

**DALTON DE OLIVEIRA FERREIRA**

**GmNAC081: ELEMENTO DE CONVERGÊNCIA PARA COMUNICAÇÃO  
CRUZADA ENTRE SENESCÊNCIA E TOLERÂNCIA À SECA**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2017

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

T

F383g  
2017

Ferreira, Dalton de Oliveira, 1987-  
GmNAC081 : elemento de convergência para comunicação  
cruzada entre senescência e tolerância à seca / Dalton de  
Oliveira Ferreira. – Viçosa, MG, 2017.  
viii, 74f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 60-74.

1. *Glycine max*. 2. Soja - Estresse abiótico. 3. Senescência  
vegetal. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-graduação  
em Genética e Melhoramento. II. Título.

CDD 22. ed. 633.34

DALTON DE OLIVEIRA FERREIRA

**GmNAC081: ELEMENTO DE CONVERGÊNCIA PARA COMUNICAÇÃO  
CRUZADA ENTRE SENESCÊNCIA E TOLERÂNCIA À SECA**

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

APROVADA: 20 de julho 2017.

*Iara Pinheiro Calil*  
Iara Pinheiro Calil

*Márcia Flores da Silva Ferreira*  
Márcia Flores da Silva Ferreira

*Otávio José Bernardes Brustolini*  
Otávio José Bernardes Brustolini

*Elizabeth Pacheco Batista Fontes*  
Elizabeth Pacheco Batista Fontes  
(Orientadora)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por estar presente em todos os momentos felizes e difíceis, sua presença dá sentido à vida e forças para seguir em frente.

À minha família, razão de todo o meu esforço, aos meus pais Dimas e Dalva, pelo amor, dedicação, exemplo de honestidade, simplicidade, trabalho e não medirem esforços para realização dos meus sonhos. Minha irmã Aline e meu sobrinho Ítalo pelo carinho, amor e apoio em tudo na minha vida. A vocês dedico todas as minhas vitórias e o desejo de podermos estar cada vez mais juntos.

Aos meus familiares, tios, tias e primos por sempre me apoiarem e entenderem minha ausência em momentos importantes.

A Universidade Federal de Viçosa, pela instituição exemplo de pesquisa e ensino, e pela oportunidade de realizar esse grande projeto profissional.

Ao CNPq pelo o suporte financeiro.

À professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes pela orientação e ensinamentos, confiança no meu trabalho, exemplo competência, dedicação e amor à ciência.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, professores, funcionários e amigos pelo aprendizado e pelo conhecimento adquirido.

Aos amigos do LBMP, pela excelente convivência e companheirismo. Pela oportunidade de troca de conhecimento e aprendizado. Obrigado pelas horas de conversa e ajuda durante o desenvolvimento das pesquisas.

Ao Adriano, Gláucia, Marlene e Virgílio, pela ótima companhia e apoio técnico durante os anos de laboratório.

Aos meus queridos amigos, alguns muito presentes e outros menos, levo vocês do lado esquerdo do peito e estão comigo nesse momento.

Obrigado a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão dessa etapa, que Deus esteja presente em todos os momentos de nossas vidas.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vii
1.Introdução .....	1
2. Revisão Bibliográfica .....	3
2.1. Regulação de Senescência por fatores de transcrição NAC .....	3
2.2. Via de Morte celular programada mediada pelas NRPs .....	7
2.3. Estresse hídrico .....	9
3. Material e Métodos .....	12
3.1. Material vegetal .....	12
3.2. Extração de RNA de folhas de soja e síntese de cDNA.....	13
3.3. Ensaio de PCR em tempo real (qRT-PCR) .....	13
3.4. Sequenciamento do mRNA .....	14
3.5 Análise de expressão gênica diferencial utilizando os dados de RNA-seq.....	14
3.6 Identificação de genes candidatos a alvos diretos de GmNAC081 .....	15
3.7 Detecção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por DAB (Diaminobenzidina) .....	16
3.8. Avaliação fenotípica de plantas de soja superexpressando <i>GmNAC081</i> .....	16
3.9. Produtividade das linhagens transgênicas .....	16
3.10. Expressão diferencial de genes relacionados ao estresse hídrico .....	17
3.11. Indução de estresse hídrico em soja .....	17
3.12. Determinação do teor relativo de água.....	18
3.13. Parâmetros fisiológicos de trocas gasosas .....	18
3.14. Parâmetros fisiológicos de fluorescência .....	18
3.15. Determinação de MDA (malondialdeído).....	19
3.16. Determinação dos teores de clorofilas e carotenóides .....	20
4. Resultados e Discussão .....	20
4.1Adequabilidade das linhagens transgênicas para análise da função de <i>GmNAC081</i> em senescência. ....	20

4.2 Transcriptoma induzido pela senescência foliar em plantas de soja não transformadas (WT) e plantas expressando ectopicamente o gene <i>GmNAC081</i> .....	27
4.3 Efeito da superexpressão de <i>GmNAC081</i> na tolerância da soja ao déficit hídrico. ....	35
5. Conclusão .....	44
6. Dados suplementares .....	46
7. Referências Bibliográficas .....	60

## RESUMO

FERREIRA, Dalton de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **GmNAC081: elemento de convergência para comunicação cruzada entre senescência e tolerância à seca.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

O setor da agroindústria representa a maior fração das divisas na economia brasileira. No entanto, as culturas agronômicas estão sujeitas aos estresses do meio ambiente, incluindo os estresses bióticos (causados por microrganismos, herbívoros ou vírus) e abióticos (disponibilidade de água, nutrientes, presença de agentes estressantes no solo, etc) e eventos de desenvolvimento, como a senescência. No caso de defesa a estresses múltiplos, as plantas ativam uma via de sinalização de morte celular programada (PCD, *programmed cell death*) mediada pelos fatores de transcrição *GmNAC081* e *GmNAC030* que pertencem a uma grande família de transfatores específicos de plantas. Foi observado que *GmNAC081* está envolvido com o processo de senescência natural e seu silenciamento retarda a senescência foliar e atenua os demais sintomas decorrentes da morte celular programada; porém, o mecanismo bioquímico envolvido não foi totalmente elucidado. Nesta investigação, foi explorada uma abordagem de genômica funcional para avaliar o mecanismo pelo qual *GmNAC081* está envolvido em senescência, bem como o efeito da expressão ectópica de *GmNAC081* durante o déficit hídrico. As linhagens transgênicas superexpressando o gene *GmNAC081* senesceram mais rápido do que as plantas não transformadas. Nas linhagens transgênicas, *GmNAC081-1*, e *GmNAC081-3*, a expressão ectópica de *GmNAC081* acelerou o amarelecimento foliar que foi associado com maior acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), comparado com as plantas controles. Enquanto que no estágio V3 (20 dias após germinação), nas linhagens transgênicas, o nível de transcritos de *GmNAC081* foi muito superior àqueles de plantas não transformadas BR16, no estágio R7 (80 DAG), a expressão de *GmNAC081* endógeno, em BR16, foi induzida pelo processo de senescência, alcançando níveis similares àqueles das linhagens transgênicas. A indução natural de *GmNAC081* durante senescência mimetizou o fenótipo da superexpressão do transgene, uma vez que, em clusterização, as sequências expressas

durante senescência natural em BR16 agruparam junto com as sequências expressas da linhagem GmNAC081-3 nas plantas em R7. Em contraste, nas plantas em V3, na linhagem transgênica, 1849 e 2813 genes foram induzidos e reprimidos, respectivamente, dos quais 455 genes regulados positivamente e 1200 genes regulados negativamente foram comum ao processo de senescência natural de folhas. Estes resultados indicam que *GmNAC081* tem um papel predominante como regulador positivo de senescência foliar natural. Entre os genes regulados positivamente destacam-se alvos diretos de *GmNAC081*, validando os resultados de RNA-seq. Além disso, foram selecionados adicionais genes candidatos com o potencial de serem modulados por *GmNAC081*, como *JMT*, *MLO3*, *NRT1.5*, *KIN10*, *KIT1* e *SPI*, os quais contêm sítios de ligação para o gene *GmNAC081* nos seus promotores. Estes resultados ampliaram a atividade transcricional de GmNAC081 em escala genômica, identificando um conjunto de possíveis alvos diretos que atuam para estabelecimento do processo de senescência. Também foi avaliado o efeito da superexpressão do gene *GmNAC081* em resposta ao déficit hídrico. As plantas superexpressando *GmNAC081* foram mais sensíveis ao déficit hídrico, apresentando menor teor de água e menor potencial hídrico, sob o mesmo regime de déficit hídrico, que as plantas não transformadas, o que foi associado com um fenótipo de senescência acelerada induzida por seca. Além disso, os parâmetros fisiológicos de trocas gasosas e de fluorescência monitorados durante o déficit demonstraram a maior sensibilidade das plantas transgênicas à seca. Coletivamente, os resultados dessa investigação descreveram a atividade transcricional de GmNAC081 em escala genômica e demonstraram que GmNAC081 exerce uma função positiva predominante no estabelecimento de senescência natural e regula negativamente a tolerância de plantas à seca.

## ABSTRACT

FERREIRA, Dalton de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **GmNAC081-induced global variation of gene expression during senescence in soybean.** Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

In Brazil, the agribusiness contributes considerably to economy. However, the crops are exposed to environmental stresses, including biotic stresses, which are caused by microorganisms, herbivores or viruses, as well as abiotic stresses caused by water deficit, nutrient deprivation, presence of stressing agents in the soil, etc. In the case of defense to multiple stresses, the plants activate a programmed cell death (PCD) signaling mediated by GmNAC081 and GmNAC030 proteins, which belong to a large family of plant-specific transcriptional factors. Recently, GmNAC081 has been demonstrated to play a positive role in natural leaf senescence, as *GmNAC081* silencing delays leaf senescence and attenuates the hallmarks of PCD, although the underlying mechanism has not been totally elucidated. In this investigation, a functional genomic approach was exploited to evaluate the mechanism by which *GmNAC081* mediates senescence, as well as the effect of ectopic expression of *GmNAC081* during water deficit. The *GmNAC081*-overexpressing lines displayed accelerated senescence as compared to wild type, untransformed plants. In the transgenic lines, GmNAC081-1 and GmNAC081-3, the ectopic expression of *GmNAC081* accelerated leaf yellowing, which was associated with a greater accumulation of ROS, as compared to control lines. While in V3 plants (20 days after germination (20 DAG)), in the transgenic lines, the transcript levels of *GmNAC081* were much greater than those of untransformed plants, BR16, in R7 plants (80 DAG), the expression of endogenous *GmNAC081* in BR16 was induced by senescence, reaching similar levels as the transgenic lines. The natural induction of *GmNAC081* during senescence mimicked the phenotype of transgene overexpression because the expressed sequences during natural senescence in BR16 clustered together with the expressed sequences of the GmNAC081-3 line in plants at R7. In contrast, in V3 plants, in the transgenic line, 1849 and 2813 genes were induced and repressed, respectively; among those, 455 up-regulated genes and 1200 down-regulated genes were common to the process of leaf senescence. These

results indicate that GmNAC081 plays a major role as a positive regulator of natural leaf senescence. Among the up-regulated genes, direct targets of GmNAC081 were highlighted, validating the results of RNA-seq. Furthermore, additional candidate genes were selected with the potential to be modulated directly by GmNAC081, including *JMT*, *MLO3*, *NRT1.5*, *KIN10*, *KIT1* e *SPI*, which contain GmNAC081 binding sites on their promoter. These results amplified the transcriptional activity of GmNAC081, as they identified a set of possible direct target genes, which function in the onset of senescence. The effect of *GmNAC081* overexpression in response to water deficit was also examined. *GmNAC081*-overexpressing plants were more sensitive to water stress, as they displayed a lower water potential and relative water content than untransformed plants under the same regime of water deficit, which was associated with a drought-induced accelerated senescence phenotype. Furthermore, gas exchange and fluorescence physiological parameters during water deficit confirmed the greater sensitivity of transgenic lines to drought. Collectively, our results described the wide-genomics transcriptional activity of GmNAC081, demonstrating that GmNAC081 plays a major positive role in leaf senescence and a negative role in water deficit tolerance.

## 1.Introdução

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] se destaca como uma das leguminosas mais importantes do mundo devido ao seu alto conteúdo de proteínas e óleos presentes nos grãos. Ela é uma importante fonte de nutrientes utilizada mundialmente contribuindo tanto para a dieta básica da população como para a produção de biodiesel.

Em seu ciclo, as plantas de soja florescem, produzem sementes e, em seguida processo de maturidade das vagens que culmina com a morte da planta. Acompanhando tal processo, as folhas e os pecíolos tendem a amarelar, murchar e sofrer a abscisão. Essa propriedade é muito útil para que a colheita da soja realizada mecanicamente, o que facilita muito a produção do grão.

O processo de senescência é um mecanismo bem complexo, pois envolve a degradação dos componentes celulares e sua remobilização para os órgãos em desenvolvimento, como folhas jovens e imaturas, durante o crescimento vegetativo ou durante a fase reprodutiva que são direcionados para as sementes (Gregersen *et al.*, 2008; Krupinska *et al.*, 2012; Avice e Etienne, 2014; Diaz-Mendoza *et al.*, 2014). Este processo permite a reutilização de nutrientes, principalmente carbono e nitrogênio, durante o processo de formação da semente. A senescência é um processo fisiológico ordenado, que é principalmente mediado por uma programação genética, contudo fatores ambientais tem grande influência no processo de início e na taxa de progressão da senescência. Os processos abióticos, como a seca, a alta temperatura, a salinização do solo e as deficiências nutricionais aceleram o processo de senescência (Quirino *et al.*, 2000; Yoshida, 2003; Guo and Gan, 2005; Gregersen *et al.*, 2008; Martinez *et al.*, 2008).

A senescência é acompanhada de uma reprogramação transcricional de um grande número de genes, incluindo aqueles que codificam os fatores de transcrição (TFs), como já foram mostrados em perfis de variação global de transcriptoma em varias espécies (Andersson *et al.*, 2004; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Gregersen e Holm, 2007; Balazadeh *et al.*, 2008; Breeze *et al.*, 2011; Cantu *et al.*, 2011; Carvalho *et al.* 2014; Zhang *et al.*, 2014). Recentemente, foram identificados vários TFs do tipo NAC [N para

não apical meristema (NAM), A para Arabidopsis ATAF1/2, e C para Cup-shaped cotyledon (CUC) ], envolvidos na senescência, tendo sido encontrados tantos reguladores positivos quanto negativos. Em Arabidopsis, os reguladores positivos incluem ORE1 ou ANAC092 (AtNAC2) (Kim *et al.*, 2009; Balazadeh *et al.*, 2010; Rauf *et al.*, 2013), ORS1 ou ANAC059 (Balazadeh *et al.*, 2011), AtNAP (Guo e Gan, 2006) e ANAC016 (Kim *et al.*, 2013). Já os reguladores negativos da senescência incluem JUB1 ou ANAC042 (Wu *et al.*, 2012) e VND-INTERACTING2 ou ANAC083 (Yang *et al.*, 2011). Um aspecto importante da senescência não é apenas os fatores de transcrição, mas também os seus genes alvos. Estudos que revelaram alguns desses genes demonstraram que o processo de senescência envolve complexas redes reguladoras.

Em soja, o fator de transcrição GmNAC081 tem sido descrito como importante gene efetor de senescência induzida por estresses como de senescência natural das folhas (Faria *et al.*, 2009; Pimenta *et al.*, 2016). O gene *GmNAC081* foi inicialmente identificado como componente *downstream* de uma via de sinalização adaptativa que transduz um sinal de morte celular em resposta integrada aos estresses osmótico e do retículo endoplasmático (Faria *et al.*, 2011). Essa via de sinalização integra a transdução de múltiplos sinais de estresses, como seca, estresse osmótico, estresse do retículo endoplasmático, além de senescência foliar natural, em uma resposta de morte celular programada (PCD). A morte celular programada, por sua vez, é iniciada com a ativação de uma cascata de sinalização mediada pelas proteínas DCD/NRPs (*developmental cell death domain-containing asparagine-rich proteins*) que culmina com a indução da expressão dos genes *GmNAC081* e *GmNAC30*, responsáveis pela indução do gene *VPE* (*vacuolar processing enzyme*), executor do programa de morte celular programada pelo colapso do vacúolo (Costa *et al.*, 2008; Faria *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2011; Mendes *et al.*, 2013, Pimenta *et al.*, 2016). Assim o estudo do gene *GmNAC081* é de fundamental importância para compreender melhor os mecanismos envolvidos em uma diversidade de estresses como na seca e senescência natural. Nesta investigação, pretende-se avaliar o mecanismo pelo qual o gene *GmNAC081* está

envolvido em senescência. Além disso, pretende-se avaliar o efeito da expressão ectópica de *GmNAC081* durante o déficit hídrico.

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1. Regulação de Senescência por fatores de transcrição NAC**

A senescência foliar ocorre juntamente com mudanças de cor nas folhas que é um fenômeno facilmente visível no ciclo de vida das plantas. A senescência envolve a degradação de clorofilas, carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos e contribui para a mobilização de nutrientes de folhas velhas para tecidos em crescimento ou para tecidos de armazenamento. A importância de uma regulação eficiente do processo de senescência foliar foi relatada por um estudo sobre a domesticação do trigo cultivado. Nesse estudo demonstrou que no *loci* em que se encontram genes para o enriquecimento de vários nutrientes importantes em grãos de cereais se encontram também genes fortemente ligados que codificam fatores de transcrição (TFs) que regulam o início da senescência foliar em plantas de trigo (Uauy *et al.*, 2006; Waters *et al.*, 2009). O início da senescência é em grande parte afetado pela idade da planta, mas também é influenciado pelas alterações nas condições ambientais. O etileno e outros hormônios podem acelerar ou retardar a senescência a fim de que as plantas sejam capazes de lidar com as mudanças ambientais severas e alcançar o máximo rendimento da produção de sementes e biomassa (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2007).

A senescência inclui o envolvimento de diversos eventos fisiológicos, que inclui a degradação de clorofila, proteína, cessação de fotossíntese e degradação de ácidos nucléicos, catabólitos, transporte de nutrientes e respostas de morte celular. Para isso, os genes responsáveis por cada evento são precisamente ativados ao nível transcricional. Estudos relacionados identificaram um grupo de genes associados a senescência (SAGs) que são induzidos durante o processo de senescência foliar (Gan e Amasino, 1997; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Veyres *et al.*, 2008).

A enorme variação na expressão gênica que acompanha o início da senescência é provavelmente controlada por um conjunto associado de fatores de transcrição (TF) que na sua maioria não foram ainda identificados.

Contudo, perfis de expressão temporal de alta resolução revelaram que os fatores de transcrição do tipo NAC exibem expressão diferencial durante vários estágios da senescência natural de folhas em *Arabidopsis* (Breeze *et al.*, 2011), sugerindo assim que eles desempenham um papel crucial na regulação da senescência, embora a informação funcional seja restrita a alguns membros da família (Guo e Gan, 2006; Kim *et al.*, 2009; Balazadeh *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012).

Os TFs NAC fazem parte de uma grande família de TFs específicos de planta que estão envolvidos na resposta de estresse e desenvolvimento (Xie *et al.*, 2000; Fujita *et al.*, 2004; Olsen *et al.*, 2005; Guo e Gan, 2006; Kim *et al.*, 2009). Cerca de 1551 e 126 membros da família NAC foram anotados em genomas de *Oryza sativa* e *Arabidopsis thaliana*, respectivamente (<http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de>). Em soja, a família NAC é representada por pelo menos 152 cópias (Pinheiro *et al.*, 2009; Nuruzzaman *et al.*, 2010; Le *et al.*, 2011).

Os TFs NAC possuem um domínio conservado na porção N-terminal, designado domínio NAC, que é responsável pela ligação no cis elemento do DNA. O domínio NAC é formado por dois éxons, compreendendo 150 resíduos de aminoácidos, que são divididos em cinco subdomínios conservados, denominados de A até E. A região C-terminal é mais divergente em sequência e tamanho, e engloba um potencial transcricional (TR) que possui função de ativador ou repressor (Ren *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2000; Duval *et al.*, 2002; Ooka *et al.*, 2003; Nakashima *et al.*, 2012). Algumas vezes esta região pode também possuir atividade de ligação de proteínas e um domínio transmembrana adicional (Tran *et al.*, 2009; Seo *et al.*, 2010). Com isso, apesar da maioria das proteínas de domínio NAC localizarem-se no núcleo, onde desempenham o seu papel no controle da transcrição como fatores transcricionais, um sub-conjunto das proteínas NAC são inseridas na membrana plasmática (Kim *et al.*, 2007; SEO *et al.*, 2010). A ativação das proteínas NAC ancoradas na membrana plasmática implica uma transdução de sinal para o núcleo (Lee *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014a; 2014b).

Os TFs NAC são essenciais para o controle de respostas de defesas vegetais contra fatores ambientais (Hegedus *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2007; Nakashima *et al.*, 2007). A avaliação da expressão gênica

em plantas de *Arabidopsis*, arroz e soja revelou que estes TFs são induzidos por pelo menos um tipo de estresse abiótico, tais como salinidade, seca, frio, bem como pelo hormônio ácido abscísico (ABA) (Fujita *et al.*, 2004; Fang *et al.*, 2008; Kawaura *et al.*, 2008; Nuruzzaman *et al.*, 2010; Le *et al.*, 2011; Nuruzzaman, *et al.*, 2012). A análise da expressão global usando *microarrays* 22K e 44K revelou 45 genes NAC responsivos a estresse abiótico e 26 a estresse biótico em arroz (Nuruzzaman *et al.*, 2010).

A maioria dos genes de NAC mostraram ser sensíveis ao sal e à alta temperatura (Zeller *et al.*, 2009; Jensen *et al.*, 2010). Tais estudos demonstraram que os NACs podem ser regulados de forma dependente ou independente do ABA, de acordo com os elementos reguladores cis presentes no seu promotor. Esses fatores transcricionais também desempenham papéis relevantes na regulação das defesas de plantas contra agentes patogênicos, em resposta a lesões mecânicas e em resposta ao ácido Salicílico (SA). A expressão gênica de NAC foi monitorada em resposta ao ataque de vírus, fungos e bactérias (Ren *et al.*, 2000; Collinge e Boller, 2001; Mysore *et al.*, 2002; Hegedus *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2005; Selth *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2007; Jeong *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009a, Wang *et al.*, 2009b; Xia *et al.*, 2010a; Xia *et al.*, 2010b;).

Apesar das proteínas NAC representarem uma grande fração de TFs regulados pela senescência em varias plantas, a função biológica foi atribuída a apenas algumas espécies de NACs reguladas pela senescência (Andersson *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2004; Lin e Wu, 2004; Buchanan Wollaston *et al.*, 2005; Gregersen e Holm, 2007; Balazadeh *et al.*, 2008). Em *Arabidopsis*, o gene *AtNAP* (*ANAC029*), que codifica um TF contendo domínio NAC, é regulado de forma ascendente durante a senescência foliar (Guo e Gan, 2006). As plantas que apresentam superexpressão de *AtNAP* exibem a senescência foliar precoce, enquanto que a perda da função atrasa o início da senescência. Alguns alvos do *AtNAP* incluem SAG-113, um gene que codifica a fosfatase 2C, que funciona como regulador do movimento estomático mediado pelo ABA e a perda de água durante a senescência foliar (Zhang e Gan, 2012; Zhang *et al.*, 2012). Os genes homólogos em arroz e feijão-roxo do *AtNAP*, *OsNAP* e *PvNAP* mostraram restaurar a senescência tardia em alelos múltiplos nulos de *Atnap*, sugerindo que os

genes *AtNAP* podem ser um fator transcricional universal para a regulação da senescência foliar (Guo e Gan, 2006). Com isso, a manipulação dos níveis de expressão de genes *AtNAP* podem ser consideradas uma estratégia inovadora para o controle racional da senescência foliar em culturas economicamente relevantes. O membro da família NAC *ANAC092/AtNAC2/ORE1* também foi identificado como um regulador positivo da morte celular induzida por senescência foliar em *Arabidopsis* (Kim *et al.*, 2009; Balazadeh *et al.*, 2010; Balazadeh *et al.*, 2011). *ORE1* atenua a atividade de *GLK2*, que atua na manutenção dos cloroplastos, e conseqüentemente reduz a manutenção do cloroplasto. A atividade de *ORE1* é modulada tanto a nível transcricional e quanto pós-transcricional (Kim *et al.*, 2009). *ORE1* mRNA é direcionado pelo micro RNA *miR164*. A redução do conteúdo de *miR164* com o envelhecimento da folha é largamente dependente do gene *EIN2*, o que leva ao acúmulo de *ORE1* mRNA em folhas velhas. Estudos recentes têm revelado que *EIN3* ativa diretamente a expressão de *ORE1* (Li *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014). O *EIN3* reprime três genes precursores de *miR164* e está envolvida tanto em regulação positiva e indireta do gene *ORE1* (Li *et al.*, 2013). Consistente com a evidência molecular, a expressão de *ORE1* é reduzida em mutante *ein3* durante a senescência foliar. Estas observações sugerem que *EIN3*, *miR164* e *ORE1* compõem uma rede regulatória que trabalha a jusante da via de sinalização de etileno.

Em hibridações de *microarray*, cerca de 218 genes foram identificados diferencialmente expressos durante a senescência como potenciais alvos de *ANAC092* (Balazadeh *et al.*, 2010). Do mesmo modo, o gene NAC responsivo ao ABA *VND-INTERACTING2 (VNI2, ANAC083)* pode integrar os sinais de estresse abiótico mediados por ABA no envelhecimento das folhas, regulando um subconjunto de genes *COR* (Cold-regulados) e *RD* (sensíveis a desidratação; Yang *et al.*, 2011). Além disso, o fator de transcrição NAC *NTL4* desempenha um papel na indução de senescência promovida pela seca em *Arabidopsis* (Lee *et al.*, 2012), enquanto que *JUNGRUNNEN1 (JUB1)* um NAC responsivo a espécies reativas de oxigênio regula negativamente a senescência em *Arabidopsis* (Wu *et al.*, 2012). Em arroz, o fator de transcrição de NAC *OsNAC5* tem sido associado a senescência

natural (Sperotto *et al.*, 2009) e em soja, pelo menos dois genes NAC, *GmNAC081* e *GmNAC030*, demonstraram estar envolvidos na senescência foliar induzida pelo estresse (Pinheiro *et al.*, 2009; Faria *et al.*, 2011; Reis *et al.*, 2011; Mendes *et al.*, 2013; Pimenta *et al.*, 2016).

Os fatores de transcrição de NAC em soja *GmNAC081* e *GmNAC030* integram o estresse osmótico e os sinais de estresse do retículo endoplasmático em uma resposta programada de morte celular (PCR). Quando expresso ectopicamente em protoplastos de soja e em folhas de *Nicotiana benthamiana*, *GmNAC081* e *GmNAC030* induzidos pelo estresse osmótico e estresse no retículo endoplasmático (ER) induzem uma resposta de morte celular com características da senescência foliar e a morte celular programada (PCD), como a indução da atividade da Caspase-1-like, fragmentação de DNA, perda de clorofila, degradação de proteínas, aumento da peroxidação lipídica e indução de genes marcadores associados à senescência (Costa *et al.*, 2008; Faria *et al.*, 2011; Reis *et al.*, 2011; Mendes *et al.*, 2013).

