC6* em resposta a tunicamicina produziu uma coloração constitutiva de GUS, embora o nível de expressão tenha variado de acordo com o tipo de tecido (Figuras 4, 5, 6 e 7). Por exemplo, ainda que tenha ocorrido maior uniformidade de coloração nas folhas basais, o nível relativo da expressão de GUS pareceu maior no tecido vascular que no mesofilo, principalmente considerando folhas apicais (Figure 3, veja TUN, disco apical). Além disso, o nível da expressão do gene repórter GUS foi mais acentuado em

tecidos em franca divisão celular, como pode ser observado na porção basal do caule sob estresse de tunicamicina (Figura 6d – seta vermelha), no tecido do floema interno do caule apical (Figura 6c – seta vermelha) e no meristema, em tecido vascular (Figura 7b, seta vermelha). De uma maneira geral, genes induzidos por estresse no retículo endoplasmático também são induzidos em células em intensa divisão celular (meristemas e região do procâmbio) e com elevada atividade condutora (tecido vascular). De fato, já foi demonstrado que as atividades dos promotores induzíveis por tunicamicina, BiP-6 and BIP-9, direcionam um padrão similar de distribuição de expressão de GUS (Buzeli *et al.*, 2002). Similarmente, o envolvimento na formação de raízes laterais já foi descrito para alguns membros da família NAC (Olse *et al.*, 2005 e Kato *et al.*, 2010). Em raiz, ocorreu uma forte indução, resultado esperado pelo fato de ser o primeiro órgão a entrar em contato com o estresse, uma vez em que o agente indutor de estresse está diretamente em contato com a raiz, gerando uma resposta intensa e rápida (Figura 7j).

Seguindo tunicamicina, o polietileno glicol (PEG) foi o agente que induziu em segundo menor nível o promotor em estudo (análise quantitativa – Figura 3). Em plântulas de soja, foi demonstrado que a expressão do gene NAC6 é induzida por PEG e tunicamicina (Faria *et al.*, 2011). Entretanto, o nível de acúmulo de transcritos de NAC6 foi maior em resposta a tunicamicina do que em PEG, o que está em contraste com os dados de atividade do promotor, obtidos nesta investigação (Figura 3). Provavelmente, esta diferença se deve aos diferentes tecidos analisados ou a diferença na cinética de indução do

promotor em resposta aos diferentes estímulos. Embora a concentração dos agentes indutores de estresses usada nesta investigação tenha sido idêntica aquela utilizada em Faria *et al.* (2011), o tempo de indução variou entre os experimentos sendo comparados (nesta investigação, 36 horas para ambos os indutores de estresses; 10 horas para PEG e 16 horas para tunicamicina em Faria *et al.*, 2011).

Assim como observado na indução do acúmulo de transcritos do gene NAC6 (Faria *et al.*, 2011), a combinação dos tratamentos com PEG e tunicamicina promoveu uma indução sinérgica da atividade do promotor NAC6 (Figura 3), indicando que a integração das vias de resposta a estresse osmótico e do RE ocorre provavelmente no nível de transcrição. Esta indução sinérgica dos componentes da via de resposta a estresses que sinaliza um evento de morte celular mediado pelas proteínas NRPs já foi demonstrada através da indução da expressão dos genes NRPs (Costa *et al.*, 2008) e do gene NAC6 (Faria *et al.*, 2011). Os resultados dessa investigação incrementam nossos conhecimentos com relação a esta via de sinalização de estresses em plantas, indicando que o acúmulo sinérgico dos transcritos do gene NAC6 é devido a uma regulação no nível de transcrição.

A análise da distribuição espacial da atividade de GUS em resposta a PEG ilustra um padrão de expressão tecido-específico bem mais complexo do que aquele observado pela indução por tunicamicina. Embora PEG tenha promovido uma indução uniforme na expressão do gene repórter em folhas e raízes (Figura 4-5, 7K), a indução da atividade de GUS não foi detectada nos

tecidos condutores, floema externo e xilema, do caule basal (Figura 6, letra f) e no meristema do ápice caulinar (Figura 7, letra C). No caule apical, também houve a indução somente nos tecidos condutores, floema interno e xilema (Figura 6e – setas vermelhas).

O fitoregulador ácido salicílico (AS) é descrito por suas diversas participações em diferentes processos biológicos (Fragnière *et al.*; 2011). No entanto, na presente investigação, teve como papel simular o estresse vinculado ao ataque de patógenos, uma vez que a via de resposta a esse tipo de ataque é dependente desse fitoregulador e o gene NAC6 é induzido por estresses bióticos (Faria *et al.*, 2011).

Como resultado principal, AS promoveu a indução do promotor de maneira eficiente, confirmando a teoria de que o promotor atua mais ativamente nos tecidos mais velhos (Figura 3). Pode-se também evidenciar a intensidade de expressão no meristema da parte aérea e raiz (Figura 7d e 7i). No caule apical, a indução da expressão do gene repórter predominou no floema interno e parênquima (Figura 6g), já no caule basal a expressão confirmou a indução de NAC6 nos tecidos em diferenciação sob estresse (Figura 6h, veja seta vermelha).

Consistente com seu envolvimento em morte celular foram demonstrados que NAC6 é induzido por cicloheximida em células de soja, antibiótico que promove morte celular por inibição da tradução (Pinheiro *et al.*, 2009). Com a finalidade de verificar se o promotor de NAC6 também era induzido por cicloheximida (Ciclo), as plântulas de tabaco transformadas com a construção

pNAC6::GUS foram tratadas com este indutor de morte celular. O tratamento com cicloheximida promoveu altos níveis de expressão do gene repórter dirigida pelo promotor NAC6 em todos os tecidos analisados, com predominância de coloração nos órgãos em envelhecimento, como folha basal (Figuras 3 - 7). Observa-se uma intensa coloração em células meristemáticas, floema interno e externo em caules apicais e tecido vascular na raiz de tabaco (Figura 6i, Figura 7e e Figura 7m) e, no caule basal, não ocorrendo indução do promotor no xilema (Figura 6J). Provavelmente, por se tratar de células mortas, cicloheximida não atua no xilema, o que explica a falta de indução do promotor neste tecido em resposta ao antibiótico.

Foi demonstrado previamente que a expressão do gene NAC6 é reprimida por BAP (Pinheiro *et al.*, 2009), um inibidor de senescência que atua como antagonista de morte celular (Xu *et al.*, 2011). Entretanto, os resultados dessa investigação demonstraram que o promotor do gene NAC6 é induzido por BAP ao invés de ser reprimido. Uma possível explicação para esta aparente contradição seria a observação de que a indução do promotor NAC6 por BAP somente ocorreria eficientemente em células em estádios avançados de morte. Consistente com esta hipótese, o promotor NAC6 é fortemente induzido por BAP no xilema do caule basal (Figure 6i) e não é induzido no meristema do ápice caulinar, onde ocorre forte predominância de células em divisão celular (Figura 7f).

O promotor NAC6 também foi induzido pelo fitoregulador ácido jasmônico (AJ) que promoveu a maior expressão do gene repórter (Figura 3). Entretanto,

em células de soja em suspensão, já foi demonstrado que AJ não promove indução da expressão do gene NAC6 (Pinheiro *et al.*, 2009). Provavelmente, a diferença nos resultados observados se deve aos diferentes sistemas utilizados para avaliar a expressão gênica. Seria importante avaliar se AJ também promove aumento da expressão do gene NAC6 em folhas de soja. Por se tratar de um fitoregulador associado com estresse biótico, assim como AS que também induziu NAC6, estes resultados indicam que NAC6 pode estar envolvido na via de sinalização de resposta a ataque de patógenos.

A indução da expressão de genes da família NAC em resposta ao ataque de patógenos ou a interação de proteínas NAC com proteínas de vírus tem sido intensamente estudado. Por exemplo, Xie *et al.* (1999) descreveram a interação de uma proteína NAC (*GRAB*) com a proteína de replicação de geminivírus. Similarmente, Ren *et al.* (2000) descreveram a interação de proteínas NAC com capsídeo viral conferindo resistência ao vírus Turnip Crinkle Vírus (TCV) da família Tombusviridae em *Arabidopsis*. Assim também, tem sido demonstrado que a expressão do gene *StNAC* de *Solanum tuberosum* é induzida em resposta a infecção por fungo *Phytophthora infestans* (Collinge & Boller, 2001).

O padrão de expressão quantitativo para AJ seguiu o mesmo padrão, sendo observado indução maior em folhas velhas (folha basal) seguido por folhas médias e folhas apicais (Figura 3). Similarmente, uma coloração mais intensa do gene repórter foi observada nas folhas basais (Figuras 4 e 5). Nos demais órgãos, como caules e raízes a expressão do promotor NAC6 promoveu

uma coloração uniforme nos órgãos analisados, porém apresentou uma menor intensidade nos vasos condutores do caule (Figura 6m e 6n). Além disso, nos meristemas, apenas os tecidos vasculares foram corados (Figura 7g).

Finalmente, tratamento de plântulas de tabaco transgênicas com ácido abscísico (ABA), fitoregulador associado com estresse abiótico e regulador de senescência (Brossa *et al*, 2011), induziu o promotor NAC6 e promoveu um aumento na expressão do gene repórter (Figura 3). Já foi demonstrado, em células de soja, que a expressão do gene NAC6 é induzida por ABA (Pinheiro *et al.*, 2009). Entretanto, a cinética de indução é precoce, sendo NAC6 induzido, rapidamente e transientemente, 1 hora após o tratamento com ABA. Nesta investigação, foi demonstrado que após 36 horas de tratamento com ABA, o promotor NAC6 promoveu um aumento considerável na atividade do gene repórter em folhas apicais e mediais, e uma indução menos intensa em folhas basais (Figura 3). Provavelmente, as diferenças na cinética de indução observada em resposta ao ABA se deve a diferenças nos sistemas em estudos (células de soja x tabaco transgênicos) e a alta estabilidade da proteína repórter. Uma vez que a enzima GUS tem uma meia vida alta, a atividade do produto de expressão do gene quimérico pode persistir por um longo tempo após a indução do promotor. Quanto à menor indução do promotor por ABA nas folhas basais em oposição ao padrão de indução observado em resposta aos outros estímulos, uma possível explicação seria o antagonismo natural que existe entre a via de sinalização dependente por AJ e a via de resposta dependente por ABA (Brossa *et al.*, 2011). A análise da distribuição espacial da

atividade do promotor induzida por ABA demonstrou uma coloração uniforme entre os tecidos, com uma maior indução nas regiões de crescimento do caule basal (Figura 6p, seta vermelha), no tecido do floema interno do caule apical (Figura 6o), no tecido vascular do meristema (Figura 7h, seta vermelha) e no cilindro vascular da raiz (Figura 7p, seta vermelha).

