

MARIA ANETE SANTANA VALENTE

**A PROTEÍNA BiP EXERCE FUNÇÃO PROTETORA CONTRA O DÉFICIT
HÍDRICO EM PLANTAS DE SOJA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS- BRASIL

2008

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

T

V154p
2008

Valente, Maria Anete Santana, 1974-

A proteína BiP exerce função protetora contra o déficit hídrico em plantas de soja / Maria Anete Santana Valente.

– Viçosa, MG, 2008.

xiii, 108f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Estresse hídrico. 2. Proteínas de ligação.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 572.8

AGRADECIMENTOS

MARIA ANETE SANTANA VALENTE

A Professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes, pela orientação e discussão dos resultados, pelo apoio e estímulo constantes durante a realização deste trabalho e pelos ensinamentos fundamentais na formação de um pesquisador,
A PROTEÍNA BiP EXERCE FUNÇÃO PROTETORA CONTRA O DÉFICIT HÍDRICO EM PLANTAS DE SOJA

Ao Professor Maurílio Alves Moreira, pela confiança e pela atenção, e pelo apoio no desenvolvimento do trabalho.

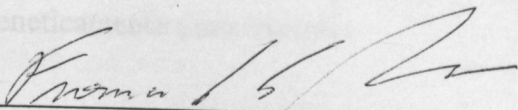
Ao Professor Luciano Fietto, pela disponibilidade para a apresentação da tese e pela contribuição às análises de resultados.

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

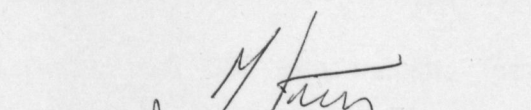
Ao Professor Marcelo Ehlers Loureiro, pela atenção, pelas sugestões e pela colaboração.

APROVADA: 23 de julho de 2008.

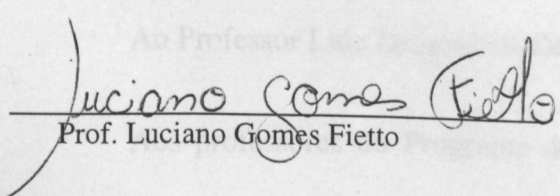
Ao Dr. Francisco José Lima Aragão, pela parceria e contribuição, fornecendo o material genético para a realização do trabalho.

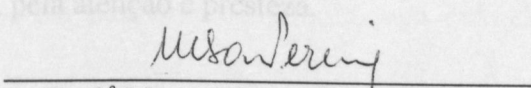

Dr. Francisco José Lima Aragão

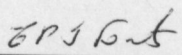
(Co-orientador)


Prof. Marcelo Ehlers Loureiro

(Co-orientador)


Prof. Luciano Gomes Fietto


Prof.ª Maria Cristina Baracat Pereira


Prof.ª Elizabeth Pacheco Batista Fontes

(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

À Professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes, pela orientação e discussão dos resultados, pelo apoio e estímulo constantes durante a realização deste trabalho e pelos ensinamentos fundamentais na formação de um pesquisador.

Ao Professor Maurílio Alves Moreira, pela confiança e pela atenção, e pelo apoio no desenvolvimento do trabalho.

Ao Professor Luciano Fietto, pela disponibilidade, pela presteza e pela contribuição na análise de resultados.

Ao Professor Marcelo Ehlers Loureiro, pela atenção, pelas sugestões e pela colaboração na análise dos dados.

Ao Dr. Franciso Aragão, pela parceria e contribuição, fornecendo o material geneticamente transformado.

À Professora Maria Cristina Baracat Pereira, pelos ensinamentos e pela disponibilidade.

Ao Professor Luiz Orlando de Oliveira, pela atenção e presteza.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, de modo especial aos professores Maria Gorete de Almeida Oliveira, Sebastião Tavares e Valéria Monteze Guimarães, pelos ensinamentos e apoio.

Ao professor Marco Oliva, pelas sugestões na condução do experimento e pelo apoio.

De modo especial, ao Newton Piovesan, pela disponibilidade constante, colaborando na realização deste trabalho e na análise dos dados.

A Alan, Rogério, Alessandro, Werner, Mariana e Elaine, pela presteza e contribuições para a execução dos experimentos.

Ao Eduardo Monteiro, pela competência e gentileza.

Aos funcionários do BIOAGRO e da casa de vegetação, em especial à Marlene e ao José Carlos, pela importante contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos companheiros da equipe BiP Pedro, Sônia, Maximiller, Guilherme e Túlio, por terem participado, direta ou indiretamente, desta pesquisa, e, de modo especial, à Jerusa, pela contribuição e atuação efetiva no desenvolvimento desta tese.

A todos do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas Anésia, Caroline, Claudine, Daniela, Eliciane, Juliana, Lílian, Lucas, João Paulo e Renata, por terem estado presentes e contribuído, de algum modo, para que este trabalho fosse concretizado, bem como aos colegas do Laboratório de Proteômica, pelo agradável convívio.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, pela amizade e pelo companheirismo.

À minha família, pelo amor, incentivo e apoio constantes; de modo especial aos meus pais, José Geraldo e Lúcia, tão importantes em todos os momentos da minha vida; e aos meus queridos irmãos Sidney e Amélia e aos meus cunhados, Cristina e Ueverton, pela confiança, força e torcida constantes.

Ao Rogério, pelo incentivo e apoio incondicional, por todo o carinho e compreensão.

Aos meus amigos, por estarem sempre torcendo e me enviando mensagens positivas e pela amizade.

A Deus, por sua imensa bondade.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, pela oportunidade de realização do Curso. Ao CNPq, pelo apoio financeiro, o que me possibilitou desenvolver este trabalho.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho... Muito obrigada!

BIOGRAFIA

MARIA ANETE SANTANA VALENTE, filha de José Geraldo Lisboa Valente e Lúcia Janote Santana Valente, nasceu em Porto Firme, Minas Gerais.

Diplomou-se Nutricionista pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa-MG, em outubro de 1998. Iniciou sua carreira profissional em janeiro de 1999, como Nutricionista da EMBRASA S.A. Alimentação e Serviços, permanecendo até janeiro de 2002, quando foi contratada pela SODEXHO do Brasil Com. Ltda., permanecendo nessa empresa até maio de 2002.

Em junho de 2002 foi admitida na empresa Nutri Care Ltda./Novartis Consumer Ltda., permanecendo até agosto de 2002. Em setembro de 2002, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Bioquímica Agrícola, pela UFV, concluindo-o em 30 de julho de 2004.