## **2.2. Via de Morte celular programada mediada pelas NRPs**

O retículo endoplasmático (ER) é uma organela altamente dinâmica que esta envolvida em funções celulares importantes, como a síntese proteica, dobradura e processamento de proteínas secretoras recentemente sintetizadas, controle da qualidade proteica e manutenção da homeostase  $Ca^{2+}$ . Devido à regulação rigorosa da homeostase do ER, esta organela também esta envolvida na ativação das respostas ao estresse celular (Ron *et al.*, 2007). Em condições normais, a taxa de síntese de proteínas e o acúmulo de proteínas dentro do lúmen do ER é balanceada com a capacidade de processamento de proteínas dessa organela. A quebra desse equilíbrio entre o acúmulo das proteínas e o processamento e a capacidade de dobramento do ER promovem uma condição conhecida como estresse no ER. A perturbação da homeostase do ER causada por este estresse geralmente promove o acúmulo de proteínas mal dobradas no lúmen, o que desencadeia uma via de sinalização citoprotetora referida como resposta à proteína mal dobrada (UPR) (Schröder *et al.*, 2008). A ativação da via UPR permite o retorno das condições de equilíbrio da homeostase do ER.

Portanto, em condições de estresse moderado, a indução, mediada por UPR, de chaperonas residentes no ER e de genes da ERAD promovem processos de controle de qualidade para reestabelecer a homeostase do ER. Entretanto, sobre estresse prolongado e severo, se o funcionamento do ER e o crescimento celular não puderem ser restaurados, um programa de morte celular é desencadeado, possivelmente para proteger o organismo de células aberrantes que contem proteínas mal dobradas.

Uma resposta de morte celular induzida por estresse no ER específica de plantas mostrou ser mediada pela proteólise intramembranar regulada do TF NAC089 ligado à membrana do ER (Yang *et al.*, 2014b). Em resposta ao estresse no ER, o NAC089 é transferido para o núcleo para controlar a expressão dos genes posteriores envolvidos no PCD, como NAC094, MC5 e BAG6. Como a expressão de NAC089 é controlada por bZIP28 e bZIP60, durante a resposta ao estresse de ER na planta, esses transdutores da UPR também provocam sinais de pró-morte, uma propriedade que é compartilhada por seus homólogos em mamíferos. Uma resposta distinta à morte celular induzida pelo estresse no ER específico em plantas que integra um sinal de estresse osmótico em uma resposta PCD completa foi relatada em soja e mediada pelas proteínas DCD/NRP-A e DCD/NRP-B (Costa *et al.*, 2008). A expressão de DCD/NRP é controlada pelo TF GmERD15 que é induzido pelo estresse osmótico e pelo estresse no RE. GmERD15 se liga especificadamente aos promotores DCD/NRP para ativar a transcrição desses genes (Alves *et al.*, 2011). O aumento da acumulação de DCD/NRP provoca a indução dos TFs específicos em planta GmNAC081 e GmNAC030, que interagem para ativar a expressão da enzima de processamento vacuolar (VPE), um componente essencial da via de morte celular programada (PCD) que possui a atividade caspase-1-like (Faria *et al.*, 2011; Mendes *et al.*, 2013). Portanto, GmNAC081, GmNAC030 e VPE estão envolvidos em uma cascata regulatória específica de plantas que integra o estímulo osmótico e a PCD induzida pelo estresse no ER. Entretanto, a atividade transcricional de GmNAC081 em amplitude genômica permanece para ser determinada.

### 2.3. Estresse hídrico

O estresse hídrico ocorre quando a disponibilidade de água no solo é reduzida, e as condições ambientais levam a uma contínua perda de água pela evapotranspiração (Jaleel *et al.*, 2007). Este tipo de estresse é o fator mais limitante para o desempenho das plantas comparado a outros fatores de estresses. Reduzir os efeitos deste tipo de estresse e juntamente aumentar a produtividade das plantas tem sido primordial para a agricultura mundial (Cattivelli *et al.*, 2008). Os mecanismos naturais têm favorecido a adaptação e a sobrevivência de algumas plantas através da seleção das plantas. Estudos dessas plantas adaptadas tem fornecido significativo ganho no entendimento de respostas fisiológicas e moleculares ao déficit hídrico; contudo maiores esclarecimentos dos mecanismos envolvidos e a obtenção de maior produtividade associada são necessários (Cattivelli *et al.*, 2008). Durante os estádios de desenvolvimento, as plantas demonstram diferentes sensibilidade ao estresse hídrico. No caso da soja, o estágio reprodutivo é o mais susceptível (Dogan *et al.*, 2007). Outro fator preponderante é que os mecanismos envolvidos na tolerância à seca são muito complexos o que leva a um progresso lento na compreensão desses mecanismos (Tuberosa e Salvi, 2006).

Algumas características que levam a perda de rendimento de produtividade que estão presentes ou associadas à adaptabilidade das plantas a ambientes susceptíveis à seca têm sido identificadas por estudos fisiológicos. Dentre essas características podemos destacar pequeno tamanho da planta, área foliar reduzida, maturidade precoce, redução nas taxas de assimilação de CO<sub>2</sub> e prolongado fechamento estomático (Fischer e Wood, 1979; Karamanos e Papatheohari, 1999). Os processos fisiológicos podem ser ativados por variações no conteúdo de água dos tecidos, enquanto outros são acionados por hormônios das plantas que sinalizam variações hídricas (Chaves *et al.*, 2003). O controle osmótico é um mecanismo que possibilita às plantas manterem a absorção de água e a pressão de turgor, estes por sua vez contribuem diretamente para o aumento da taxa fotossintética e para o crescimento. A análise comparativa do controle osmótico tem sugerido que o controle não pode ser considerado

igualmente útil em todas as culturas e/ou condições de déficit. Sugere ainda que uma associação positiva entre produtividade e controle osmótico pode ser encontrada sob estresse severo onde a produtividade tende a ser baixa (Serraj e Sinclair, 2002).

As alterações fisiológicas podem advir de alterações na estrutura da membrana celular promovendo mudanças em canais de transporte ativados por pressão, modificando a conformação ou a justaposição de proteínas sensoriais embebidas nas membranas celulares e altera a continuidade entre a parede e a membrana celular (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1999; Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2000). A mudança no potencial osmótico pode ser uma resposta ao estresse hídrico em nível molecular (Bray, 1993). Contudo esta percepção precisa ser traduzida em compostos bioquímicos e metabólitos, gerando uma consequente resposta fisiológica ao estresse (Ingram e Bartels, 1996).

Os efeitos visuais e gerais da seca no crescimento das plantas como crescimento reduzido são bem conhecidos. No entanto, os efeitos primários do estresse em níveis bioquímicos e moleculares ainda necessitam mais investigação (Zhu, 2002; Chaves *et al.*, 2003; Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2005). Os efeitos do estresse hídrico iniciam-se a partir de uma complexa via de respostas, começando com a percepção do estresse, o qual desencadeia uma cascata de eventos moleculares, sendo finalizada em vários níveis de respostas fisiológicas, metabólicas e de desenvolvimento (Bray, 1993), que auxiliam as plantas a se adaptarem as condições adversas (Arora, 2002; Seki, 2003). A elucidação dos mecanismos envolvidos nessas respostas é essencial para a compreensão da resistência ao estresse hídrico nas plantas (Reddy *et al.*, 2004; Jaleel *et al.*, 2006; Shao *et al.*, 2008). As respostas ao déficit hídrico podem ser classificadas em dois grupos, aquelas que protegem diretamente contra estresse e as que regulam a expressão de genes e a transdução de sinais em resposta ao estresse. O primeiro grupo inclui proteínas como as chaperonas e as proteínas destoxificadoras, que funcionam como protetores do estresse. O segundo grupo é constituído de proteínas regulatórias, como transfatores transcricionais que regulam a expressão de genes responsivos a estresses, além de proteínas quinases e

fosfatases que regulam transdução de sinais (Hasegawa *et al.*, 2000; Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2000).

Durante o estresse um padrão de expressão gênica pode ser estabelecido como resultado de condições específicas de estresse. Esse padrão pode sofrer alteração nas etapas iniciais, alterando a expressão de genes específicos e/ou controlando a expressão de mRNA ou da taxa de tradução (Bray *et al.*, 2002). A análise transcricional em folhas de soja submetidas a estresse osmótico e a estresse do retículo endoplasmático apresentou alterações na expressão gênica, predominantemente positivas, e identificou genes co-regulados por esses estresses (Irsigler *et al.*, 2007). Análises genômicas e moleculares têm facilitado a identificação de novos genes e assim permitido a engenharia genética a utilizar esses genes regulatórios ou funcionais para investigar as vias relacionadas à tolerância ao estresse hídrico em plantas (Umezawa *et al.*, 2006). As vias de transdução de sinais envolvidas nas respostas das plantas ao déficit hídrico podem ser divididas em dois grupos, as vias dependentes de ABA (tipo I e tipo II) e as vias independentes de ABA (tipo II, IV) (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1997, 1999, 2000; Seki *et al.*, 2003; Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2005). A via ABA dependente tipo I requer a síntese de certas proteínas para ativar os fatores de transcrição MYC/MYB (Abe *et al.*, 1997) e/ou bZIP, os quais se ligam a regiões do DNA como os ABREs (*ABA-Responsive Elements*). A via de ABA dependente tipo II ativa o fator de transcrição bZIP (Nakagawa *et al.*, 1996; Hollung *et al.*, 1997) o qual aciona a expressão genica pela ligação com os elementos ABA responsivos (ABREs) e elementos tais como CE1 e CE3 (*Coupling Elements*). A via ABA-independente tipo IV induz a expressão gênica pela ativação de DREBP (*Dehydration-Response-Element-Binding Protein*) que se liga ao elemento de resposta à seca DRE/CRT (*Drought Response Element/C-repeat*), conduzindo para a indução de genes estimulados pela seca e frio. A via ABA independente tipo III compreende alguns genes induzidos pela seca que não respondem ao ABA e nem ao frio.

As plantas adaptadas à seca possuem respostas moleculares diferenciadas que quando submetidas à uma análise de transcriptoma revelam muitos genes relacionados com o mecanismo envolvido. Tal técnica

tem revelado um grande número de genes relacionados e uma complexidade de respostas a esse tipo de estresse em uma ampla gama de espécies de plantas (Kollipara *et al.*, 2002; Buchanan *et al.*, 2005; Hazen *et al.*, 2005). A análise molecular em *Arabidopsis* tem esboçado uma complexa rede de comunicação celular durante a resposta à seca. Essas análises em plantas modelo tem levado ao avanço do conhecimento em vias moleculares conservadas incluindo as relacionadas aos estresses. Conseqüentemente, essas vias e os genes relacionados aos componentes regulatórios têm sido amplamente estudados.

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1. Material vegetal**

As plantas de soja transformadas com o gene *GmNAC081*, linhagens NAC081-1, NAC081-2 e NAC081-3, foram descritas previamente (Pimenta *et al.*, 2016). Sementes de soja não transformadas (WT) (*Glycine max* cv. BR16) e transgênicas (*GmNAC081*) foram germinadas em substrato e a transgenia foi confirmada por PCR.

O DNA total foi isolado a partir de folhas de 7 dias de soja cv BR16 transformada e não transformada, utilizando o tampão de extração CTAB 2% (p/v), NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM pH 8,0, EDTA 20 mM e p-mercaptoetanol 0,2% (v/v), conforme descrito por Doyle e Doyle (1987). PCR foi realizada utilizando 50 ng de DNA genômico como molde, 0,5 µM de cada um dos primers 35AMVF – CCACTATCCTTCGCAAGAC e NAC6R – TCTCTCTCTCCTCTAGTGCTCG (Tabela1) e 0,25 U de GoTaq® DNA Polymerase Promega, em um volume final de 50 µL. A mistura foi aquecida a 94 °C durante 3 min e PCR foi conduzida durante 35 ciclos (45 s a 94 °C, 45 s a 53 °C e 60 s a 72 °C) com uma extensão final a 72 °C, para 10 min, utilizando um sistema de C1000™ Thermal Cycler (BIO-RAD). O produto da PCR foi examinado em eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) corado com brometo de etídeo 1µg/ml, confirmando a amplificação de um fragmento de 708 pb do transgene (Figura S1).

Após a confirmação do transgene, as plântulas transgênicas foram transferidas para potes de 3 litros contendo uma mistura de solo, substrato e

areia (3:1:1) e crescidas em casa de vegetação sob condições naturais de luz, umidade relativa (65-85%) e temperatura (15-35°C).

**Tabela 1.** Listagem dos oligonucleotídeos utilizados para confirmar o transgene.

Primers	Sequência (5'—3')	Gene
35AMVF	CCACTATCCTTCGCAAGAC	NAC081 transgene
NAC6R	TCTCTCTCTTCTCTAGTGCTCG	

### 3.2. Extração de RNA de folhas de soja e síntese de cDNA

Sementes de soja não transformadas (WT; *Glycine max* cv. BR16) e de cada uma das três linhagens transgênicas (NAC081-1, NAV081-2 e NAC081-3) foram germinadas em substrato e crescidas em casa de vegetação sob condições naturais de luz, umidade relativa (65-85%) e temperatura (15-35°C). Para extração do RNA total, foi utilizado o reagente Trizol (Invitrogen), conforme recomendações do fabricante, seguido por precipitação com isopropanol. Foi verificada a integridade do RNA por eletroforese em gel de agarose desnaturante 1,2% (p/v) corado com brometo de etídeo 1µg/ml (Figura S2). O RNA total foi tratado com uma unidade de DNase livre de RNase (Invitrogen). Para a síntese de cDNA, foram utilizadas 3 µg de RNA, e a enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen) e oligo-dT, de acordo com as recomendações do fabricante.

### 3.3. Ensaios de PCR em tempo real (qRT-PCR)

Todos os procedimentos de PCR em tempo real, incluindo testes de eficiência, validações e experimentos, foram conduzidos seguindo informações contidas nos manuais fornecidos pela *Applied Biosystems*. As reações foram conduzidas no equipamento ABI7500 *Real Time PCR Systems* (Applied Biosystems), usando *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems).

A expressão gênica foi quantificada utilizando o método comparativo de Ct:  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  e  $2^{-\Delta Ct}$ . Para expressão do gene *GmNAC081*, o gene da Helicase foi utilizado como controle endógeno, para a normalização dos

dados. O gene *Unknown2* foi usado como controle endógeno, para normalização dos dados (Hu *et al.*, 2009; Hirschburger *et al.*, 2015) para os genes diferencialmente expressos. Os oligonucleotídeos utilizados para qRT-PCR estão discriminados na Tabela S1.

#### **3.4. Sequenciamento do mRNA**

O material vegetal foi obtido da terceira folha contando a partir da folha cotiledonar de três plantas de soja para cada um dos tratamentos. Os tratamentos foram as duas linhagens independentes supreeexpressando GmNAC081 e, como controle, o cultivar BR16. Foram coletadas folhas em dois estágios da planta, estágio vegetativo três (V3) e estágio reprodutivo sete (R7). Cada estágio compõe um conjunto de nove bibliotecas. Cada conjunto de nove bibliotecas foram colocadas em duas lanes constituindo assim uma réplica de cada conjunto. Imediatamente após a coleta, o material vegetal foi armazenado em freezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Em cada planta, foram coletados 6 discos de 0,9 cm de diâmetro e mascerados juntamente em nitrogênio líquido. O RNA total foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), conforme recomendações do fabricante, seguido por precipitação com isopropanol. O RNA total então foi tratado com a enzima DNase para evitar contaminação por DNA. A integridade, a qualidade e a quantidade de RNA extraído foram inferidos utilizando-se o aparelho Bioanalyzer 2100 (Agilent). O preparo das bibliotecas de sequenciamento foi realizado através do *TruSeq® Stranded Sample Preparation* utilizando o *Low Sample (LS) Protocol* da Illumina. O sequenciamento de bibliotecas *paired ends* foi realizado a partir de moléculas de cDNA, utilizando o modo high da Illumina HiSeq2500 e 9 bibliotecas/lane. Cada conjunto de 9 bibliotecas foram colocadas em duplicadas em lanes diferentes.

#### **3.5 Análise de expressão gênica diferencial utilizando os dados de RNA-seq**

Os dados obtidos pelo RNA-seq foram avaliados para determinar a qualidade das sequências (reads) utilizando o FASTQC. Após a avaliação da qualidade das sequências, foi aplicado o programa Sickle (Joshi e Fass, 2011) para retirar as sequências de baixa qualidade ( $Q < 30$ ). Então, as sequências resultantes foram mapeadas por meio do programa Bowtie 2

(Langmead e Salzberg, 2012) no genoma da soja versão Wm82.a2.v1 (Goodstein *et al.*, 2012) presente no banco de dados Phytozome 12. A contagem dos fragmentos mapeados nas regiões gênicas foi realizada pelo pacote Rsubread (Liao *et al.*, 2013) presente no Bioconductor/R. Este criou a matriz de contagem bruta por gene anotado no genoma da soja. Esta matriz foi submetida ao pacote DESeq2 (Love *et al.*, 2014) para a normalização e o teste estatístico para expressão diferencial. Foi utilizado como ponto de corte o Log 2.Fold Change > 1,0 ou <- 1 e q-value ≤ 0,01.

O teste de qualidade das replicatas em relação às lanes e aos tratamentos foi realizado utilizando a análise de componentes principais (PCA) e de agrupamento hierárquico pelo método Ward. Os resultados dos contrastes foram armazenados no banco de dados relacional PostgreSQL (<https://www.postgresql.org>). As análises de ontologia gênica e enriquecimento das vias metabólicas e de sinalização foram realizadas, respectivamente pelos pacotes GOstats (Falcon e Gentleman, 2007) e Pathview (Luo *et al.*, 2013).

### **3.6 Identificação de genes candidatos a alvos diretos de GmNAC081**

Após a análise diferencial dos genes, estes foram ranqueados dentro das classes gênicas, selecionando as de envolvimento direto ou indireto com a senescência, como GO:1900056 regulação negativa da senescência foliar, GO:0006624 processamento da proteína vacuolar, GO:0007623 ritmo circadiano, GO:0009723 resposta ao etileno, GO:0009611 resposta a danos mecânicos, GO:0008219 morte celular, GO:1900057 regulação positiva da senescência foliar, GO:0009751 resposta ao ácido salicílico, GO:0007568 envelhecimento, GO:0009835 enchimento de fruto, GO:0012501 morte celular programada, GO:0010150 senescência foliar e GO:1900055 regulação da senescência foliar. Dentro dessas classes foram identificados os genes mais diferencialmente expressos. Foram realizados ensaios de qRT-PCR (assim como descrito anteriormente) para validar cada gene selecionado.

Por meio do banco de dados do Phytozome 12, foram identificados a sequência de 2000 pb do promotor de cada um desses genes. Foi então

identificado e localizado em cada um desses promotores o elemento de ligação de NAC081, TGTGT(TGC), descrito por Mendes *et al.* 2013. A probabilidade de ocorrência ao acaso dessa sequência foi calculada através da binomial.

### **3.7 Detecção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por DAB (Diaminobenzidina)**

A produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em plantas de WT e em plantas transformantes de NAC081 foi avaliada usando o reagente 3,3-diaminobenzidina (DAB-Sigma) segundo Weigel & Glazebrook (2002). Foram coletadas a terceira folha a partir da folha cotiledonar aos 80 dias após a germinação e imediatamente submersas em solução de fosfato de potássio (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 10 mM contendo 1mg.mL<sup>-1</sup> de DAB, pH 3,8, e foram mantidas nessa solução por 8 horas sobre iluminação constante. Após esse período, as folhas foram fervidas em etanol 100% até o completo descoramento das mesmas.

### **3.8. Avaliação fenotípica de plantas de soja superexpressando *GmNAC081***

Foram utilizadas dez plantas de cada uma das linhagens independentes superexpressando GmNAC081 e, como controle, a variedade BR16. Após a confirmação das plantas transgênicas, as mesmas foram confirmadas fenotipicamente pela aceleração da senescência comparado a plantas WT.

### **3.9. Produtividade das linhagens transgênicas**

Para avaliar a influência do gene GmNAC081 na produtividade foram avaliadas as duas linhagens de NAC081.1, NAC081.3 e como controle a BR16. Foram instalados em casa de vegetação nove repetições. Cada parcela experimental foi constituída de quatro plantas de cada variedade. Após a condução até o final do ciclo, as sementes de cada conjunto de quatro plantas foram colhidas e pesadas. Os dados foram submetidos a ANOVA utilizando o software R.

### **3.10. Expressão diferencial de genes relacionados ao estresse hídrico**

Os dados obtidos no RNA-seq foram então utilizados para comparar a expressão diferencial de genes relacionados ao estresse hídrico. Os genes foram obtidos no banco de dados *Drought Stress Gene Database* (Alter *et al.*, 2014). Foram analisados os 105 genes anotados neste banco de dados para *Arabidopsis*. Através do banco de dados do Phytozome 12, foram verificados os ortólogos desses genes em soja. A expressão diferencial desses genes foi determinada por RNA-seq nas plantas de soja com 20 dias após a germinação.

### **3.11. Indução de estresse hídrico em soja**

Sementes de soja não transformadas (WT) (*Glycine max* cv. BR16) e de cada uma das três linhagens transgênicas (NAC081) foram germinadas em substrato, transferidas para potes de 3 litros contendo uma mistura de solo, substrato e areia (3:1:1) e acondicionadas em casa de vegetação sob condições naturais de luz, umidade relativa (65-85%) e temperatura (15-35°C). Cada vaso foi pesado e adicionado o mesmo peso de mistura de solo e continha uma planta.

Quando a planta atingiu o estágio V3, foi adicionado água até a capacidade de campo, quando o solo retém o máximo de água que suporta. Após o excesso de água ser drenado pela gravidade, cada vaso foi pesado e anotado. Os vasos foram distribuídos em blocos inteiramente casualizados com os oito tratamentos, para cada uma das linhagens independentes (a) NAC081 irrigado, (b) NAC081 sem irrigação, e o controle (c) WT (BR16) irrigado e (d) WT (BR16) sem irrigação. Cada tratamento constituiu de 48 plantas. Nos vasos irrigados, foram adicionados aproximadamente 180 ml de água correspondente ao total de água perdido, os vasos sem irrigação total foram pesados todos os dias e adicionados água em uma série decrescente do valor perdido por evapotranspiração (40; 35; 30; 25; 20; 15; 10; 5; 2,5 e 0%). A cada dois dias o valor de correção do volume perdido era alterado seguindo a série decrescente. O potencial hídrico foi medido com Bomba Scholander entre 3h-5h da manhã, em quatro repetições de cada tratamento, ao longo dos dias, até que se obteve o valor de  $\psi = -2,0$  nas plantas.

### **3.12. Determinação do teor relativo de água**

Para se medir o teor relativo de água, foram coletados 6 discos foliares de 0,9 cm de diâmetro na terceira folha trifoliolada a partir da folha cotiledonar em cada planta. Cada tratamento teve quatro plantas coletadas. Os discos foram coletados às 5h da manhã e armazenados em eppendorf e levados ao laboratório para serem pesados, determinando assim o peso fresco das amostras (FW). Após a pesagem os discos foram colocados em placas de petri, contendo 40 ml de água deionizada por 4 horas para hidratação completa. Os discos foram pesados novamente e se determinou o peso turgido (TW). Então os discos foram colocados em estufa à 70°C por 24 horas e foram pesados novamente para se determinar o peso da matéria seca (DW). Para se determinar o teor relativo de água (RWC) aplicaram-se os dados na formula:  $RWC = (FW-DW) / (TW-DW)$  (Weatherley 1950).

### **3.13. Parâmetros fisiológicos de trocas gasosas**

A taxa de assimilação líquida do CO<sub>2</sub> (A), a condutância estomática ao vapor d'água (gs), a taxa transpiratória (E) e razão interna e externa de carbono (razão Ci/Ca) foram avaliadas no terceiro trifólio completamente expandido, a partir das folhas cotiledonares, por intermédio de um analisador de gases a infravermelho (IRGA - modelo portátil LI-6400xt, LI-COR Biosciences Inc., Lincon, Nebraska, USA). As medições foram realizadas entre 08:00 e 11:00 horas, em casa de vegetação, utilizando radiação fotossinteticamente ativa (PAR) constante (1000  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), concentração de CO<sub>2</sub> de 400  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ , temperatura e umidade ambiente. A eficiência instantânea do uso da água (EUW) foi calculada pela razão A/E, a eficiência de carboxilação (EFC) pela razão A/Ci e a eficiência intrínscica do uso da água (EIW) pela razão A/gs .

### **3.14. Parâmetros fisiológicos de fluorescência**

As variáveis de fluorescência da clorofila a foram obtidas na mesma área da folha em que foram realizadas as medidas das trocas gasosas, com auxílio de um fluorômetro acoplado ao IRGA (LI-6400xt, LI-COR). Os parâmetros adaptados ao escuro foram avaliados na noite anterior (22:00 – 24:00h), para garantia que os centros de reação estavam completamente

abertos (todos os aceptores primários oxidados), com perda de calor mínima.

As variáveis de indução da fluorescência obtidas foram a fluorescência inicial ( $F_o$ ), fluorescência máxima ( $F_m$ ) e fluorescência variável ( $F_v$ ) determinada pela diferença entre  $F_o$  e  $F_m$ . Com os valores de  $F_v$  e  $F_m$ , foi possível calcular o rendimento quântico potencial do PSII ( $F_v/F_m$ ) (Genty *et al.*, 1989). As variáveis da fase lenta de indução da fluorescência foram obtidas sequencialmente após a análise das trocas gasosas com a aplicação de uma iluminação actínica e um pulso de luz actínica saturante para a determinação das seguintes variáveis: fluorescência em amostra adaptada à luz antes do pulso de saturação ( $F$ ) e fluorescência máxima em amostra adaptada à luz ( $F_m'$ ). A partir desses parâmetros, foi possível calcular: a fluorescência mínima do tecido vegetal iluminado ( $F_o' = F_o / [ ((F_m - F_o / F_m) + (F_o / F_m')) ]$ ) (Oxborough & Baker, 1997). O rendimento quântico efetivo do fluxo linear de elétrons pelo fotossistema II (PSII) ( $Y_{II}$ ), o rendimento quântico da dissipação de energia regulada ( $Y_{NPQ}$ ) foram calculados de acordo com Genty *et al.* (1989) e Hendrikson *et al.* (2004). O  $Y_{II}$  foi utilizado para estimar a taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) (Bilger *et al.*, 1995).

### **3.15. Determinação de MDA (malondialdeído)**

A quantificação da peroxidação lipídica foliar foi estimada através do teor de malondialdeído (MDA) e foi conduzida segundo a metodologia de Cakmak e Horst (1991). Os discos foliares foram coletados às 5h da manhã e pesados em balança de precisão. Para corrigir a variação devido ao grau de hidratação das plantas, foi utilizado o teor relativo de água para que todas as plantas ficassem com 100% de hidratação. As folhas foram trituradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas com 2 mL de ácido tricloroacético a 0,1% (v / v) e depois centrifugadas a 12000 g durante 15 min. Todos os passos foram realizados a 4 °C. Foram adicionados alíquotas de sobrenadante (0,5 mL) a 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico a 0,5% (v / v) em ácido tricloroacético a 20% (v / v) e as amostras foram incubadas a 90 °C durante 20 min. A reação foi parada para incubação em gelo, seguindo-se centrifugação a 13000 g durante 4 min. Foi determinada a absorvância do

sobrenadante a 532 nm e subtraindo-se do A600 não específico. A concentração de malondialdeído foi calculada utilizando o coeficiente de absorvidade molar de  $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Heath e Packer, 1968).

### **3.16. Determinação dos teores de clorofilas e carotenóides**

A quantificação de pigmentos fotossintéticos foi realizada segundo a metodologia proposta por Wellburn (1994). Os discos foliares foram coletados às 5h da manhã e pesados em balança de precisão. Para corrigir a variação devido ao grau de hidratação das plantas, foi utilizado o teor relativo de água corrigindo para 100% de hidratação. Os discos foliares foram incubados com 3 mL de dimetilsulfóxido saturado de  $\text{CaCO}_3$  (DMSO). As clorofilas a e b absorvem (máximas) nas faixas espectrais azuis (perto de 428 e 453 nm) e vermelhas (perto de 661 e 642 nm). Os carotenoides amarelos isolados têm uma ampla absorção com três picos na gama espectral azul entre 400 e 500 nm. Assim, após 16 h à temperatura ambiente, a absorvência dos extratos foi determinada espectrofotometricamente a 480, 649,1 e 665,1 nm e expressa em  $\mu\text{g g}^{-1}\text{FW}$ .