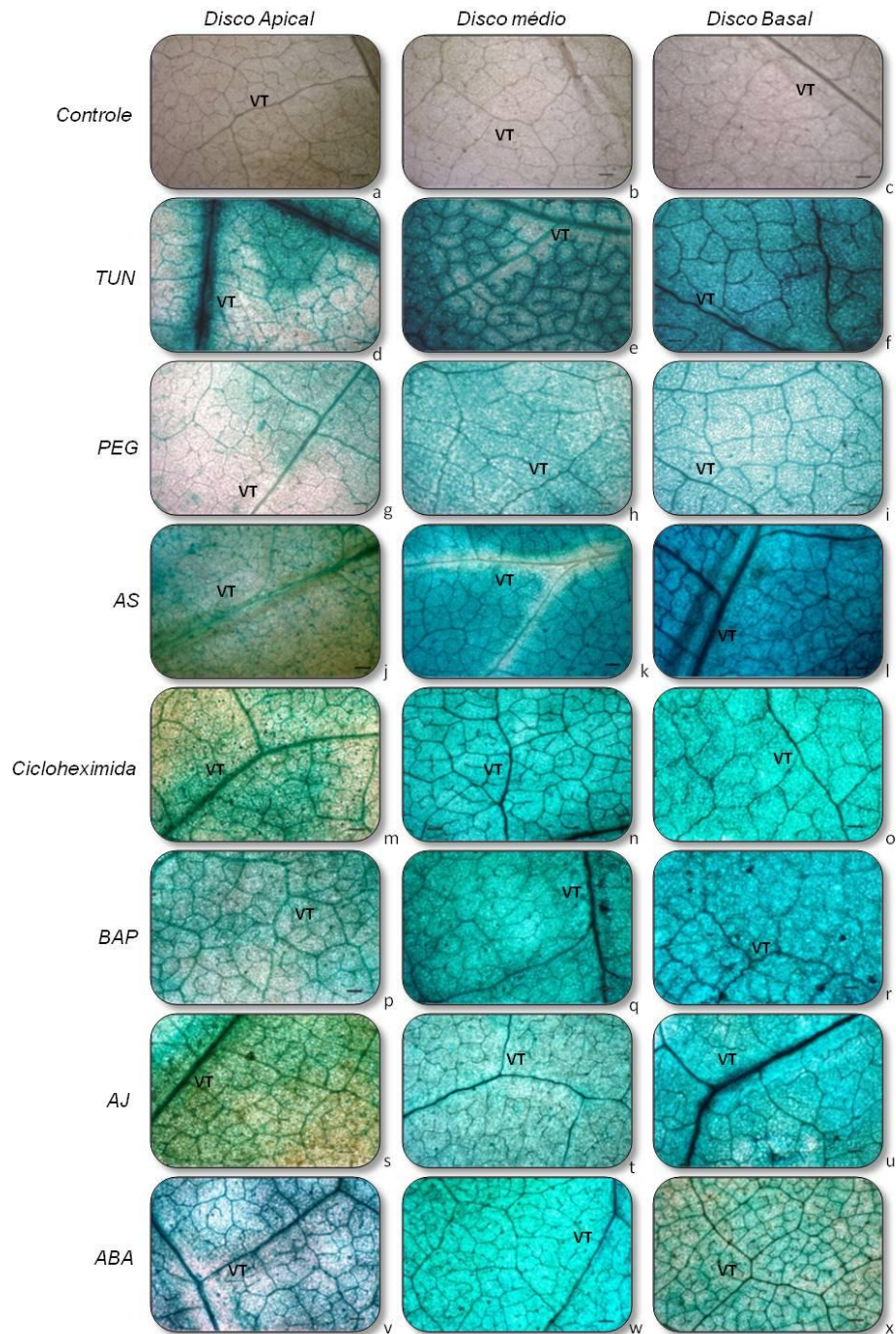


Figura 4 – Análise histoquímica na superfície foliar da regulação tecido-específica do promotor de NAC6 fusionado a GUS em plantas transgênicas de tabaco contendo a construção pNAC61000:GUS. Plantas não estimuladas foram usadas como controle. VT, tecido vascular. Barras = 150 μ M.

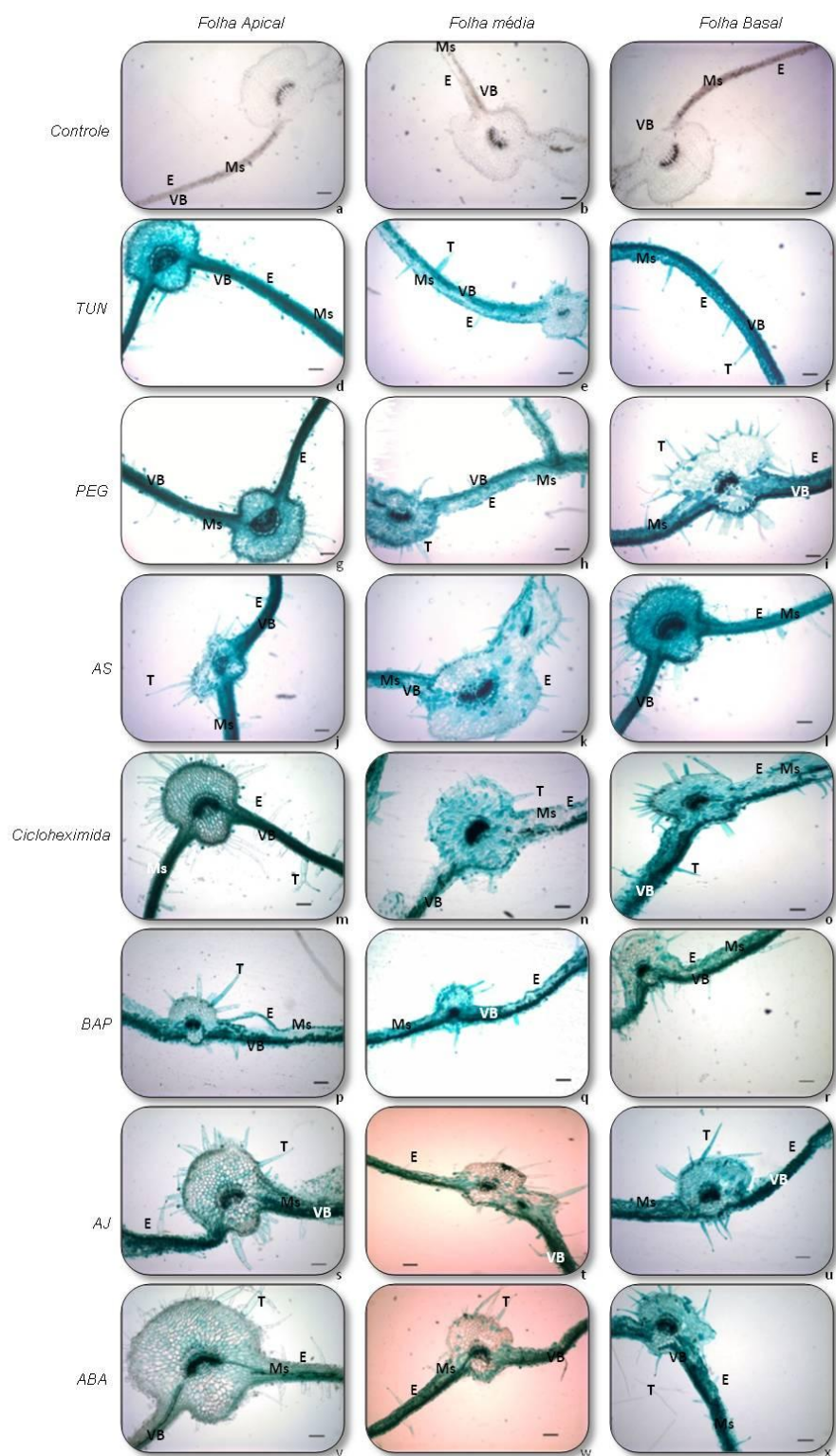


Figura 5 – Análise histoquímica da regulação tecido-específica do promotor de NAC6 fusionado a GUS em folhas transgênicas de tabaco contendo as construções pNAC61000:GUS. Plantas não estimuladas foram usadas como controle. Barras = 150 μ M.

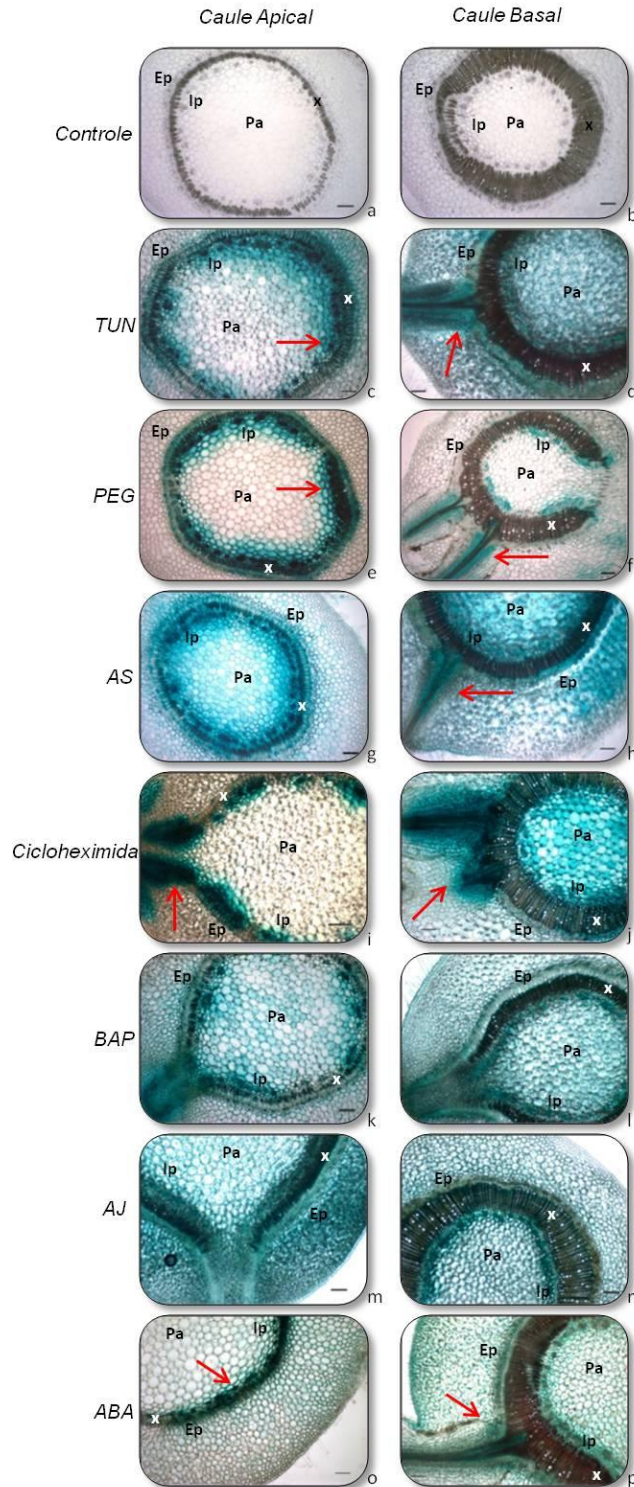


Figura 6 – Análise histoquímica da regulação tecido-específica do promotor de NAC6 fusionado a GUS em caules de plantas transgênicas de tabaco contendo as construções pNAC61000:GUS. Plantas não estimuladas foram usadas como controle. Setas vermelhas indicam regiões de coloração predominante. Parênquima, PA; Xilema, X; Floema interno, IP; Floema externo, EP; Barras = 150 μ M