Em agosto de 2004 iniciou o Doutorado no programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola pela mesma Universidade, foi professora substituta do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa (UFV) de outubro de 2006 a abril de 2007, submetendo-se à defesa de tese de doutorado em 23 de julho de 2008.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. <i>Binding Protein</i> (BiP)	4
2.2. Estresse no Retículo Endoplasmático: ativação da via UPR	7
2.3. Estresse Hídrico	13
CAPÍTULO I	
OBTENÇÃO E ANÁLISE MOLECULAR DE PLANTAS DE SOJA TRANSFORMADAS COM O GENE <i>BiP</i>	18
1. RESUMO	19
2. INTRODUÇÃO	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Obtenção das linhagens transgênicas de soja	22
3.1.1. Construção do vetor e transformação da soja	22
3.1.2. <i>Screening</i> das plantas transgênicas por PCR	23
3.2. Material vegetal	23
3.3. Extração e quantificação de proteínas	24
3.4. SDS-PAGE e <i>Imunoblotting</i>	24
3.5. Extração de RNA e síntese de cDNA	25
3.6. RT-PCR em Tempo Real (qRT-PCR)	26
3.7. Isolamento de fração microssomal	27

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1. Obtenção de linhagens transgênicas de soja	28
4.2. Plantas transgênicas de soja superexpressando BiP	30
4.3. Análise molecular da soja transgênica	33
4.4. BiP acumula-se no retículo endoplasmático	35
4.5. Seleção de plantas transformadas da geração T4 e T5	38
4.6. Obtenção de plantas transgênicas em homozigose	38
5. CONCLUSÃO	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
7. APÊNDICE	64
CAPÍTULO II	
BINDING PROTEIN MEDIATES AN APPARENT INCREASE IN	
DROUGHT TOLERANCE BY DELAYING LEAF SENESCENCE	
	65
1. ABSTRACT	66
2. INTRODUCTION	67
3. MATERIAL AND METHODS	70
3.1. Soybean transformation	70
3.2. PCR analysis of transgenic plants	71
3.3. Immunoblot analysis	71
3.4. Isolation of microsomal fraction	72
3.5. Plant growth and water stress induction	72
3.6. Real-time RT-PCR analysis	73
3.7. Physiological measurements	75
3.8. Proline content determination	76
3.9. Determination of chlorophyll content and lipid peroxidation	76

3.10. Data analyses	77
4. RESULTS	78
4.1. Generation of soybean transgenic lines	78
4.2. Stress tolerance in 35S: BiP transgenic lines	80
4.3. Ectopic expression of BiP in soybean does not promote typical stress avoidance responses	83
4.4. Overexpression of BiP inhibits induction of stress-responsive gene expression	89
4.5. Overexpression of BiP prevents down-regulation of ER- stress specific targets by severe drought conditions	90
4.6. Expression of leaf senescence-associated markers in wild type and OE lines during drought	92
5. DISCUSSION	97
7. LITERATURE CITED	102

RESUMO

VALENTE, Maria Anete Santana, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2008. **A proteína BiP exerce função protetora contra o déficit hídrico em plantas de soja.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-orientadores: Francisco José Lima Aragão e Marcelo Ehlers Loureiro.

As plantas estão sob constantes condições de estresses bióticos e abióticos, e a seca é um dos principais fatores abióticos limitantes da produção agrícola, desencadeando alterações bioquímicas, fisiológicas e moleculares nas plantas. Baseada na capacidade de BiP em aumentar tolerância à seca em *Nicotiana tabacum*, propôs-se analisar se esta estratégia molecular para aumento de tolerância seria efetiva em soja. Inicialmente, plantas de soja, variedade ‘Conquista’, foram transformadas com o gene *soyBiPD*, sob o controle do promotor constitutivo 35S e a análise de transgenia foi avaliada em populações segregantes até a geração T6. A expressão do transgene foi analisada em seis transformantes, designados 35S:BiP-1, 35S:BiP-2, 35S:BiP-3, 35S:BiP-4, 35S:BiP-5, 35S:BiP-6. Na geração T6, foram selecionadas plantas homozigotas, superexpressando BiP, da linhagem 35S:BiP-4. Maior acúmulo da proteína BiP foi observado no retículo endoplasmático das plantas transgênicas, indicando um correto endereçamento celular da proteína recombinante.

Plantas de soja T3 superexpressando BiP foram submetidas a condições de estresse hídrico. Após condição de restrição hídrica, foi observado um fenótipo tolerante nas plantas senso com manutenção do nível de turgescência foliar e não acumularam níveis elevados de sacarose, enquanto as plantas de soja controle não mantiveram o mesmo nível de turgescência foliar e acumularam maiores níveis de sacarose. Sob condições de restrição hídrica, as plantas senso apresentaram capacidade fotossintética e de condutância estomática significativamente superiores às plantas não transformadas.

Plantas de soja T4 e T5 também foram submetidas a déficit hídrico severo pela suspensão total de irrigação e as plantas transgênicas mostraram maior tolerância à seca. As plantas não transformadas apresentaram taxa fotossintética, condutância estomática e transpiração significativamente inferiores nessas condições. As concentrações de prolina aumentaram significativamente nas plantas sob seca, apresentando-se significativamente superior nas plantas *wild type*. A condição de estresse elevou o conteúdo de malondialdeído (MDA) nas plantas de soja, ocorrendo peroxidação de lipídios em ambas, mas significativamente superior nas plantas controle. Foi constatado também que as raízes das plantas controle, sob estresse osmótico, apresentaram ramificação maior. Em condições de estresse hídrico genes foram diferencialmente expressos nas linhagens transgênicas e nas plantas controle, destacando a indução superior de genes responsivos à seca, como genes LEA, antiqutina e GST nas plantas não transformadas. A superexpressão de BiP retardou a indução do processo de senescência foliar, sendo o teor de clorofila e de proteína significativamente inferiores nas plantas controle. Coletivamente, estes resultados sugerem que a proteína BiP exerce função protetora contra o déficit hídrico em plantas.

ABSTRACT

VALENTE, Maria Anete Santana, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2008.

The protein BiP has a protector function against the water deficit in plants of soybean. Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-advisers: Francisco José Lima Aragão and Marcelo Ehlers Loureiro.

The plants are under continuous biotic and abiotic stress conditions, and drought is the major abiotic factors which limits agricultural production, triggering biochemical, physiological and molecular changes in plants. Based on the capacity of BiP to increase drought tolerance in *Nicotiana tabacum*, it was aimed in this research to analyze if such molecular strategy for increasing the tolerance would be effective in soybean. Soybean plants, belonging to the *consquista* variety, were initially transformed with the *soyBiPD* gene under control of the 35S constitutive promoter. The transgenic analysis was evaluated in segregating populations until the T6 generation. The transgene expression was analyzed in six transformants called 35S:BiP-1, 35S:BiP-2, 35S:BiP-3, 35S:BiP-4, 35S:BiP-5, 35S:BiP-6. On T6 generation, homozygous plants of the 35S:BiP-4 lineage that were overexpressing BiP were selected. Higher BiP protein accumulation was found in the endoplasmatic reticulum of the transgenic plants, indicating a right cellular addressing of the recombinant protein.

T3 soybean plants overexpressing BiP were subjected to hydric stress. After hydric restriction, a tolerant phenotype was observed in plants sense which kept leaf turgescence level without accumulating high levels of sucrose, while soybean control plants did not have the same leaf turgescence level and they accumulated higher levels of sucrose. Under hydric restriction, transformed plants significantly showed higher photosynthetic ability and stomatic conductance than non-transformed plants. T4 and T5 soybean plants were also subjected to severe hydric deficit by complete watering

interruption and the transgenic plants revealed higher drought resistance. Non-transformed plants significantly showed lower photosynthetic, stomatic conductance and transpiration rates in this water stress. Proline concentration increased significantly in plants that underwent drought, being noticeably higher in the wild type plants. The stress condition increased malondialdehyde (MDA) contents in soybean plants, occurring peroxidation in the membrane lipids of both plants, but it was significantly higher in the controls. It was also found that control plant roots under osmotic stress showed greater branching. Under conditions of water stress, genes were differentially expressed in transgenic lineages and control plants, standing out the induction of drought responsive genes, such as LEA, antiqutin and GST, in non-transformed plants. BiP superexpression delayed leaf senescence induction, being chlorophyll and protein percentages significantly lower in the control plants. Altogether, these results suggest that BiP protein has a protector function against the water deficit in plants.