## **4. Resultados e Discussão**

### **4.1 Adequabilidade das linhagens transgênicas para análise da função de *GmNAC081* em senescência.**

As linhagens transgênicas de NAC081 apresentaram senescência antecipada quando crescidas em condições normais em casa de vegetação (Figura 1A). Tal comportamento já havia sido observado em trabalhos anteriores (Pimenta *et al.*, 2016). De fato, aos 90 dias após a germinação (DAG), as linhagens transgênicas apresentavam coloração amarela intensa mais evidente do que nas plantas de BR16. O fenótipo mais evidente da senescência é o amarelecimento das plantas, o que indica que as plantas de NAC081 estavam em um processo mais avançado de senescência. Consistentes com estes resultados, aos 80 dias após a germinação, o acúmulo de peróxido de hidrogênio nas linhagens transgênicas foi superior do que aquele observado nas linhagens não-transformadas (Figura 1B). A presença do peróxido de hidrogênio foi monitorada por meio de coloração com DAB que reage com o peróxido de hidrogênio, formando um precipitado

escuro nas células. Conseqüentemente, o acúmulo de um precipitado escuro leva a um escurecimento da folha, cuja intensidade é proporcional ao nível de morte celular e ao grau de senescência. As folhas das linhagens NAC081.1 e NAC081.3 apresentaram uma coloração escura mais intensa e uniforme, já a variedade BR16 exibiu apenas algumas áreas mais escuras. Estes resultados indicam que, aos 80 dias após a germinação, o processo de morte celular foi mais intenso nas linhagens transgênicas NACs e, conseqüentemente, o processo de senescência estava mais avançado nestas linhagens.

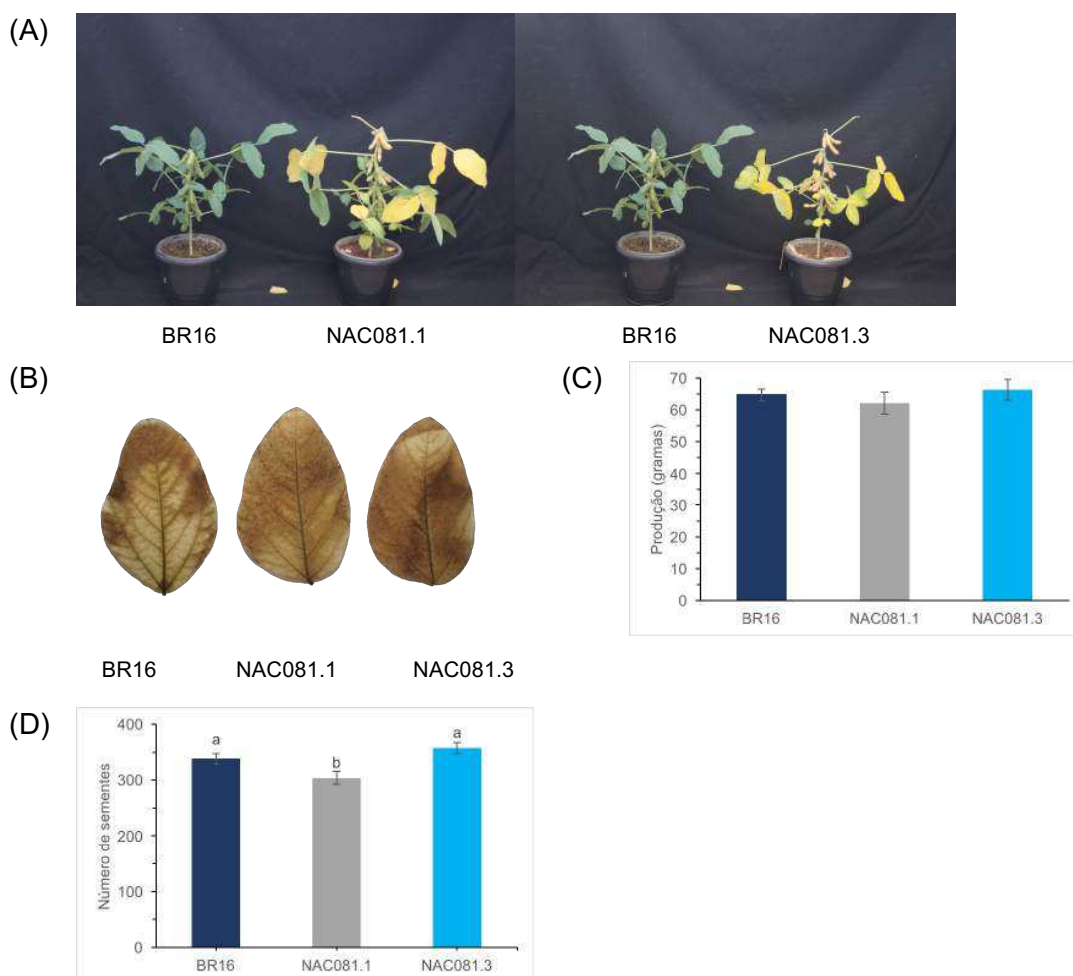


Figura 1 - A superexpressão de GmNAC081 acelera senescência foliar. (A). Fenótipo de desenvolvimento aos 90 DAG das linhagens transgênicas NAC081 e BR16. (B) Acúmulo de peróxido de hidrogênio em folhas de soja com 80 DAG coradas com DAB. (C) Produtividade em massa das plantas BR16 e das linhagens transgênicas NAC081 (média  $\pm$  erro padrão). (D)

Número de sementes das plantas BR16 e das linhagens transgênicas NAC081 (média  $\pm$  erro padrão). Colunas seguidas dos mesmos caracteres não diferem em teste Tukey  $p < 0.05$ .

Um dos grandes problemas associados com a aceleração da senescência é a perda de produtividade (Gregersen *et al.*, 2013). A produção das plantas superexpressando o gene *GmNAC081* foi comparada com as plantas BR16 e não houve diferença significativa entre a produção em termos de peso de sementes (Figura 1C). Apesar de as plantas da linhagem NAC081-1 apresentarem um número menor de sementes que a BR16, as plantas da linhagem NAC081-3 produziram um número maior de sementes (Figura 1D). Entretanto, quando comparado o peso total dessas sementes não se obteve diferença significativa. Assim o adiantamento da senescência pela expressão do *GmNAC081* não comprometeu a produção das plantas de soja.

Foi demonstrado previamente que o gene *GmNAC081* é regulado positivamente durante a senescência (Carvalho *et al.*, 2014; Pimenta *et al.*, 2016). Os dados de RNA-seq confirmaram uma forte indução do gene *GmNAC081* durante a senescência. Enquanto que aos 20 DAG, a expressão de *GmNAC081*, em BR16, foi relativamente baixa quando comparada com a linhagem NAC081-3, aos 80 DAG, o gene *GmNAC081* endógeno foi induzido na linhagem BR16, alcançando um patamar de expressão similar ao da linhagem transgênica NAC081-3 (Figura 2A e 2C). Estes resultados foram confirmados por qRT-PCR, indicando uma indução natural do gene em questão aos 80 DAG. Outra coisa a se considerar é que a expressão de *GmNAC081* na linhagem NAC081-3 foi superior da linhagem NAC081-1, que exibiu um ligeiro aumento de expressão em relação a BR16 (Figura 2A), sendo confirmado por qRT-PCR (Figura 2B). Entretanto, devido a elevação da expressão do gene endógeno durante a senescência tal fenômeno não foi observado em plantas aos 80 DAG.

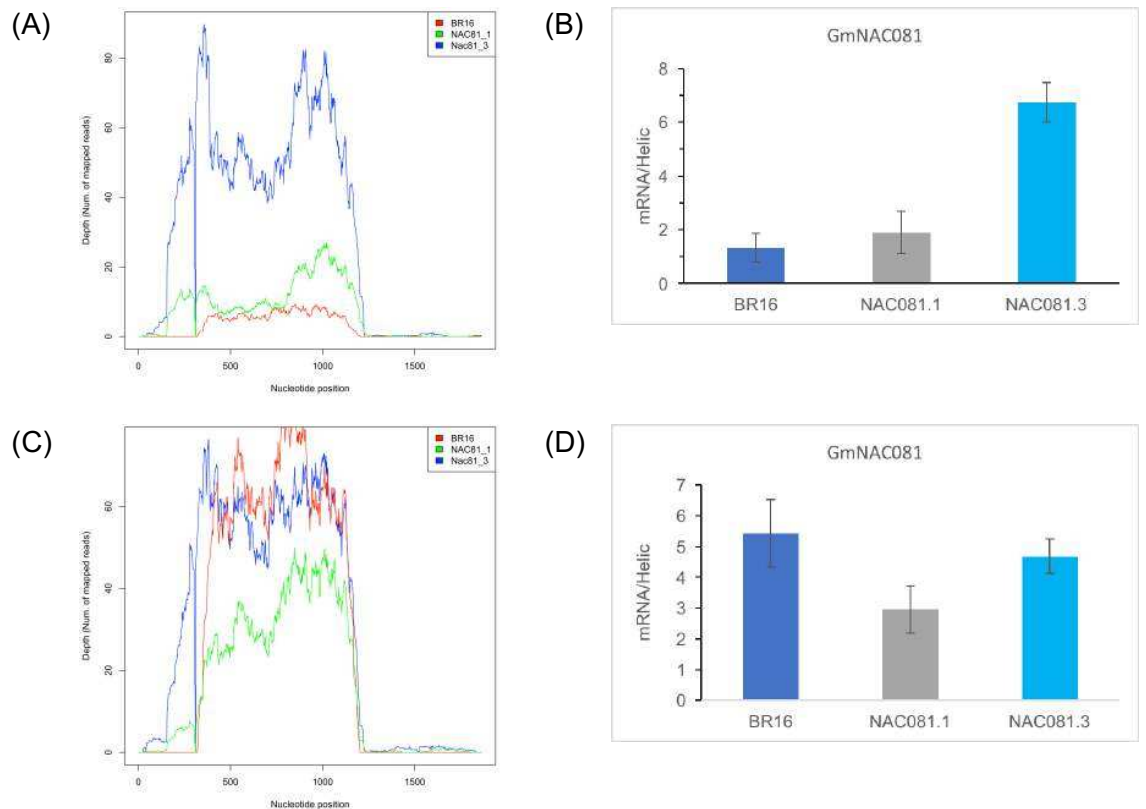


Figura 2. Expressão do gene *GmNAC081*. (A) Representação esquemática do *locus* do gene *GmNAC081* e dos dados do sequenciamento do RNA após a normalização aos 20 DAG. Os hits foram mapeados no locus Glyma.12G022700 (phytozome 12). (B) Expressão normalizada do gene *GmNAC081* aos 20 DAG. O acúmulo de transcritos do transgene *GmNAC081* foi determinado por  $2^{-\Delta Ct}$  (média  $\pm$  erro padrão). (C) Representação esquemática do gene e mapeamento dos transcritos aos do de *GmNAC081* após a normalização aos 80 DAG. (D) Expressão normalizada do gene *GmNAC081* aos 80 DAG. O acúmulo de transcritos do gene *GmNAC081* foi determinado por  $2^{-\Delta Ct}$  (média  $\pm$  erro padrão).

*GmNAC081* tem sido caracterizado como um componente da via de morte celular mediada pelas proteínas DCD/NRPs e regula diretamente a expressão do gene *downstream VPE* (Mendes *et al.*, 2013). A fim de confirmar a funcionalidade do transgene *NAC081*, foi monitorada a expressão diferencial dos genes envolvidos na via de morte celular mediada pelas NRPs (Figura 3A e 3B). Em plantas transgênicas de *NAC081* aos 20 DAG, os componentes *upstream* a *GmNAC081* não foram diferencialmente

expressos, sendo que alguns componentes, como *ERD15*, foram ligeiramente regulados negativamente na linhagem transgênica GmNAC81-3. Em contraste, duas cópias do gene *VPE*, Glyma.14G092800 e Glyma.17G230700, que são alvos diretos de GmNAC81-3 (Mendes *et al.*, 2013), foram fortemente induzidos pela expressão aumentada de GmNAC81 na linhagem NAC81-3. Estes resultados demonstraram que o transgene *GmNAC081* foi capaz de ativar seu gene alvo *VPE*, o que explica, pelo menos em parte, o fenótipo de senescência acelerada da linhagem transgênica (Pimenta *et al.*, 2016). Contudo aos 80 DAG, devido à indução do gene endógeno na variedade BR16, não foi observado diferença acentuada na expressão do gene *GmNAC081*, que foi ligeiramente regulado negativamente, sendo que apenas *VPE* foi induzido. Além disso, as análises de RNA-seq demonstraram que aos 80 DAG, a via de sinalização de morte celular mediada por DCD/NRPs estava induzida na linhagem transgênica em extensão similar à BR16. Sendo assim, as análises subsequentes para avaliação da função de *GmNAC081* se concentraram na linhagem GmNAC81-3 devido a sua maior expressão do gene *GmNAC081*.

(A) 35S:GmNAC081 (20DAG) x BR16 (20DAG) (B) 35S:GmNAC081 (80DAG) x BR16 (80DAG)

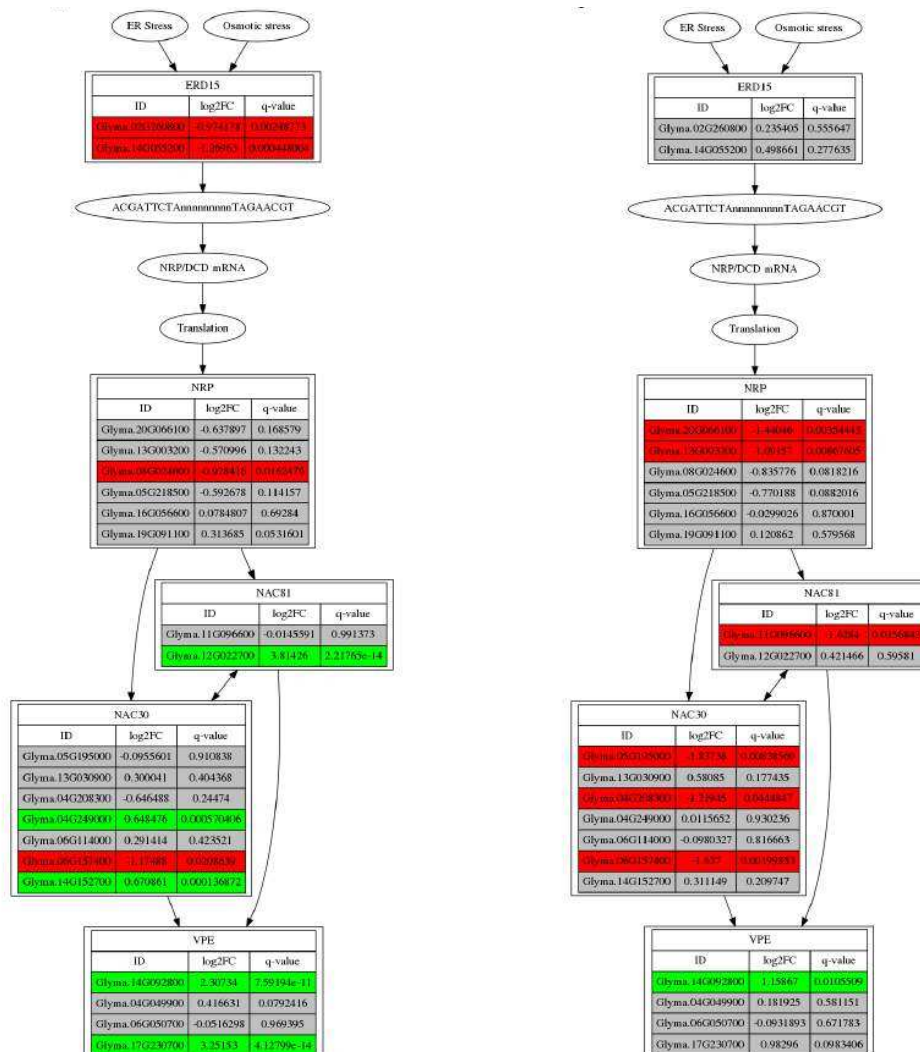


Figura 3. Esquema da via de sinalização de morte celular programada mediada por NRP. (A) Expressão diferencial dos componentes da via de sinalização induzida pela expressão de GmNAC081 aos 20 DAG [35S:GmNAC081 (20DAG) x BR16 (20DAG)] e aos 80 DAG [35S:GmNAC081 (80DAG) x BR16 (80DAG)] (B). Verde indica regulação positiva e vermelho, regulação negativa.

Outros genes alvos diretos do *GmNAC081* (Mendes *et al.*, 2013) apresentaram expressão diferencial no contraste 35S:GmNAC081 (20 DAG) – WT (20 DAG) (Tabela 2). Foram encontrados quatro genes regulados positivamente e dois regulados negativamente pela superexpressão de

*GmNAC081*, como resultados complementares que confirmam a funcionalidade do transgene *GmNAC081* e validam as análises de RNA-seq.

Tabela 2 – Expressão diferencial de genes alvos de *GmNAC081* no contraste 35S:*GmNAC081* (20 DAG) – WT (20 DAG).

Descrição	ID Glyma2	ID Glyma1	log2FC	P-adj
FE(II)/ascorbate oxidase superfamily	Glyma.01G137100	Glyma01g33350		
EF-1 guanine nucleotide exchange domain Elongation factor 1 $\beta/\delta$ chain	Glyma.02G276600	Glyma02g44460	-0.73	0.00
Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain-3 related		Glyma05g04560		
Protein of unknown function	Glyma.05G122900	Glyma05g25260	0.34	0.10
Permease of the major facilitator superfamily	Glyma.05G142500	Glyma05g27410		
S-adenosylhomocysteine hidrolase	Glyma.05G152000	Glyma05g28480	-0.51	0.08
Dual specificity protein phosphatase	Glyma.06G145000	Glyma06g15000	0.25	0.26
CDC2-related kinase	Glyma.06G166200	Glyma06g17460	0.30	0.42
CAF1 family ribonuclease	Glyma.07G024000	Glyma07g02730	0.92	0.00
Protein of unknown function	Glyma.07G233600	Glyma07g36130		
Iron/ascorbate family oxidoreductases	Glyma.08G307000	Glyma08g41980		
Protein of unknown function	Glyma.13G085900	Glyma13g02220	-1.80	0.00
Mitochondrial transcription termination factor, mTERF	Glyma.15G153300	Glyma15g16400	-0.64	0.20
$\alpha/\beta$ Hydrolase	Glyma.17G045900	Glyma17g05080	0.94	0.00
1-Aminocyclopropane-1-carboxylase synthase	Glyma.17G158100	Glyma17g16990		
Nonspecific serine/threonine protein kinase	Glyma.17G161800	Glyma17g17520	-0.12	0.48
MYB family	Glyma.17G162100	Glyma17g17560		
Protein of unknown function	Glyma.17G232300	Glyma17g35070	0.42	0.08
D-alanyl-D-alanine carboxipeptidase	Glyma.18G019200	Glyma18g02260	0.51	0.00
Serine-threonine protein kinase	Glyma.18G216800	Glyma18g44930	1.07	0.00
Predicted endo 1,3 $\beta$ -glucanase	Glyma.18G266900	Glyma18g50180	0.57	0.15
Predicted small molecule transporter	Glyma.20G031700	Glyma20g03960	0.36	0.21
Protein of unknown function	Glyma.20G089800	Glyma20g22140		
Adenylosuccinate lyase		Glyma20g28590		

O ID Glyma 1 indica a notação do gene no phytozome 11 e o ID Glyma 2 refere-se a anotação no phytozome12. Linhas em vermelho indicam que o gene foi regulado negativamente. Linhas em verde indicam que o gene foi regulado positivamente. Linhas sem cor indicam que não houve diferença. Linha em cinza indicam que o gene não foi encontrado na nova notação do genoma ou não foi encontrada sua expressão.

#### **4.2 Transcriptoma induzido pela senescência foliar em plantas de soja não transformadas (WT) e plantas expressando ectopicamente o gene *GmNAC081*.**

Os resultados anteriores confirmaram que o gene *GmNAC081* induz senescência foliar. Com a finalidade de analisar a amplitude da atividade transcricional de *GmNAC081* em escala genômica durante senescência, foi comparado o transcriptoma induzido por superexpressão de *GmNAC081* aos 20 DAG [35S:*GmNAC081* (20DAG) - WT (20 DAG) ]. Estas análises permitem avaliar a contribuição do gene *GmNAC081* para o processo de senescência, além de sua participação no módulo NAC081/VPE de sinalização de morte celular. Uma clusterização global de sequências expressas entre BR16 a 20 DAG e a 80 DAG, linhagem *GmNAC81-3* a 20 DAG e a 80 DAG, revelou que os transcriptomas induzidos por *GmNAC081* a 80 DAG e induzidos por senescência (BR16 a 80 DAG) foram altamente relacionados, já que se agruparam juntos com alta probabilidade de bootstrap e de *P-value* (Figura 4A). Estes resultados confirmaram que o efeito da superexpressão do transgene *GmNAC081* é superado pela forte indução do gene endógeno durante senescência natural (80 DAG em BR16), promovendo respostas similares entre os genótipos durante senescência aos 80 DAG. Entretanto, a 20 DAG, a superexpressão do *GmNAC081* na linhagem transgênica promoveu uma resposta similar ao mecanismo de senescência, porque o transcriptoma induzido por *GmNAC081* a 20 DAG se aproximou dos transcriptomas representados pelo cluster de senescência e diferiu consideravelmente do transcriptoma de BR16 a 20 DAG. Esta linhagem *GmNAC81-3* também foi utilizada para acessar a variação global na expressão gênica induzido pela expressão de *GmNAC081* [*NAC81-3*(20DAG) - BR16(20DAG)] em comparação com aquela induzida por senescência natural em BR16 [BR16(80DAG) – BR16(20DAG)] (Figura 4B e 4C). Dentre esses genes diferencialmente expressos 25,3% dos genes regulados positivamente e 42,7% dos genes regulados negativamente são comuns a genes induzidos por senescência.

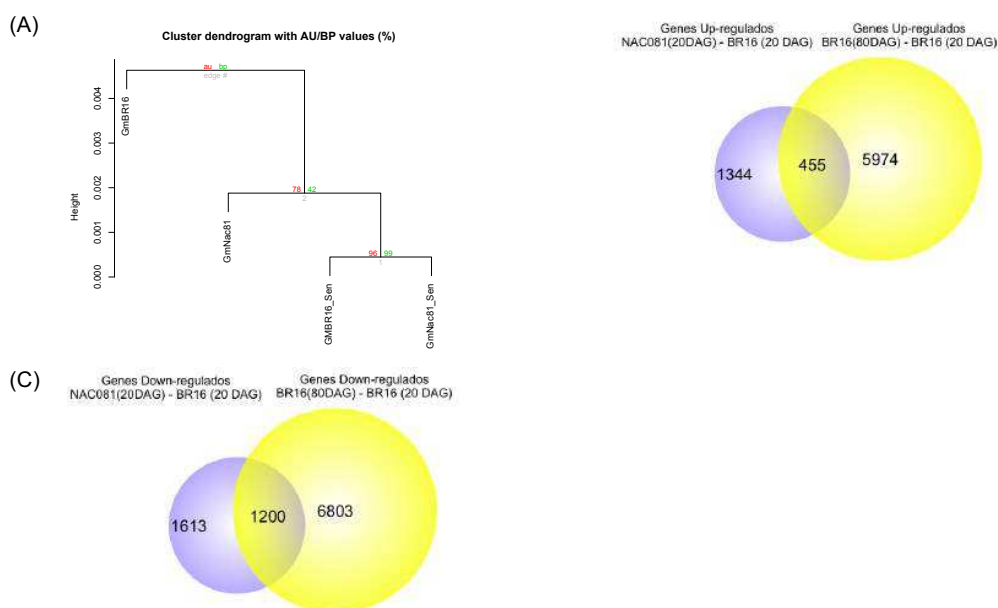


Figura 4 – Genes diferencialmente expressos específicos e compartilhados por expressão de GmNAC081 e por senescência natural. (A) Agrupamento hierárquico dos dados de expressão de genótipos de soja em diferentes DAGs, utilizando o método WARD e pela distância de correlação. (B) Genes regulados positivamente por comparação do contraste [35S:GmNAC081 (20DAG) - WT (20 DAG) ] x [WT (80 DAG) - WT (20 DAG)]. Diagrama de venn mostra o número de genes regulados positivamente (C) Número de genes regulados negativamente por comparação do [35S:GmNAC081 (20DAG) - WT (20 DAG) ] x [WT (80 DAG) - WT (20 DAG) ].

Análise pela hipergeométrica de enriquecimento de genes diferencialmente expressos, identificados pelo contraste NAC081-3(20 DAG) - BR16(20 DAG), revelou um grande número de classes funcionais com alta representatividade (Figura 5). As classes enriquecidas para genes diferencialmente expressos mais bem representadas incluem processos metabólicos primários em que os genes diferencialmente expressos correspondem a 15,7%, processos metabólicos celulares 13,8% e processos metabólicos de macromoléculas 13,2%. Entretanto, essas classes não estão envolvidas diretamente, ou muito pouco indiretamente, com o processo de senescência. Dentro das classes mais envolvidas diretamente com o processo de senescência como regulação de senescência foliar, morte celular e hormônios relacionados a este processo, destacam-se genes já

caracterizados como marcadores de processos de senescência como *SAG-21*, *SAG 101*, *gamaVPE*, etc (Tabela 3 e Tabela S2). Como representativos das classes enriquecidas, alguns genes altamente induzidos ou reprimidos foram selecionados para estudos subsequentes.

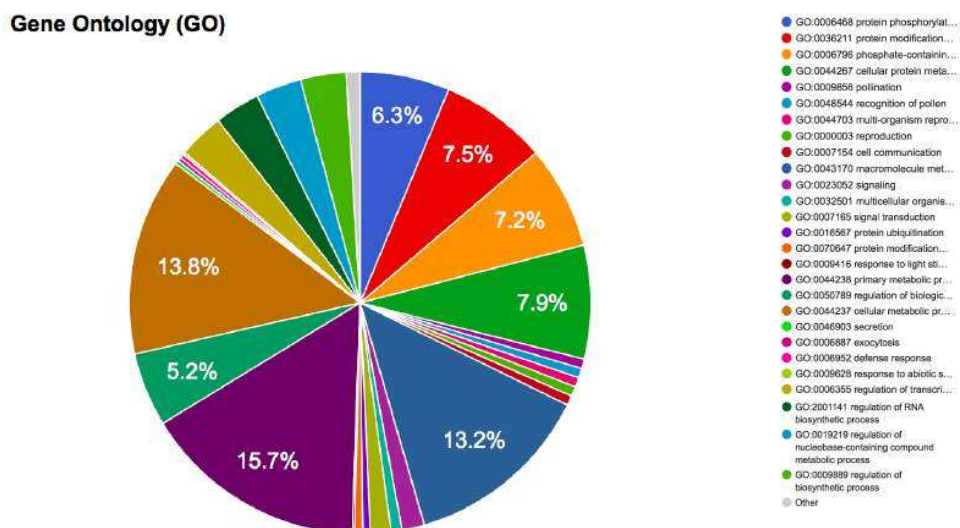


Figura 5 - GO (*gene ontology*) das classes enriquecidas pela hipergeométrica no contraste de NAC081 (20 DAG) - BR16 (20 DAG).

Tabela 3 – Análise de enriquecimento de genes diferencialmente expressos [NAC081 (20DAG) - BR16 (20 DAG) ] relacionados com senescência e a respectiva categoria GO.