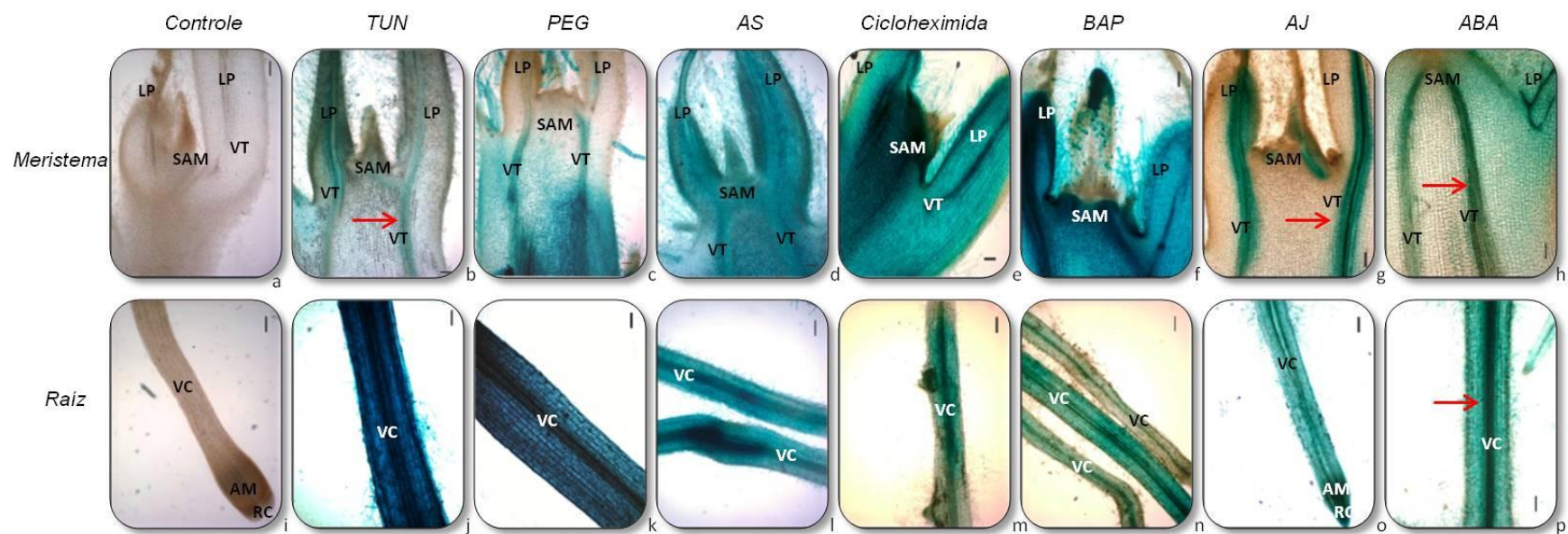


Figura 7 – Análise histoquímica da regulação tecido-específica do promotor de NAC6 fusionado a GUS no ápice caulinar e raiz de plantas transgênicas de tabaco contendo as construções pNAC61000:GUS. Plantas não estimulada foram usadas como controle. Setas vermelhas indicam regiões de intensa coloração da atividade histoquímica de GUS. Meristema apical caulinar, SAM; Primórdio foliar, LP; Tecido vascular, VT; Meristema apical radicular, AM; Cilindro Vascular, VC; Coifa, RC. Barras = 150μm

Esquema de regiões truncadas do promotor utilizadas para transformar tabaco e diagnóstico molecular das plantas transgênicas

A fim de se mapearem os cis-elementos regulatórios presentes no promotor do fator de transcrição NAC6, uma série de deleções de sequências do promotor foram realizadas, resultando em regiões truncadas até as posições de -750, -500 e -250pb em relação ao códon AUG de iniciação de tradução (Figura 8).

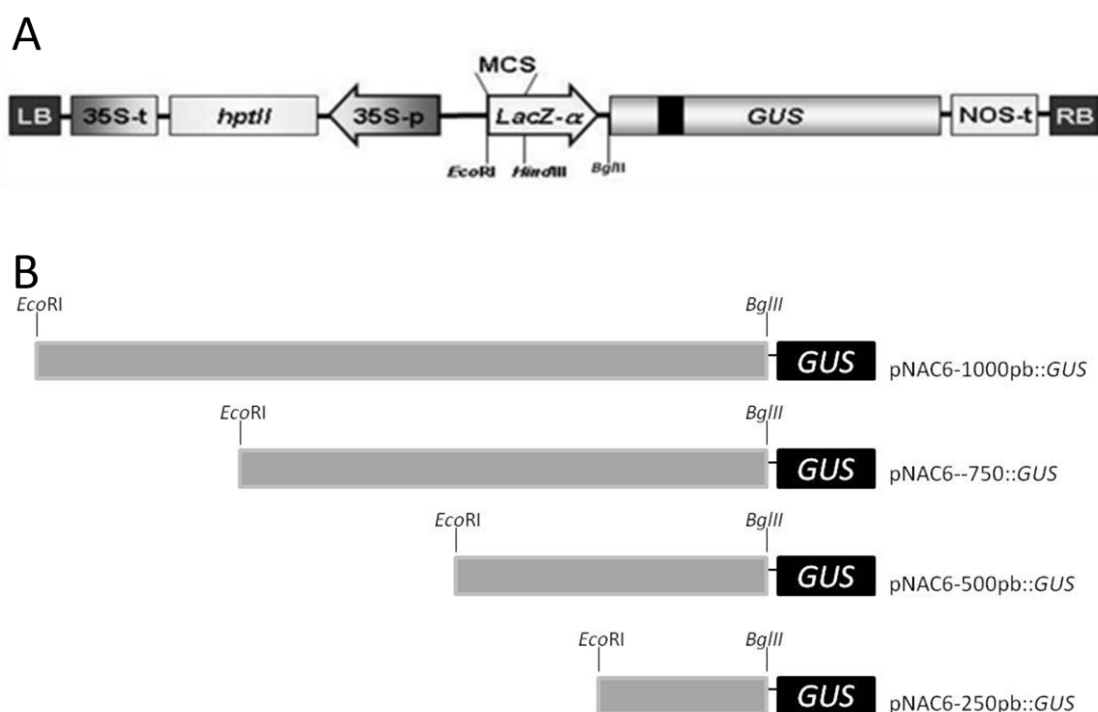


Figura 8 - Esquema mostrando as regiões do promotor que foram estudadas. A) Mapa do vetor binário de expressão em plantas pCambia1381z. As regiões com as enzimas utilizadas indicadas na figura e o gene de resistência a higrômica. B) Regiões do promotor fusionadas ao gene repórter GUS.

Os fragmentos truncados do promotor de NAC6 foram clonados em vetores binários de transformação de plantas diretamente fusionados ao cDNA de GUS, com o objetivo de averiguar o efeito da região deletada em resposta a todos os estresses testados. As plantas transformadas foram

confirmadas por PCR com primers específicos para as regiões promotoras, conforme mostrado nas Figuras 9, 10 e 11.

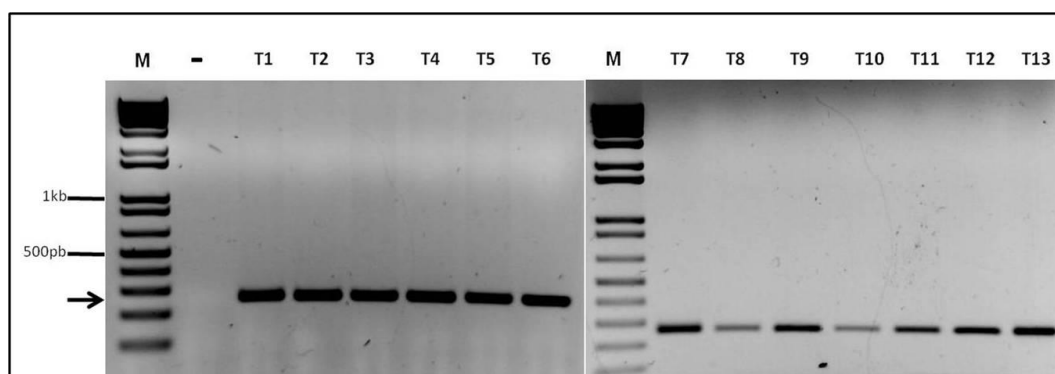


Figura 9 – Gel de confirmação das plantas com promotor de 250pb de NAC6 fusionado a GUS. A seta à esquerda indica a mobilidade eletroforética correspondente a fragmento de DNA de tamanho de 250pb. Em todos os ensaios, foram utilizados sempre três transformantes independentes dentre os treze confirmados acima.

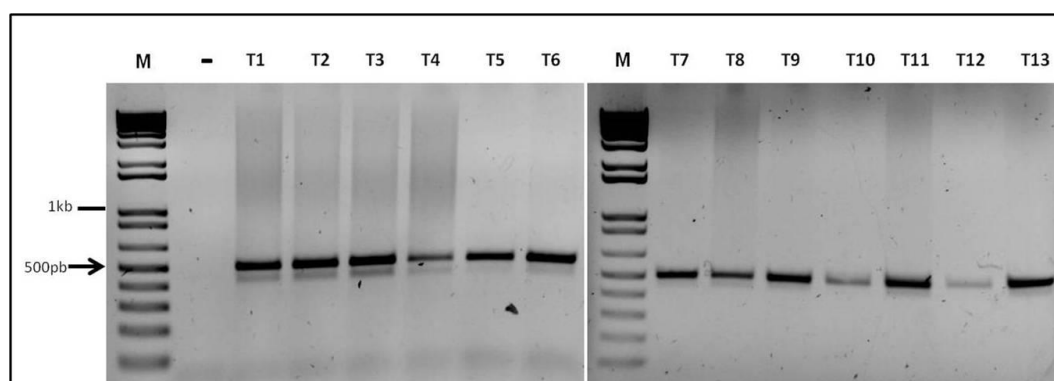


Figura 10 – Gel de confirmação das plantas com promotor de 500pb de NAC6 fusionado a GUS. A seta à esquerda indica a mobilidade eletroforética do tamanho de 500pb. Em todos os ensaios, foram utilizados sempre três transformantes independentes dentre os treze confirmados.

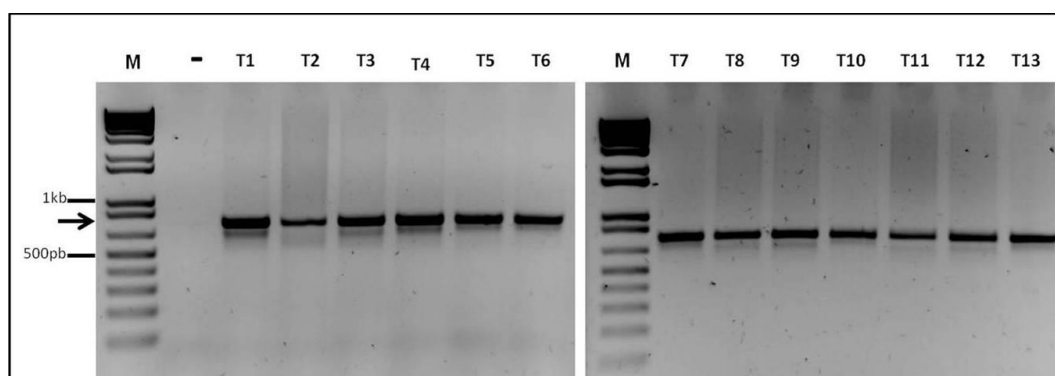


Figura 11 – Gel de confirmação das plantas com promotor de 750pb de NAC6 fusionado a GUS. A seta à esquerda indica a mobilidade eletroforética do tamanho de 750pb. Em todos os ensaios, foram utilizados sempre três transformantes independentes dentre os treze confirmados.