1. INTRODUÇÃO

A agricultura exerce um papel de destaque na economia mundial e a soja é hoje uma das principais culturas geneticamente modificada que possui importância sócio-econômica (FAO, 2003; CONAB, 2003). O desenvolvimento de novos genótipos de plantas, mais tolerantes a estresses bióticos e abióticos, tem-se tornado essencial para que a agricultura continue alimentando e subsidiando a crescente população, assim como gerando empregos e movimentando a economia.

Plantas são constantemente submetidas a estresses abióticos, principalmente os causados por seca, que afetam de maneira negativa seu crescimento e metabolismo. O estresse hídrico é um fator ambiental que limita a produção da agricultura, causando uma série de mudanças fisiológicas, bioquímicas e moleculares nas plantas. Genótipos que diferem em tolerância ao déficit hídrico podem apresentar diferenças qualitativas e quantitativas na expressão gênica. Uma resposta fisiológica específica ao déficit hídrico pode representar, na realidade, a combinação de eventos moleculares prévios, que foram ativados pela percepção do sinal de estresse. Compreender como esses eventos são ativados e desativados, e como interagem entre si, é essencial para o desenvolvimento de novas variedades mais tolerantes à seca. Assim, estudos intensivos têm contribuído para a elucidação dos mecanismos regulatórios de expressão de genes responsivos a estresses (THOMASHOW et al., 1999; SHINOZAKI et al., 2003).

A homeostase do retículo endoplasmático pode ser alterada por condições de estresse. Essa organela é um compartimento celular essencial para a síntese e a maturação de proteínas secretórias, e funciona como reservatório de cálcio. Alterações das funções do retículo endoplasmático, como perturbação do equilíbrio de cálcio,

inibição da glicosilação de proteínas ou da formação de ligações dissulfídicas podem resultar em acúmulo de proteínas incorretamente enoveladas, alterando a homeostase dessa organela e promovendo estresse no retículo endoplasmático. A redução da carga protéica excessiva no retículo endoplasmático ocorre quando as células acionam a via de resposta a proteínas incorretamente enoveladas (*unfolded protein response*, UPR). Isto desencadeia a atenuação transiente da tradução, degradação de proteínas mal dobradas e a indução de chaperonas moleculares e enzimas que contribuem para aumentar a capacidade de enovelamento e degradação de proteínas incorretamente enoveladas. Se o estresse do retículo não for aliviado, vias apoptóticas são ativadas. Sob condições de estresse, a superexpressão de chaperonas é essencial para a sobrevivência celular por facilitar o correto enovelamento de proteínas do retículo e prevenir sua agregação. A proteína BiP, uma chaperona do retículo endoplasmático, encontra-se envolvida na via de sinalização de estresse e no processo de degradação protéica para atenuar o estímulo apoptótico (NI e LEE, 2007). BiP é uma das mais abundantes chaperonas do retículo endoplasmático e encontra-se próximo ao poro translocon. Devido a essa localização pode associar-se imediatamente com as cadeias polipeptídicas nascentes, contribuindo para sua translocação e enovelamento correto.

Trabalhos anteriores desenvolvidos no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (BIOAGRO - UFV) com plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum*, exibindo níveis elevados de BiP, mostraram que essas plantas apresentaram tolerância a estresse hídrico (ALVIM, 2000; ALVIM et al.; 2001; CAROLINO, 2000; CAROLINO, 2001; VAEZ, 2003), tornando interessante investigar se essas vantagens adquiridas com a expressão ectópica de BiP poderiam ser estendidas a culturas de relevância agrônômica como a soja. Esse foi o objetivo primordial desse trabalho e, para isso, plantas transgênicas de soja superexpressando BiP foram obtidas e o efeito da superexpressão

constitutiva de BiP no desenvolvimento e em resposta a condições de estresse hídrico foi investigado em linhagens de soja 'Conquista'.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Binding Protein* (BiP)

O retículo endoplasmático (RE) é o primeiro compartimento da via secretória de eucariotos, sendo responsável pela síntese, modificação e endereçamento de proteínas para seu destino apropriado na via secretória e no espaço extracelular. Imediatamente após a entrada nessa organela, os polipeptídios nascentes podem sofrer uma série de processamentos pós-traducionais. Estes incluem a adição covalente de carboidratos e clivagem por enzimas proteolíticas, enovelamento nas estruturas secundárias e terciárias apropriadas, as quais são estabilizadas por ligações dissulfídicas e, em alguns casos, aquisição de estruturas quaternárias em complexos multiméricos (YANJUN et al., 2003).

O retículo endoplasmático também possui mecanismo de controle de qualidade que discrimina proteínas corretamente enoveladas das proteínas incorretamente enoveladas. Esse mecanismo assegura que somente proteínas corretamente enoveladas e montadas prossigam para o seu destino final na via secretória (ODA et al., 2003). Esses processos são auxiliados e monitorados por chaperonas do retículo endoplasmático, entre as quais, BiP exerce função de destaque.

BiP é uma proteína multifuncional envolvida na regulação de diversos processos celulares associados ao retículo endoplasmático (PILON e SCHEKMAN, 1999). Além de participar do enovelamento de cadeias polipeptídicas nascentes, BiP auxilia a translocação dessas cadeias para o lúmen do retículo endoplasmático e funciona como

um vedante do translocon durante os estágios iniciais de translocação. Dessa forma, a barreira de permeabilidade entre o retículo endoplasmático e o citosol é conservada e o nível de cálcio, conseqüentemente, mantido (HAMMAN et al., 1998; VOGEL et al., 1990; HAIGH e JOHNSON, 2002; ALDER et al., 2005). Isso posiciona BiP em um local estratégico para se ligar a cadeias polipeptídicas nascentes, assim que estas entram no retículo endoplasmático (SANDERS et al., 1992). Proteínas anormais e incapazes de adquirir a conformação nativa e funcional são reconhecidas pelo controle de qualidade do retículo endoplasmático e endereçadas para a degradação, prevenindo seu acúmulo no lúmen da organela e evitando, assim, a formação de agregados insolúveis que podem tornar-se tóxicos para a célula. Esse mecanismo de *turnover* é denominado degradação associada ao retículo endoplasmático (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation, ERAD) (HAMPTON, 2002), no qual BiP está diretamente envolvida, auxiliando a identificação e o endereçamento desses substratos para a degradação (MOLINARI et al., 2002). O tempo de interação entre BiP e uma proteína defeituosa tem sido relacionado à estabilidade dessa proteína. Sugere-se que a exposição de regiões não enoveladas de proteínas liberadas após interações com chaperonas possam regular o endereçamento destas para a degradação (SKOWRONEK et al., 1998). BiP também funciona como um modulador da via UPR, atuando, sob condições normais, como regulador negativo dos transdutores de estresse do retículo endoplasmático IRE1, PERK e ATF6, descritos em células de mamíferos (LIU e KAUFMAN, 2003).