GO	Número encontrado	Número no grupo	P-value FDR.
GO:0006624 vacuolar protein processing	4	14	0.098
GO:0007568 aging	11	93	0.000
GO:0007623 Circadian rhythm	56	151	0.102
GO:0008219 cell death	29	109	0.000
GO:0009611 response to wounding	123	445	0.000
GO:0009723 response to ethylene	62	248	0.000
GO:0009751 response to salicylic acid	56	190	0.000
GO:0009835 fruit ripening	7	35	0.002
GO:0010150 leaf senescence	62	250	0.000
GO:0012501 programmed cell death	13	46	0.020
GO:1900055 regulation of leaf senescence	2	4	0.444
GO:1900056 negative regulation of leaf senescence	6	33	0.001
GO:1900057 positive regulation of leaf senescence	3	6	0.506

Dentro da classe de senescência foliar, foram selecionados o *gene NTR1.5 (Nitrate Transporter 1.5)* e o *gene KIN10* que codifica *Sucrose-non-*

*Fermentation Kinase homolog 10* (Tabela S2). Nitrate Transporter 1.5 é uma proteína transmembrana responsável pelo transporte de nitrato, sendo o gene correspondente induzido em resposta a baixa ou alta concentração de nitrato. Sabe-se que a deficiência em nitrogênio induz a senescência foliar (Schulte auf'm Erley *et al.*, 2007; Agüera *et al.*, 2010) e que a reciclagem de nutrientes é uma parte essencial do processo de senescência (Himmelblau e Amansino, 2001; Diaz *et al.*, 2005). Assim durante o processo de senescência, em que ocorre intenso processo de reciclagem de nutrientes, principalmente nitrogênio (Hörtensteiner e Feller, 2002; Diaz *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2009; Bieker e Zentgraf, 2013), o gene do *NTR1.5* é induzido (Meng *et al.*, 2015). O aumento na expressão desse gene em linhagens NAC081 pode ser um efeito secundário do processo de senescência acelerado ou o resultado direto da ativação de sua expressão por NAC081. Em suporte a última hipótese, as sequências 5' flanqueadora do gene *NTR1.5* contém cinco cis-elementos TGTGT(TGC) de ligação de *GmNAC081* com uma probabilidade baixa (0.004) de serem aleatórios (Mendes *et al.*, 2013; Tabela 3).

Tabela 4. Genes candidatos a alvos diretos para ligação de *GmNAC081*, contendo sítios de ligação de *GmNAC081*, TGTGT(TGC), em sequências 5' flanqueadoras.

Gene	Locus	Frequência do TGTGT(TGC)	Distância do ATG	prob (Poisson)
MLO3	Glyma.19G179900	2	-367; -1977	0.1824
JMT	Glyma.14G072300	1	-316	0.4300
NRT1.5	Glyma.09G237600	5	-1032; -1034; -1036; -1538; -1635	0.0039
KIN10	Glyma.08G240400	3	-793; -1254; -1906	0.0613
KTI1	Glyma.08G235400	2	-1179; -1817	0.1824
SPI	Glyma.10G184700	1	-1535	0.4300

KIN10 interage diretamente com e fosforila o gene *ETHYLENE-INSENSITIVE 3*, durante a senescência, desestabilizando um fator de transcrição chave no processo de senescência e assim regula negativamente genes envolvidos na síntese de etileno (Kim *et al.*, 2017). Os resultados de RNA-seq confirmaram que o gene *KIN10* é regulado positivamente durante a senescência natural (Tabela 5), o que explica a

regulação negativa predominante de genes associados ao etileno (Tabela S2).

Tabela 5 – Exemplos de genes diferencialmente expressos compartilhados pelos [NAC081(20DAG) - BR16 (20DAG)] vs [BR16 (80 DAG) - BR16 (20DAG)].

ID	NAC081(20DAG) -BR16 (20DAG)		BR16 (80 DAG)- BR16 (20DAG)		Descrição
	log2FC	padj	log2F C	padj	
Glyma.08G240400	2.30	0.000	3.51	0.000	SNF1 kinase homolog 10
Glyma.09G237600	3.32	0.000	4.10	0.000	nitrate transporter 1.5
Glyma.19G179900	4.36	0.000	6.57	0.000	Seven transmembrane MLO family protein
Glyma.08G235400	-6.88	0.000	-3.76	0.000	kunitz trypsin inhibitor 1
Glyma.10G184700	-5.17	0.000	-5.11	0.000	Serine protease inhibitor, potato inhibitor I-type family protein

O gene *GmNAC081* pode estar modulando o gene *KIN10* de modo que o processo de senescência não se desencadeie de forma agressiva levando a planta à morte e não a senescência natural. No promotor desse gene foram encontrados três sítios de ligação do *GmNAC081* com a probabilidade de 0.0613 de serem aleatórios (Tabela 4). Esse gene que está relacionado com o processo de senescência é considerado um candidato potencial para estar sobre a regulação do fator de transcrição NAC081.

Na classe de morte celular, destaca-se o gene *MLO3* (*Seven transmembrane MLO Family protein*), altamente induzido pela superexpressão de *GmNAC081* a 20 DAG (Tabela S2). *MLO3* é uma proteína G exclusiva de plantas com sete domínios transmembrana (Devoto *et al.*, 1999). Ela modula os processos de defesa e morte celular responsiva ao meio ambiente (Piffanelli *et al.*, 2002). Os resultados do RNA-seq confirmam que *MLO3* é fortemente induzida pelo processo de senescência natural (Tabela 5). A proteína G também é uma possível candidata a estar sobre a regulação do TF já que em seu promotor foram encontrados dois sítios de ligação com a probabilidade de serem aleatórios de 0.1824 (Tabela 4).

O gene *JMT* (*ácido jasmônico carbóxilo metiltransferase*) que está na classe de genes responsivos a danos mecânicos também foi induzido pela superexpressão de *GmNAC081* aos 20 DAG. *JMT* é responsável pela

metilação do ácido jasmônico formando o MeJA (Turner *et al.*, 2002), que induz a expressão de genes associados à senescência (SAGs), tais como *SAG12* e *SAG13*, promovendo a senescência em plantas (Li *et al.*, 2012). Assim, a elevação do nível interno de MeJA leva à aceleração do processo de senescência (Chena *et al.*, 2017). O promotor desse gene possui um sítio de ligação para o TF NAC081 com a probabilidade de ser aleatória de 0.43 (Tabela 4). Assim *JMT* é também candidato em potencial de estar sobre modulação direta de *GmNAC081* levando o processo de senescência acelerado.

Recentemente, foi demonstrado que *GmNAC081* também atua como repressor transcricional em certos genes alvos (Mendes *et al.*, 2013). Consequentemente, também foram selecionados alguns genes regulados negativamente pela superexpressão de *GmNAC081* para estudos subsequentes. Entre eles, dentro da classe de danos mecânicos, o gene *KIT1* (*Kunitz Trypsin Inhibitor 1*), também presente nas classes de resposta ao ácido salicílico e a morte celular programada, foi fortemente reprimido por superexpressão de *GmNAC081* aos 20 DAG. Silenciamento de *KIT1* em *Arabidopsis* por utilização de RNAi causa um aumento da formação de lesões nas folhas causadas por morte celular e uma alteração na morfologia da folha (Lia *et al.*, 2008). Possivelmente a expressão do referido gene pode estar sendo regulada diretamente por *GmNAC081*, já que em seu promotor foram encontrados dois sítios de ligação do possível repressor com uma probabilidade de 0.1824 de serem aleatórios (Tabela 4).

Similarmente, o gene *SPI* (*serine protease inhibitor*) pode estar sendo modulado negativamente por *GmNAC081* (Tabela S2). As proteases estão envolvidas em muitos processos no ciclo de desenvolvimento das plantas como a mobilização de proteínas durante a germinação e a senescência ou início da morte celular (Creemers, 2002; Loukas, 2002; Schaller, 2004). Esses genes, em arroz, podem inibir a atividade do *OsPI8-1* que modula o progresso da morte celular programada (Wang *et al.*, 2008). As análises de expressão diferencial revelaram que o referido gene é regulado negativamente durante senescência natural e por *GmNAC081* (Tabela 5). No promotor desse gene, foram encontrados um sítio de ligação do repressor com uma probabilidade de 0.43 de ser aleatório (Tabela 4).

Os resultados de RNA-seq foram confirmados por meio de qRT-PCR (Figura 6). Aos 20 DAG, os genes *NRT1.5*, *MLO3*, *JMT* e *KIN10* foram induzidos pela expressão aumentada de *GmNAC081*, enquanto que os genes *KIT1* e *SPI* foram reprimidos. A modulação de genes positivamente como *JMT*, *MLO3* e *NRT1.5* e a modulação negativa de *KIT1* e *SPI* pode estar levando a aceleração do processo de senescência. A fim de exercer um controle refinado do processo de senescência, é possível que *GmNAC081* induza a expressão de *KIN10*, um regulador negativo de senescência, a fim de controlar a extensão com que o processo de senescência é desencadeado de maneira a não interferir na longevidade natural das folhas.

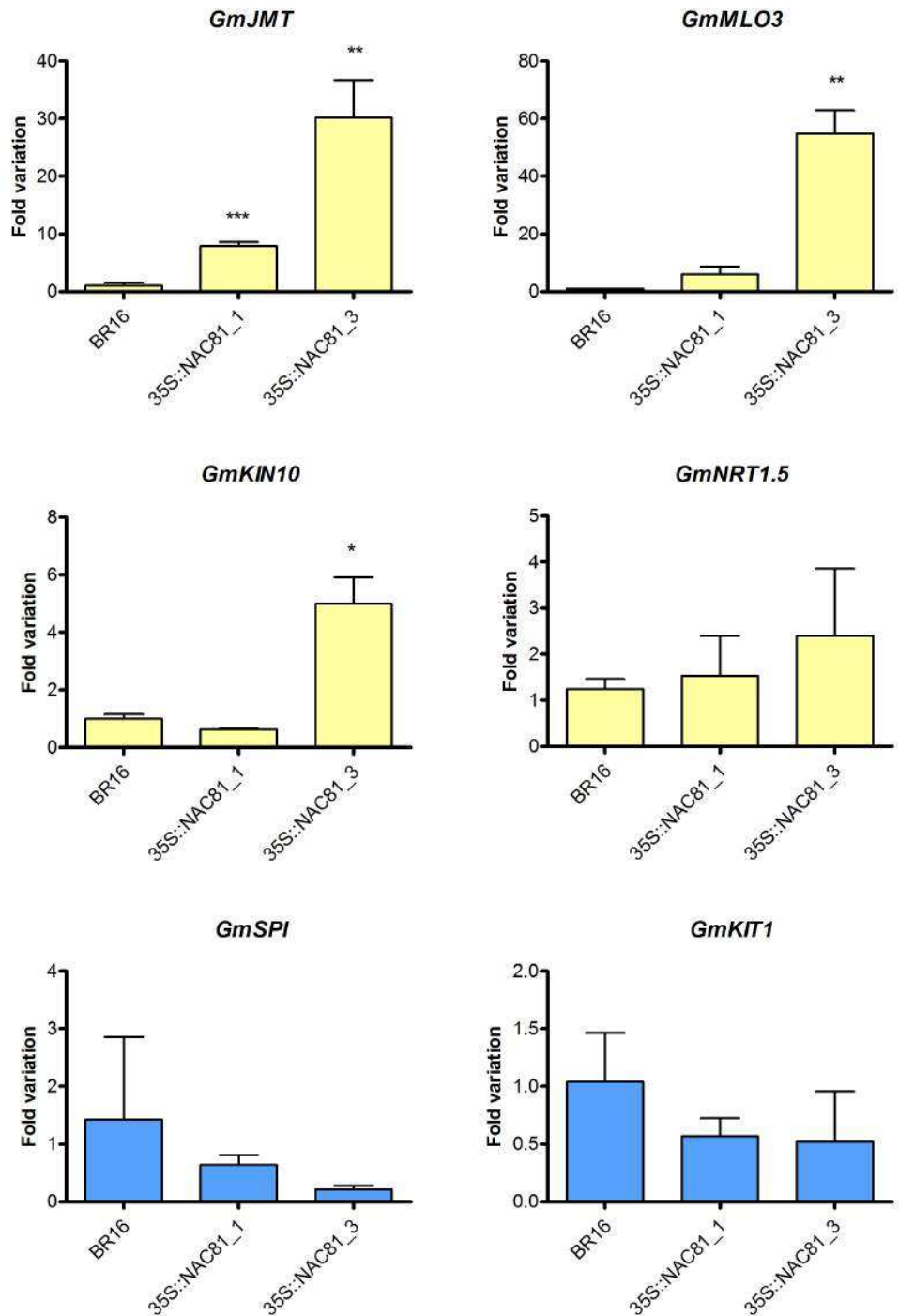


Figura 6- Expressão dos genes candidatos em plantas de soja aos 20 DAG. O acúmulo de transcritos foram determinados por qRT-PCR (média  $\pm$  erro padrão). O gene *Unkown 2* foi utilizado como controle endógeno para se determinar o *Fold variation* ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) (A) *GmJMT*, (B) *GmMLO3*, (C) *GmKIN10*, (D) *GmNRT1.5*, (E) *GmSPI*, e (F) *GmKIT1*.

### **4.3 Efeito da superexpressão de *GmNAC081* na tolerância da soja ao déficit hídrico.**

Tem sido demonstrado que a inibição da via de sinalização de morte celular mediada por NRPS aumenta a tolerância de plantas a déficit hídrico. De fato, a expressão constitutiva do chaperone molecular BiP modula negativamente a expressão dos genes *NRPs*, *NAC081* e *VPE* e confere tolerância à seca (Valente *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2014). Estes resultados prévios levantaram a hipótese de que um dos mecanismos de tolerância a estresses abióticos está associado ao controle de longevidade foliar em plantas. A fim de avaliar se existe correlação direta entre suscetibilidade à seca e aceleração de senescência, o comportamento das linhagens transgênicas, superexpressando o modulador positivo da via de morte celular, *GmNAC081*, foi investigado sob déficit hídrico. Para isto, as linhagens de soja no estágio V3 de desenvolvimento foram submetidas a um regime lento de déficit hídrico pela redução progressiva da irrigação por um período de 20 dias. Durante este período análises fisiológicas utilizando o IRGA, o potencial hídrico ( $\psi_w$ ) e o teor de umidade das folhas foram conduzidas.

Nestas condições, as linhagens transgênicas e a variedade BR16 mantiveram o potencial hídrico similar até os 11 dias após o início do déficit hídrico (Figura 7A), a partir do qual as folhas BR16 mantiveram um potencial hídrico maior que as plantas de NAC081, o que foi correlacionado com o grau maior de turgidez das folhas (Figura 7B) e o teor relativo de água (TRA) das folhas (Figura 7C). Com relação às plantas irrigadas, não houve diferença entre o potencial hídrico das linhagens NACs e BR16. Aos 17 dias após o início do tratamento, as plantas NAC081.3 chegaram ao potencial de -2,0, sendo que as plantas de NAC081.1 precisaram de um dia adicional para alcançar o potencial de -2,0. Este fenótipo foi associado com a expressão diferencial do transgene NAC081 nas linhagens transgênicas, já que a expressão do gene *GmNAC081* é maior na linhagem 35S:NAC081-3 do que em 35S:NAC081-1 (Figura 2A e 2B). Já as plantas de BR16 levaram 20 dias para chegarem ao potencial de -2,0. Com relação ao TRA, a partir de 17 dias após o início do tratamento, as plantas de NAC081 começaram a se

diferenciar das plantas de BR16 (Figura 7C). Somente aos 19 dias de tratamento, TRA foliar de BR16 foi similar a das linhagens transgênicas NAC081. Contudo, as plantas irrigadas não apresentaram diferenças no TRA. Coletivamente, estes resultados indicam que as linhagens GmNAC08 são mais susceptíveis ao déficit hídrico que as plantas de BR16.

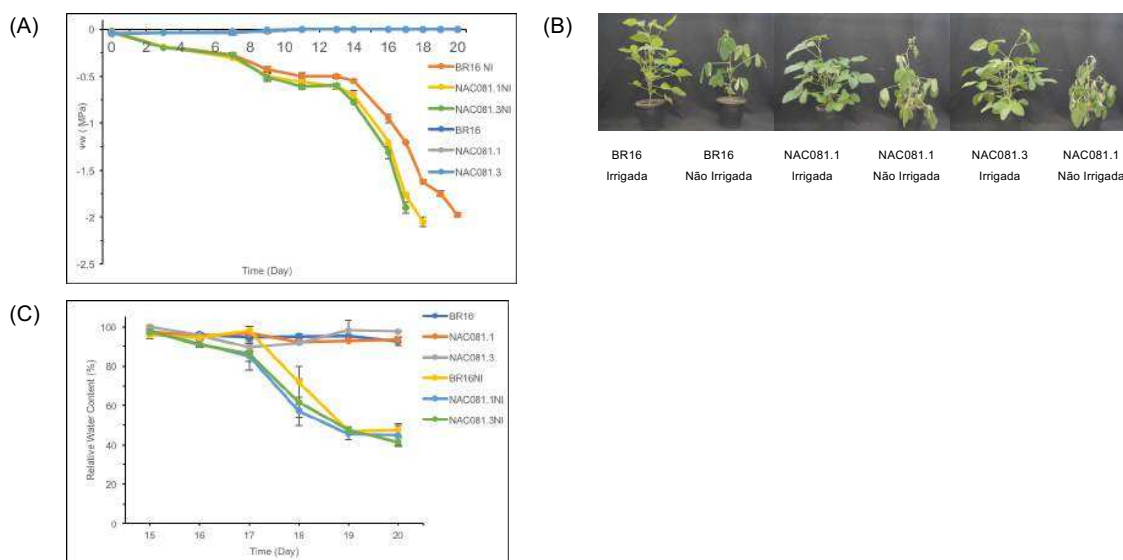


Figura 7 – Desidratação de folhas induzidas por seca em BR16 e linhagens transgênicas NAC081. Plantas no estágio de desenvolvimento V3 foram submetidas a um regime de déficit hídrico progressivo. (A) Potencial hídrico medido com bomba de Scholander ao longo do tempo. As barras representam o erro padrão (n=4) (B) Fenótipo das plantas de soja quando o potencial hídrico alcançou -1,0 nas NAC081-3. (C) Teor relativo de água das em relação ao tempo. As barras representam o erro padrão (n=4).

Durante condições normais de crescimento, entretanto, a taxa fotossintética das linhagens transgênicas foi superior àquela das plantas BR16 (Figura 8A), consistente com o desenvolvimento mais acelerado dessas linhagens transgênicas. Estes resultados podem estar relacionados com a regulação positiva de componentes do aparato fotossintético exibida pelas linhagens transgênicas superexpressando o gene GmNAC31 aos 20 dias após germinação (Figura 9). Essa regulação positiva da fotossíntese pode explicar o porque das plantas superexpressando o gene relacionado a senescência não levou a perda na produção de grãos. A condutância

estomática e taxa de transpiração foram similares em BR16 e linhagens transgênicas irrigadas durante todo o período do experimento (Figuras 8B e 8C). Entretanto, durante o déficit hídrico progressivo, o decréscimo da taxa fotossintética foi mais acentuado nas linhagens transgênicas NAC081-1 e NAC81-3 que em BR16. Nessas linhagens transgênicas não irrigadas, houve uma redução drástica da taxa fotossintética aos 15 dias após o tratamento chegando a aproximadamente zero aos 17 dias, enquanto que a taxa fotossintética de BR16 chegou a aproximadamente zero somente após 19 dias de déficit hídrico gradual (Figura 8A). Esse comportamento foi similar na condutância estomática e taxa de transpiração (Figura 8B e 8C). Conseqüentemente, sob um regime gradual de déficit hídrico, a taxa fotossintética, condutância estomática e taxa de respiração em BR16 diminuí menos intensamente do que nas linhagens transgênicas. Conseqüentemente, estas alterações da taxa fotossintética e da taxa de transpiração podem ser um resultado direto do fechamento estomático ocorrendo mais rapidamente nas linhagens transgênicas. Estes resultados indicam que o mecanismo de maior sensibilidade a déficit hídrico das linhagens transgênicas não está relacionado com falhas no fechamento estomático.

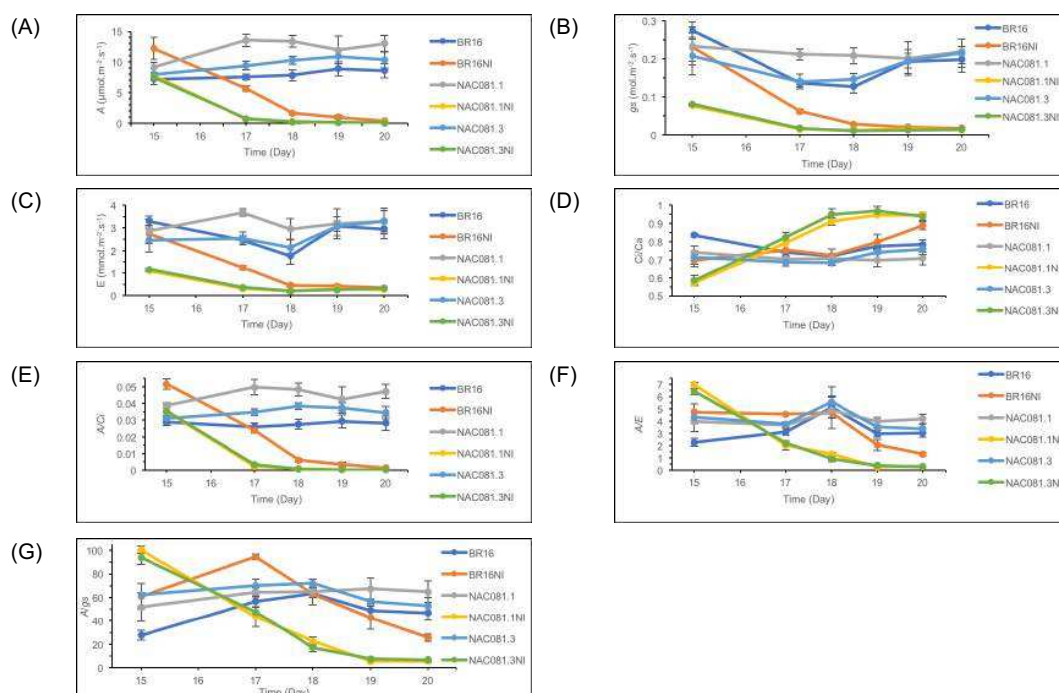
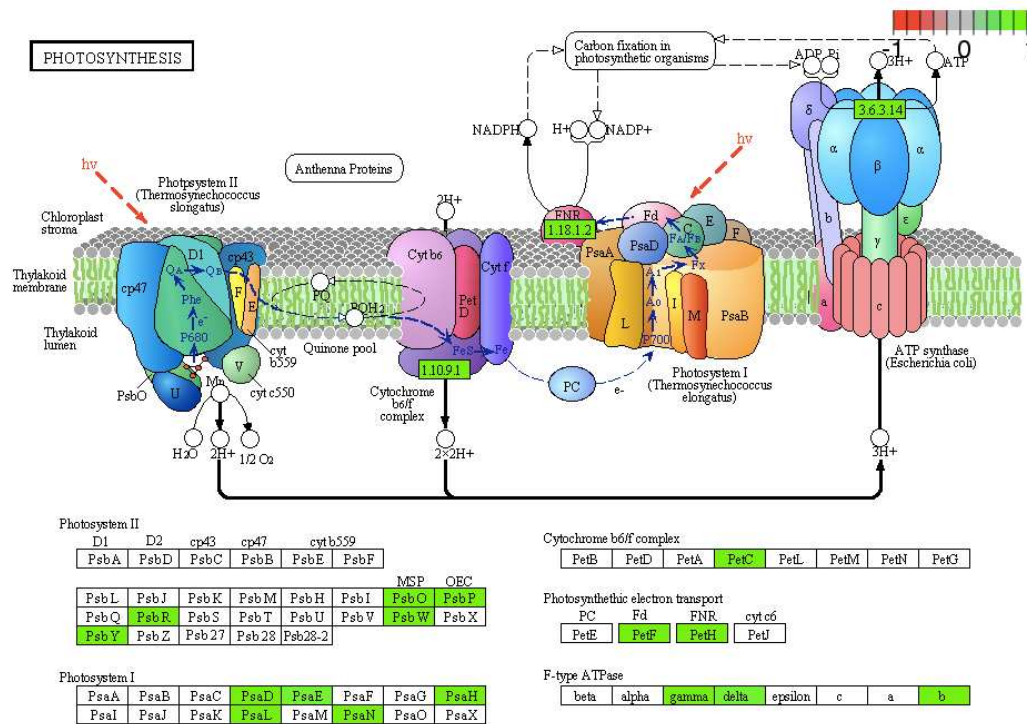


Figura 8 - Parâmetros fisiológicos de trocas gasosas ao longo do déficit hídrico gradual. (A) Fotossíntese. (B) Condutância estomática. (C), Taxa transpiratória. (D) Taxa de relação  $C_i/C_a$ . (E) Eficiência de carboxilação. (F) Eficiência instantânea do uso da água. (G) Eficiência intrínseca do uso da água. As barras representam o erro padrão ( $n=4$ ).

A taxa fotossintética baixa durante o déficit hídrico nas linhagens transgênicas causou efeito na concentração de carbono interno ( $C_i$ ). Apesar do contínuo fechamento estomático durante o déficit hídrico, as linhagens transgênicas apresentaram uma maior relação  $C_i/C_a$ , com um aumento acentuado aos 17 dias após o início do déficit hídrico quando comparado com BR16, indicando menor eficiência de fixação de carbono das linhagens transgênicas, sob um regime de déficit hídrico progressivo (Figura 8D). Similarmente aos parâmetros fisiológicos de trocas gasosas anteriores, BR16 alcançou valores de  $C_i/C_a$  similares aqueles das linhagens transgênicas aos 20 dias após tratamento.

A eficiência de carboxilação dada pela razão  $A/C_i$  foi reduzida ao decorrer do déficit hídrico (Figura 8E). Observa-se que as plantas NAC081 tiveram reduções significativas aos 17 dias chegando a valores similares a

zero. As plantas de BR16 chegaram a valores similares somente aos 19 dias após o início do déficit hídrico.



ID	log2foldchange	padj	labels
Glyma.10G249000	0.93	0.00	PSAD-2
Glyma.02G282500	1.08	0.00	PSBP-1
Glyma.07G019700	0.90	0.00	PSAH2
Glyma.08G204800	0.88	0.00	PSAH2
Glyma.18G148600	8.58	0.00	PSAH2
Glyma.05G168400	1.23	0.00	FD1
Glyma.08G188500	1.65	0.00	FD1
Glyma.05G172300	1.17	0.00	PSBY
Glyma.08G173700	1.24	0.00	PSBR
Glyma.15G253700	0.86	0.00	PSBR
Glyma.04G145900	0.79	0.00	ATPC2
Glyma.04G145900	0.79	0.00	AT2G07707
Glyma.13G129500	1.17	0.00	PSAE-2
Glyma.19G161400	0.99	0.00	PSBW
Glyma.01G180800	0.97	0.00	PSBO2
Glyma.13G302900	0.76	0.00	PETC
Glyma.12G199400	0.85	0.00	PETC
Glyma.13G204800	1.18	0.00	ATPC2
Glyma.15G107900	1.06	0.00	ATPC2
Glyma.17G130100	0.96	0.00	ATPD
Glyma.09G250800	0.86	0.00	PSAL
Glyma.04G215800	0.95	0.00	PSAN
Glyma.02G047600	0.91	0.00	FNR2

Figura 9 - Expressão diferencial dos componentes envolvidos no processo fotossintético induzida pela expressão de GmNAC081. [35S:GmNAC081 (20DAG) x BR16 (20DAG)]. Verde indica regulação positiva e vermelho, regulação negativa.