Regiões discretas do promotor NAC6 contêm os cis-elementos responsivos aos estímulos testados

Após a confirmação da transformação das plantas com as construções desejadas, foram realizadas as análises de indução dos promotores deletados com todos os estímulos testados anteriormente.

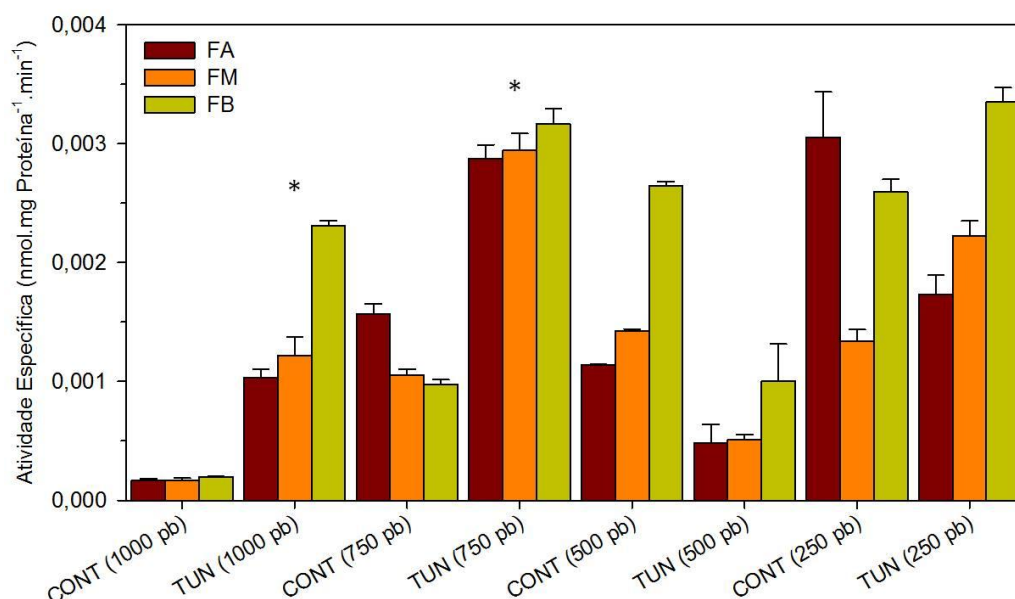


Figura 12 – Análise quantitativa da expressão da enzima GUS sob estresse de TUN em plantas transgênicas de tabaco contendo os promotores de tamanho indicado do gene NAC6 fusionado diretamente a GUS. A atividade específica de GUS foi determinada por ensaio fluorimétrico, (n=9, 3 triplicatas biológicas e 3 transformantes independentes). (*) asterisco indica diferença significativa por teste “t” de Students a $P < 0,05$ em relação ao respectivo controle. FA, folha apical; FM, folha medial; FB, folha basal; Cont = controle.

A indução por tunicamicina se manteve em níveis baixos com relação aos outros estímulos testados (Figura 12). Entretanto, deleção da região delimitada pelas posições -1000 a -750 não causou perda da inducibilidade do promotor em resposta à tunicamicina. Este efeito de perda de função somente foi observado ao se deletar a região de -750 a -500, quando os níveis de indução do promotor truncado se igualou

estatisticamente ao controle sem tratamento com tunicamicina. Estes resultados indicam que a região delimitada pelas posições -750pb a -500pb, em relação ao ATG, pode conter algum cis-elemento de resposta a tunicamicina (Figura 12).

In silico análise da sequência de 1000pb a montante do sítio de início de tradução revelou a presença de diversos cis-elementos conservados em promotores eucarióticos como a sequência TATA e uma sequência CCAAT invertida, além de diversos outros cis-elementos de promotores de genes de plantas envolvidos em respostas a diferentes estímulos (Faria *et al.*, 2011). Desta forma, não constitui surpresa o fato de esta região corresponder a um promotor funcional, conforme demonstrado nesta investigação pela sua capacidade de promover a expressão de um gene repórter. Entretanto, nenhuma sequência conservada correspondente a elementos de resposta a estresse no RE (ESRE ou UPRE) está presente na região de -750 a -500 que confere ao promotor de NAC6 inducibilidade a tunicamicina (Figura 12). Uma vez que já foi demonstrado que o gene NAC6 é induzido pela expressão das proteínas NRPs (Faria *et al.*, 2011), é possível que a indução do promotor NAC6 por tunicamicina seja indireta através da indução da expressão de NRPs.

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 (Figura 13). Se confrontar os dados obtidos com o banco de dados PlantPAN, não foram encontrados nenhum cis-elemento diretamente

envolvido em resposta à desidratação com o já descrito DRE (Dehydration-responsive element – TACCGACAT). No entanto, como já foi revisto por Shinosaki e Shinosaki (2006), muitos genes induzidos por diferentes estresses abióticos podem estar envolvidos em um “cross-talk” entre essas vias de sinalização, o que implicaria na interação de diferentes cis-elementos nessa “comunicação” em resposta aos diferentes estímulos.

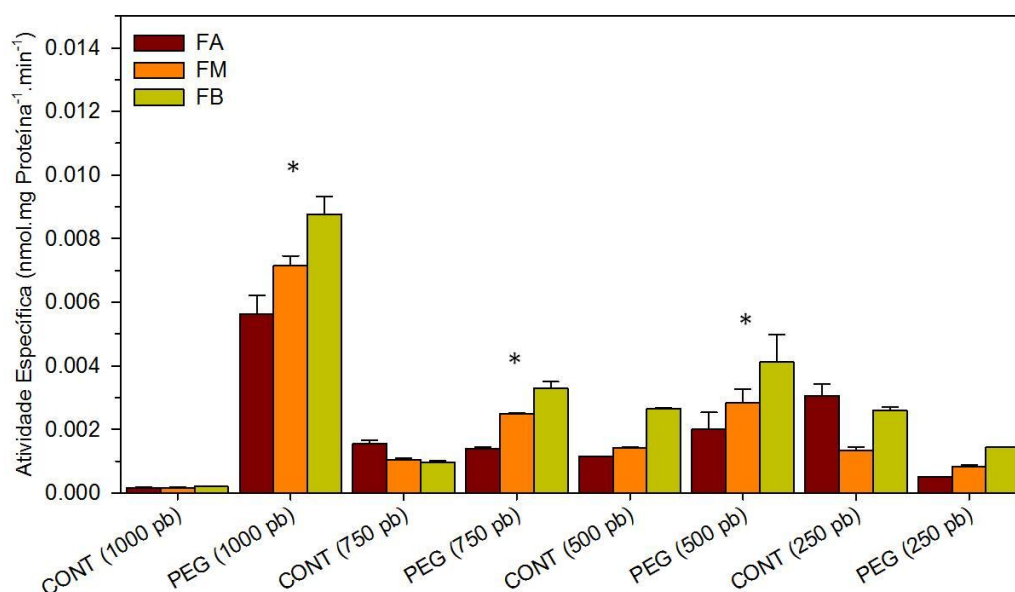


Figura 13 – Análise quantitativa da expressão da enzima GUS sob estresse de PEG em plantas transgênicas de tabaco contendo os promotores de tamanho indicado do gene NAC6 fusionado diretamente a GUS. A atividade específica de GUS foi determinada por ensaio fluorimétrico, (n=9, 3 triplicatas biológicas e 3 transformantes independentes). (*) asterisco indica diferença significativa por teste “t” de Students a $P < 0,05$ em relação ao respectivo controle. FA, folha apical; FM, folha medial; FB, folha basal; Cont = controle.

A resposta decorrente ao estímulo provocado por AS, com o objetivo de simular estresse biótico e ferimento, não seguiu o padrão de declínio já descrito em tunicamicina e PEG (Figura 15).

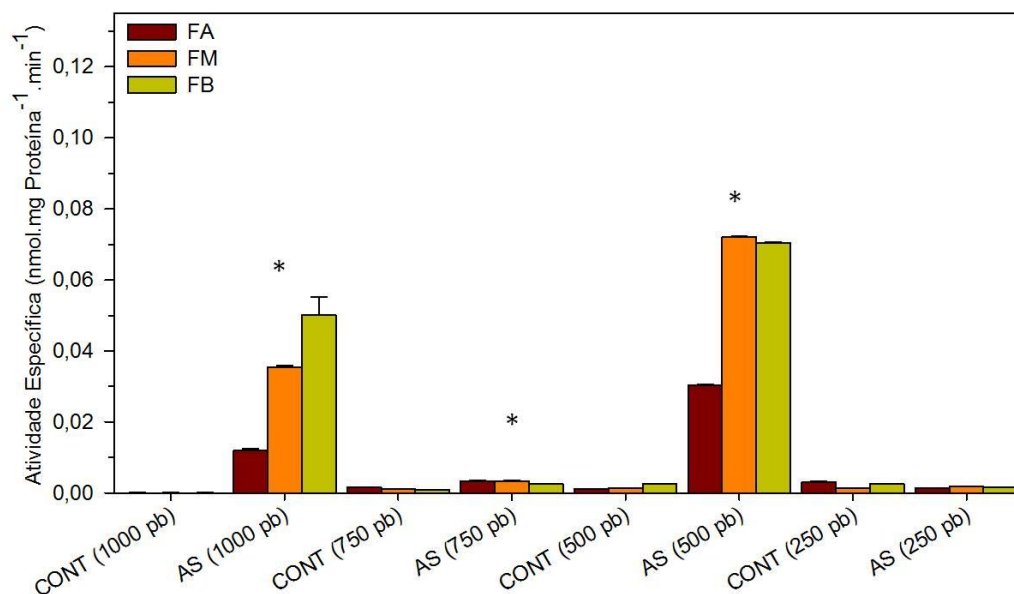


Figura 15 – Análise quantitativa da expressão da enzima GUS sob estresse de AS em plantas transgênicas de tabaco contendo os promotores de tamanho indicado do gene NAC6 fusionado diretamente a GUS. A atividade específica de GUS foi determinada por ensaio fluorimétrico, (n=9, 3 triplicatas biológicas e 3 transformantes independentes). (*) asterisco indica diferença significativa por teste “t” de Students a $P < 0,05$ em relação ao respectivo controle. FA, folha apical; FM, folha medial; FB, folha basal; Cont = controle.

O padrão de resposta foi alterado assim que ocorreu a deleção até a posição -750, diminuindo consideravelmente a inducibilidade do promotor quase ao nível do controle, mas ainda sim estatisticamente diferente. Deleção sucessiva da região delimitada pelas posições -750 e -500 promoveu um acentuado aumento da inducibilidade do promotor truncado quando comparado com o promotor completo (até posição -1000).

Esse resultado claramente indica a presença de elementos cis-regulatórios negativos na região delimitada pelas posições -750 a -500. Por outro lado, deleção da região -500 a -250 promoveu a total perda de inducibilidade do promotor, indicando a presença de cis-elementos regulatórios positivos responsáveis pela resposta à AS. De fato, esta região contém três de quatro sequências conservadas de interação do

transfator WRKY envolvidas em resposta à patógeno e ferimento, nas posições -229, -364, -421 e -479 (Figura 16 – verde claro). Estas sequências conservadas constituem excelentes alvos para racionalização de estudos posteriores visando o mapeamento preciso de cis-elementos responsivos a AS no promotor de NAC6. O elemento chamado W-box (sequência TGAC) no promotor de *GmNAC6*, geralmente está presente em promotores de genes responsivos à defesa e à senescência (Nishiuchi *et al*, 2004; Oh *et al*, 2008). Fatores de transcrição da família WRKY reconhecem a sequência W-box e têm sido descritos por estarem envolvidos em resposta à patógenos, ferimentos e diversos tipos de estresses abióticos, como nesse caso, induzido por tunicamicina. No entanto, inicialmente identificamos cinco possíveis regiões de regulação por parte dessas proteínas nas posições -229, -364, -421, -479 e -992 (Figura 16- grifado em verde claro). As sequências W-box também foram descritas como cis-reguladores negativos em processos de resposta a estresse por Chen e Chen (2004) e Oh e colaboradores (2008).