BiP (Grp78) é uma proteína de 78 kDa e pertence à família das chaperonas Hsp70 (HAAS e MEO, 1988), sendo uma das chaperonas mais bem caracterizadas do retículo endoplasmático (DENECKE, 1996). Como as outras proteínas Hsp70, BiP tem dois domínios importantes, um amino-terminal que contém um sítio catalítico, e um domínio de ligação ao substrato no carboxi-terminal (McKAY, 1993; BUKAU e

HORWICH, 1998; GETHING, 1999). Esses domínios se comunicam para regular a afinidade e o tempo de interação com polipeptídeos (KNARR et al., 1995). A base bioquímica desse processo está na habilidade das Hsp70 interagirem reversivelmente com as proteínas, de modo precisamente regulado por ciclos de ligação e hidrólise de ATP. O modelo para a ação de uma proteína Hsp70 assume que a associação de polipeptídeos é regulada por comunicação entre esses domínios, e ocorre por alterações conformacionais. A presença de ATP no sítio amino-terminal provoca a abertura conformacional desse domínio para que possa associar-se à molécula protéica, o que ocorre com baixa afinidade e é dependente de ATP (KNARR et al., 2002). A associação com a molécula ligante estimula a hidrólise de ATP e a Hsp70 associada à ADP assume a conformação fechada e firmemente associada ao ligante (BLOND-ELGUINDI et al., 1993; ZHU et al., 1996), elevando a afinidade da Hsp70 por proteínas em várias ordens de magnitude (JIANG et al., 2005). Além do seu papel na liberação da molécula ligante, acredita-se que o domínio ATPase possa interagir com outros componentes da maquinaria de translocação e enovelamento protéicos, influenciando a síntese de proteínas secretórias (SNOWDEN et al., 2007). Assim que os polipeptídeos recém-sintetizados são translocados para o lúmen do retículo endoplasmático, BiP é capaz de se ligar a eles e manter um estado competente para subseqüentes enovelamento e oligomerização (HURTLEY et al., 1989, HENDERSHOT et al., 1996; GEHTING, 1999). BiP liga-se a cadeias polipeptídicas na conformação estendida, reconhecendo, preferencialmente, regiões da cadeia polipeptídica com alto conteúdo de resíduos hidrofóbicos. A extensão mínima de um polipeptídeo reconhecido por BiP foi um heptapeptídeo, com resíduos hidrofóbicos presentes em pelo menos quatro posições alternadas (BLOND-ELGUINDI et al., 1993).

Em plantas, vários genes *hsp70* têm sido identificados nas últimas décadas (VIERLING, 1991; BOSTON et al., 1996; GUY and LI, 1998), mas com o seqüenciamento completo do genoma de *Arabidopsis thaliana*, o quadro geral das famílias Hsp70 emergiu (BORGES et al., 2001; SUNG et al., 2001 a; 2001b; CAGLIARI et al., 2005). Dentro desse cenário, a família BiP é representada por três cópias no genoma de *Arabidopsis*; a presença de múltiplos genes para BiP tem sido observada no genoma de outras espécies de plantas (SUNG et al., 2001a). De fato, subfamílias de BiP foram identificadas em tabaco compreendendo pelo menos cinco genes, em soja existem pelo menos quatro genes, eucalipto possui pelo menos cinco genes, em milho existem pelo menos dois, enquanto em outras, como em *Citrus*, pelo menos um foi identificado (DENECKE et al., 1991; FONTES et al., 1991; WROBEL et al., 1997; CASCARDO et al., 2000; 2001; SUNG et al., 2001b; CAGLIARI et al., 2005; FIETTO et al., 2007).

2.2. Estresse no retículo endoplasmático: ativação da via UPR

A alteração de algum dos processos que ocorrem no retículo endoplasmático causa estresse nessa organela. No retículo, o foco de estresse é devido à alteração no enovelamento protéico. As chaperonas moleculares do retículo endoplasmático são expressas, constitutivamente, em baixos níveis em todas as células, mas são induzidas pelo acúmulo de proteínas mal dobradas no lúmen do retículo endoplasmático (FONTES et al., 1991; GETTING e SAMBROOK, 1992; FONTES et al., 1996; FIGUEIREDO et al., 1997; CASCARDO et al., 2000; Ma e HENDERSHOT, 2004). A indução específica de BiP indica situação de estresse no retículo endoplasmático (LEE,

2005). Vias de transduções de sinais são ativadas para tentar manter a homeostase dessa organela, e essas vias são coletivamente denominadas via de resposta a proteínas incorretamente enoveladas (UPR), e tem como principal objetivo aumentar a capacidade de enovelamento do retículo endoplasmático (URADE, 2007).

A UPR é uma via de transdução de sinais que permite a comunicação entre o retículo endoplasmático e o núcleo, ativando a expressão de diversos genes-alvo, envolvidos na manutenção da homeostase celular (KIMATA et al., 2003). Em células não submetidas a condições estressantes, os transdutores de estresse do retículo endoplasmático ATF6, IRE1 e PERK são mantidos em estado inativo por meio da interação com BiP. Sob condições de estresse no retículo endoplasmático, BiP é liberada desses sensores, os quais se tornam ativos, iniciando a via UPR (LEE, 2005). Essa resposta ativa a expressão de diversos genes-alvo envolvidos na manutenção da homeostase celular, com o objetivo de expandir a capacidade do retículo endoplasmático de processamento de proteínas, nas condições de estresses. Estes incluem as chaperonas e fatores de tráfico de membrana, envolvidos nos processos de enovelamento, translocação, glicosilação, degradação e transporte protéicos (Ma e Hendershot, 2001; PATIL et al., 2001; HARDING, 2002; KAUFMAN et al., 2002; KIMATA et al., 2003).

IRE1 é uma proteína transmembrana do retículo endoplasmático, que é ativada por estresse nessa organela, por meio de dimerização. Similarmente ao que ocorre em leveduras, IRE1 exerce uma atividade RNase citosólica, promovendo o *splicing* do mRNA do fator transcricional XBP-1 em mamíferos (e Hac1 em leveduras), que é translocado ao núcleo para regulação transcricional de genes-alvo. Hac1 e XBP-1 associam-se a elementos responsivos à UPR (UPRE) presentes na região promotora de genes alvos, como BiP e de genes relacionados à UPR. IRE1 também media a rápida

degradação de mRNAs específicos devido à sua localização na membrana do retículo endoplasmático (HOLLIEN et al., 2006). Essa resposta pode seletivamente inibir a tradução de proteínas do retículo endoplasmático e secretórias, e tornar disponível a maquinaria de translocação e enovelamento para o processo de remodelamento. IRE1, subseqüentemente, pode ocasionar a ativação da apoptose (YONEDA et al., 2001; NISHITOH et al., 2002).

Ortólogos de IRE1 têm sido identificados em *Arabidopsis* (AtIre1-1 e AtIre1-2) e em arroz (OsIre1). A região carboxiterminal de AtIre1-2 e OsIre1 possui atividade de autofosforilação, sendo o seu domínio carboxi-terminal conservado entre uma variedade de organismos. O domínio amino-terminal de AtIre1-1, AtIre1-2 e OsIre1 funcionou como sensor do estresse do retículo endoplasmático em células de leveduras (KOIZUMI et al., 2001; OKUSHIMA et al., 2002). IRE1, de leveduras e mamíferos, funciona como um sensor para o estresse no retículo endoplasmático por meio de um processo envolvendo homodimerização e autofosforilação. O domínio luminal tem um sítio de ligação a BiP numa região próxima ao domínio transmembrana, e a dissociação e associação de BiP a este domínio regula a ativação de IRE1 (BERLOTTI et al., 2000; LIU et al., 2003; KIMATA et al., 2004). Essa proteína é inativa quando seu domínio luminal está associado a BiP. Sob acúmulo de proteínas incorretamente enoveladas no retículo endoplasmático, BiP é liberada do domínio luminal de IRE1, atendendo à demanda de proteínas mal-dobradas no lúmen do retículo endoplasmático, sendo assim IRE1 ativada (CREDLE et al., 2005; ZHOU et al., 2006). Evidências indicam que, também em plantas, a ativação dos ortólogos de IRE1 é controlada por BiP, uma vez que a superexpressão da BiP em células de tabaco e soja inibe a ativação da via UPR por tunicamicina (LEBORGNE-CASTEL et al., 1999; CAROLINO et al., 2003; COSTA et al., 2008).