As reduções nas taxas de fotossintéticas, acompanhadas de fechamento estomático e diminuição das taxas transpiratórias são eventos comuns causados por déficit hídrico (Schulze *et al.*, 1986; Blum, 1996; Zhang *et al.*, 2001; Grisi *et al.*, 2008; Izanloo *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2010). Contudo ainda não há um consenso se a redução da taxa assimilatória de CO<sub>2</sub> é uma resposta da limitação física ocasionada pelo fechamento estomático ou através de danos bioquímicos (Flexas e Medrano, 2002; Reddy *et al.*, 2004; Chaves, 2009). Contudo a elevação da taxa de Ci, sugere que a redução da taxa de assimilação seja causada por danos bioquímicos no aparato fotossintético.

A eficiência instantânea do uso da água (EUA) é definida como a razão entre o ganho de carbono e o consumo de água dado pela transpiração (Blum, 2009). A redução da EUA correlacionou-se com o aumento progressivo do déficit hídrico tanto nas linhagens transgênicas quanto na variedade BR16, porém em diferentes extensões (Figura 8E). Enquanto que as linhagens transgênicas NAC081 apresentaram uma redução significativa de EUA aos 17 dias, diminuindo a valores aproximados a zero aos 19 dias de déficit hídrico progressivo, a variedade BR16 manteve valores superiores mesmo após 20 dias de déficit hídrico gradual.

A eficiência intrínseca do uso da água (EIUA), ou seja, a assimilação de CO<sub>2</sub> para uma determinada condutância estomática teve redução com a progressão das condições de déficit hídrico (Figura 8G). Similarmente ao observado para EUA, as plantas superexpressando o gene *GmNAC081* tiveram uma redução em EIUA mais rápida que BR16, alcançando valores próximos a zero aos 19 dias após o início do déficit hídrico gradual.

Os parâmetros fisiológicos de fluorescência também foram alterados durante o déficit hídrico gradual. O rendimento quântico do PSII (Fv/Fm) foi modulado durante o déficit hídrico. As linhagens transgênicas NAC081, sobre o regime de déficit hídrico, começaram a se diferenciar das plantas irrigadas após os 17 dias de tratamento, enquanto que BR16 somente aos 20 dias (Figura 10A). Aos 20 dias, o valor Fv/Fm da linhagem NAC081.3 foi menor do que aquele da linhagem NAC081-1, o que pode ser correlacionado à expressão maior do transgene *GmNAC081* na linhagem NAC081-3. A redução na razão Fv/Fm indicam perturbações no aparato fotossintético

causado pelo déficit hídrico, sendo mais severo nas linhagens transgênicas *GmNAC81* e explicam a redução da assimilação de CO<sub>2</sub> nas linhagens transgênicas quando comparado com BR16.

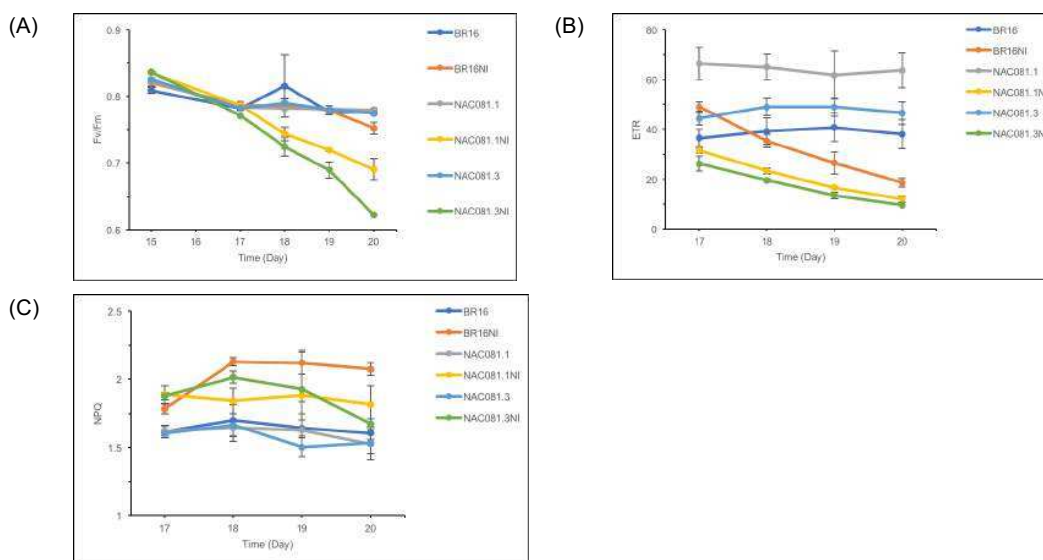


Figura 10 - Parâmetros fisiológicos de fluorescência ao longo do déficit hídrico gradual. (A) Relação Fv/Fm. (B) Taxa de transporte de elétrons. (C) Rendimento quântico do fotossistema II. As barras representam o erro padrão (n=4).

A taxa de transporte de elétrons (ETR) também foi afetada com o déficit hídrico gradual. Aos 17 dias após estresse progressivo, observa-se que as linhagens NAC081.3 apresentam uma taxa ETR menor que os outros tratamentos (Figura 10B). Esta permanece menor ao longo do experimento seguida pela taxa da linhagem NAC081.1. Somente aos 20 dias após tratamento, os valores ETR de BR16 se igualaram aos das linhagens transgênicas NAC081. Entre as plantas irrigadas, as linhagens *GmNACs* apresentaram valores superiores que a BR16 irrigada, indicando que as linhagens transgênicas podem possuir dificuldade em dissipar o excesso de radiação a partir do sistema fotossintético (Baker, 2008).

A redução da eficiência de remoção dos elétrons da quinona receptora do PSII associado com a redução de ETR, e aumento na dissipação da energia de excitação, principalmente na forma de calor sugerem mecanismos de fotoproteção nas linhagens NAC081.

O rendimento quântico da dissipação de energia regulada no PSII ( $Y_{NPQ}$ ) também foi modulado pelo estresse hídrico (Figura 10C). As plantas da variedade BR16 não irrigadas apresentaram menores valores de PSII em relação às linhagens transgênicas. Até os 20 dias após o tratamento, as linhagens transgênicas NAC081 ainda não haviam atingido os valores similares a BR16. Em função do aumento da severidade do déficit hídrico observaram-se reduções na conversão da energia absorvida destinada a cadeia de transporte de elétrons.

Os pigmentos fotossintéticos fornecem informações relevantes sobre o comportamento fisiológico dos vegetais diante de estresses ambientais, como déficit hídrico (Ashraf e Harris, 2013). Durante o estresse hídrico houve redução no teor de clorofila, principalmente da clorofila b (Figura 11 A – C). A linhagem transgênica NAC081.3 apresentou maior redução no teor de clorofilas, seguido pela linhagem NAC081.1 e, então, por BR16. Estes resultados estão consistentes com os dados de troca gasosas e os parâmetros fisiológicos de fluorescência. Similarmente, os pigmentos de carotenoides foram afetados pelo déficit hídrico (Figura 11D). A linhagem transgênica NAC081.3 exibiu redução nos pigmentos carotenóides a partir dos 20 dias após o início do déficit hídrico. Como esta linhagem é mais suscetível ao estresse hídrico, foi mais afetada do que os outros genótipos.

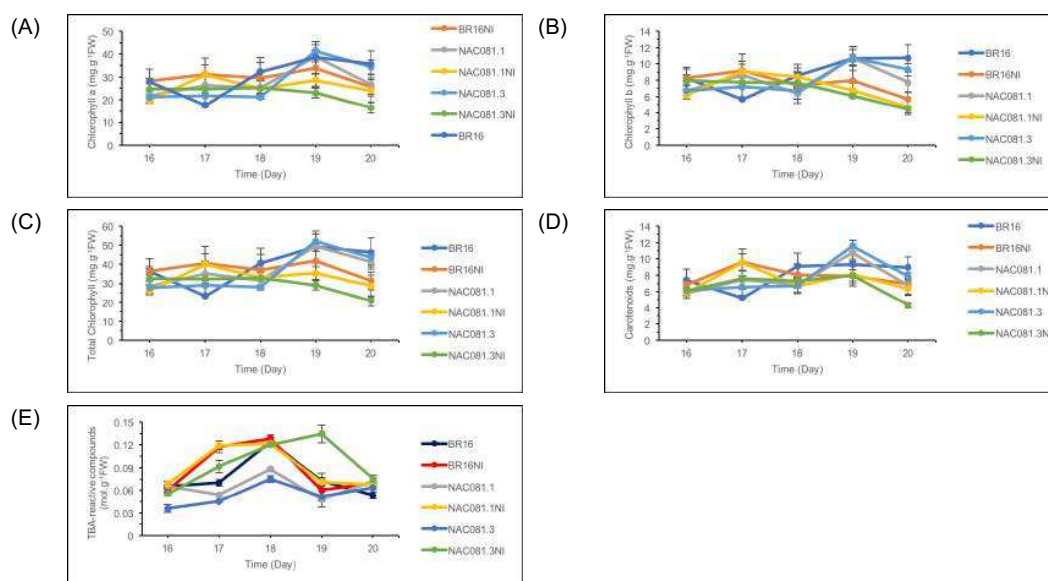


Figura 11 – Concentração de pigmentos e peróxido de hidrogênio ao longo do déficit hídrico gradual. (A) Clorofila a. (B) Clorofila b. (C) Clorofila total. (D) Carotenoides. (E) Compostos reativos com ácido tiobarbitúrico.

Como um adicional marcador bioquímico de senescência (natural ou induzida por seca), foi monitorado o acúmulo de compostos reativos do ácido tiobarbitúrico (TBA), tal como o malondialdeído (MDA), a fim de avaliar a peroxidação de lipídeos associada ao déficit hídrico. As linhagens transgênicas NAC081.3 apresentaram um maior acúmulo de MDA do que a variedade BR16 (Figura 11E). Isto demonstra que o processo de morte celular induzido por déficit hídrico estava mais pronunciado nas linhagens transgênicas, confirmando assim a susceptibilidade dessas plantas ao déficit hídrico.

Uma vez que *GmNAC081* participa ativamente na via de morte celular mediada por NRPs e induzida por múltiplos estresses (Pimenta *et al.*, 2011), a hipótese central seria que a superexpressão de *GmNAC081* promoveria maior susceptibilidade à seca devido à sua capacidade de acelerar morte celular induzida por estresses múltiplos. De fato, foi demonstrado na presente investigação que superexpressão de *GmNAC081* promove um estado de senescência acelerada nas linhagens transgênicas. Com a finalidade de analisar se *GmNAC081* poderia estar regulando genes de tolerância típica contra seca, como fatores de transcrição DREB e AREB, genes envolvidos na síntese e sinalização de ABA, etc, foram avaliados a

representação de genes diferencialmente expressos pela superexpressão de *GmNAC081* pertencentes à categoria defesa contra estresses abióticos. Em condições normais de crescimento aos 20 DAG, a superexpressão de *GmNAC081* promoveu predominantemente a regulação negativa de genes relacionados ao déficit hídrico comparado com plantas não transgênicas (Tabela 5). Considerando genes responsivos à seca, 42 genes foram diferencialmente expressos na linhagem transgênica NAC081, dos quais 11 genes foram regulados positivamente e 31 genes regulados negativamente. Entre os genes regulados negativamente se destaca *PDR12 (AtPDR12)/ABCG40* (pleiotropic drug resistance transporter) que codifica um transportador da membrana plasmática que promove a absorção de ABA (Kang *et al.*, 2010). A baixa expressão de *ABCG40* nas linhagens transgênicas poderiam estar comprometendo a absorção de ABA durante déficit hídrico o que poderia contribuir para maior sensibilidade à seca dessas linhagens. Também foram regulados negativamente genes que codificam aquaporinas que regulam o transporte de água em células vegetais, como *PIP2A* plasma membrane intrinsic protein 2A e *TMP-C* plasma membrane intrinsic protein 1;4, além do gene *CBF4*, um membro da subfamília *DREB A-1* da família de fatores de transcrição *ERF/AP2*. Este cenário associado com a observação de que a superexpressão de *GmNAC081* causa predominantemente regulação negativa de genes relacionados à resposta de defesa ao déficit hídrico substantia o argumento de que o fenótipo de maior sensibilidade à seca pela superexpressão de *GmNAC081* pode estar associado não somente à propriedade de *GmNAC081* de induzir morte celular programada e senescência natural, mas também a sua atividade de repressão transcricional de genes chaves de resposta ao déficit hídrico.

## 5. Conclusão

O gene *GmNAC081* atua na via de morte celular programada mediada pelas NRPs em resposta à defesa a estresses múltiplos e a senescência. O presente trabalho confirma que a superexpressão do gene leva a um processo de senescência acelerado, contudo tornando as plantas mais suscetíveis ao déficit hídrico.

Foi demonstrado que a superexpressão de *GmNAC081* durante o estágio vegetativo de desenvolvimento, aos 20 DAG, modula a expressão de genes, previamente conhecidos como alvos diretos de *GmNAC081* e que são naturalmente induzidos ou reprimidos durante a senescência. Além disso, candidatos adicionais com o potencial de serem diretamente controlados por *GmNAC081* e que atuam no processo de senescência, como *JMT*, *MLO3*, *NRT1.5*, *KIN10*, *KIT1* e *SPI*, foram selecionados, cuja expressão diferencial foi confirmada por qRT-PCR. Estes genes possuem sítios de ligação de *GmNAC081* localizados na região promotora, reforçando a hipótese de que possam ser alvos diretos do controle por *GmNAC081*. Assim sendo, os dados do RNA-seq ampliam a atividade transcricional de *GmNAC081* em escala genômica, identificando um conjunto de possíveis alvos diretos que atuam para estabelecimento do processo de senescência. Considerando que 25,3% dos genes regulados positivamente e 42,7% dos genes regulados negativamente por *GmNAC081* são também induzidos por senescência natural, pode-se adiantar que o mecanismo pelo qual *GmNAC081* induz senescência está associado não somente a atuação da VPE, mediando o colapso do vacúolo, mas também com processos de autofagia e de morte celular programada.

Foi também fornecido evidências que *GmNAC081* controla negativamente tolerância à seca em soja. Inicialmente, foi demonstrado que sob o mesmo regime de déficit hídrico progressivo, as linhagens transgênicas exibiram menor potencial hídrico e teor relativo de água nas folhas. Além disso, o aparato fotossintético foi danificado mais rapidamente nas linhagens transgênicas do que na variedade controle BR16. Sob desidratação progressiva, nas linhagens transgênicas, o decréscimo da taxa fotossintética e condutância estomática foi mais acentuado, sendo que a razão  $C_i/C_a$  foi maior refletindo menor eficiência de fixação de carbono e o valor  $F_v/F_m$  foi menor, confirmando danificação maior no aparato fotossintético, comparado com a variedade controle BR16. Dados bioquímicos referentes a perda de pigmentos e peroxidação de lipídeos demonstraram um processo acelerado de morte celular induzida por seca nas linhagens transgênicas, o que é consistente com o panorama da variação global da expressão gênica induzido por *GmNAC081*. Entretanto,

também foi detectado que *GmNAC081* regula negativamente genes associados à resposta típica de tolerância à seca em plantas, levantando a hipótese da existência de mecanismos adicionais para o controle negativo de *GmNAC081* na tolerância à seca. É possível que *GmNAC081* represente um ponto convergente na comunicação cruzada entre sinalização de resposta a estresses múltiplos em plantas e senescência natural programada pelo desenvolvimento.

Coletivamente, estes resultados demonstram que as análises do RNA-seq forneceram um cenário de genes diferencialmente expressos que pode delimitar os mecanismos pelos quais *GmNAC081* regula positivamente o estabelecimento de senescência e negativamente tolerância à seca. A confirmação da atividade transcricional de *GmNAC081* diretamente sob os genes selecionados poderá ser examinada posteriormente em ensaios transcricionais sob os promotores selecionados, fusionados a genes repórteres, em protoplastos de soja.

## 6. Dados suplementares

**Tabela suplementar 1.** Listagem dos oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de qRT-PCR.

Primers	Sequência (5'—3')	Gene
GM UKN2 F	GCCTCTGGATACCTGCTCAAG	Unknown 2
GM UKN2 R	ACCTCCTCCTCAAACCTCCTCTG	
HELIC Fwd	TAACCCTAG CCCCTTCGC CT	HELICASE
HELIC Rvs	GCCTTGTCGTCTTCCTCCTCG	
qRTGmNAC081	CCA ACA AAA GCA CTT GTG GCA	GmNAC081
qRTGmNAC081	GGA CTA TTC AACTGA GCCCAAAG	
qRTGmMLO3Fwd	AGTGGCACAGATGGGTTTCAG	MLO3
qRTGmMLO3Rv	TCTTGGCTCCATTCTGAGGAC	
qRTGmNRT1.5Fwd	AATGCACAAACACCTGATGG	NRT1.5
qRTGmNRT1.5Rv	ATCCATCCTGGCATCTCATC	
qRTGmJMTFwd	GGAAGGGTCATTATTGTGG	JMT
qRTGmJMTRv	ATGGTCCTTGCAACTCGTTC	
qRTGmKIN10Fwd	TTGATGTCTGGAGTTGTGGTG	KIN10

qRTGmKIN10Rv	TGGCTCCAGGAGATAGATGG	
qRTGmKIT1Fwd	TTGCCCTCAACGTTCAAGATG	KIT1
qRTGmKIT1RV	TTCCACTCCTCGTGTCGTTC	
qRTGmSPIFwd	GGCCTGAGCTAGTTGGAGTG	SPI
qRTGmSPIRv	CAATGTGGGGAACCTTCCTTG	

**Tabela suplementar 2** – Funcional categorização, baseado em GO, de genes diferencialmente expressos no contraste 35S:GmNAC081 (20 DAG) – WT (20 DAG).

<b>GO:0006624 vacuolar protein processing</b>			
<b>ID</b>	<b>log2FC</b>	<b>padj</b>	<b>Description</b>
Glyma.12G129300	-0.61	0.002	AT2G42700.1
Glyma.05G055700	0.94	0.002	BETAVPE beta vacuolar processing enzyme
Glyma.14G092800	2.31	0.000	GAMMAVPE gamma vacuolar processing enzyme
Glyma.17G230700	3.25	0.000	GAMMAVPE gamma vacuolar processing enzyme
<b>GO:0007568 aging</b>			
<b>ID</b>	<b>log2FC</b>	<b>padj</b>	<b>Description</b>
Glyma.20G036100	-2.39	0.012	RNS1 ribonuclease 1
Glyma.04G147100	-1.17	0.022	TET7 tetraspanin7
Glyma.08G029100	-0.66	0.006	TET2 tetraspanin2
Glyma.13G091000	-0.52	0.029	TET8 tetraspanin8
Glyma.07G059300	0.48	0.016	RNS2 ribonuclease 2
Glyma.19G013200	0.58	0.014	SAG101 senescence-associated gene 101
Glyma.10G112000	0.63	0.031	CCH copper chaperone
Glyma.13G210800	0.69	0.049	GS2 glutamine synthetase 2
Glyma.15G102000	0.91	0.002	GS2 glutamine synthetase 2
Glyma.04G190200	1.03	0.000	PIMT1 protein-l-isoaspartate methyltransferase 1
Glyma.12G109200	1.64	0.012	GS2 glutamine synthetase 2
<b>GO:0007623 Circadian rhythm</b>			
<b>ID</b>	<b>log2FC</b>	<b>padj</b>	<b>Description</b>
Glyma.17G172400	-2.75	0.000	SPT basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
Glyma.06G114900	-2.11	0.000	ATRR4 response regulator 9
Glyma.13G244200	-1.90	0.022	SRF3 STRUBBELIG-receptor family 3
Glyma.17G126400	-1.82	0.000	BT2 BTB and TAZ domain protein 2
Glyma.11G054600	-1.72	0.000	SPT basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
Glyma.13G184200	-1.64	0.039	SRF3 STRUBBELIG-receptor family 3
Glyma.05G239400	-1.57	0.005	ADO3,FKF1 flavin-binding, kelch repeat, f box 1
Glyma.11G155100	-1.44	0.006	ATRR4 response regulator 9
Glyma.19G110200	-1.29	0.002	GATA9 GATA transcription factor 9
Glyma.12G074100	-1.22	0.000	JK224,NPH1,PHOT1,RPT1 phototropin 1

Glyma.17G093900	-1.20	0.000	RR5 response regulator 5
Glyma.05G033000	-1.10	0.002	RR5 response regulator 5
Glyma.06G296800	-1.10	0.028	SRF3 STRUBBELIG-receptor family 3
Glyma.17G037400	-1.05	0.002	Plant neutral invertase family protein
Glyma.05G067100	-0.87	0.000	CKB1 casein kinase II beta chain 1
Glyma.15G074000	-0.77	0.000	GSL1 glucan synthase-like 1
Glyma.20G060400	-0.75	0.006	COL9 CONSTANS-like 9
Glyma.02G296300	-0.68	0.007	FIM1 fimbrin 1
Glyma.14G094800	-0.67	0.024	GATA22 cytokinin-responsive gata factor 1
Glyma.11G117600	-0.66	0.000	GRP7 cold, circadian rhythm, and rna binding 2
Glyma.12G043000	-0.64	0.001	CCR1,GR-RBP8,GRP8 cold, circadian rhythm, and RNA binding 1
Glyma.11G230200	-0.62	0.023	ATNFXL2 sequence-specific DNA binding transcription factors; zinc ion binding;sequence-specific DNA binding transcription factors
Glyma.11G054800	-0.59	0.025	Protein kinase superfamily protein
Glyma.01G187300	-0.54	0.022	Protein kinase superfamily protein
Glyma.19G242900	-0.43	0.027	WNK1,ZIK4 with no lysine (K) kinase 1
Glyma.04G096200	-0.39	0.013	TIFY1,ZIM GATA-type zinc finger protein with TIFY domain
Glyma.13G135900	-0.37	0.000	PRR7 pseudo-response regulator 7
Glyma.01G200800	0.32	0.045	PRR2 CheY-like two-component responsive regulator family protein
Glyma.15G162300	0.33	0.005	ZTL Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein
Glyma.06G314300	0.37	0.000	FHY3 far-red elongated hypocotyls 3
Glyma.05G157200	0.45	0.018	MPK7 MAP kinase 7
Glyma.16G018000	0.46	0.035	PRR5 pseudo-response regulator 5
Glyma.08G218100	0.47	0.007	IRX4 cinnamoyl coa reductase 1
Glyma.10G248400	0.49	0.010	WNK1,ZIK4 with no lysine (K) kinase 1
Glyma.04G124300	0.50	0.000	FHY3 far-red elongated hypocotyls 3
Glyma.17G152800	0.54	0.000	PRR2 CheY-like two-component responsive regulator family protein
Glyma.19G260400	0.55	0.000	PRR5 pseudo-response regulator 5
Glyma.19G227700	0.55	0.041	CSP41B chloroplast RNA binding
Glyma.09G056100	0.58	0.000	ZTL Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein
Glyma.07G049400	0.61	0.001	PRR5 pseudo-response regulator 5
Glyma.20G228000	0.62	0.006	WNK1,ZIK4 with no lysine (K) kinase 1
Glyma.10G160400	0.65	0.000	WNK1,ZIK4 with no lysine (K) kinase 1
Glyma.03G261300	0.66	0.000	PRR5 pseudo-response regulator 5
Glyma.02G100000	0.74	0.037	STN7 STT7 homolog STN7
Glyma.03G230000	0.78	0.019	CSP41B chloroplast RNA binding
Glyma.04G012700	0.79	0.000	GRP7 cold, circadian rhythm, and rna binding 2
Glyma.06G136600	0.80	0.022	PRR5 pseudo-response regulator 5
Glyma.06G012600	0.82	0.000	GRP7 cold, circadian rhythm, and rna binding 2
Glyma.01G087900	0.85	0.001	STN7 STT7 homolog STN7
Glyma.09G062800	0.88	0.000	GNC GATA type zinc finger transcription factor family protein

Glyma.08G274400	0.90	0.000	STM serine transhydroxymethyltransferase 1
Glyma.18G150000	0.96	0.000	STM serine transhydroxymethyltransferase 1
Glyma.15G043600	0.98	0.000	JK224,NPH1,PHOT1,RPT1 phototropin 1
Glyma.17G055200	0.99	0.004	GNC GATA type zinc finger transcription factor family protein
Glyma.02G073900	1.19	0.001	GATA transcription factor 4
Glyma.04G190900	1.64	0.013	BT2 BTB and TAZ domain protein 2
<b>GO:0008219 cell death</b>			
<b>ID</b>	<b>log2FC</b>	<b>padj</b>	<b>Description</b>
Glyma.14G081300	-4.08	0.000	PLP2 phospholipase A 2A
Glyma.16G080100	-1.26	0.000	MLO1 Seven transmembrane MLO family protein
Glyma.14G098000	-1.25	0.003	GPA1 G protein alpha subunit 1
Glyma.04G056600	-1.13	0.015	GPA1 G protein alpha subunit 1
Glyma.16G111900	-1.12	0.001	MLO8 Seven transmembrane MLO family protein
Glyma.20G178800	-0.86	0.035	MLO6 Seven transmembrane MLO family protein
Glyma.09G010000	-0.73	0.000	Fumarylacetoacetase, putative
Glyma.09G196800	-0.66	0.027	MLO8 Seven transmembrane MLO family protein
Glyma.12G159600	-0.27	0.045	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein
Glyma.14G040800	-0.25	0.027	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein
Glyma.13G145100	0.28	0.004	PIR2 NRAMP metal ion transporter family protein
Glyma.11G087500	0.41	0.022	MLO8 Seven transmembrane MLO family protein
Glyma.03G118800	0.42	0.019	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein
Glyma.01G157500	0.42	0.019	MLO8 Seven transmembrane MLO family protein
Glyma.20G229500	0.44	0.000	EDR1 Protein kinase superfamily protein
Glyma.07G205500	0.58	0.000	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein
Glyma.12G082100	0.59	0.008	PAO Pheophorbide a oxygenase family protein with Rieske [2Fe-2S] domain
Glyma.08G074500	0.59	0.005	SERK3 BRI1-associated receptor kinase
Glyma.17G261700	0.59	0.000	CAT2 catalase 2
Glyma.03G168700	0.67	0.000	PAR2 GroES-like zinc-binding dehydrogenase family protein
Glyma.06G017900	0.69	0.001	CAT2 catalase 2
Glyma.04G002400	0.76	0.000	MLO1 Seven transmembrane MLO family protein
Glyma.11G192300	0.82	0.000	PAO Pheophorbide a oxygenase family protein with Rieske [2Fe-2S] domain
Glyma.20G125200	0.89	0.016	RPI2 ribose-5-phosphate isomerase 2
Glyma.04G017500	0.93	0.000	CAT2 catalase 2
Glyma.10G212300	1.24	0.000	MLO6 Seven transmembrane MLO family protein
Glyma.12G070600	1.95	0.000	MLO6 Seven transmembrane MLO family protein
<a href="#">Glyma.03G179200</a>	<a href="#">3.11</a>	<a href="#">0.000</a>	<a href="#">MLO3 Seven transmembrane MLO family protein</a>
<a href="#">Glyma.19G179900</a>	<a href="#">4.36</a>	<a href="#">0.000</a>	<a href="#">MLO3 Seven transmembrane MLO family protein</a>
<b>GO:0009611 response to wounding</b>			
<b>ID</b>	<b>log2FC</b>	<b>padj</b>	<b>Description</b>
<a href="#">Glyma.08G235400</a>	<a href="#">-6.88</a>	<a href="#">0.000</a>	<a href="#">ATKTI1,KT11 kunitz trypsin inhibitor 1</a>