-1Kb TATGAAAGTCA TTTGATTAAAGGCTTCATTAAATTAACGCTGCAGTACTG
 TTTGGTTTGGGAATTATGCCATTCAAGACCCAAATAAGAGTATG CACGTAT

-900 TTAGATGTGAGGAACTTTCAAAGGTTGGAGTTGAGTCTGCTAATTTGTA
 ATTTTCTCGTTTGGGAAGCTGTTGGCATGTTGCT ACGT TATTTGGCATGTA

-800 AGTGGAATAACAACG ACGTAGAAATACTTTTATTTTGTGCCCAAATCATT
 TAGCAAATAATACAACTTGTCTTTGCTACAACGCACTTAGTAAAGTC

-700 ATAGACAAAAAAATTAACCATAATGTGCGAGATCAAATCTCATAACTCT
 TCTTCCCCCTTCTCCAGGGGATTGGGACCTTCATCTCTTGTGAACTTCCC

-600 TTAAATAAAACCCTTACATGCATTAAAAACAAGTTAATGGTAAGGTAAT
 TTTGTACCGTACATTTTTTTTCTTACATGCTGAAATGGAAGAAATTAAAG

-500 AACATAAAGTATAAAGTATG GTCA TGAAAATTGTAAGAGGAATTTCCGGG
 TAAAAGTCCAAAACCGAAAGAAAAAATAGGTCAAGCCATAACATGTATAT

-400 GCTGTCCCACCACAGTTTAGTCTCTGCAGACTTTTT GTCA AGCCG CGTGG
 GTCCCACTTCTGGCGGACCCACCACACTAATGTCGTAATAATGTGGAGAG

-300 TCGCAATTACAAGTCCATTTTCTTTCAAGATTTCTTAGAGACTTTTGTGC
 CCCCTAGGCCTC CACG ACCAA GTCA TAACCCAACTCAAATATTTAATAA

-200 AAATAAATCCATCAATTAGCATAGTTATGAAACCAACCATTCTTTATAAA
 TACCCTCACAACACATATTCATTTTATATCAACTAACTTTGTGCTTCCTC

-100 CGCAGAAAAATAAAAAAAGAGTAGCTAGCACTAGCTAGCTAAACACAGTA
 CGAGTAGTGATCATAGGCAAGCAAAAGCATATTCATAATATGGCAACCATG

Figura 16 - Representação dos cis-elementos putativos na sequência nucleotídica do promotor de *GmNAC6*. A região promotora foi analisada no banco de dados PlantPAN. Os números indicam as posições relativas ao códon de iniciação da tradução ATG (marcado em verde). Os elementos regulatórios putativos em destaque são: ABRELATERD1/ACGTAERD1, WBOX e núcleo da ligação de NACs (CACG).

Em resposta à cicloheximida, um indutor de morte celular, a indução do promotor após a deleção até a posição -750 ativou de forma mais intensa o promotor (Figura 17). Este resultado pode ser explicado pela presença de cis-elementos silenciadores entre -1000pb e -750pb, responsáveis por regulação negativa em resposta ao estímulo de morte celular. Além desse controle negativo, claramente cis-elementos positivos devem estar presentes na região -750 a -500 já que o nível alto de indução foi totalmente perdido com deleções ate a posição -500.

Exceto para AJ que parece regular o promotor NAC6 por meio de cis-elementos positivos mapeadas na região de -750 a -250 (Figura 18), os demais estresses mostraram regular o promotor NAC6 por meio de cis-elementos positivos e negativos.

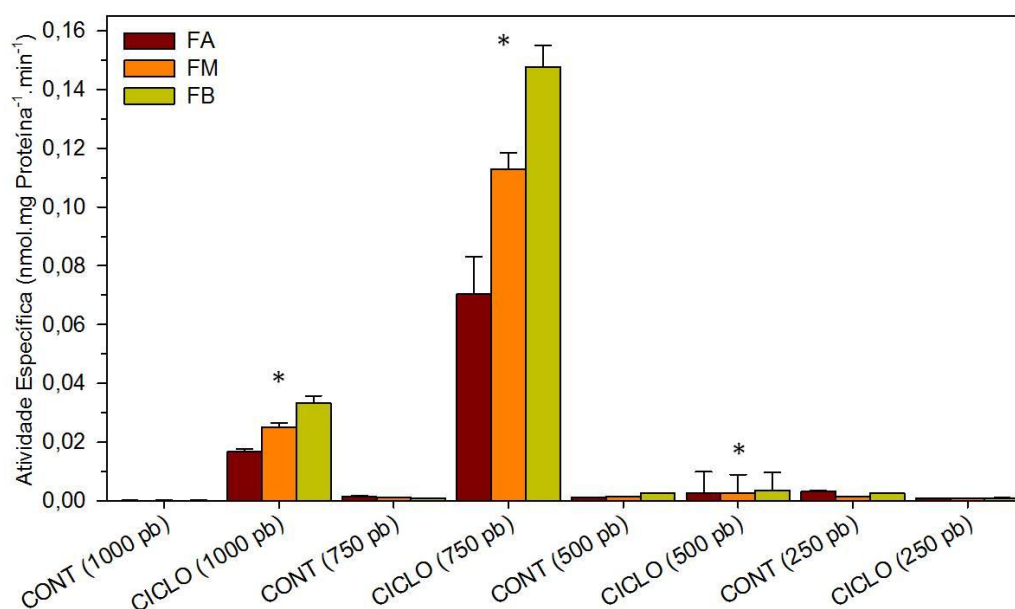


Figura 17 – Análise quantitativa da expressão da enzima GUS sob estresse de cicloheximida em plantas transgênicas de tabaco contendo os promotores de tamanho indicado do gene NAC6 fusionado diretamente a GUS. A atividade específica de GUS foi determinada por ensaio fluorimétrico, (n=9, 3 triplicatas biológicas e 3 transformantes independentes. (*) asterisco indica diferença significativa por teste “t” de Students a $P < 0,05$ em relação ao respectivo controle. FA, folha apical; FM, folha medial; FB, folha basal; Cont = controle.

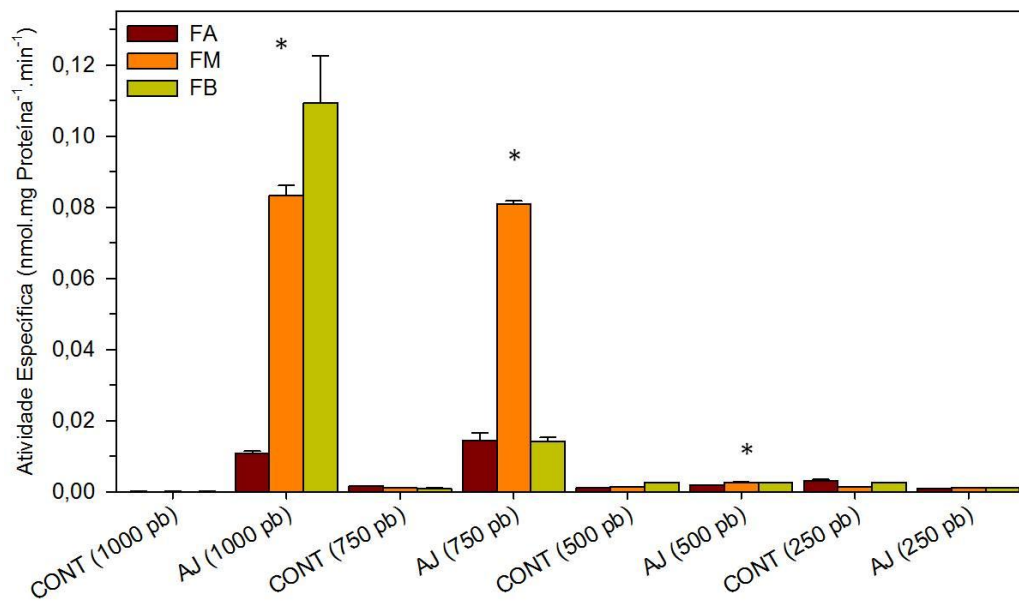


Figura 18 – Análise quantitativa da expressão da enzima GUS sob estresse de AJ em plantas transgênicas de tabacocontendo os promotores de tamanho indicado do gene NAC6 fusionado diretamente a GUS. A atividade específica de GUS foi determinada por ensaio fluorimétrico, (n=9, 3 triplicatas biológicas e 3 transformantes independentes. (*) asterisco indica diferença significativa por teste “t” de Students a $P < 0,05$ em relação ao respectivo controle. FA, folha apical; FM, folha medial; FB, folha basal; Cont = controle.

Para BAP, um inibidor de senescência, a resposta do promotor a esse estímulo diferenciou do padrão observado pelos outros estresses. No resultados para BAP, ocorreu o maior nível de ativação quando o promotor apresentava menor extensão proposta, apenas -250pb (Figura 19). Provavelmente, a presença de elementos negativos de resposta a BAP nas regiões de -1000 a -250 deve controlar o padrão de resposta do promotor a BAP.

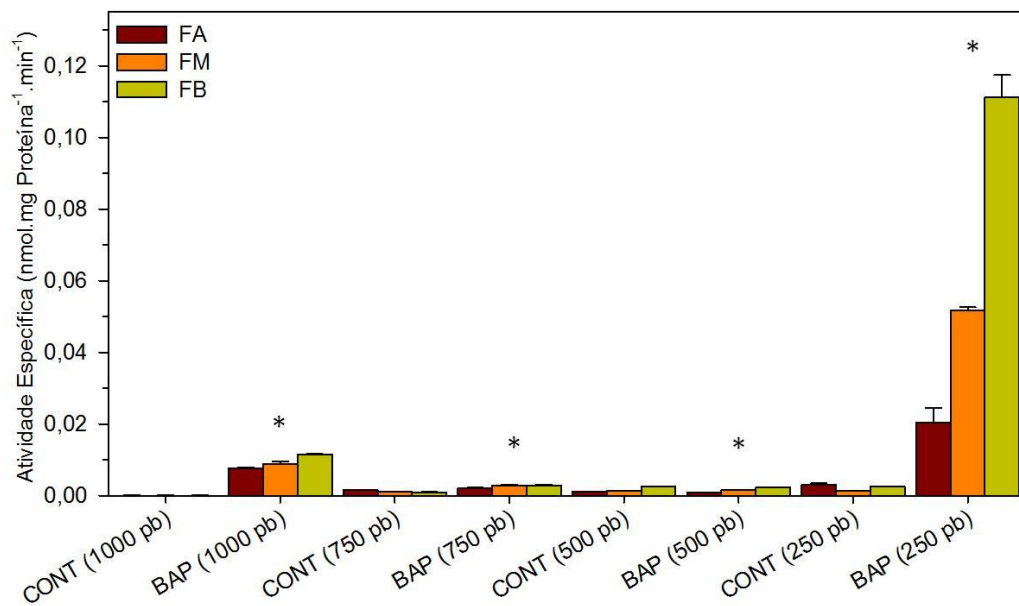


Figura 19 – Análise quantitativa da expressão da enzima GUS sob estresse de BAP em plantas transgênicas de tabaco contendo os promotores de tamanho indicado do gene NAC6 fusionado diretamente a GUS. A atividade específica de GUS foi determinada por ensaio fluorimétrico, (n=9, 3 triplicatas biológicas e 3 transformantes independentes). (*) asterisco indica diferença significativa por teste “t” de Students a $P < 0,05$ em relação ao respectivo controle. FA, folha apical; FM, folha medial; FB, folha basal; Cont = controle.