ATF6 é uma proteína transmembrana do retículo endoplasmático que percebe estresse nessa organela por meio do seu domínio lumenal. Duas seqüências de localização (GLS1 e GLS2) foram identificadas no domínio lumenal do retículo endoplasmático de ATF6 (SHEN et al., 2002). ATF6 localiza-se no retículo endoplasmático através de interações entre GLS1 e BiP. A dissociação de BiP do peptídio-sinal durante condições de estresse permite a exposição do sinal de localização para o Complexo de Golgi e possibilita a translocação de ATF6 até essa organela, tornando-se substrato de proteases. O domínio citosólico de ATF6 é um fator transcricional ativo e, como resultado de clivagem, é liberado do complexo do Golgi para o núcleo, onde reconhece elementos de estresse do retículo endoplasmático (ERSE), induzindo a expressão de genes-alvo como chaperonas (HAZE et al., 1999; YE et al., 2000; LIU et al., 2003; OKADA et al., 2003).

PERK é uma proteína transmembrana sensora de estresse no retículo endoplasmático, através do seu domínio lumenal. Uma vez detectado o estresse no retículo endoplasmático, o domínio quinase de PERK é ativado por autofosforilação, resultando na fosforilação do fator de iniciação traducional eIF2 α em seus resíduos serina, inibindo o processo de tradução (HARDING et al., 1999; HARDING et al., 2000). Um ortólogo de PERK já tem sido descrito em plantas, embora aumento na fosforilação de eIF2 α e atenuação da tradução durante o estresse no retículo endoplasmático ainda não tenham sido confirmados (KAMAUCHI et al., 2005).

Análises genômicas recentes revelaram diversos genes-alvo da via UPR em *Arabidopsis*, funcionalmente relacionados com o retículo endoplasmático e com a via secretora (MARTINEZ e CHRISPEELS, 2003; KAMAUCHI et al., 2005). Os resultados dessas análises genômicas indicam que, assim como as células de mamíferos, as células de plantas evoluíram três mecanismos diferentes mediados pela via UPR:

indução transcricional de genes que codificam chaperonas moleculares e tráfico de vesículas de proteínas; atenuação da expressão de genes que codificam proteínas secretórias; ativação do sistema ERAD, promovendo rápida eliminação de proteínas incorretamente enoveladas no retículo endoplasmático. Entretanto, a caracterização da via UPR em plantas é ainda rudimentar. Os únicos componentes conhecidos da via UPR em plantas são os sensores proximais putativos que incluem os homólogos de IRE1 descritos anteriormente (KOIZUMI et al., 2005) e duas proteínas relacionadas com ATF6 e designadas AtbZIP28 e AtbZIP60 (IWATA e KOIZUMI, 2005; LIU et al., 2007).

AtbZIP60 e AtbZIP28 foram descritos como fatores de transcrição do tipo zíper de leucina (bZIP), induzidos por condições de estresse no retículo endoplasmático, que estão ancorados na membrana do retículo endoplasmático sob condições normais e podem servir como sensores e transdutores da via UPR. Sob condições de estresses no retículo endoplasmático, AtbZIP28 é liberado da membrana por proteólise e translocado para o núcleo por meio de um mecanismo que se acredita ser similar àquele que age sob o transdutor ATF6 de mamíferos (LIU et al., 2007). Expressão de uma forma truncada de AtbZIP28 ou AtbZIP60, contendo o domínio bZIP, induz a expressão de genes alvos da via UPR, sob condições normais (IWATA e KOIZUMI, 2005; LIU et al., 2007).

É possível que a via UPR esteja relacionada a outras vias de transdução de sinais. Assim, genes regulados por outras vias de transdução de sinais conectadas à UPR podem, eventualmente, ser identificados como induzidos ou reprimidos após os tratamentos que induzem estresse no retículo endoplasmático. O papel desses genes e a conexão entre a UPR e outras vias de sinalização em plantas ainda estão sob estudo (IRSIGLER et al., 2007).

Em plantas, a morte celular programada também parece ser ativada durante a UPR. Entretanto, o mecanismo regulatório ainda não foi esclarecido (KAMAUCHI et al., 2005). Hsr203j é uma serina hidrolase relacionada à morte celular programada (PCD), que é induzida por estresse do retículo endoplasmático e tradicionalmente usada como marcador de PCD (BAUDOUIN et al., 1997; PONTIER et al., 1998). Acredita-se que a transcrição do mRNA de Hsr203j seja induzida por um sistema de transdução de sinal diferente da UPR. Em *Arabidopsis* o inibidor-1 BAX (AtBI1) atua como modulador da morte celular programada. Verificou-se que em momentos prévios à PCD induzida por tunicamicina esse gene é drasticamente induzido. Embora a sua superexpressão reduza a sensibilidade das plântulas de *Arabidopsis* à tunicamicina, não promove efeitos significativos no padrão de genes induzidos por estresse do retículo endoplasmático (AtBiP2, AtPDI, AtCRt1 e AtCNX1). Watanabe e Lam (2008) sugerem que AtBI1 exerce papel essencial como fator de sobrevivência altamente conservado durante condições de estresse do retículo endoplasmático, atuando em paralelo com a via UPR. Coletivamente, esses dados indicam que a PCD apoptótica é induzida em plantas quando a homeostase do retículo endoplasmático não é restaurada após o estresse (URADE, 2007). Em mamíferos, tem sido demonstrado que BiP é também capaz de complexar com pro-caspases que se associam à membrana dessa organela. Através dessas interações, BiP regula o balanço entre a sobrevivência celular e a apoptose em células sob estresse no retículo endoplasmático. Portanto, BiP é um regulador-chave dos transdutores de estresse do retículo endoplasmático, já que a ativação desses, sob condições de estresses, é dependente da liberação de GRP78 (LEE, 2005). Enquanto que já está bem estabelecido que o retículo endoplasmático exerce papel essencial na homeostase celular, recentes descobertas direcionam o retículo endoplasmático como um sítio de convergência, tanto para moléculas pró como anti-

apoptóticas. A homeostase do retículo endoplasmático é altamente regulada. Grande número de genes específicos de plantas é induzido por estresse do retículo endoplasmático, mas o significado funcional de sua indução ainda não foi completamente estabelecido (BRECKENRIDGE et al., 2003; SCORRANO et al., 2003; IRSIGLER et al., 2007).

2.3. Estresse hídrico

Estresse hídrico ocorre quando a disponibilidade de água no solo é reduzida e as condições atmosféricas causam contínua perda de água por evaporação ou transpiração (JALEEL et al., 2007). Esse estresse limita o desenvolvimento e o desempenho das plantas mais que qualquer outro fator. Muitos esforços têm sido realizados para aumentar a produtividade sob condições limitantes de água, já que a seca é um significativo estresse ambiental na agricultura mundial (CATTIVELLI et al., 2008). Enquanto mecanismos naturais têm favorecido a adaptação e a sobrevivência de alguns tipos de plantas, estudos têm fornecido significativo ganho no entendimento de respostas fisiológicas e moleculares de plantas a déficit hídrico, mas ainda carece de esclarecimentos para a obtenção de aumento na produtividade. (CATTIVELLI et al., 2008). As plantas mostram diferenças na sensibilidade a estresse por seca nos diferentes estádios do seu desenvolvimento. A complexidade dos mecanismos de tolerância à seca explica o lento progresso no aumento da produtividade em ambientes propensos a essa condição (TUBEROSA e SALVI, 2006).