Glyma.06G220800	-6.44	0.000	ATBCB,BCB,SAG14 blue-copper-binding protein
Glyma.10G184600	-5.95	0.000	Serine protease inhibitor, potato inhibitor I-type family protein
Glyma.07G034900	-5.87	0.000	ATLOX1,LOX1 lipoxygenase 1
Glyma.20G205800	-5.77	0.000	Serine protease inhibitor, potato inhibitor I-type family protein
Glyma.10G184700	-5.17	0.000	Serine protease inhibitor, potato inhibitor I-type family protein
Glyma.04G035000	-4.65	0.000	AOS,CYP74A,DDE2 allene oxide synthase
Glyma.15G223900	-4.34	0.000	ATOPR2,OPR2 12-oxophytodienoate reductase 2
Glyma.08G342100	-4.20	0.002	ATKT11,KTI1 kunitz trypsin inhibitor 1
Glyma.08G341700	-3.36	0.000	ATKT11,KTI1 kunitz trypsin inhibitor 1
Glyma.08G341800	-3.36	0.001	ATKT11,KTI1 kunitz trypsin inhibitor 1
Glyma.14G103100	-3.34	0.000	ATWRKY40,WRKY40 WRKY DNA-binding protein 40
Glyma.13G030300	-3.04	0.000	ATLOX2,LOX2 lipoxygenase 2
Glyma.08G189600	-2.99	0.000	ATLOX1,LOX1 lipoxygenase 1
Glyma.09G126200	-2.81	0.015	ATCHIA,CHIA chitinase A
Glyma.14G102900	-2.70	0.001	ATWRKY40,WRKY40 WRKY DNA-binding protein 40
Glyma.03G160200	-2.70	0.021	CYP94B1 cytochrome P450, family 94, subfamily B, polypeptide 1
Glyma.08G341600	-2.62	0.000	ATKT11,KTI1 kunitz trypsin inhibitor 1
Glyma.13G346700	-2.56	0.000	ATCHITIV,ATEP3,CHIV,EP3 homolog of carrot EP3-3 chitinase
Glyma.08G342300	-2.52	0.031	ATKT11,KTI1 kunitz trypsin inhibitor 1
Glyma.13G370100	-2.50	0.000	ATWRKY40,WRKY40 WRKY DNA-binding protein 40
Glyma.13G186200	-2.42	0.029	ATOPR2,OPR2 12-oxophytodienoate reductase 2
Glyma.20G036100	-2.39	0.012	ATRNS1,RNS1 ribonuclease 1
Glyma.08G003900	-2.37	0.014	ATDGK2,DGK2 diacylglycerol kinase 2
Glyma.01G228700	-2.08	0.005	TT4 Chalcone and stilbene synthase family protein
Glyma.16G173000	-2.03	0.002	ATCHIA,CHIA chitinase A
Glyma.08G109500	-2.01	0.046	ATCHS,CHS,TT4 Chalcone and stilbene synthase family protein
Glyma.10G005300	-1.88	0.002	ATPTR3,PTR3 peptide transporter 3
Glyma.17G126400	-1.82	0.000	ATBT2,BT2 BTB and TAZ domain protein 2
Glyma.08G218600	-1.66	0.009	ATWRKY40,WRKY40 WRKY DNA-binding protein 40
Glyma.06G061900	-1.63	0.019	WRKY40 WRKY DNA-binding protein 40
Glyma.11G124500	-1.55	0.004	ATCHITIV,ATEP3,CHIV,EP3 homolog of carrot EP3-3 chitinase
Glyma.11G197500	-1.51	0.016	PLAT/LH2 domain-containing lipoxygenase family protein
Glyma.16G020200	-1.51	0.025	CIPK9,PKS6,SnRK3.12 CBL-interacting protein kinase 9
Glyma.20G054000	-1.41	0.000	ATLOX2,LOX2 lipoxygenase 2
Glyma.03G260200	-1.39	0.000	CIPK9,PKS6,SnRK3.12 CBL-interacting protein kinase 9
Glyma.13G347800	-1.36	0.043	ATLOX1,LOX1 lipoxygenase 1
Glyma.07G196800	-1.34	0.042	LOX3 lipoxygenase 3
Glyma.13G043500	-1.30	0.006	ABCG11,ATWBC11,COF1,DSO,WBC11 white-brown complex homolog protein 11
Glyma.08G018000	-1.24	0.024	ACS6,ATACS6 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (acc) synthase 6
Glyma.15G026400	-1.21	0.033	ATLOX1,LOX1 lipoxygenase 1
Glyma.06G157400	-1.17	0.021	ANAC002,ATAF1 NAC (No Apical Meristem) domain transcriptional regulator superfamily protein

Glyma.04G007700	-1.13	0.000	SPE2 arginine decarboxylase 2
Glyma.07G059000	-1.10	0.000	Pyridoxal phosphate (PLP)-dependent transferases superfamily protein
Glyma.13G239000	-1.06	0.004	LOX3 lipoxygenase 3
Glyma.18G118100	-1.05	0.000	SQE1,XF1 FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein
Glyma.16G088000	-0.99	0.000	ATFKBP62,FKBP62,ROF1 rotamase FKBP 1
Glyma.19G009100	-0.99	0.010	FDH formate dehydrogenase
Glyma.08G197300	-0.98	0.008	IAR3,JR3 peptidase M20/M25/M40 family protein
Glyma.11G122700	-0.94	0.006	AOS,CYP74A,DDE2 allene oxide synthase
Glyma.13G088100	-0.90	0.001	RAP2.4 related to AP2 4
Glyma.09G160000	-0.90	0.000	ABCG11,ATWBC11,COF1,DSO,WBC11 white-brown complex homolog protein 11
Glyma.14G171500	-0.88	0.013	RAP2.4 related to AP2 4
Glyma.03G086200	-0.69	0.013	FKBP62,ROF1 rotamase FKBP 1
Glyma.20G136300	-0.67	0.001	Inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase family protein
Glyma.11G035200	-0.66	0.000	ACX1,ATACX1 acyl-CoA oxidase 1
Glyma.09G070500	-0.59	0.000	ATSSL4,SSL4 strictosidine synthase-like 4
Glyma.09G044500	-0.49	0.006	ATMRP4,EST3,MRP4 multidrug resistance-associated protein 4
Glyma.20G077000	-0.49	0.000	KAT2,PED1,PKT3 peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase 3
Glyma.16G111700	-0.47	0.020	ATGLR3.6,GLR3.6 glutamate receptor 3.6
Glyma.06G016000	-0.44	0.044	GLR3.3 glutamate receptor 3.3
Glyma.01G096600	-0.40	0.046	ZBF1 Basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding family protein
Glyma.08G346700	-0.36	0.030	ATFKBP62,FKBP62,ROF1 rotamase FKBP 1
Glyma.01G202600	0.18	0.027	UPF1 RNA helicase, putative
Glyma.17G022300	0.19	0.045	CHR3,SYD P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
Glyma.09G087900	0.22	0.009	Binding;RNA binding
Glyma.06G072200	0.31	0.002	LUG,RON2 LisH dimerisation motif;WD40/YVTN repeat-like-containing domain
Glyma.18G269500	0.32	0.004	HRT,RCY1,RPP8 Disease resistance protein (CC-NBS-LRR class) family
Glyma.15G194000	0.33	0.020	Binding;RNA binding
Glyma.13G352400	0.34	0.024	IAR3,JR3 peptidase M20/M25/M40 family protein
Glyma.02G297400	0.36	0.023	WRKY20 WRKY family transcription factor family protein
Glyma.11G012000	0.39	0.009	AT-RSH3,ATRSH3,RSH3 RELA/SPOT homolog 3
Glyma.03G167900	0.40	0.021	Pyridoxal phosphate (PLP)-dependent transferases superfamily protein
Glyma.07G180100	0.40	0.045	KAT2,PED1,PKT3 peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase 3
Glyma.13G084100	0.43	0.005	ARAKIN,ATMEKK1,MAPKKK8,MEKK1 MAPK/ERK kinase kinase1
Glyma.08G271900	0.43	0.004	ATMYC2,JAI1,JIN1,MYC2,RD22BP1,ZBF1 Basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding family protein
Glyma.18G171100	0.45	0.000	LUH LEUNIG_homolog
Glyma.06G089800	0.47	0.002	Inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase family protein
Glyma.05G123200	0.48	0.024	ARAKIN,ATMEKK1,MAPKKK8,MEKK1 MAPK/ERK kinase kinase1
Glyma.08G078200	0.51	0.005	ARAKIN,ATMEKK1,MAPKKK8,MEKK1 MAPK/ERK kinase kinase1
Glyma.04G088000	0.52	0.010	Inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase family protein
Glyma.03G216400	0.52	0.027	RSH1 RELA/SPOT homolog 1
Glyma.19G227700	0.55	0.041	CRB,CSP41B chloroplast RNA binding

Glyma.07G057900	0.59	0.003	FIN219,JAR1 Auxin-responsive GH3 family protein
Glyma.08G354500	0.60	0.000	LUH LEUNIG_homolog
Glyma.12G099500	0.61	0.004	ATGLR3.4,GLR3.4,GLUR3 glutamate receptor 3.4
Glyma.11G130200	0.62	0.000	ATLOX2,LOX2 lipoxygenase 2
Glyma.09G191300	0.63	0.015	ATPERK1,PERK1 proline extensin-like receptor kinase 1
Glyma.19G210700	0.63	0.021	ATMRP4,EST3,MRP4 multidrug resistance-associated protein 4
Glyma.19G212900	0.63	0.007	AT-RSH1,ATRSH1,RSH1 RELA/SPOT homolog 1
Glyma.04G249000	0.65	0.001	ANAC002,ATAF1 NAC (No Apical Meristem) domain transcriptional regulator superfamily protein
Glyma.14G152700	0.67	0.000	ANAC002,ATAF1 NAC (No Apical Meristem) domain transcriptional regulator superfamily protein
Glyma.11G087100	0.71	0.000	ATGLR3.6,GLR3.6 glutamate receptor 3.6
Glyma.10G019000	0.71	0.042	ATMRP4,EST3,MRP4 multidrug resistance-associated protein 4
Glyma.15G128000	0.72	0.005	Pyridoxal phosphate (PLP)-dependent transferases superfamily protein
Glyma.20G164900	0.73	0.010	ATCHIA,CHIA chitinase A
Glyma.03G230000	0.78	0.019	CSP41B chloroplast RNA binding
Glyma.16G026900	0.79	0.001	FIN219,JAR1 Auxin-responsive GH3 family protein
Glyma.01G235600	0.85	0.011	OPR2 12-oxophytodienoate reductase 2
Glyma.12G054700	0.85	0.000	ATLOX2,LOX2 lipoxygenase 2
Glyma.07G013300	0.86	0.002	IAR3,JR3 peptidase M20/M25/M40 family protein
Glyma.11G085100	0.91	0.000	RHD4 Phosphoinositide phosphatase family protein
Glyma.16G008700	0.92	0.000	LOX3 lipoxygenase 3
Glyma.13G095600	0.93	0.001	4CL2,AT4CL2 4-coumarate:CoA ligase 2
Glyma.U025000	0.99	0.004	AtPSKR2,PSKR2 phytoylfokine-alpha receptor 2
Glyma.06G305000	1.01	0.000	ATGLR3.4,GLR3.4,GLUR3 glutamate receptor 3.4
Glyma.10G255000	1.04	0.000	Inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase family protein
Glyma.20G206300	1.11	0.000	ATPTR3,PTR3 peptide transporter 3
Glyma.10G183900	1.12	0.000	ATPTR3,PTR3 peptide transporter 3
Glyma.14G223600	1.16	0.000	ATOPR1,OPR1 12-oxophytodienoate reductase 1
Glyma.13G361200	1.22	0.002	AXR3,IAA17 AUX/IAA transcriptional regulator family protein
Glyma.11G239200	1.53	0.001	RAP2.4 related to AP2 4
Glyma.11G130300	1.56	0.000	ATLOX2,LOX2 lipoxygenase 2
Glyma.19G263300	1.56	0.004	LOX3 lipoxygenase 3
Glyma.04G190900	1.64	0.013	ATBT2,BT2 BTB and TAZ domain protein 2
Glyma.07G162900	1.67	0.009	AOS,CYP74A,DDE2 allene oxide synthase
Glyma.18G132000	1.69	0.000	IAR3,JR3 peptidase M20/M25/M40 family protein
Glyma.15G074300	1.70	0.000	PLAT/LH2 domain-containing lipoxygenase family protein
Glyma.10G153900	2.21	0.000	ATLOX1,LOX1 lipoxygenase 1
Glyma.14G092800	2.31	0.000	GAMMA-VPE,GAMMAVPE gamma vacuolar processing enzyme
Glyma.01G193300	3.24	0.000	BT4 BTB and TAZ domain protein 4
Glyma.17G230700	3.25	0.000	GAMMA-VPE,GAMMAVPE gamma vacuolar processing enzyme
Glyma.14G072300	3.48	0.000	JMT jasmonic acid carboxyl methyltransferase
<b>GO:0009723 response to ethylene</b>			

ID	log2FC	padj	Description
Glyma.07G033500	-5.22	0.000	ABCG40,ATABCG40,ATPDR12,PDR12 pleiotropic drug resistance 12
Glyma.15G012000	-5.12	0.000	ABCG40,ATABCG40,ATPDR12,PDR12 pleiotropic drug resistance 12
Glyma.03G247500	-3.25	0.000	HEL,PR-4,PR4 pathogenesis-related 4
Glyma.03G168000	-2.61	0.005	ABCG40,ATABCG40,ATPDR12,PDR12 pleiotropic drug resistance 12
Glyma.06G247100	-1.89	0.000	PORA protochlorophyllide oxidoreductase A
Glyma.06G317500	-1.78	0.000	ATPHB3,PHB3 prohibitin 3
Glyma.07G130400	-1.70	0.000	ARF7,BIP,IAA21,IAA23,IAA25,MSG1,NPH4,TIR5 Transcriptional factor B3 family protein / auxin-responsive factor AUX/IAA-related
Glyma.04G147000	-1.66	0.003	EBF1,FBL6 EIN3-binding F box protein 1
Glyma.19G245400	-1.49	0.000	HEL,PR-4,PR4 pathogenesis-related 4
Glyma.13G361900	-1.45	0.000	ABCG40,ATABCG40,ATPDR12,PDR12 pleiotropic drug resistance 12
Glyma.02G122000	-1.39	0.006	FER Malectin/receptor-like protein kinase family protein
Glyma.08G018000	-1.24	0.024	ACS6,ATACS6 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (acc) synthase 6
Glyma.05G021100	-1.17	0.042	ATRBOH F,ATRBOHF,RBOH F,RBOHAP108,RBOHF respiratory burst oxidase protein F
Glyma.09G209900	-1.12	0.001	XLG3 extra-large GTP-binding protein 3
Glyma.08G018900	-1.05	0.025	ATRBOH F,ATRBOHF,RBOH F,RBOHAP108,RBOHF respiratory burst oxidase protein F
Glyma.13G166200	-0.96	0.002	EBF1,FBL6 EIN3-binding F box protein 1
Glyma.09G072200	-0.81	0.007	ARF7,BIP,IAA21,IAA23,IAA25,MSG1,NPH4,TIR5 Transcriptional factor B3 family protein / auxin-responsive factor AUX/IAA-related
Glyma.16G119000	-0.72	0.000	SSL5,YLS2 Calcium-dependent phosphotriesterase superfamily protein
Glyma.01G002100	-0.68	0.001	ARF7,BIP,IAA21,IAA23,IAA25,MSG1,NPH4,TIR5 Transcriptional factor B3 family protein / auxin-responsive factor AUX/IAA-related
Glyma.03G191000	0.25	0.049	AtCTR1,CTR1,SIS1 Protein kinase superfamily protein
Glyma.13G145100	0.28	0.004	ATEIN2,CKR1,EIN2,ERA3,ORE2,ORE3,PIR2 NRAMP metal ion transporter family protein
Glyma.09G002600	0.30	0.030	AtETR1,EIN1,ETR,ETR1 Signal transduction histidine kinase, hybrid-type, ethylene sensor
Glyma.14G031700	0.32	0.028	transducin family protein / WD-40 repeat family protein
Glyma.08G240800	0.37	0.001	WRKY4 WRKY DNA-binding protein 4
Glyma.01G147800	0.42	0.000	EDR2 ENHANCED DISEASE RESISTANCE 2
Glyma.03G041600	0.43	0.001	ATSCAR2,DIS3,ITB1,SCAR2,WAVE4 SCAR homolog 2
Glyma.20G229500	0.44	0.000	ATEDR1,EDR1 Protein kinase superfamily protein
Glyma.14G116800	0.45	0.024	EBF1,FBL6 EIN3-binding F box protein 1
Glyma.19G242400	0.45	0.002	AIN1,ATXRN4,EIN5,XRN4 exoribonuclease 4
Glyma.15G158300	0.47	0.006	HMA7,RAN1 copper-exporting ATPase / responsive-to-antagonist 1 / copper-transporting ATPase (RAN1)
Glyma.02G085900	0.49	0.006	ARR2,RR2 response regulator 2
Glyma.18G270700	0.51	0.027	FER Malectin/receptor-like protein kinase family protein
Glyma.18G270600	0.54	0.003	FER Malectin/receptor-like protein kinase family protein
Glyma.13G151100	0.55	0.004	AtCTR1,CTR1,SIS1 Protein kinase superfamily protein
Glyma.06G068400	0.56	0.000	EBF1,FBL6 EIN3-binding F box protein 1
Glyma.05G106000	0.57	0.003	ATTBP3,ATTRB2,TBP3,TRB2 Homeodomain-like/winged-helix DNA-binding family protein
Glyma.14G218000	0.58	0.000	AtXRN3,XRN3 5'-3' exoribonuclease 3
Glyma.07G243300	0.60	0.005	ARR2,RR2 response regulator 2

Glyma.08G027800	0.60	0.025	ARF7,BIP,IAA21,IAA23,IAA25,MSG1,NPH4,TIR5 Transcriptional factor B3 family protein / auxin-responsive factor AUX/IAA-related
Glyma.18G270900	0.62	0.001	FER Malectin/receptor-like protein kinase family protein
Glyma.10G017600	0.62	0.041	AtLEA5,SAG21 senescence-associated gene 21
Glyma.08G248900	0.63	0.001	FER Malectin/receptor-like protein kinase family protein
Glyma.01G128700	0.63	0.000	ATSCAR2,DIS3,ITB1,SCAR2,WAVE4 SCAR homolog 2
Glyma.10G066000	0.63	0.000	AtCTR1,CTR1,SIS1 Protein kinase superfamily protein
Glyma.18G271200	0.63	0.016	FER Malectin/receptor-like protein kinase family protein
Glyma.11G020700	0.69	0.015	ATRBOH F,ATRBOHF,RBOH F,RBOHAP108,RBOHF respiratory burst oxidase protein F
Glyma.18G269900	0.70	0.003	FER Malectin/receptor-like protein kinase family protein
Glyma.13G362000	0.73	0.001	ABCG40,ATABCG40,ATPDR12,PDR12 pleiotropic drug resistance 12
Glyma.18G270800	0.73	0.004	FER Malectin/receptor-like protein kinase family protein
Glyma.09G212100	0.73	0.000	EDR2 ENHANCED DISEASE RESISTANCE 2
Glyma.02G017100	0.73	0.014	AtLEA5,SAG21 senescence-associated gene 21
Glyma.18G271000	0.76	0.003	FER Malectin/receptor-like protein kinase family protein
Glyma.18G270100	0.86	0.001	FER Malectin/receptor-like protein kinase family protein
Glyma.05G221300	0.87	0.000	ARF7,BIP,IAA21,IAA23,IAA25,MSG1,NPH4,TIR5 Transcriptional factor B3 family protein / auxin-responsive factor AUX/IAA-related
Glyma.14G127800	0.97	0.000	ABCG40,ATABCG40,ATPDR12,PDR12 pleiotropic drug resistance 12
Glyma.13G053700	1.25	0.000	FER Malectin/receptor-like protein kinase family protein
Glyma.03G168200	1.27	0.009	ABCG40,ATABCG40,ATPDR12,PDR12 pleiotropic drug resistance 12
Glyma.01G222700	1.61	0.000	ATRBOH F,ATRBOHF,RBOH F,RBOHAP108,RBOHF respiratory burst oxidase protein F
Glyma.02G196000	1.62	0.000	FER Malectin/receptor-like protein kinase family protein
Glyma.18G209100	1.75	0.000	ATSCAR2,DIS3,ITB1,SCAR2,WAVE4 SCAR homolog 2
Glyma.14G092800	2.31	0.000	GAMMA-VPE,GAMMAVPE gamma vacuolar processing enzyme
Glyma.17G230700	3.25	0.000	GAMMA-VPE,GAMMAVPE gamma vacuolar processing enzyme
<b>GO:0009751 response to salicylic acid</b>			
<b>ID</b>	<b>log2FC</b>	<b>padj</b>	<b>Description</b>
Glyma.08G235400	-6.88	0.000	ATKT11,KTI1 kunitz trypsin inhibitor 1
Glyma.07G033500	-5.22	0.000	ABCG40,ATABCG40,ATPDR12,PDR12 pleiotropic drug resistance 12
Glyma.15G012000	-5.12	0.000	ABCG40,ATABCG40,ATPDR12,PDR12 pleiotropic drug resistance 12
Glyma.08G342100	-4.20	0.002	ATKT11,KTI1 kunitz trypsin inhibitor 1
Glyma.08G341700	-3.36	0.000	ATKT11,KTI1 kunitz trypsin inhibitor 1
Glyma.08G341800	-3.36	0.001	ATKT11,KTI1 kunitz trypsin inhibitor 1
Glyma.14G103100	-3.34	0.000	ATWRKY40,WRKY40 WRKY DNA-binding protein 40
Glyma.05G161600	-3.30	0.000	ATGSTU7,GST25,GSTU7 glutathione S-transferase tau 7
Glyma.18G273200	-3.28	0.000	DMR6 2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
Glyma.18G185400	-3.02	0.001	RLK receptor lectin kinase
Glyma.14G102900	-2.70	0.001	ATWRKY40,WRKY40 WRKY DNA-binding protein 40
Glyma.08G341600	-2.62	0.000	ATKT11,KTI1 kunitz trypsin inhibitor 1
Glyma.03G168000	-2.61	0.005	ABCG40,ATABCG40,ATPDR12,PDR12 pleiotropic drug resistance 12
Glyma.08G342300	-2.52	0.031	ATKT11,KTI1 kunitz trypsin inhibitor 1

Glyma.13G370100	-2.50	0.000	ATWRKY40,WRKY40 WRKY DNA-binding protein 40
Glyma.04G238300	-2.41	0.002	ATWRKY30,WRKY30 WRKY DNA-binding protein 30
Glyma.08G118700	-2.31	0.004	ATGSTU7,GST25,GSTU7 glutathione S-transferase tau 7
Glyma.10G005300	-1.88	0.002	ATPTR3,PTR3 peptide transporter 3
Glyma.17G126400	-1.82	0.000	ATBT2,BT2 BTB and TAZ domain protein 2
Glyma.08G118900	-1.82	0.018	ATGSTU7,GST25,GSTU7 glutathione S-transferase tau 7
Glyma.08G218600	-1.66	0.009	ATWRKY40,WRKY40 WRKY DNA-binding protein 40
Glyma.06G061900	-1.63	0.019	ATWRKY40,WRKY40 WRKY DNA-binding protein 40
Glyma.07G140000	-1.49	0.014	ATGSTU7,GST25,GSTU7 glutathione S-transferase tau 7
Glyma.13G361900	-1.45	0.000	ABCG40,ATABCG40,ATPDR12,PDR12 pleiotropic drug resistance 12
Glyma.18G294400	-1.38	0.029	CRK5,RLK6 cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 5
Glyma.11G228100	-1.34	0.042	ATHSPRO2,HSPRO2 ortholog of sugar beet HS1 PRO-1 2
Glyma.07G140200	-0.93	0.013	ATGSTU7,GST25,GSTU7 glutathione S-transferase tau 7
Glyma.08G330300	-0.73	0.001	AHG2,ATPARN Polynucleotidyl transferase, ribonuclease H-like superfamily protein
Glyma.16G119000	-0.72	0.000	SSL5,YLS2 Calcium-dependent phosphotriesterase superfamily protein
Glyma.17G091500	-0.72	0.002	RDR2,SMD1 RNA-dependent RNA polymerase 2
Glyma.05G168600	-0.60	0.037	EBS1,PSL2,UGGT UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferases;transferases, transferring hexosyl groups;transferases, transferring glycosyl groups
Glyma.08G187500	-0.44	0.001	EBS1,PSL2,UGGT UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferases;transferases, transferring hexosyl groups;transferases, transferring glycosyl groups
Glyma.18G269500	0.32	0.004	HRT,RCY1,RPP8 Disease resistance protein (CC-NBS-LRR class) family
Glyma.08G240800	0.37	0.001	WRKY4 WRKY DNA-binding protein 4
Glyma.01G147800	0.42	0.000	EDR2 ENHANCED DISEASE RESISTANCE 2
Glyma.05G106000	0.57	0.003	ATTBP3,ATTRB2,TBP3,TRB2 Homeodomain-like/winged-helix DNA-binding family protein
Glyma.06G128100	0.65	0.000	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
Glyma.03G081900	0.70	0.013	AS1,ATMYB91,ATPHAN,MYB91 myb-like HTH transcriptional regulator family protein
Glyma.13G362000	0.73	0.001	ABCG40,ATABCG40,ATPDR12,PDR12 pleiotropic drug resistance 12
Glyma.09G212100	0.73	0.000	EDR2 ENHANCED DISEASE RESISTANCE 2
Glyma.02G086100	0.87	0.000	ATRDRP1,RDR1 RNA-dependent RNA polymerase 1
Glyma.14G127800	0.97	0.000	ABCG40,ATABCG40,ATPDR12,PDR12 pleiotropic drug resistance 12
Glyma.03G261600	1.02	0.003	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
Glyma.20G206300	1.11	0.000	ATPTR3,PTR3 peptide transporter 3
Glyma.10G183900	1.12	0.000	ATPTR3,PTR3 peptide transporter 3
Glyma.14G223600	1.16	0.000	ATOPR1,OPR1 12-oxophytodienoate reductase 1
Glyma.03G168200	1.27	0.009	ABCG40,ATABCG40,ATPDR12,PDR12 pleiotropic drug resistance 12
Glyma.04G209700	1.43	0.000	ATPAD4,PAD4 alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
Glyma.16G111800	1.52	0.000	ATIRE1-2,IRE1-2,IRE1A Endoribonuclease/protein kinase IRE1-like
Glyma.06G137000	1.53	0.001	DMR6 2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
Glyma.04G190900	1.64	0.013	ATBT2,BT2 BTB and TAZ domain protein 2
Glyma.06G156300	1.83	0.000	ATPAD4,PAD4 alpha/beta-Hydrolases superfamily protein