A resposta promovida pelo promotor em resposta a ABA, fitoregulador regulador de senescência e envolvido na resposta a estresse abiótico, apresentou dois picos de indução, um com o promotor inteiro em estudo (-1kb) e o outro com o promotor com a metade do tamanho original (-500pb, Figura 20). A indução só se igualou estatisticamente ao controle quando o promotor apresentava tamanho igual a -250pb, indicando que na região delimitada entre -500pb e -250pb se encontra uma possível região de interesse.

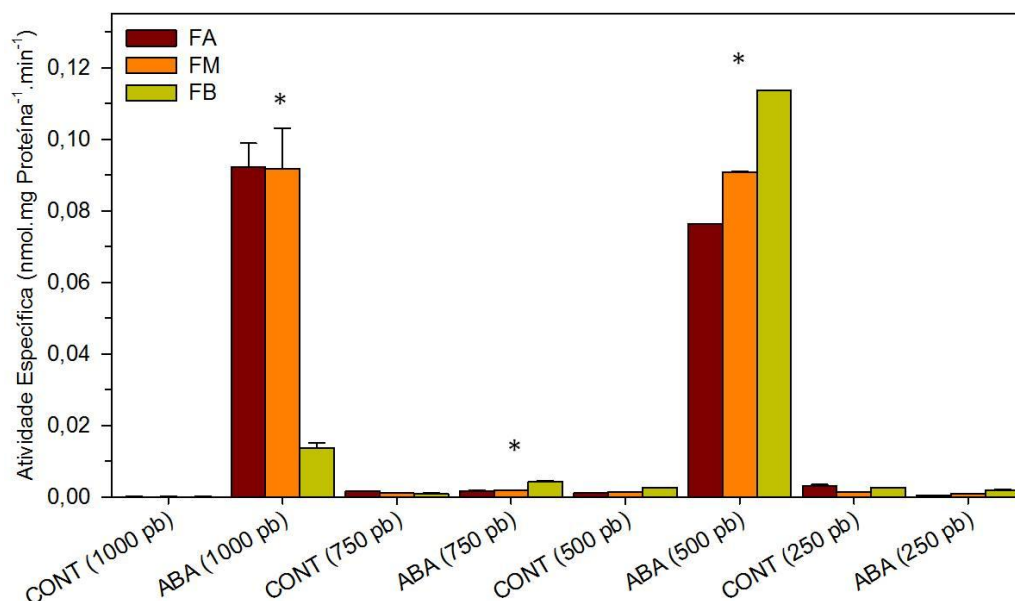


Figura 20 – Análise quantitativa da expressão da enzima GUS sob estresse de ABA em plantas transgênicas de tabaco contendo os promotores de tamanho indicado do gene NAC6 fusionado diretamente a GUS. A atividade específica de GUS foi determinada por ensaio fluorimétrico, (n=9, 3 triplicatas biológicas e 3 transformantes independentes. (*) asterisco indica diferença significativa por teste “t” de Students a $P < 0,05$ em relação ao respectivo controle. FA, folha apical; FM, folha medial; FB, folha basal; Cont = controle.

A presença destes elementos no promotor em análise é condizente com a indução transiente e inicial de *GmNAC6* decorrente da aplicação exógena de ABA (Pinheiro *et al.*, 2009). A análise *in silico* de sequências conservadas no promotor (Figura 16) revela a presença do elemento responsivo a ABA, ABRE (ABA-responsive element), descrito na literatura por regular a senescência, infecção de patógenos, ferimentos e estresse abióticos dependentes da presença desse hormônio. A sequência palindrômica ABRE (ACGTG) é responsável juntamente com ACGT pela expressão responsiva por parte do gene *AtERD1* (Early Responsive Dehydration 1) (Simpson *et al.*, 2003). Esses elementos regulatórios foram encontrados na análise do promotor de NAC6, posicionados em -906, -816

e -784, sempre em relação ao ATG (Figura 16 – grifado em vermelho). ABRE é o principal cis-elemento descrito na regulação gênica para resposta dependente de ABA segundo Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki (2005). A presença desses elementos pode explicar a alta inducibilidade do promotor completo (até posição -1000) em resposta a ABA (Figura 20).

O promotor de GmNAC6 é induzido por proteínas envolvidas na via de morte celular induzida pela integração dos sinais a estresses osmótico e do RE.

Recentemente, foi demonstrado que o transfator GmNAC6 atua como componente “downstream” da via de sinalização de morte celular mediada pelas proteínas NRPs e emanada de estresse no retículo endoplasmático e de sinais de estresse osmótico (Faria *et al.*, 2011). Assim como NRPs, NAC é induzida sinergisticamente em resposta ao tratamento combinado com indutores de estresse no RE e osmótico e induz morte celular em folhas de tabaco e células de soja em suspensão. Os genes NRPs e NAC6 são induzidos coordenadamente por uma variedade de estresses bióticos e abióticos, mas a indução de NRPs precede a indução de NAC6. Além disso, expressão de NRPs em células de soja ativa a expressão do promotor de NAC6 e induz a expressão do gene correspondente. Sendo assim, os experimentos descritos a seguir foram delineados para confirmar se NRPs promoveria a ativação do promotor NAC6 no sistema heterólogo em estudo. Além disso, uma vez que foram identificados sítios putativos de interação de transfatores NACs no

promotor de NAC6 (Figura 16), também foi de interesse verificar se o promotor de NAC6 pudesse ser auto regulado ou controlado por expressão de NAC32, outro componente da via de integração da resposta de morte celular induzida por sinais de estresses no RE e osmótico (Giselle C. Mendes e Elizabeth P. B. Fontes, comunicação pessoal).

Assim, com o objetivo de avaliar a participação dessas proteínas na indução do promotor de NAC6, culturas de agrobactéria, transformadas com as construções pYFP-*NRP-A*, pYFP-*NRP-B*, pK7F-*NAC32*, pYFP-*NAC6* e pK7F-*L18* (controle) foram agroinfiltradas em folhas de tabaco transgênico estavelmente transformadas com a construção pNAC6::GUS. A expressão transiente dos genes agroinoculados foi avaliada por RT-PCR (Figura 21) e quantificada por PCR em tempo real (Figura 22). Além da expressão transiente dos genes individualmente em folhas de tabaco, também foi avaliado o efeito da co-expressão transiente de NAC6 e NAC32 na atividade do promotor de NAC6, uma vez que foi recentemente demonstrado que estes transfatores interagem *in vitro* e provavelmente atuam juntos na regulação de promotores em plantas (Giselle C. Mendes e Elizabeth P. B. Fontes, comunicação pessoal).

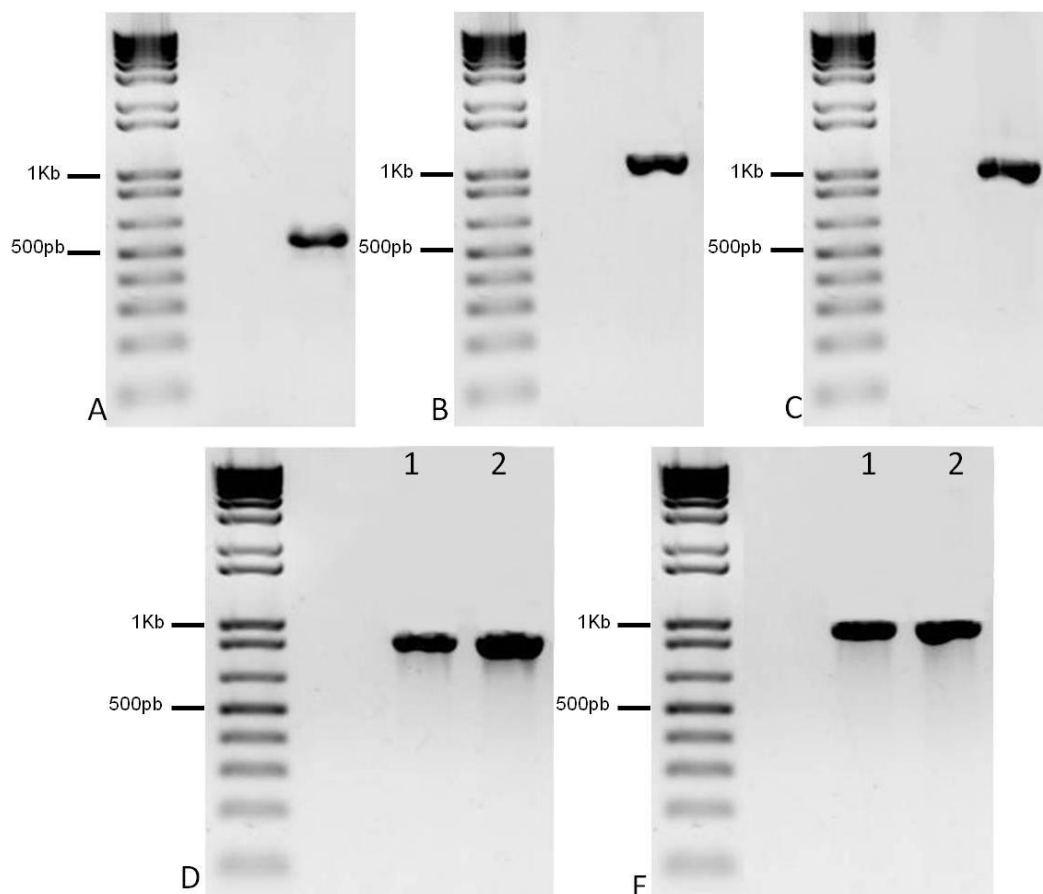


Figura 21 – Expressão transiente dos genes agroinoculados em folhas de tabaco transgênicas transformadas com a construção pNAC6::GUS. A expressão foi avaliada por RT-PCR. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de um pool de 3 transformantes independentes (n=3 replicas manuais). A) representa a confirmação da expressão de L18 (~600pb); B) representa a expressão de NRPA (~1010pb); C) representa a expressão de NRPB (~990); D) representa a expressão de NAC6 (1) (~900pb) e NAC6 co-infiltrado com NAC32, confirmado com primer para NAC6 (2) (~900pb); E) representa a expressão de NAC32 (1) e NAC32 co-infiltrado com NAC6, confirmado com primer para NAC32 (2).