Estudos fisiológicos têm identificado algumas características presentes ou associadas à adaptabilidade a ambientes susceptíveis à seca, que desencadeiam reduzido

rendimento. Entre esses, podem ser destacados pequeno tamanho da planta, reduzida área foliar, maturidade precoce, redução nas taxas de assimilação de CO₂ e prolongado fechamento do estômato (FISCHER e WOOD, 1979; KARAMANOS e PAPTATHEOHARI, 1999). Alguns processos fisiológicos são 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). Ajuste osmótico é um mecanismo que possibilita às plantas manter a absorção de água e a pressão de turgor, contribuindo para sustentar alta taxa fotossintética e expansão do crescimento. Uma análise comparativa de muitos estudos dedicados a ajuste osmótico tem sugerido que o ajuste não pode ser considerado igualmente útil em todas as culturas e/ou condições de seca, mas que uma associação positiva entre produtividade e ajuste osmótico pode ser encontrada sob estresse severo onde a produtividade tende a ser baixa (SERRAJ e SINCLAIR, 2002). Também alterações na estrutura da membrana celular promovem mudanças em canais de transporte ativados por pressão, modifica a conformação ou a justaposição de proteínas sensoriais embebidas nas membranas celulares e altera a continuidade entre a parede e a membrana celulares (SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1999; SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000). Mudança no potencial osmótico pode ser uma resposta ao estresse hídrico em nível molecular (BRAY, 1993). A percepção do déficit hídrico celular precisa ser traduzida em compostos bioquímicos e metabólitos, gerando uma conseqüente resposta fisiológica ao estresse (INGRAM e BARTELS, 1996).

Embora sejam razoavelmente bem conhecidos os efeitos gerais da seca no crescimento das plantas, os efeitos primários do déficit hídrico em níveis bioquímicos e moleculares ainda não são bem entendidos (ZHU, 2002; CHAVES et al., 2003; YAMAGUCHI-SHINOZAKI e SHINOZAKI, 2005). O déficit hídrico em plantas

inicia-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 os vegetais a se adaptarem a condições adversas (ARORA, 2002; SEKI, 2003). O conhecimento dessas respostas é essencial para elucidar os mecanismos de resistência nas plantas (REDDY et al., 2004; JALEEL et al., 2006; SHAO et al., 2008), cujas respostas variam com a severidade e duração do estresse (FOYER, 2001; SHAO et al., 2006). Os produtos dos genes induzidos por estresse podem ser classificados em dois grupos: aqueles que protegem diretamente contra estresses e aqueles que regulam a expressão de genes e a transdução de sinais em resposta a estresse. O primeiro grupo inclui proteínas como chaperones e proteínas detoxificadoras, que provavelmente funcionam como protetores celulares contra desidratação. 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 (HASSEGAWA et al., 2000; SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000).

Um padrão de expressão gênica pode ser estabelecido como resultado de condições específicas de estresse. Esse padrão pode sofrer variações nas etapas iniciais, alterando a taxa de transcrição de um gene específico ou, subseqüentemente, controlando especificamente os níveis de mRNA e a 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 descoberta de genes e capacitado a engenharia genética a usar vários genes regulatórios ou funcionais para investigar vias

relacionadas à tolerância a seca em plantas (UMEZAWA et al., 2006). Até o momento foram descritas quatro vias de transdução de sinais envolvidas nas respostas das plantas ao déficit hídrico. Duas vias são dependentes de ABA (tipo I e tipo II), e duas vias são não dependentes de ABA (tipo III e IV) (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997, 1999, 2000; SEKI et al., 2003; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; 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 ABA dependente tipo II ativa o fator de transcrição bZIP (NAKAGAWA et al., 1996; HOLLUNG et al., 1997) o qual aciona a expressão gênica pela ligação com os elementos ABA responsivos (ABREs) e elementos tais como CE1 e CE3 (*Coupling Elements*). A via ABA não dependente 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 não dependente tipo III compreende alguns genes induzidos pela seca que não respondem ao ABA nem ao frio.

A adaptação das plantas à seca induz a ativação de resposta molecular que pode significativamente aumentar a tolerância a restrições e isso é de grande importância quando submetidas à análise de controle transcricional. Muitos genes relacionados a estresse têm sido isolados e caracterizados nas duas últimas décadas numa variedade de espécies (CATTIVELLI et al., 2002; RAMANJULU e BARTELS, 2002), embora a complexidade da resposta molecular à seca tenha sido só recentemente revelada por análises de transcriptoma (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. Informações genéticas têm sido

obtidas nas plantas modelo, levando a avanços em vias moleculares conservadas, incluindo aquelas associadas à tolerância ao estresse. Seguindo essa abordagem, componentes regulatórios de resposta à seca têm sido pesquisados e identificados em plantas (KIZIS e PAGES, 2002; SHEN et al., 2003; MARE` et al., 2004; LI et al., 2005).

CAPÍTULO I

OBTENÇÃO E ANÁLISE MOLECULAR DE PLANTAS DE SOJA TRANSFORMADAS COM O GENE *BiP*

1. RESUMO

As chaperonas moleculares, presentes no retículo endoplasmático, atuam no enovelamento e montagem correta das proteínas. A proteína BiP constitui a chaperona molecular mais bem caracterizada do retículo endoplasmático. As chaperonas moleculares do retículo endoplasmático são expressas, constitutivamente, em baixos níveis em todas as células, porém induzidas pelo acúmulo de proteínas mal dobradas no lúmen dessa organela. Sob condições de estresse, a superexpressão de chaperonas é essencial para a sobrevivência celular, por auxiliar o correto enovelamento de proteínas no retículo endoplasmático e prevenir a agregação protéica.

A soja é uma das principais culturas de importância sócio-econômica. Visando investigar se a superexpressão de BiP em soja confere papel protetor contra o estresse hídrico, como verificado em trabalho anterior desenvolvido com plantas transgênicas de tabaco, plantas transgênicas de soja superexpressando BiP foram obtidas. Plantas de soja da variedade 'Conquista' foram transformadas com o gene *soyBiPD*, sob o controle do promotor constitutivo 35S, sendo a segregação das plantas transgênicas avaliada por meio da superexpressão da proteína BiP, superior nas plantas senso, que apresentaram maior acúmulo dessa proteína na fração microsomal. O estudo da expressão do transgene foi conduzido de geração em geração em diferentes linhagens, sendo a homozigose obtida na linhagem 35S:BiP-4, na geração T6.

2. INTRODUÇÃO

A soja é uma cultura agrônômica relevante para o cenário nacional brasileiro, exercendo importância também no mercado externo (FAO, 2003; CONAB, 2003). O crescente interesse por essa cultura é devido ao seu valor nutricional decorrente do alto teor de proteínas e óleo de suas sementes, sendo considerada uma das melhores fontes protéicas de origem vegetal, deficiente somente em aminoácidos sulfurados, metionina e cisteína. Essas proteínas são sintetizadas nos ribossomos associados à membrana do retículo endoplasmático, sendo co-traducionalmente transportadas para o lúmen dessa organela, onde podem permanecer ou ser transportadas, via complexo de Golgi, para os vacúolos de proteínas de reserva (VITALE; DENECKE, 1999).

O retículo endoplasmático é uma organela em que ocorrem o enovelamento e a maturação de proteínas secretórias, a síntese de fosfolípidios e esteróis e a estocagem de cálcio (VOELTZ et al., 2002). O enovelamento de proteínas no retículo endoplasmático é auxiliado por chaperonas moleculares, impedindo interações intra e intermoleculares no lúmen do retículo endoplasmático (HAMMOND e HELENIUS, 1995). Entre as chaperonas moleculares do retículo endoplasmático, destaca-se BiP, uma proteína multifuncional envolvida na regulação de diversos processos celulares associados a essa organela (PILLON e SCHEKMAN, 1999). Em soja, BiP é codificada por uma família multigênica, cujos membros isolados apresentam expressão e regulação diferencial, e são denominados *soyBiPA*, *soyBiPB*, *soyBiPC* e *soyBiPD* (FIGUEIREDO et al., 1997; CASCARDO et al., 2001).