Glyma.14G178500	1.98	0.000	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
Glyma.14G092800	2.31	0.000	GAMMA-VPE,GAMMAVPE gamma vacuolar processing enzyme
Glyma.01G193300	3.24	0.000	ATBT4,BT4 BTB and TAZ domain protein 4
Glyma.17G230700	3.25	0.000	GAMMA-VPE,GAMMAVPE gamma vacuolar processing enzyme
<b>GO:0009835 fruit ripening</b>			
<b>ID</b>	<b>log2FC</b>	<b>padj</b>	<b>Description</b>
Glyma.02G268000	1.36	0.000	ACO4,EAT1,EFE ethylene-forming enzyme
Glyma.02G268200	-2.43	0.043	ACO4,EAT1,EFE ethylene-forming enzyme
Glyma.04G097900	-3.29	0.002	MATE efflux family protein
Glyma.07G229100	-1.54	0.003	ANAC029,ATNAP,NAP NAC-like, activated by AP3/PI
Glyma.08G018000	-1.24	0.024	ACS6,ATACS6 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (acc) synthase 6
Glyma.17G009800	-2.92	0.001	ACO4,EAT1,EFE ethylene-forming enzyme
Glyma.17G247400	-2.22	0.005	MATE efflux family protein
<b>GO:0010150 leaf senescence</b>			
<b>ID</b>	<b>log2FC</b>	<b>padj</b>	<b>Description</b>
Glyma.08G092800	-3.96	0.000	ATSRG1,SRG1 senescence-related gene 1
Glyma.08G180600	-2.29	0.030	ALD1 AGD2-like defense response protein 1
Glyma.02G244000	-2.25	0.030	ATGLN1;1,ATGSR1,GLN1;1,GSR 1 glutamine synthase clone R1
Glyma.16G031900	-2.17	0.004	AtWRKY22,WRKY22 WRKY family transcription factor
Glyma.01G056100	-1.99	0.001	ATSRG1,SRG1 senescence-related gene 1
Glyma.07G229100	-1.54	0.003	ANAC029,ATNAP,NAP NAC-like, activated by AP3/PI
Glyma.01G068200	-1.31	0.006	ATSRG1,SRG1 senescence-related gene 1
Glyma.08G049000	-1.26	0.000	AHK4,ATCRE1,CRE1,WOL,WOL1 CHASE domain containing histidine kinase protein
Glyma.02G124700	-0.97	0.049	ATSRG1,SRG1 senescence-related gene 1
Glyma.17G073800	-0.92	0.021	Cytosol aminopeptidase family protein
Glyma.03G165500	-0.62	0.030	ATPSAT1,PSAT1 phospholipid sterol acyl transferase 1
Glyma.04G080700	-0.58	0.001	ASP3,YLS4 aspartate aminotransferase 3
Glyma.01G142300	-0.39	0.020	DHHC-type zinc finger family protein
Glyma.18G220400	-0.38	0.018	DHHC-type zinc finger family protein
Glyma.02G204000	-0.33	0.021	Cytosol aminopeptidase family protein
Glyma.12G159600	-0.27	0.045	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein
Glyma.14G040800	-0.25	0.027	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein
<a href="#">Glyma.13G060400</a>	<a href="#">0.20</a>	<a href="#">0.037</a>	<a href="#">AKIN10,KIN10,SNRK1.1 SNF1 kinase homolog 10</a>
Glyma.12G164100	0.21	0.019	ARF1 auxin response factor 1
Glyma.07G211600	0.28	0.035	ATATG2,ATG2 autophagy 2
Glyma.13G145100	0.28	0.004	ATEIN2,CKR1,EIN2,ERA3,ORE2,ORE3,PIR2 NRAMP metal ion transporter family protein
Glyma.17G008400	0.30	0.037	UPL5 ubiquitin protein ligase 5
Glyma.02G133400	0.32	0.024	ATATG2,ATG2 autophagy 2
Glyma.11G012000	0.39	0.009	AT-RSH3,ATRSH3,RSH3 RELA/SPOT homolog 3
Glyma.07G265600	0.39	0.037	UPL5 ubiquitin protein ligase 5
Glyma.16G015700	0.40	0.038	ORMDL family protein

Glyma.03G118800	0.42	0.019	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein
Glyma.16G008900	0.45	0.000	Subtilase family protein
Glyma.02G085900	0.49	0.006	ARR2,RR2 response regulator 2
Glyma.02G046900	0.49	0.000	ATMCB1,MBP1,MCB1,RPN10 regulatory particle non-ATPase 10
Glyma.03G216400	0.52	0.027	AT-RSH1,ATRSH1,RSH1 RELA/SPOT homolog 1
Glyma.07G205500	0.58	0.000	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein
Glyma.02G249600	0.60	0.005	RCA rubisco activase
Glyma.07G243300	0.60	0.005	ARR2,RR2 response regulator 2
Glyma.10G017600	0.62	0.041	AtLEA5,SAG21 senescence-associated gene 21
Glyma.19G212900	0.63	0.007	AT-RSH1,ATRSH1,RSH1 RELA/SPOT homolog 1
Glyma.07G040100	0.63	0.000	Subtilase family protein
Glyma.06G128100	0.65	0.000	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
Glyma.05G137500	0.66	0.026	ATSRG1,SRG1 senescence-related gene 1
Glyma.02G017100	0.73	0.014	AtLEA5,SAG21 senescence-associated gene 21
Glyma.11G215500	0.78	0.020	ATGLN1;1,ATGSR1,GLN1;1,GSR 1 glutamine synthase clone R1
Glyma.07G051600	0.82	0.000	ATCRK3,CRK3 CDPK-related kinase 3
Glyma.14G067000	0.86	0.000	RCA rubisco activase
Glyma.16G008400	0.94	0.000	AT-RSH3,ATRSH3,RSH3 RELA/SPOT homolog 3
Glyma.03G261600	1.02	0.003	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
<a href="#">Glyma.18G260000</a>	<a href="#">1.08</a>	<a href="#">0.024</a>	<a href="#">NRT1.5 nitrate transporter 1.5</a>
Glyma.11G221000	1.09	0.001	RCA rubisco activase
Glyma.04G140100	1.11	0.000	ATPUB44,PUB44,SAUL1 senescence-associated E3 ubiquitin ligase 1
Glyma.14G223600	1.16	0.000	ATOPR1,OPR1 12-oxophytodienoate reductase 1
Glyma.07G039600	1.18	0.000	AT-RSH3,ATRSH3,RSH3 RELA/SPOT homolog 3
<a href="#">Glyma.05G070600</a>	<a href="#">1.19</a>	<a href="#">0.000</a>	<a href="#">NRT1.5 nitrate transporter 1.5</a>
Glyma.16G051800	1.19	0.004	ANAC083,NAC083,VNI2 NAC domain containing protein 83
Glyma.18G036400	1.20	0.001	RCA rubisco activase
Glyma.04G209700	1.43	0.000	ATPAD4,PAD4 alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
<a href="#">Glyma.17G153300</a>	<a href="#">1.47</a>	<a href="#">0.000</a>	<a href="#">NRT1.5 nitrate transporter 1.5</a>
Glyma.15G240600	1.50	0.000	ATSRG1,SRG1 senescence-related gene 1
Glyma.06G156300	1.83	0.000	ATPAD4,PAD4 alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
Glyma.12G040400	1.90	0.000	ARM repeat superfamily protein
Glyma.14G178500	1.98	0.000	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
<a href="#">Glyma.08G240400</a>	<a href="#">2.30</a>	<a href="#">0.000</a>	<a href="#">AKIN10,KIN10,SNRK1.1 SNF1 kinase homolog 10</a>
Glyma.14G092800	2.31	0.000	GAMMA-VPE,GAMMAVPE gamma vacuolar processing enzyme
Glyma.17G230700	3.25	0.000	GAMMA-VPE,GAMMAVPE gamma vacuolar processing enzyme
<a href="#">Glyma.09G237600</a>	<a href="#">3.32</a>	<a href="#">0.000</a>	<a href="#">NRT1.5 nitrate transporter 1.5</a>
<b>GO:0012501 programmed cell death</b>			
<b>ID</b>	<b>log2FC</b>	<b>padj</b>	<b>Description</b>
<a href="#">Glyma.08G235400</a>	<a href="#">-6.88</a>	<a href="#">0.000</a>	<a href="#">ATKT11,KTI1 kunitz trypsin inhibitor 1</a>
<a href="#">Glyma.08G342100</a>	<a href="#">-4.20</a>	<a href="#">0.002</a>	<a href="#">ATKT11,KTI1 kunitz trypsin inhibitor 1</a>

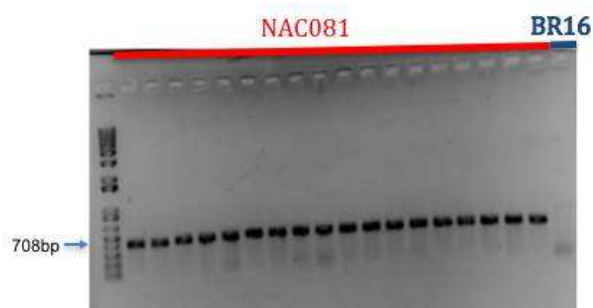
Glyma.16G056300	-4.02	0.000	ATTSO2,TSO2 Ferritin/ribonucleotide reductase-like family protein
Glyma.08G341700	-3.36	0.000	ATKTI1,KTI1 kunitz trypsin inhibitor 1
Glyma.08G341800	-3.36	0.001	ATKTI1,KTI1 kunitz trypsin inhibitor 1
Glyma.08G341600	-2.62	0.000	ATKTI1,KTI1 kunitz trypsin inhibitor 1
Glyma.08G342300	-2.52	0.031	ATKTI1,KTI1 kunitz trypsin inhibitor 1
Glyma.03G195600	-1.71	0.031	ATTSO2,TSO2 Ferritin/ribonucleotide reductase-like family protein
Glyma.18G294400	-1.38	0.029	CRK5,RLK6 cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 5
Glyma.08G033300	-0.68	0.000	ATHXK1,GIN2,HXK1 hexokinase 1
Glyma.05G226600	-0.42	0.042	ATHXK1,GIN2,HXK1 hexokinase 1
Glyma.19G242400	0.45	0.002	AIN1,ATXRN4,EIN5,XRN4 exoribonuclease 4
Glyma.14G218000	0.58	0.000	AtXRN3,XRN3 5\`-3\` exoribonuclease 3
<b>GO:1900055 regulation of leaf senescence</b>			
<b>ID</b>	<b>log2FC</b>	<b>padj</b>	<b>Description</b>
Glyma.01G142300	-0.39	0.020	DHHC-type zinc finger family protein
Glyma.18G220400	-0.38	0.018	DHHC-type zinc finger family protein
<b>GO:1900056 negative regulation of leaf senescence</b>			
<b>ID</b>	<b>log2FC</b>	<b>padj</b>	<b>Description</b>
Glyma.09G065900	-1.44	0.000	MMP matrix metalloproteinase
Glyma.01G147800	0.42	0.000	EDR2 ENHANCED DISEASE RESISTANCE 2
Glyma.09G212100	0.73	0.000	EDR2 ENHANCED DISEASE RESISTANCE 2
Glyma.08G294300	0.75	0.009	Galactosyltransferase family protein
Glyma.08G292300	1.24	0.001	MMP matrix metalloproteinase
Glyma.18G128600	1.42	0.000	Galactosyltransferase family protein

**Tabela suplementar 3** – Genes envolvidos em estresse hídrico diferencialmente expressos entre plantas de NAC081 e BR16 aos 20 DAG.

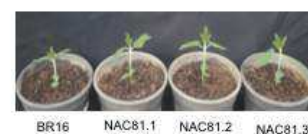
ID	log2FC	padj	Description
Glyma.07G033500	-5.22	0.000	ABCG40,ATABCG40,ATPDR12,PDR12 pleiotropic drug resistance 12
Glyma.15G012000	-5.12	0.000	ABCG40,ATABCG40,ATPDR12,PDR12 pleiotropic drug resistance 12
Glyma.09G147200	-3.47	0.004	CBF4,DREB1D C-repeat-binding factor 4
Glyma.19G227800	-3.33	0.000	AtGolS2,GolS2 galactinol synthase 2
Glyma.13G088700	-2.92	0.000	ANNAT1,ATOXY5,OXY5 annexin 1
Glyma.03G229800	-2.89	0.000	AtGolS2,GolS2 galactinol synthase 2
Glyma.05G208700	-2.76	0.000	PIP1;4,PIP1E,TMP-C plasma membrane intrinsic protein 1;4
Glyma.03G168000	-2.61	0.005	ABCG40,ATABCG40,ATPDR12,PDR12 pleiotropic drug resistance 12
Glyma.11G230100	-2.46	0.000	ATPLC2,PLC2 phospholipase C 2
Glyma.06G045400	-2.32	0.000	STZ,ZAT10 salt tolerance zinc finger
Glyma.04G044900	-1.97	0.004	STZ,ZAT10 salt tolerance zinc finger
Glyma.03G161300	-1.71	0.000	ATPARP2,PARP2 poly(ADP-ribose) polymerase 2
Glyma.03G180900	-1.55	0.001	PIP2,PIP2;1,PIP2A plasma membrane intrinsic protein 2A
Glyma.01G204200	-1.46	0.010	ATOST1,OST1,P44,SNRK2-6,SNRK2.6,SRK2E Protein kinase superfamily protein

Glyma.13G361900	-1.45	0.000	ABCG40,ATABCG40,ATPDR12,PDR12 pleiotropic drug resistance 12
Glyma.18G027100	-1.44	0.001	ATPLC2,PLC2 phospholipase C 2
Glyma.01G153300	-1.42	0.045	CYP707A1 cytochrome P450, family 707, subfamily A, polypeptide 1
Glyma.12G084700	-1.42	0.000	HD2C,HDT3 histone deacetylase 2C
Glyma.09G157900	-1.38	0.000	ATCLC-C,CLC-C chloride channel C
Glyma.17G013800	-1.30	0.000	CPK21 calcium-dependent protein kinase 21
Glyma.13G319500	-1.28	0.000	HD2C,HDT3 histone deacetylase 2C
Glyma.11G038800	-1.28	0.000	ATOST1,OST1,P44,SNRK2-6,SNRK2.6,SRK2E Protein kinase superfamily protein
Glyma.14G098000	-1.25	0.003	ATGPA1,GP ALPHA 1,GPA1 G protein alpha subunit 1
Glyma.15G238400	-1.22	0.023	ANNAT4 annexin 4
Glyma.05G021100	-1.17	0.042	ATRBOH F,ATRBOHF,RBOH F,RBOHAP108,RBOHF respiratory burst oxidase protein F
Glyma.04G056600	-1.13	0.015	ATGPA1,GP ALPHA 1,GPA1 G protein alpha subunit 1
Glyma.02G017200	-1.12	0.002	APP,ATPARP1,PARP1,PP poly(ADP-ribose) polymerase
Glyma.12G181400	-1.11	0.000	HD2C,HDT3 histone deacetylase 2C
Glyma.18G118100	-1.05	0.000	SQE1,XF1 FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein
Glyma.08G018900	-1.05	0.025	ATRBOH F,ATRBOHF,RBOH F,RBOHAP108,RBOHF respiratory burst oxidase protein F
Glyma.02G128400	-1.01	0.046	DOR F-box and associated interaction domains-containing protein
Glyma.02G046600	1.12	0.000	AHK1,ATHK1,HK1 histidine kinase 1
Glyma.08G120800	1.12	0.048	ATTPS1,TPS1 trehalose-6-phosphate synthase
Glyma.03G006600	1.14	0.000	AtMYB60,MYB60 myb domain protein 60
Glyma.15G250100	1.27	0.045	ATNCED3,NCED3,SIS7,STO1 nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3
Glyma.03G168200	1.27	0.009	ABCG40,ATABCG40,ATPDR12,PDR12 pleiotropic drug resistance 12
Glyma.12G132100	1.36	0.014	ATSYP61,OSM1,SYP61 syntaxin of plants 61
Glyma.08G176300	1.49	0.016	ATNCED3,NCED3,SIS7,STO1 nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3
Glyma.09G203500	1.54	0.000	PCK1,PEPCK phosphoenolpyruvate carboxykinase 1
Glyma.01G222700	1.61	0.000	ATRBOH F,ATRBOHF,RBOH F,RBOHAP108,RBOHF respiratory burst oxidase protein F
Glyma.04G048500	2.10	0.000	SQE1,XF1 FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein
Glyma.14G090400	2.59	0.000	SQE1,XF1 FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein

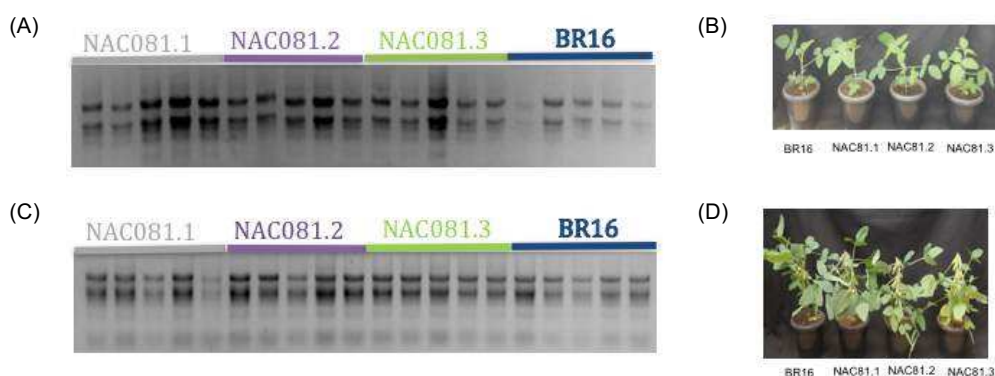
(A)



(B)



**Figura suplementar 1** – Confirmação das plantas transgênicas. (A) Diagnóstico molecular das linhas transgênicas homozigotas. PCR foi realizado no DNA total de mudas de plantas transgênicas utilizando os primers 35AMVF- CCACTATCCTTCGCAAGAC e NAC6R - TCTCTCTCTTCCTCTAGTGCTCG, que amplificam um fragmento de 708-bp de GmNAC081 (transgene) e não amplificam a sequência genômica (gene endógeno). (B) Plantas que foram realizadas as coletas para extração do DNA total.



**Figura suplementar 2** – Verificação da integridade do RNA total extraído das plantas de soja. (A) Verificação da integridade RNA total por eletroforese em gel de agarose desnaturante 1,2% (p/v) corado com brometo de etídeo 1µg/ml extraído das plantas de soja aos 20 DAG após o tratamento com 1 uma unidade DNase. (B) Plantas de soja aos 20 DAG. (C) Verificação da integridade RNA total por eletroforese em gel de agarose desnaturante 1,2% (p/v) corado com brometo de etídeo 1µg/ml extraído das plantas de soja aos 80 DAG após o tratamento com 1 uma unidade DNase. (D) Plantas de soja aos 80 DAG.

## 7. Referências Bibliográficas

- Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K. (1997). Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. **The Plant Cell** **9**: 1859–1868.
- Agüera E, Cabello P, de la Haba P. (2010). Induction of leaf senescence by low nitrogen nutrition in sunflower (*Helianthus annuus*) plants. **Physiol. Plant.** **138**: 256–267.
- 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. **J Biol Chem.** **286**: 20020–30.

- Andersson A, Keskitalo J, Sjödin A, Bhalerao R, Sterky F, Wissel K, *et al.* (2004) A transcriptional timetable of autumn senescence. **Genome Biol.** **5**: R24.
- Arora R. (2002). Cold acclimation in *Rhododendron*: A genetic and physiological study. In: P.H. Li and T. Palva (eds.), *Plant Cold Hardiness: Gene regulation and genetic engineering*. **Kluwer Academic/Plenum Publishers**, NY, pp 77-92. (Proceedings of the Sixth International Plant Cold Hardiness Symposium held in Helsinki, Finland).
- Ashraf M, Harris PJC. (2013). Photosynthesis under stressful environments: An overview. **Photosynthetica** **51**: 163–190.
- Avice JC, Etiene P. (2014). Leaf senescence and nitrogen remobilization efficiency in oilseed rape (*Brassica napus*L.). **J Exp Bot** **65**: 3813-3824.
- Baker NR. (2008). Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Annual review of plant biology** **59**: 89–113.
- Balazadeh S, Kwasniewski M, Caldana C, Mehrnia M, Zanol MI, Xue G-P, *et al.* (2011). ORS1, an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-responsive NAC transcription factor, controls senescence in *Arabidopsis thaliana*. **Mol. Plant** **4**: 346–360.
- Balazadeh S, Rianõ-Pachón DM, Mueller-Roeber B. (2008). Transcription factors regulating leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Biol.** **10**: 63–75.
- Balazadeh S, Siddiqui H, Allu AD, Matallana-Ramirez LP, Caldana C. (2010). A gene regulatory network controlled by the NAC transcription factor ANAC092/AtNAC2/ORE1 during salt-promoted senescence. **Plant J.** **62**: 250–264.
- Bieker S, Zentgraf U. (2013). Plant senescence and nitrogen mobilization and signaling. In: *Senescence and Senescence Related Disorders*, Z.W. Wang and H. Inuzuka, eds. (**Rijeka**, Croatia: Intech), p. 53.
- Bilger W, Schreiber U, Bock M. (1995). Determination of the quantum efficiency of photosystem II and non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. **Oecologia** **102**: 425-432.
- Blum A. (1996). Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. **Plant Growth Regul.** **20**:135–148.
- Blum A. (2009). Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress. **Field crops research** **112**: 119–123.
- Bray EA. (1993). Molecular responses to water deficit. **Plant Physiol.** **103**: 1035–1040.
- Breeze E, Harrison E, McHattie S, Hughes L, Hickman R, Hill C, *etal.* (2011). High-resolution temporal profiling of transcripts during *Arabidopsis* leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. **Plant Cell** **23**: 873–894.
- Buchanan CD, Lim S, Salzman RA, Kagiampakis I, Morishige DT, Weers BD, Klein RR, Pratt LH, Cordonnier-Pratt MM, Klein PE, Mullet JE. (2005). *Sorghum bicolor*'s transcriptome response to dehydration, high salinity and

ABA. **Plant Mol. Biol.** **58**: 699–720.

- Buchanan-Wollaston V, Earl S, Harrison E, Mathas E, Navabpour S, Page T, et al. (2003). The molecular analysis of leaf senescence – a genomics approach. **Plant Biotechnol. J.** **1**: 3–22.
- Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, Breeze E, Lim PO, Nam HG, et al. (2005). Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in Arabidopsis. **Plant J.** **42**: 567–585.
- Cakmak I, Horst JH (1991). Effects of aluminium on lipid peroxidation, superoxid dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiol. Plant.** **83**: 463–468.
- Cantu D, Pearce SP, Distelfeld A, Christiansen MW, Uauy C, Akhunov E, Fahima T, Dubcovsky J. (2011). Effect of the down-regulation of the high grain protein content (GPC) genes on the wheat transcriptome during monocarpic senescence. **BMC Genomics** **12**: 492.
- Carvalho HH, Brustolini OJB, Pimenta MR, Mendes GC, Gouveia BC, Silva PA, Silva JCF, Mota CS, Soares–Ramos JRL, Fontes EPB. (2014). The Molecular Chaperone Binding Protein BiP Prevents Leaf Dehydration–Induced Cellular Homeostasis Disruption. **Plos One** **9** doi: 10.1371/journal.pone.0086661.
- Cattivelli L, Rizza F, Badeck FW, Mazzucotelli E, Mastrangelo AN, Francia E, Marè C, Tondelli A, Stanca AM. (2008). Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. **Field Crops Res.** **105**: 1–14.
- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of botany** **103**: 551–560.
- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS. (2003). Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology** **30**: 239 – 264.
- Che P, Bussell JD, Zhou W, Estavillo GM, Pogson BJ, Smith SM. (2010). Signaling from the endoplasmic reticulum activates brassinosteroid signaling and promotes acclimation to stress in Arabidopsis. **Science Signalling** **3**: ra69.
- Chen S, Lin G, Huang J, Jenerette GD. (2009). Dependence of carbon sequestration on the differential responses of ecosystem photosynthesis and respiration to rain pulses in a semiarid steppe. **Global Change Biol.** **15**: 2450–2461.
- Chena Y, Wang Y, Huang J, Zhenga C, Caib C, Wangb Q, Wua C-A. (2017). Salt and methyl jasmonate aggravate growth inhibition and senescence in Arabidopsis seedlings via the JA signaling pathway. **Plant Science** **261**: 1–9.
- Collinge M, Boller T. (2001). Differential induction of two potato genes, *Stprx2* and *StNAC*, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to

- wounding. **Plant Mol. Biol.** **46**: 521–529.
- Costa MD, Reis PA, Valente MA, Irsigler AS, Carvalho CM, Loureiro ME, Aragao FJ, Boston RS, Fietto LG, Fontes EP. (2008). A new branch of endoplasmic reticulum stress signaling and the osmotic signal converge on plant-specific asparagine-rich proteins to promote cell death. **Journal of Biological Chemistry** **283**: 20209–20219.
- Creemers J. (2002). Proteolytic enzymes as therapeutic targets - Keystone Symposium. **IDrugs** **5**: 216-219.
- Deng Y, Humbert S, Liu JX, Srivastava R, Rothstein SJ, Howell SH. (2011). Heat induces the splicing by IRE1 of a mRNA encoding a transcription factor involved in the unfolded protein response in Arabidopsis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **108**:7247–52.
- Devoto A, Piffanelli P, Nilsson I, Wallin E, Panstruga R, von Heijne G, Schulze-Lefert P. (1999). Topology, subcellular localization, and sequence diversity of the Mlo family in plants. **J Biol Chem** **274**: 34993–35004.
- Diaz C, Lemaître T, Christ A, Azzopardi M, Kato Y, Sato F, Morot-Gaudry J-F, Le Dily F, Masclaux-Daubresse C. (2008). Nitrogen recycling and remobilization are differentially controlled by leaf senescence and development stage in Arabidopsis under low nitrogen nutrition. **Plant Physiol.** **147**:1437–1449.
- Diaz C, Purdy S, Christ A, Morot-Gaudry J-F, Wingler A, Masclaux-Daubresse C. (2005). Characterization of markers to determine the extent and variability of leaf senescence in Arabidopsis. A metabolic profiling approach. **Plant Physiol.** **138**: 898–2014). C1A cysteine protease-cystatin interactions in leaf senescence. **J Exp Bot** **65**:3825-3833.
- Diaz-Mendoza M, Arroyo-Velasco B, Gonzalez-Melendi P, Martinez M, Diaz I. (Bray EA. (2002). Classification of genes differentially expressed during water deficit stress in Arabidopsis thaliana: an analysis using micro array and differential expression data. **Ann Bot** **89**:803–11.
- Dogan E, Kirnak H, Copur O. (2007). Deficit irrigations during soybean reproductive stages and CROPGRO-soybean simulations under semi-arid climatic conditions. **Field Crops Res.** **103**: 154–159.
- Doyle J.J., Doyle J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of freshleaf tissue. **Phytochemical Bulletin** **19**: 11-15.
- Dunaevskii YE, Tsybina TA, Belyakova GA, Domash VI, Sharpio TP, Zabreiko AS, Belozerskii MA. (2005) Protease inhibitors as antistress proteins in higher plants. **Appl. Biochem. Microbiol.** **41**: 344–348.
- Duval M, Hsieh TF, Kim SY, Thomas TL. (2002) Molecular characterization of AtNAM: a member of the Arabidopsis NAC domain super family. **Plant Mol. Biol.** **50**: 237–248.
- Falcon S, Gentleman R. (2007). Using GOstats to test gene lists for GO term association. **Bioinformatics** **23**: 257-258.
- Fan S-C, Lin C-S, Hsu P-K, Lin S-H, Tsay Y-F. (2009). The Arabidopsis nitrate transporter NRT1. 7, expressed in phloem, is responsible for

- source-to-sink remobilization of nitrate. **Plant Cell** **21**:2750–2761.
- Fanata WID, Lee SY, Lee KO. (2013). The unfolded protein response in plants: A fundamental adaptive cellular response to internal and external stresses. **J Proteomics**. **93**: 356–68.
- 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**: 547–563.
- Faria JAQA, Reis PAB, Reis MTB, Rosado GL, Pinheiro GL, Mendes GC, et al. (2011). The NAC domain-containing protein, GmNAC6, is a downstream component of the ER stress- and osmotic stress-induced NRP-mediated cell-death signaling pathway. **BMC Plant Biol.** **11**:129.
- Farias JRB, Nepomuceno AL, Neumaier N. (2007). Ecofisiologia da Soja. 9 p. (**EMBRAPA Soja**. Circular Técnica, 48).
- Fischer RA, Wood JT. (1979). Drought resistance in spring wheat cultivars. III. Yield associations with morpho-physiological traits. **Aust. J. Agric. Res.** **30**:1001–1020.
- Flexas J, Medrano H. (2002). Drought-inhibition of Photosynthesis in C3 Plants: Stomatal and Non-stomatal Limitations Revisited. **Annals of botany** **89**: 183–189.
- Fujita M, Fujita Y, Maruyama K, Seki M, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, et al. (2004) A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. **Plant J.** **39**: 863–876.
- Gan S, Amasino RM. (1997). Making sense of senescence (molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence). **Plant Physiol.** **113**: 313–319.
- Gao H, Brandizzi F, Benning C, Larkin RM. (2008). A membrane-tethered transcription factor defines a branch of the heat stress response in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA** **105**: 16398–16403.
- Genty B, Briantais J-M, Baker NR. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects** **990**: 87–92.
- Goodstein DM, Shu S, Howson R, Neupane R, Hayes RD, Fazo J, Mitros T, Dirks W, Hellsten U, Putnam N, Rokhsar DS. (2012). Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. **Nucleic Acids Research** **40**: D1178-D1186.
- Gregersen PL, Culetic A, Fau-Boschian L, Boschian L, Fau-Krupinska K, Krupinska K (2013) Plant senescence and crop productivity. *Plant Mol Biol TA* - **Plant Mol Biol** **82**:603–622.
- Gregersen PL, Holm PB and Krupinska K. (2008). Leaf senescence and nutrient remobilization in barley and wheat. **Plant Biol** **10**:37-49.
- Gregersen PL, Holm PB. (2007) Transcriptome analysis of senescence in the

- flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Biotechnol. J.** **5**: 192–206.
- Grisi FA, Alves JD, Castro EM, Oliveira C, Biagiotti G, Melo L. (2008). Leaf anatomical evaluations in 'Catuai' and 'Siriema' coffee seedlings submitted to water stress. *Ciência e Agrotecnologia* 32: 1730-1736.
- Guo Y, Cai Z, Gan S. (2004) Transcriptome of Arabidopsis leaf senescence. **Plant Cell Environ.** **27**: 521–549.
- Guo Y, Gan S. (2005). Leaf senescence: Signals, execution, and regulation. **Current Top Dev Biol** **71**: 83-112.
- Guo Y, Gan S. (2006). AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. **Plant J.** **46**: 601–612.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 51: 463–499.
- Hayashi S, Wakasa Y, Takahashi H, Kawakatsu T., Takaiwa F. (2011). Signal transduction by IRE1-mediated splicing of bZIP50 and other stress sensors in the endoplasmic reticulum stress response of rice. **Plant J.** **69**: 946 – 956.
- Hazen SP, Pathan MS, Sanchez A, Baxter I, Dunn M, Estes B, Chang HS, Zhu T, Krepis JA, Nguyen HT. (2005). Expression profiling of rice segregating for drought tolerance QTLs using a rice genome array. **Funct. Integr. Genomics** **5**: 104–116.
- Heath RL, Packer L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Arch Biochem Biophys** **125**: 189-198.
- Hegedus D, Yu M, Baldwin D, Gruber M, Sharpe A, Parkin I, et al. (2003). Molecular characterization of *Brassica napus* NAC domain transcriptional activators induced in response to biotic and abiotic stress. **Plant Mol. Biol.** **53**: 383–397.
- Hendrickson L, Furbank RT, Chow WS. (2004). A simple alternative approach to assessing the fate of absorbed light energy using chlorophyll fluorescence. **Photosynthesis research** **82**: 73–81.
- Henriquez-Valencia C, Moreno AA, Sandoval-Ibañez O, Mitina I, Blanco-Herrera F, Cifuentes-Esquivel N, et al. (2015). bZIP17 and bZIP60 regulate the expression of BiP3 and other salt stress responsive genes in an UPR- independent manner in Arabidopsis thaliana. **J Cell Biochem.** **116**: 1638–1645.
- Himelblau E, Amasino, RM. (2001). Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. **J. Plant Physiol.** **158**:1317–1323.
- Hirakuri MH. (2014). Impactos econômicos de estresses bióticos e abióticos na produção de soja. 8p. (**Embrapa Soja**. Circular Técnica, 105).
- Hirschburger D, Müller M, Voegelé RT, Link T. (2015). Reference Genes in the Pathosystem *Phakopsora pachyrhizi*/ Soybean Suitable for Normalization in Transcript Profiling. **Int. J. Mol. Sci.** **16**: 23057-23075.