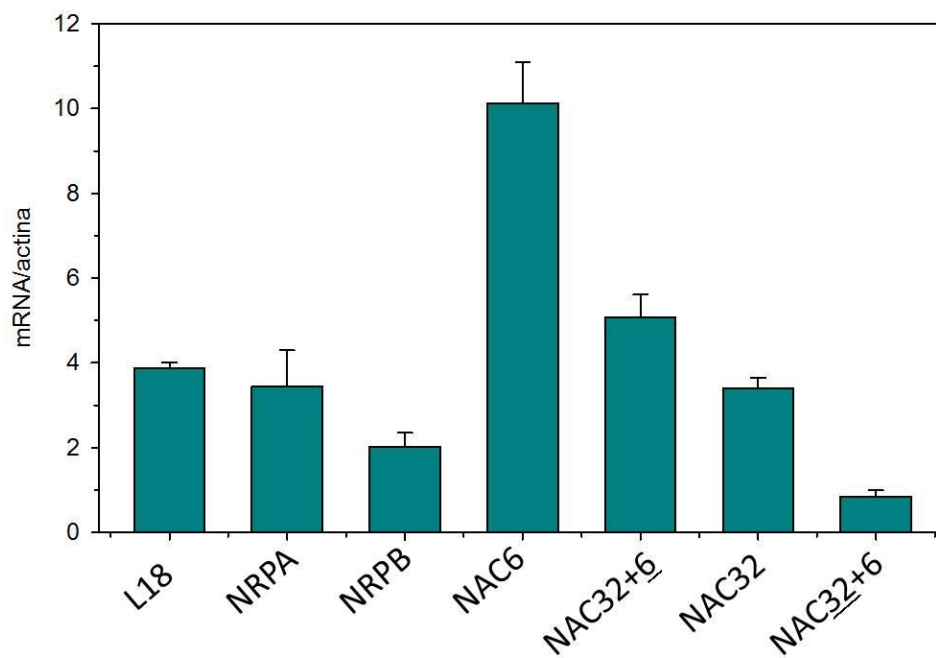


Figura 22 – Expressão relativa dos genes agroinoculadas em folhas de tabaco transgênicas contendo o promotor de NAC6. O acumulo dos transcritos foi avaliada por PCR em tempo real. Os valores foram calculados usando o método $2^{-\Delta CT}$ utilizando como controle endógeno actina. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de um pool de 3 réplicas biológicas (n=3 replicas manuais). Para a co-infiltração de NAC32+NAC6, foram utilizados primers específicos para NAC32 e para NAC6 para confirmação da mesma amostra.

O resultado da agroinoculação mostra uma forte indução do promotor de NAC6 como resultado da expressão das proteínas NRPs, quando comparada com a atividade do promotor mediada pela expressão de L18, uma proteína ribossomal de *Arabidopsis thaliana*, utilizada como controle (Figura 23).

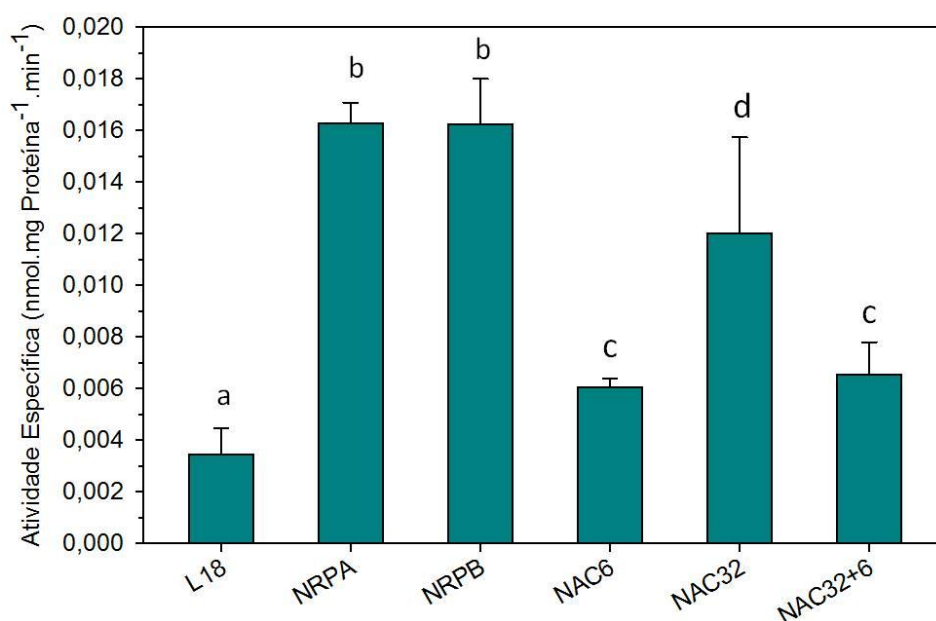


Figura 23. Atividade do promotor de NAC6 em resposta a expressão transiente de proteínas envolvidas na via de morte celular. Folhas de tabaco foram agroinfiltradas com as construções de interesse, conforme indicado na figura. A atividade específica de GUS foi determinada pelo ensaio fluorimétrico com extrato protéico das folhas infiltradas. (n=6, 3 repetições biológicas e 2 transformantes independentes). Letras diferentes indicam diferença significativa por teste “t” de Students a $P < 0,05$ em relação ao controle, L18.

Esse resultado confirma que tanto NRP-A quanto NRP-B são capazes de ativar o promotor de NAC6, consistente com os resultados obtidos previamente por Faria *et al.* (2011), que demonstraram que as NRPs ativam a indução do gene de NAC6 em células de soja.

A ativação do promotor NAC6 resultado da expressão do gene L18, mesmo que mínima, pode ser atribuída à execução do protocolo, uma vez que a agroinoculação provoca ferimento na folha. Esse resultado é perfeitamente compatível com os obtidos anteriormente, que demonstraram que a expressão do gene NAC6 e a ativação de seu promotor é induzido por ferimento em células de soja em suspensão (Faria *et al.*, 2011).

A expressão transiente do gene NAC32 também ativou fortemente o promotor *GmNAC6*, sugerindo que NAC32 pode atuar como um fator transcricional controlando a regulação do gene NAC6. Observa-se, entretanto que a ativação do promotor de NAC6 mediada por NAC32 é significativamente diminuída pela co-expressão do gene NAC6. Estes resultados indicam que NAC6 interfere negativamente na atividade transcricional de NAC32 e que os transfatores NAC32 e NAC6 provavelmente interagem *in vivo*. A interação entre NAC6 e NAC32 já foi demonstrado em leveduras através do sistema de duplo híbrido (Giselle C. Mendes e Elizabeth P.B. Fontes, comunicação pessoal), suportando o argumento de que os transfatores NAC6 e NAC32 devem interagir *in vivo* para controlar a atividade do promotor de NAC6. Experimentos de ligação ao DNA *in vitro* e de co-imunoprecipitação de cromatina *in vivo* devem ser realizados para comprovar esta hipótese.

CONCLUSÕES

Os experimentos descritos nesta investigação forneceram evidências conclusivas de que as sequências que flanqueiam o gene NAC6 até a posição -1000 possuem elementos funcionais de um promotor eucariótico induzido por estresses. Além de possuir sítios conservados de promotores basais (TATA box e CCAAT box), corretamente posicionados em relação ao putativo sítio de início de transcrição, estas sequências foram capazes de direcionar a expressão de um gene repórter em resposta a diversos estímulos, como tratamento com indutores de estresse no retículo endoplasmático e osmótico, indutores de morte celular, e hormônios como AB, AS, AJ e BAP. Consistente com seu papel em eventos de morte celular, o promotor de NAC6 foi fortemente induzido em tecidos em estádios avançados de desenvolvimento, exceto para o regulador de senescência ABA, indicando que sob estresse o promotor de NAC6 é mais ativo em tecidos mais velhos. O promotor também apresentou elevada atividade em tecidos em diferenciação e intensa divisão celular, o que forneceu novos indícios de que NAC6 pode estar envolvido em processos de diferenciação e multiplicação celular quando induzido por estresse.

As deleções em séries de regiões do promotor permitiram identificar e mapear importantes regiões cis-regulatórias envolvidas na indução do promotor em resposta a diferentes estresses, conforme destacado na Figura 24. Tanto elementos silenciadores como elementos ativadores do promotor foram destacados em domínios discretos do promotor. Provavelmente,

estes domínios contêm sítios de ligação para proteínas repressoras e ativadoras de transcrição. Estes módulos de regulação do promotor servirão de bases para estudos posteriores visando ao mapeamento preciso desses sítios de ligação de transfatores responsáveis pela regulação do promotor de NAC6. Os resultados dessa investigação também demonstraram que as proteínas NRP-A e NRP-B, que intermedeiam o processo de morte celular programada induzido por estresses prolongados do RE e osmótico, ativam de modo eficiente o promotor do gene NAC6, substanciando o argumento de que NAC6 atua como componente “downstream” a NRPS nessa via. Além disso, foi também demonstrado que o transfator NAC32 ativa o promotor de NAC6 e que NAC6 interfere negativamente na atividade transcricional de NAC32, provavelmente através de formação de complexos. Experimentos de ligação ao DNA *in vitro* e de co-imunoprecipitação de cromatina *in vivo* devem ser realizados para comprovar esta hipótese.

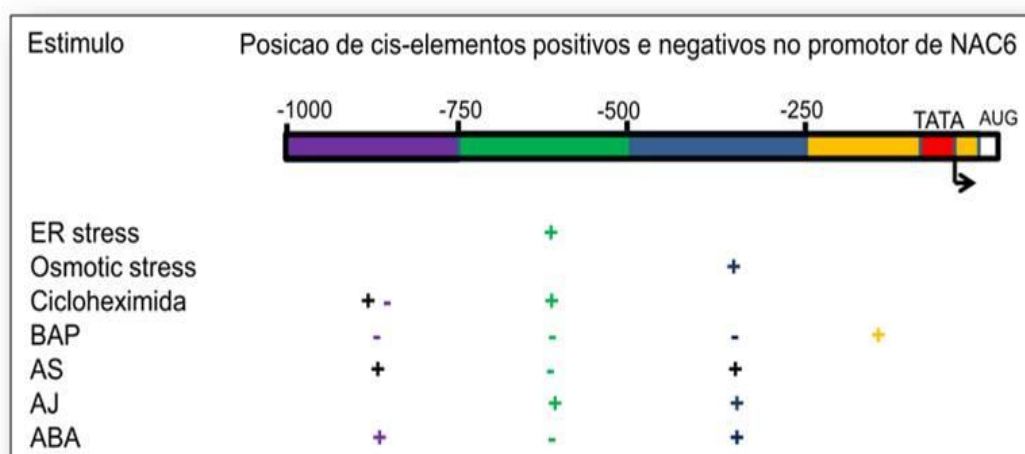


Figura 24. Posição dos elementos cis-regulatórios contidos no promotor de NAC6.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves MS, Reis PAB, Dadalto SP, Faria JAQA, Fontes EPB, Fietto LG (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** 286:20020-20030.

Alvim FC, Carolino SMB, Cascardo JCM, Nunes CC, Martinez CA, Otoni WC, Fontes EPB (2001) Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. **Plant Physiology** 126: 1042-1054.

Baumann M, Poutler J, Ernst W (2010) Structure and Basal Transcription Complex of RNA Polymerase II Core Promoters in the Mammalian Genome: An Overview. **Mol Biotechnol** 45:241–247.

Bradford M (1976) Photometric methods for protein determination. Procedures and analysis. **Analytical Biochemistry** 72: 248-254.

Breathnach R, Chambon P (1981) Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. **Annu. Rev. Biochem.**,v.50, p.349-383.

Brossa R, Carbonell ML, Marí TJ, Alegre L (2011) Interplay Between Abscissic acid and Jasmonic Acid and its Role in Water-oxidative Stress in Wild-type, ABA-deficient, JA-deficient, and Ascorbate-deficient *Arabidopsis* Plants. **J Plant Growth Regul** 30:322-333.