O estudo da atividade da proteína BiP em plantas foi recentemente conduzido em plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum*. Uma investigação sobre a função da

proteína BiP e sobre seu papel protetor contra estresse foi realizada por meio de repressão anti-senso e superexpressão de genes *BiP*. Neste trabalho, foram obtidas linhagens transgênicas de soja da variedade ‘Conquista’ transformadas, via biobalística, com o gene *soyBiPD* na orientação senso sob controle do promotor *CaMV35S* e do sinal de poliadenilação 3’ do gene da nopalina sintase (nos). Inicialmente, foram avaliadas a expressão e estabilidade do transgene nas linhagens independentes obtidas e, em seguida, por análise de segregação dos transformantes, selecionadas linhagens transgênicas em homozigose e superexpressando constitutivamente a proteína BiP.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção das linhagens transgênicas de soja

3.1.1. Construção do vetor e transformação da soja

Uma seqüência de cDNA, *soyBiPD*, que codifica a proteína BiP (acesso n.º AF031241 no *GenBank*) foi excisada do clone pUFV42, obtido por Alvim et al. (2001), com *Xba*I e inserido no vetor pB35SdAMVNOS2 sob controle do promotor *CaMV35S* (vírus do mosaico da couve-flor) com a seqüência *enhancer* do vírus do mosaico da alfafa e do sinal de poliadenilação 3' do gene da nopalina sintase (*nos*). O *gene ahas* (que confere tolerância ao herbicida *imazapyr*) de *Arabidopsis thaliana* foi removido do vetor pAC321 (ARAGÃO et al., 2000) com *Xba*I e inserido no vetor pFACM1, gerando o vetor pFACMahas. O cassete de expressão de *BiPD* foi removido com *Sa*II e *Not*I do pB35SdAMVNOS2 e clonado no vetor FACMahas, gerando pahasBiP. A construção pahasBiP foi usada para transformar a soja da variedade 'Conquista', via biobalística, de acordo com Aragão et al. (2000).

3.1.2. *Screening* das plantas transgênicas por PCR

O DNA foi isolado de folhas de acordo com Dellaporta (1983). Reações de PCR foram realizadas em termociclador (PTC-100, MJ Researcher, USA) a partir do DNA genômico com 25 µL de solução contendo 60 mM Tris-SO₄ (pH 8,9), 18 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgCl₂, 250 nM de cada dNTP; 200 nM de cada oligonucleotídeo e 5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, USA). A mistura foi aquecida a 95 °C (5 min) e submetida a 35 ciclos de amplificação (95 °C por 1 min, 50 °C por 1 min e 72 °C por 1 min) com um ciclo final de 5 min a 72 °C. Os oligonucleotídeos bipsoy235 (5'-GAGAGACTAATTGGAGAGGCTG-3') e bipsoy645c (5'-ATAGGCAATGGCAGCAGCAGTG-3') foram usados para amplificar uma seqüência de 410 pb da região codificadora de BiP.

3.2. Material Vegetal

Sementes de soja da variedade 'Conquista' transformadas com o gene *soyBiPD* e sementes-controle de plantas não-transformada, foram utilizadas nas análises. As plantas de soja cresceram em vasos de 3 L contendo uma mistura de solo e esterco na proporção 3:1, foram mantidas em casa-de-vegetação sob condições naturais de luz, com temperatura de 35 °C de dia/15 °C à noite. As linhagens transformadas analisadas foram: 35S:BiP-1, 35S:BiP-2, 35S:BiP-3, 35S:BiP-4, 35S:BiP-5 e 35S:BiP-6. O material vegetal das linhagens de soja foi coletado, imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em *freezer* a -80 °C até o processamento das amostras.

3.3. Extração e quantificação de proteínas

Os extratos protéicos totais foram obtidos de acordo com Görg et al. (1988) modificado. Aproximadamente 200 mg de folhas foram pulverizados em almofariz de porcelana com nitrogênio líquido e homogeneizados com ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v) em acetona com 2-mercaptoetanol 0,07% (v/v). O precipitado foi lavado em acetona contendo 2-mercaptoetanol 0,07% (v/v), sendo a acetona adicional removida sob vácuo. O precipitado foi ressuspendido com o auxílio de ultra-sonicação em tampão contendo uréia 8 M, Triton 4% X-100 (v/v) e DTT 60 mM. O extrato protéico obtido foi armazenado a -20 °C.

A concentração de proteína foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando-se BSA como padrão.

3.4. SDS-PAGE e *Imunoblotting*

Os extratos protéicos foram avaliados por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio) com concentração de acrilamida e Bis 10% (p/v) realizada essencialmente como descrito por Laemmli (1970). A eletroforese foi conduzida por aproximadamente 12 h a 50 V, no tampão de corrida (Tris-HCL 25 mM, glicina 200 mM, EDTA 1 mM e SDS 3,5 mM). Em seguida, os géis foram revelados em solução corante [metanol 45% (v/v), etanol 9% (v/v) e *Coomassie Brilliant blue* R250 0,01% (p/v)] e descorados em solução descorante [metanol 25% (v/v) e ácido acético glacial 7,5% (v/v)].

Quantidades iguais de proteínas totais foram aplicadas nas diferentes canaletas do gel, e após a corrida eletroforética as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, usando-se o sistema de transferência da BIORAD, de acordo com as instruções do fabricante. Após a transferência (1 h a 700 mA), a membrana foi bloqueada com o reagente *Blotting Grade Blocker, Non-Fat Dry Milk* (BIORAD) e incubada com um anticorpo policlonal contra BiP numa diluição 1:1000. O anticorpo anti-WSBiP, que reconhece uma proteína de 28 kDa, foi usado como controle endógeno da quantidade de extrato protéico aplicado nos *immunoblottings*. Esse anticorpo foi usado na diluição 1:1000, juntamente com o anticorpo anti-BiP, em muitos *immunoblottings*. Como segundo anticorpo, foi usado o anticorpo comercial contra coelho conjugado com a fosfatase alcalina (SIGMA), numa diluição 1:5000. A atividade da fosfatase alcalina foi detectada utilizando-se os substratos NBT (azul-nitro tetrazol) e BCIP (5-bromo-4-cloro-3indolil-fosfato), ambos da SIGMA.

3.5. Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen), segundo recomendações do fabricante. Para eliminação do DNA contaminante, o RNA total foi tratado com três unidade de DNase livre de RNase (Promega). Após a extração, o RNA foi quantificado (DU 650 BECKMAN Spectrophotometers) e analisado em gel de agarose desnaturante 1,3 % (p/v) corado com brometo-de-etídeo 0,1 µg/mL. A síntese de cDNA foi realizada utilizando-se 2 µg de RNA total, oligo-dT (18) e transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen), segundo especificações do fabricante.