- Hollung K, Espelund M, Schou K, Jakobsen KS. (1997). Developmental, stress and ABA modulation of mRNA levels for bZIP transcription factors and Vp1 in barley embryos and embryo- derived suspension cultures. **Plant Mol Biol** **35**: 561–571.
- Hörtensteiner S, Feller U. (2002). Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. **J. Exp. Bot.** **53**:927–937.
- Hu R, Fan C, Li H, Zhang Q, Fu YF. (2009). Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. **BMC Mol. Biol.** **10**: 93.
- Ingram J, Bartels D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** **47**: 377–403.
- Irsigler AST, Costa MDL, Zhang P, Reis PAB, Dewey RE, Boston RS, Fontes EPB. (2007). Expression profiling on soybean leaves reveals integration of ER- and osmotic-stress pathways. **BMC Genomics** **8**: 431.
- Iwata Y, Koizumi N. (2012). Plant transducers of the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Trends Plant Sci.** **17**:720–27.
- Izanloo A, Condon AG, Langridge P, Tester M, Schnurbusch T. (2008). Different mechanisms of adaptation to cyclic water stress in two South Australian bread wheat cultivars. **J Exp Bot.** **59**:3327-46.
- Jaleel CA, Gopi R, Manivannan P, Kishorekumar A, Sankar B, Panneerselvam R. (2006). Paclobutrazol influences vegetative growth and floral characteristics of *Catharanthus roseus* (L.) G. **Don, Indian J. Appl. Pure Biol.** **21**: 369–372.
- Jensen MK, Kjaersgaard T, Nielsen MM, Galberg P, Petersen K, O’Shea C, et al. (2010) The Arabidopsis thaliana NAC transcription factor family: structure–function relationships and determinants of ANAC019 stress signalling. **Biochem. J.** **426**: 183–196.
- Jeong RD, Chandra-Shekara AC, Kachroo A, Klessig DF, Kachroo P. (2008). HRT- mediated hypersensitive response and resistance to Turnip crinkle virus in Arabidopsis does not require the function of TIP, the pre-sumed guard protein. **Mol. Plant Microbe Interact.** **21**: 1316–1324.
- Joshi NA, Fass JN. (2011). Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33) [Software]. Available at <https://github.com/najoshi/sickle>.
- Kamauchi S, Nakatani H, Nakano C, Urade R. (2005). Gene expression in response to endoplasmic reticulum stress in *Arabidopsis thaliana*. **FEBS J.** **272**: 3461–76
- Kang J, Hwang JU, Lee M, Kim YY, Assmann SM, Martinoia E, et al. (2010). PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. **Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **107**: 2355–2360.
- Karamanos AJ, Papatheohari AY. (1999). Assessment of drought resistance of crop genotypes by means of the water potential index. **Crop Sci.** **39**: 1792–1797.
- Kawaura K, Mochida K, Ogihara Y. (2008). Genome-wide analysis for

- identification of salt-responsive genes in common wheat. **Functional & Integrative Genomics**, **8**:277-286.
- Kim GD, Cho YH, Yoo SD. (2017). Regulatory Functions of Cellular Energy Sensor SNF1-Related Kinase1 for Leaf Senescence Delay through ETHYLENE- INSENSITIVE3 Repression. **Sci Rep**. **7**: 3193.
- Kim HJ, Hong SH, Kim YW, Lee IH, Jun JH, Phee BK, et al. (2014). Gene regulatory cascade of senescence-associated NAC transcription factors activated by ETHYLENE-INSENSITIVE2-mediated leaf senescence signalling in Arabidopsis. **J. Exp. Bot.** **65**: 4023–4036.
- Kim HJ, Nam HG, Lim PO. (2016). Regulatory network of NAC transcription factors in leaf senescence. **Current opinion in plant biology** **33**: 48 - 56.
- Kim JH, Woo HR, Kim J, Lim PO, Lee IC, Choi SH, et al. (2009). Trifurcate feed-forward regulation of age-dependent cell death involving miR164 in Arabidopsis. **Science** **323**: 1053–1057.
- Kim SY, Kim SG, Kim YS, Seo PJ, Bae M, Yoon HK, et al. (2007) Exploring membrane-associated NAC transcription factors in Arabidopsis: implications for membrane biology in genome regulation. **Nucleic Acids Res.** **35**: 203–213.
- Kim YS, Sakuraba Y, Han SH, Yoo SC, Paek NC. (2013). Mutation of the Arabidopsis NAC016 transcription factor delays leaf senescence. **Plant Cell Physiol** **54**: 1660–1672.
- Kirst ME, Meyer DJ, Gibbon BC, Jung R, Boston RS. (2005). Identification and characterization of endoplasmic reticulum-associated degradation proteins differentially affected by endoplasmic reticulum stress. **Plant Physiol.** **138**: 218–231.
- Koizumi N, Martinez IM, Kimata Y, Kohno K, Sano H, Chrispeels MJ. (2001). Molecular characterization of two Arabidopsis Ire1 homologs, endoplasmic reticulum-located transmembrane protein kinases. **Plant. Physiol.** **127**: 949 – 962.
- Kollipara KP, Saab IN, Wych RD, Lauer MJ, Singletary GW. (2002). Expression profiling of reciprocal maize hybrids divergent for cold germination and desiccation tolerance. **Plant Physiol.** **129**: 974–992.
- Krupinska K, Mulisch M, Hollmann J, Tokarz K, Zschiesche W, Kage H, Humbeck K, Biler W. (2012). An alternative strategy of dismantling of the chloroplast during leaf senescence observed in a high-yield variety of barley. **Physiol Plant** **144**: 189-200.
- Langmead B, Salzberg S. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods** **9**:357-359.
- Le DT, Nishiyama R, Watanabe Y, Mochida K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, et al. (2011). Genome-wide survey and expression analysis of the plant-specific NAC transcription factor family in soybean during development and dehydration stress. **DNA Res.** **18**: 263–276.
- Lee DT, Nishiyama R, Watanabe Y, Mochida K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LS. (2011). Genome-wide survey and expression analysis of the plant-specific NAC transcription factor family in soybean

- during development and dehydration stress. **DNA Res.** **18**: 263–276.
- Lee S, Lee HJ, Huh SU, Paek KH, Ha JH, Park CM. (2014). The Arabidopsis NAC transcription factor NTL4 participates in a positive feedback loop that induces programmed cell death under heat stress conditions. **Plant Sci.** **227**: 76–83.
- Lee S, Seo PJ, Lee HJ, Park CM. (2012) A NAC transcription factor NTL4 promotes reactive oxygen species production during drought- induced leaf senescence in Arabidopsis. **Plant J.** **70**: 831–44.
- Li Y, Humbert S, Howell SH. (2012). ZmbZIP60 mRNA is spliced in maize in response to ER stress. **BMC Res. Notes** **5**:144.
- Li Z, Peng J, Wen X, Guo H. (2012). Gene network analysis and functional studies of senescence-associated genes reveal novel regulators of Arabidopsis leaf Senescence. **J. Integr. Plant Biol.** **54**: 526–539.
- Li Z, Peng J, Wen X, Guo H. (2013) Ethylene-insensitive3 is a senescence-associated gene that accelerates age-dependent leaf senescence by directly repressing miR164 transcription in Arabidopsis. **Plant Cell** **25**: 3311–3328.
- Lia J, Bradera G, Palvaa ET. (2008). Kunitz Trypsin Inhibitor: An Antagonist of Cell Death Triggered by Phytopathogens and Fumonisin B1 in Arabidopsis. **Molecular Plant** **1**: 482–495.
- Liao Y, Smyth GK, Shi W. (2013). The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. **Nucleic Acids Research** **41**: e108.
- Lim PO, Kim HJ, Nam HG. (2007) Leaf senescence. **Annu. Rev. Plant Biol.** **58**: 115–136.
- Lin JF, Wu SH. (2004) Molecular events in senescing Arabidopsis leaves. **Plant J.** **39**: 612–628.
- Lin R, Zhaom W, Mengm X, Wang M, Peng Y. (2007). Rice gene OsNAC19 encodes a novel NAC-domain transcription factor and responds to infection by *Magnaporthe grisea*. **Plant Sci.** **172**: 120–130.
- Liu L, Cui F, Li Q, Yin B, Zhang H, Lin B, Wu Y, Xia R, Tang S, Xie Q. (2011). The endoplasmic reticulum-associated degradation is necessary for plant salt tolerance. **Cell Res.** **21**: 957–969.
- Liu Y, Li J. (2014). Endoplasmic reticulum-mediated protein quality control in Arabidopsis. **Frontiers in Plant Science** **5**: 162.
- Loukas A. (2002). Proteolytic Enzymes as Therapeutic Targets - Keystone Symposium. **IDrugs** **5**: 220-221.
- Luo, Weijun, Brouwer and Cory (2013). Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. *Bioinformatics*, 29(14), pp. 1830-1831.
- Martinez DE, Costa ML, Gomez FM, Otegui MS, Guiamet JJ. (2008). Senescence-associated vacuoles are involved in the degradation of chloroplasts proteins in tobacco leaves. **Plant J** **56**:196-206.

- Martinez IM, Chrispeels MJ. (2003). Genomic analysis of the unfolded protein response in Arabidopsis shows its connection to important cellular processes. **Plant Cell** **15**: 561–576.
- Mendes GC, Reis PAB, Calil IP, Carvalho HH, Aragão FJL, Fontes EPB. (2013). GmNAC 30 and GmNAC081 integrate the endoplasmic reticulum stress-and osmotic stress-induced cell death responses through a vacuolar processing enzyme. **PNAS** **110**: 19627–19632.
- Meng S, Peng JS, He YN, Zhang GB, Yi HY, Fu YL, Gong JM. (2015). Arabidopsis NRT1.5 mediates the suppression of nitrate starvation-induced leaf senescence by modulating foliar potassium level. **Mol Plant** **9**:461-70.
- Mysore KS, Crasta OR, Tuori RP, Folkerts O, Swirsky PB, Martin GB. (2002). Comprehensive transcript profiling of Ptoand Prf mediated host defense responses to infection by *Pseudomonas syringae* pv. tomato. **Plant J.** **32**: 299–315.
- Nagashima Y, Mishiba K, Suzuki E, Shimada Y, Iwata Y, Koizumi N. (2011). Arabidopsis IRE1 catalyses unconventional splicing of bZIP60 mRNA to produce the active transcription factor. **Sci. Rep.** **1**:29.
- Nakagawa H, Ohmiya K, Hattori T. (1996). A rice bZIP protein, designated OSBZS, is rapidly induced by abscisic acid. **Plant J** **9**: 217-227
- Nakashima K, Takasaki H, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2012). NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. **Biochim. Biophys. Acta** **1819**: 97–103.
- Nakashima K, Tran LP, Nguyen DV, Fujita M, Maruyama K, Todaka D, et al. (2007) Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress responsive gene expression in rice. **Plant J.** **51**: 617–630.
- Nuruzzaman M, Manimekalai R, Sharoni AM, Satoh K, Kondoh H, Ooka H, et al. (2010) Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice. **Gene** **465**: 30–44.
- Oh SK, Lee S, Yu SH, Choi D. (2005) Expression of a novel NAC domain-containing transcription factor (CaNAC1) is preferentially associated with incompatible interactions between chili pepper and pathogens. **Planta** **222**: 876–887.
- Oikawa D, Tokuda M, Hosoda A, Iwawaki T. (2010). Identification of a consensus element recognized and cleaved by IRE1 $\alpha$ . **Nucleic Acids Res.** **38**: 6265–73.
- Olsen AN, Ernst HA, Leggio LL, Skriver K. (2005). NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. **Trends Plant Sci.** **10**: 79–87.
- Ooka H, Satoh K, Doi K, Nagata T, Otomo Y, Murakami K, et al. (2003). Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. **DNA Res.** **10**: 239–247.
- Oxborough K, Baker NR. (1997). An instrument capable of imaging chlorophyll a fluorescence from intact leaves at very low irradiance and at

- cellular and subcellular levels of organization. **Plant, cell & environment** **20**: 1473–1483.
- Piffanelli P, Zhou F, Casais C, Orme J, Jarosch B, Schaffrath U, Collins NC, Panstruga R, Schulze-Lefert P. (2002). The Barley MLO Modulator of Defense and Cell Death Is Responsive to Biotic and Abiotic Stress Stimuli. **Plant Physiology** **129**: 1076–1085.
- Pimenta MR, Silva PA, Mendes GC, Alves JR, Caetano HD, Machado JP, Brustolini OJ, Carpinetti PA, Melo BP, Silva JC, Rosado GL, Ferreira MF, Dal-Bianco M, Picoli EA, Aragão FJ, Ramos HJ, Fontes EPB. (2016). The Stress-Induced Soybean NAC Transcription Factor GmNAC081 Plays a Positive Role in Developmentally Programmed Leaf Senescence. **Plant and Cell physiology** **57**: 1098–1114.
- Pinheiro GL, Marques CS, Costa MD, Reis PA, Alve, MS, Carvalho CM, Fietto LG, Fontes EP. (2009). Complete inventory of soybean NAC transcription factors: sequence conservation and expression analysis uncover their distinct roles in stress response. **Gene** **444**: 10–23.
- Quirino BF, Noh Y-S, Himelblau E, Amasino RM. (2000). Molecular aspects of leaf senescence. **Trends Plant Sci** **5**: 278-282.
- Rauf M, Arif M, Dortay H, Matallana-Ramírez LP, Waters MT, Nam HG, Lim PO, Mueller-Roeber B, Balazadeh S. (2013). ORE1 balances leaf senescence against maintenance by antagonizing G2-like-mediated transcription. **EMBO Rep** **14**: 382–388.
- Reddy AR, Chaitanya KV, Vivekanandan M. (2004). Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of plant physiology** **161**: 1189–1202.
- Reddy AR, Chaitanya KV, Vivekanandan M. (2004). Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **J. Plant Physiol.** **161**: 1189–1202.
- Reis PAB, Fontes EPB. (2012). N-rich protein (NRP)-mediated cell death signaling: a new branch of the ER stress response with implications for plant biotechnology. **Plant Signal Behav.** **7**: 628–632.
- Reis PAB, Rosado GL, Silva LA, Oliveira LC, Oliveira LB, Costa MD, et al. (2011). The binding protein BiP attenuates stress induced cell death in soybean via modulation of the N-rich protein-mediated signaling pathway. **Plant Physiol.** **157**: 1853–1865.
- 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.
- Ron D, Walter P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nat Rev Mol Cell Biol.** **8**:519–29.
- Schaller A. (2004). A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. **Planta** **220**: 183-197.
- Schröder M. (2008). Endoplasmic reticulum stress responses. **Cell Mol Life Sci.** **65**: 862–94.

- Schulte auf'm Erley G, Begum N, Worku M, Banziger M, Horst WJ. (2007). Leaf senescence induced by nitrogen deficiency as indicator of genotypic differences in nitrogen efficiency in tropical maize. **J. Plant Nutr. Soil Sci.** (1999) **170**:106–114.
- Schulze ED. (1986). Carbon dioxide and water vapor exchange in response to drought in the atmosphere and the soil. **Annu Rev Plant Physiol.** **37**:247–274.
- Seki M, Kamei A, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. (2003). Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. **Curr Opin Biotechnol** **14**:194-199.
- Selth LA, Dogra SC, Rasheed MS, Healy H, Randles JW, Rezaian MA. (2005). A NAC domain protein interacts with Tomato leaf curl virus replication accessory protein and enhances viral replication. **Plant Cell** **17**: 311–325.
- Seo PJ, Kim MJ, Park JY, Kim SY, Jeon J, Lee YH, et al. (2010). Cold activation of a plasma membrane-tethered NAC transcription factor induces a pathogen resistance response in Arabidopsis. **Plant J.** **61**: 661–671.
- Serraj R, Sinclair TR. (2002). Osmolyte accumulation: Can it really help increase crop yield under drought conditions?. **Plant Cell Environ.** **25**:333 341.
- Shao HB, Chu LY, Jaleel CA, Zhao CX. (2008). Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. **Comptes Rendus Biologies** **331**: 215–225.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (1997). Gene expression and signal transduction in water-stress response. **Plant Physiology** **115**: 327–334.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (1999). Molecular responses to drought stress. In *Molecular Responses to Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants*, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki, eds (Austin, TX: **R.G. Landes Company**), pp. 11–28.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signalling pathways. **Curr Opin Plant Biol** **3**: 217–223.
- Sparkes IA, Frigerio L, Tolley N, Hawes C. (2009). The plant endoplasmic reticulum: a cell-wide web. **Biochem. J.** **423**: 145–155.
- Sperotto RA, Ricachenevsky FK, Duarte GL, Boff T, Lopes KL, Sperb ER, et al. (2009). Identification of up-regulated genes in flag leaves during rice grain filling and characterization of OsNAC5, a new ABA-dependent transcription factor. **Planta** **230**: 985–1002.
- Srivastava R, Deng Y, Shah S, Rao AG, Howell SH. (2013). BINDING PROTEIN is a master regulator of the endoplasmic reticulum stress sensor/transducer bZIP28 in Arabidopsis. **Plant Cell** **25**: 1416–1429.
- Sun L, Yang ZT, Song ZT, Wang MJ, Sun L, Lu SJ, et al. (2013). The plant-specific transcription factor gene NAC103 is induced by bZIP60 through a new cis-regulatory element to modulate the unfolded protein response in Arabidopsis. **Plant J.** **76**: 274–86.

- Sun L, Zhang SS, Lu SJ, Liu JX. (2015). Site-1 protease cleavage site is important for the ER stress-induced activation of membrane-associated transcription factor bZIP28 in Arabidopsis. **Science China–Life Sciences** **58**: 270–275.
- Svenja Alter S, Kai C. Bader KC, Manuel Spannagl M, Yu Wang Y, Eva Bauer E, Chris-Carolin Schön C-C, Klaus F.X. Mayer KFX. (2014). DroughtDB: An expert-curated compilation of plant drought stress genes and their homologs in nine species. **Database** (Oxford) 2015:bav046.
- Tran L-S, Quach TN, Guttikonda SK, Aldrich DL, Kumar R, Neelakandan A, et al. (2009). Molecular characterization of stress-inducible GmNAC genes in soybean. **Mol. Genet. Genomics** **281**: 647–664.
- Tuberosa R., Salvi S. (2006). Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. **Trends Plant Sci.** **11**: 405–412.
- Turner JG, Ellis C, Devoto A. (2002). The jasmonate signal pathway. *Plant Cell.* **14**: 153–164.
- Uauy C, Distelfeld A, Fahima T, Blechl A, Dubcovsky J. (2006). A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in Wheat. **Science** **314**: 1298–1301.
- Umezawa T, Fujita M, Fujita Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. (2006). Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes unlock the future. **Current Opinion in Biotechnology** **17**: 113–122.
- Veyres N, Danon A, Aono M, Galliot S, Karibasappa YB, Diet A, et al. (2008). The Arabidopsis sweetie mutant is affected in carbohydrate metabolism and defective in the control of growth, development and senescence. **Plant J.** **55**: 665–686.
- Walter P, Ron D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. **Science**, **334**:1081–6.
- Wang J, Shi ZY, Wan XS, Shen GZ, Zhang JL. (2008). The expression pattern of a rice proteinase inhibitor gene OsPI8-1 implies its role in plant development. **J. Plant Physiol.** **165**: 1519-1529.
- Wang X, Basnayake BM, Zhang H, Li G, Li W, Virk N, et al. (2009a). The Arabidopsis ATAF1, a NAC transcription factor, is a negative regulator of defense responses against necrotrophic fungal and bacterial pathogens. **Mol. Plant Microbe Interact.** **22**: 1227–1238.
- Wang X, Goregaoker SP, Culver JN. (2009b). Interaction of the Tobacco mosaic virus replicase protein with a NAC domain transcription factor is associated with the suppression of systemic host defenses. **J. Virol.** **83**: 9720–9730.
- Waters B.M, Uauy C, Dubcovsky J, Grusak MA. (2009). Wheat (*Triticum aestivum*) NAM proteins regulate the translocation of iron, zinc, and nitrogen compounds from vegetative tissues to grain. **J. Exp. Bot.** **60**: 4263–4274.
- Weatherley PE. (1950). Studies in the water relations of the cotton plant. I. The field measurement of water deficits in leaves. **New Phytologist** **49**., 81-97.

- Wellburn AR. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various so lvents with spectrometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology** **144**:307–313.
- Wu A, Allu AD, Garapati P, Siddiqui H, Dortay H, Zanor MI, et al. (2012). JUNGBRUNNEN1, a reactive oxygen species-responsive NAC transcription factor, regulates longevity in Arabidopsis. **Plant Cell** **24**: 482–506.
- Xia N, Zhang G, Liu XY, Deng L, Cai GL, Zhang Y, et al. (2010a). Characterization of a novel wheat NAC transcription factor gene involved in defense response against stripe rust pathogen infection and abiotic stresses. **Mol. Biol. Rep.** **37**: 3703–3712.
- Xia N, Zhang G, Sun YF, Zhua L, Xub LS, Chen XM, et al. (2010b). TaNAC8, a novel NAC transcription factor gene in wheat, responds to stripe rust pathogen infection and abiotic stresses. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** **74**: 394–402.
- Xie Q, Frugis G, Colgan D, Chua NH. (2000) Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. **Genes Dev.** **14**: 3024–3036.
- Xu Z., Zhou G., Shimizu H. (2010). Plant responses to drought and rewatering. **Plant Signal. Behav.** **5**: 649–654.
- Xu ZZ, Zhou GS, Shimizu H. (2009). Are plant growth and photosynthesis limited by pre-drought following rewatering in grass? **J Exp Bot.** **60**:3737–3749.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. (2005). Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. **Trends in Plant Science** **10**: 88–94.
- Yang S-D, Seo PJ, Yoon H-K, Park C-M. (2011). The Arabidopsis NAC transcription factor VNI2 integrates abscisic acid signals into leaf senescence via the COR/RD genes. **Plant Cell** **23**: 2155–2168.
- Yang YG, Lv WT, Li MJ, Wang B, Sun DM, Deng X. (2013). Maize membrane-bound transcription factor zmbZIP17 is a key regulator in the cross-talk of ER quality control and ABA signaling. **Plant Cell Physiol.** **54**:2020–33.
- Yang ZT, Lu SJ, Wang MJ, Bi DL, Sun L, Zhou SF, et al. (2014a). A plasma membrane-tethered transcription factor, NAC062/ANAC062/NTL6, mediates the unfolded protein response in Arabidopsis. **Plant J.** **79**: 1033–43.
- Yang ZT, Wang MJ, Sun L, Lu SJ, Bi DL, Sun L, Song ZT, Zhang SS, Zhou SF, Liu JX. (2014b). The membrane-associated transcription factor NAC089 controls ER-stress-induced programmed cell death in plants. **PLoS Genetics** **10**: e1004243.
- Yoshida S. (2003). Molecular regulation of leaf senescence. **Current Opin Plant Biol** **6**:79-84.
- Zeller G, Henz SH, Widmer CK, Sachsenberg T, Rátsch G, Weigel D, et al.

- (2009). Stress-induced changes in the *Arabidopsis thaliana* transcriptome analyzed using whole-genome tiling arrays. **Plant J.** **58**: 1068–1082.
- Zhang K, Gan SS. (2012). An abscisic acid–AtNAP transcription factor–SAG113 protein phosphatase 2C regulatory chain for controlling dehydration in senescing *Arabidopsis* leaves. **Plant Physiol.** **158**: 961–969.
- Zhang K, Xia X, Zhang Y, Gan S-S. (2012). An ABA-regulated and Golgi-localized protein phosphatase controls water loss during leaf senescence in *Arabidopsis*. **Plant J.** **69**: 667–678.
- Zhang WY, Xu YC, Li WL, Yang L, Yue X, Zhang XS, Zhao XY. (2014). Transcriptional analyses of natural leaf senescence in maize. **PLoS ONE** **9**: e115617.
- Zhang X, Zhang L, Dong F, Gao J, Galbraith DW, Song CP. (2001). Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. **Plant Physiology** **126**: 1438-1448.
- Zhu JK. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annu Rev Plant Biol** **53**: 247–73.