Buzeli RAA, Cascardo JCM, Rodrigues LAZ, Andrade MO, Loureiro ME, Otoni WC, Fontes EPB (2002) Tissue-specific regulation of *Bip/Grp78* genes: a cis-acting regulatory domain is required for *BiP* promoter activity in plant meristems. **Plant Molecular Biology** 50: 757-771.

Cascardo JCM, Almeida RS, Buzeli RAA, Carolino SMB, Otoni WC, Fontes EPB (2000) The phosphorylation state and expression of soybean BiP isoforms are differentially regulated following abiotic stresses, **The Journal of Biological Chemistry** 275, 14494-14500.

Cascardo JCM, Buzeli RAA, Almeida RS, Otoni WC, Fontes EPB (2001) Differential expression of the soybean BiP gene family. **Plant Science** (Limerick), Elsevier Science Ireland Ltda 160, 273-281.

Chang WC, Lee TY, Huang HD, Huang HY, Pan RL (2008) PlantPAN: Plant promoter analysis navigator, for identifying combinatorial cis-regulatory elements with distance constraint in plant gene groups. **BMC genomics** 9 (561).

Collinge M, Boller (2001) Differential induction of two potato genes, *Stprx2* and *StNAC*, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding. **Plant Molecular Biology** 46: 521-529.

CONAB – 2011. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&ordem=produto&Pagina_objcmsconteudos=3#A_objcmsconteudos> Acesso em 31/01/2012.

Costa MDL, Reis PAB, Valente MAS, Irsigler AST, Carvalho CM, Loureiro ME, Aragão FJL, Boston RS, Fietto LG, Fontes EPB (2008) A new branch of endoplasmic reticulum stress signalling and the osmotic signal converge on plant-specific asparagine-rich proteins to promote cell death. **Journal of Biological Chemistry** 283: 20209-20219.

Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR (2010) Absciscic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. **Annual Review Plant Biology** 61:651-679.

Ellis MH, Dennis ES, Peacock WJ (1999) Arabidopsis Roots and Shoots Have Different Mechanisms for Hypoxic Stress Tolerance. **Plant Physiology** 119:57-64.

EMBRAPA - 2011. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Disponível em <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=25&cod_pai=29>. Acesso em 31/01/12.

Fang Y, You J, Xie K, Xie W, Xiong L (2008) Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice. **Mol Genet Genomics** 280:535- 46.

Faria JAQA, Reis PAB, Reis MTB, Rosado GL, Pinheiro GL, Mendes GC, Fontes EBP (2011) The NAC domain-containing protein, *GmNAC6*, is a downstream component of the ER stress and osmotic stress-induced NRP-mediated cell-death signaling pathway. **BMC Plant Biology** 11:129

Fragnière C, Serrano M, Mansour EA, Métraux JP, L'Haridon F (2011) Salicylic acid and its location in response to biotic and abiotic stress. **FEBS Letters** 585:1847-1852.

Gershon TJ, Kadonaga JT (2010) Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. **Developmental Biology** 339 225-229.

Goldberg ML (1979) **Sequence analysis of *Drosophila* histone genes**. Ph.D.dissertation, Stanford University, Califórnia, 1979.

Hao YJ, Song QX, Chen HW, Zou HF, Wei W, Kang XS, Ma B, Zhang WK, Zhang JS, Chen SY (2010) Plant NAC-type transcription factor protein

contain a NARD domain for repression of transcriptional activation. **Planta** 232:1033-1043.

Hasegawa PM, Bressan RA, Handa AK (1984) Cellular mechanisms of tolerance to water stress. **Hortscience**, 19: 371-377.

Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga TN (1999) Plant cis acting regulatory DNA elements (PLACE) database. **Nucleic Acids Research** 27: 297-300.

Hu H, You J, Fang Y, Zhu X, Qi Z, Xiong L (2008) Characterization of transcription factor gene SNAC2 conferring cold and salt tolerance in rice. **Plant Mol Biol** 67:169–181

Huckelhoven R (2007) Cell Wall - associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. **Annual Review Phytopathology**, 45: 101-127.

Irsigler AST, Costa MDL, Zhang P, Braga PA, Dewey R, Boston RS, Fontes EPB (2007) Expression profiling on soybean leaves reveals integration of ER- and osmotic-stress pathways. **BMC Genomics**, 8 (431).

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) Gus fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO Journal** 6: 3901-3907.

Kato H, Motomura T, Komeda Y, Saito T, Kato A (2010) Overexpression of the NAC transcription factor family gene ANAC036 results in a dwarf phenotype in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Plant Physiology** 167:571-577.

Kaufmann K, Pajoro A, Angenent GC (2010) Regulation of transcription in plants: mechanisms controlling developmental switches. **Nature** 11:830-842.

Lim PO, Kim HJ, Nam HG (2007) Leaf senescence. **Annu. Rev. Plant Biol.** 58, 115–136.

Ludwig AA, Tenhaken R (2001) A new cell wall located N-rich protein is strongly induced during the hypersensitive response in *Glycine max* L. **European Journal of Plant Pathology** 107: 323-336.

Mccabe DE, Swain WF, Martinell BJ, Christou P (1988) Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle bombardment. **Biotechnology**, 6: 923-926.

Mochida K, Yoshida T, Sakurai T, Yamaguchi- Shinozaki K, Shinozaki K, Tran L-SP (2009) In silico analysis of transcription factor repertoire and prediction of stress responsive transcription factors in soybean. **DNA Research** 16, 353–369.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 5: 473-498.

Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K (2009) Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. **Plant Physiol** 149:88-95.

Nishiuchi T, Shinshi H, Suzuki K (2004) Rapid and transient activation of transcription of the *erf3* gene by wounding in tobacco leaves. **The Journal of Biological Chemistry** 279: 55355-55361.

Nogueira FTS, Schlögl PS, Camargo SR, Fernandez JH, De Rosa JRVE, Pompermayer P, Arruda P (2005) SsNAC23, a member of the NAC domain protein family, is associated with cold, herbivory and water stress in sugarcane. **Plant Science** 169: 93-106.

Oh SK, Baek K-H, Park JM, Yi SY, Yu SH, Kamoun S, Choi D (2008) Capsicum annuum WRKY protein CaWRKY1 is a negative regulator of pathogen defense. **New Phytologist** 177: 977-989.

Olsen AN, Ernst HA, Leggio LL, Skriver K (2005) NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. **Trends Plant Sci** 10:79-87.

Paoletti F, Ainger K, Donati I, Scardigli R, Vetere A (2010) Novel fluorescent cycloheximide derivatives for the imaging of protein synthesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 396:258–264.

Pei ZF, Ming DF, Liu D, Wan GL, Geng XX, Gong HJ, Zhou WJ (2010) Silicon Improves the Tolerance to Water-Deficit Stress Induced by Polyethylene Glycol in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Seedlings. **J Plant Growth Regul** 29:106-115.

Pinheiro GL, Carolino SM, Costa MDL, Reis PAB, Alves MS, Carvalho CM, Fietto LG, Fontes EBP (2009) Complete inventory of soybean NAC transcription factors: sequence conservation and expression analysis uncover their distinct roles in stress response. **Gene** 444: 10-23.

Reis PAB, Rosado GL, Silva LAC, Oliveira LC, Costa MDL, Alvim FC, Fontes EPB (2011) The binding protein BiP attenuates stress-induced cell death in soybean via modulation of the N-rich protein-mediated signaling pathway. **Plant Physiology** 157:1853-1865.

Reis, PAB, Ramos JRLS, Fontes EPB. Endoplasmic Reticulum Stress Response. **In:** Prof. Tzi-Bun Ng. (Org.). Soybean - Biochemistry, Chemistry and Physiology. Rijeka, Croatia: Intech, 2011, v. 1, p. 229-242.

Ren T, Qu F, Morris TJ (2000) HRT gene function requires interaction between a NAC protein and viral capsid protein to confer resistance to turnip crinkle virus. **Plant Cell** 12: 1917-1926.

Rulcová J and Pospíšilová J (2001) Effect of benzylaminopurine on rehydration of bean plants after water stress. **Biologia Plantarum** 44:75-81.

Rushton PJ, Bokowiec MT, Han S, Zhang H, Brannock JF, Chen X, et al (2008) Tobacco transcription factors: novel insights into transcriptional regulation in the Solanaceae. **Plant Physiol** 147:280-95.

Rutkowski DT, Hedge RS (2010) Regulation of basal cellular physiology by the homeostatic unfolded protein response. **The Journal of Cell Biology** 189:783-794.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**, Ed.2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Šereš M, Cholužová D, Bubenčíková T, Breier A, Sulová Z (2011) Tunicamycin Depresses P-Glycoprotein Glycosylation Without an Effect on Its Membrane Localization and Drug Efflux Activity in L1210 Cells. **International Journal of Molecular Sciences** 12 7772-7784.

Singh KB (1998) Transcriptional Regulation in Plants: The Importance of Combinatorial Control. **Plant Physiology** 118:1111-1120.

Simpson SD, Nakashima K, Narusaka Y, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) Two different novel cis-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous Arabidopsis gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. **The Plant Journal** 33: 259-270.

Shinosaki K, Shinosaki KY (2006) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany** 58:221–227.

SOYSTATS – **Soy Stats**[®]. Disponível em <<http://www.soystats.com/2011/Default-frames.htm>>. Acesso em 31/01/12.

Tenhaken R, Doerks T, Bork P (2005) DCD – a novel plant specific domain in proteins involved in development and programmed cell death. **BMC Bioinformatics**, 6:169.

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 **Landes Bioscience** 1(1): 1-8.

Tran L-SP, Nakashima K, Sakuma Y, Osakabe Y, Qin F, Simpson SD, *et al.* (2007c) Co-expression of the stressinducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the *ERD1* gene in Arabidopsis. **Plant J** 49:46-63.

Tran L-SP, Quach TN, Guttikonda SK, Aldrich DL, Kumar R, Neelakandan A, Valliyodan B, Nguyen H (2009) Molecular characterization of stress-inducible *GmNAC* genes in soybean. **Molecular Genetics and Genomics** 281: 647-664.

Udvardi MK, Kakar K, Wandrey M, Montanari O, Murray J, Andriankaja A, *et al.* (2007) Legume transcription factors: global regulators of plant development and response to the environment. **Plant Physiol** 144:538-49.

Wasternack C (2007) Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. **Annals of Botany** 100:681-697.

Xie Q, Guo HS, Dallman G, Fang S, Weissman AM, Chua NH (2002) SINAT5 promotes ubiquitin-related degradation of NAC1 to attenuate auxin signals. **Nature** 419:167-70.

Xie Q, Sanz-Burgos AP, Guo H, Garcia JA, Gutierrez C (1999) GRAB proteins, novel members of the NAC domain family, isolated by their interaction with a geminivirus protein. **Plant Molecular Biology** 39: 647-656.

Xu F, Yang Z, Chen X, Jin Peng, Wang X, Zheng Y (2011) 6-Benzylaminopurine Delays Senescence and Enhances Health-Promoting Compounds of Harvested Broccoli. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 60:234-240.

Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2005) Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. **Trends in Planta Science** 10(2): 88-94.

Yuan S, Lin HH (2008) Role of salicylic acid in plant abiotic stress. **Journal of Biosciences** 63:313-20.