3.6. RT-PCR em Tempo Real (qRT-PCR)

Todo o procedimento de PCR em tempo real foi conduzido seguindo manuais da *Applied Biosystems*. As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o aparelho 7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems), oligonucleotídeos específicos, cDNAs dos tratamentos e SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). As condições de amplificação foram: 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 94 °C por 15 seg e 60 °C por 1 min. Para a quantificação da expressão gênica, foi utilizado o método comparativo de Ct: $2^{-\Delta Ct}$. Como controle endógeno para normalização dos dados do qRT-PCR, utilizou-se *helicase* de soja. As seqüências dos oligonucleotídeos usados são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Oligonucleotídeos específicos para qRT-PCR

Clone	Acesso	Seqüência (5' - 3') Fw	Seqüência (5' - 3') Rv
RNA helicase	AI736067	AACCCTAGCCCCTTCGCCT	GCCTTGTCGTCTTCCTCCTCG
BiP transgene	BiPD - nos	ATCTGGAGGAGCCCTAGGCGGTGG	CATCGCAAGACCGGCAACAGGAT

3.7. Isolamento da fração microssomal

A fração microssomal de folhas de soja foi obtida de acordo com a metodologia descrita por Ripp et al. (1988). As folhas foram trituradas em almofariz de porcelana com tampão de extração (sacarose 250 mM, DTT 2,05 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 7,0 e PMSF 0,5 mM), na proporção de 1 g de folhas para 5 mL tampão. O resíduo insolúvel foi descartado após a centrifugação a 14.000 x g por 15 min, a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi centrifugado a 80.000 x g por 50 min a 15 °C e o precipitado, ressuscitado em MES-KOH 10 mM, pH 6,8, e DTT 2,5 mM. Depois da lavagem por duas vezes, o precipitado foi ressuscitado em K₂HPO₄/KH₂PO₄ 100 mM, pH 7,5 e armazenado a -80 °C.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Obtenção de linhagens transgênicas de soja

Linhagens transgênicas de soja foram obtidas com sucesso, apresentando níveis aumentados de expressão da proteína BiP. Para obter essas linhagens, o cDNA *soyBiPD* na orientação senso, sob o controle do promotor CaMV35S com uma seqüência enhancer e do sinal de poliadenilação 3' do gene da nopalina sintase (*nos*), foi introduzido na região apical do eixo embriogênico de soja da variedade 'Conquista', por biobalística, de acordo com Aragão et al. (2000). Após o bombardeamento, os transformantes primários (T0) obtidos foram selecionados com base em sua resistência ao imazapyr. Esses transformantes foram mantidos em casa-de-vegetação e analisados quanto à incorporação do transgene via PCR (dados não mostrados). Dos transformantes confirmados, foram obtidas sementes (T1) para análises posteriores.

Após várias linhagens independentes terem sido estabelecidas, a expressão da proteína BiP foi monitorada por análise de *immunoblotting*, o que tornou possível assegurar que as plantas transgênicas de soja estavam superexpressando BiP. Entre elas, foram selecionadas as seguintes linhagens transgênicas (T2) para análises subseqüentes (Figura 1): 35S:BiP-1; 35S:BiP-2; 35S:BiP-3; 35S:BiP-4; 35S:BiP-5. Os níveis da proteína BiP observados nessas plantas transgênicas senso selecionadas foram superiores aos das plantas não-transformadas. A expressão da proteína BiP pode ser controlada a nível traducional. Sob condições não estressantes, aumento nos níveis de mRNA de BiP em células de mamíferos não ocasionou incremento na sua síntese e,

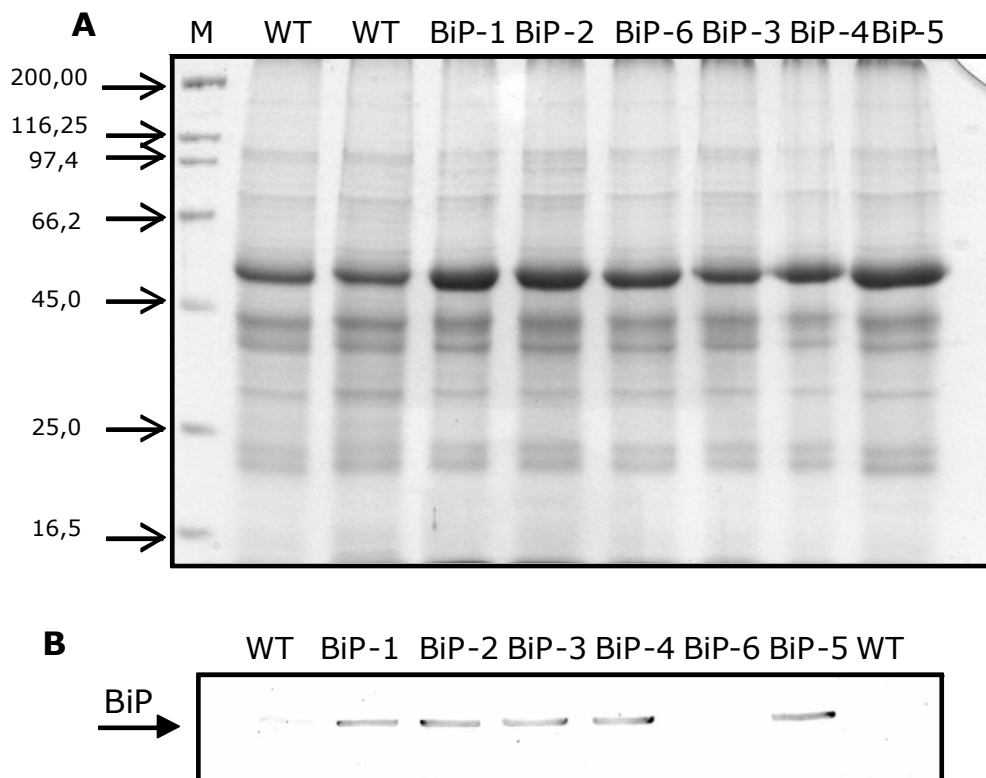


Figura 1 - Seleção de plantas de soja superexpressando BiP.

A- SDS-PAGE. Proteínas totais, em quantidades iguais (30 µg), foram fracionadas por SDS-PAGE na ordem descrita na figura e coradas com coomassie blue. WT corresponde a plantas de soja controle (não transformadas), 35S:BiP-1 (BiP-1), 35S:BiP-2 (BiP-2), 35S:BiP-3 (BiP-3), 35S:BiP-4 (BiP-4), 35S:BiP-5 (BiP-5) e 35S:BiP-6 (BiP-6) indicam plantas de soja das diferentes linhagens transformadas. M corresponde ao padrão de massas moleculares, em kDa.

B- Immunoblotting. Após SDS-PAGE, a mesma quantidade de proteínas usada em A, foi transferida para membrana de nitrocelulose e sondada com o anticorpo policlonal anti-BiP. A ordem das proteínas aplicadas está descrita na figura e corresponde às linhagens mencionadas em A.

conseqüentemente, os níveis protéicos permaneceram constantes (GÜLOW et al., 2002). Na nomenclatura das linhagens transformadas, os números denotam eventos de transformação independentes que geraram os respectivos transformantes primários.

4.2. Plantas transgênicas de soja superexpressando BiP

Análises da expressão de BiP nas plantas transformadas foram conduzidas de geração em geração, já que estas ainda não se encontravam em homozigose. As linhagens de soja selecionadas foram propagadas visando ao seu uso em experimentos subseqüentes. Plantas transformadas na geração T3 foram selecionadas por *immunoblotting* (Figura 2). As plantas que apresentaram níveis de expressão da proteína BiP maiores que os das plantas-controle foram utilizadas. A linhagem 35S:BiP-4 apresentou maior freqüência de expressão do gene exógeno (90%), em comparação com as demais linhagens, que não ultrapassaram 60% de freqüência. A proteína indicada pela seta de 28 kDa correspondeu a um controle endógeno da quantidade de proteína aplicada nas canaletas. Essa proteína não foi identificada, mas reforça a quantificação do extrato protéico.

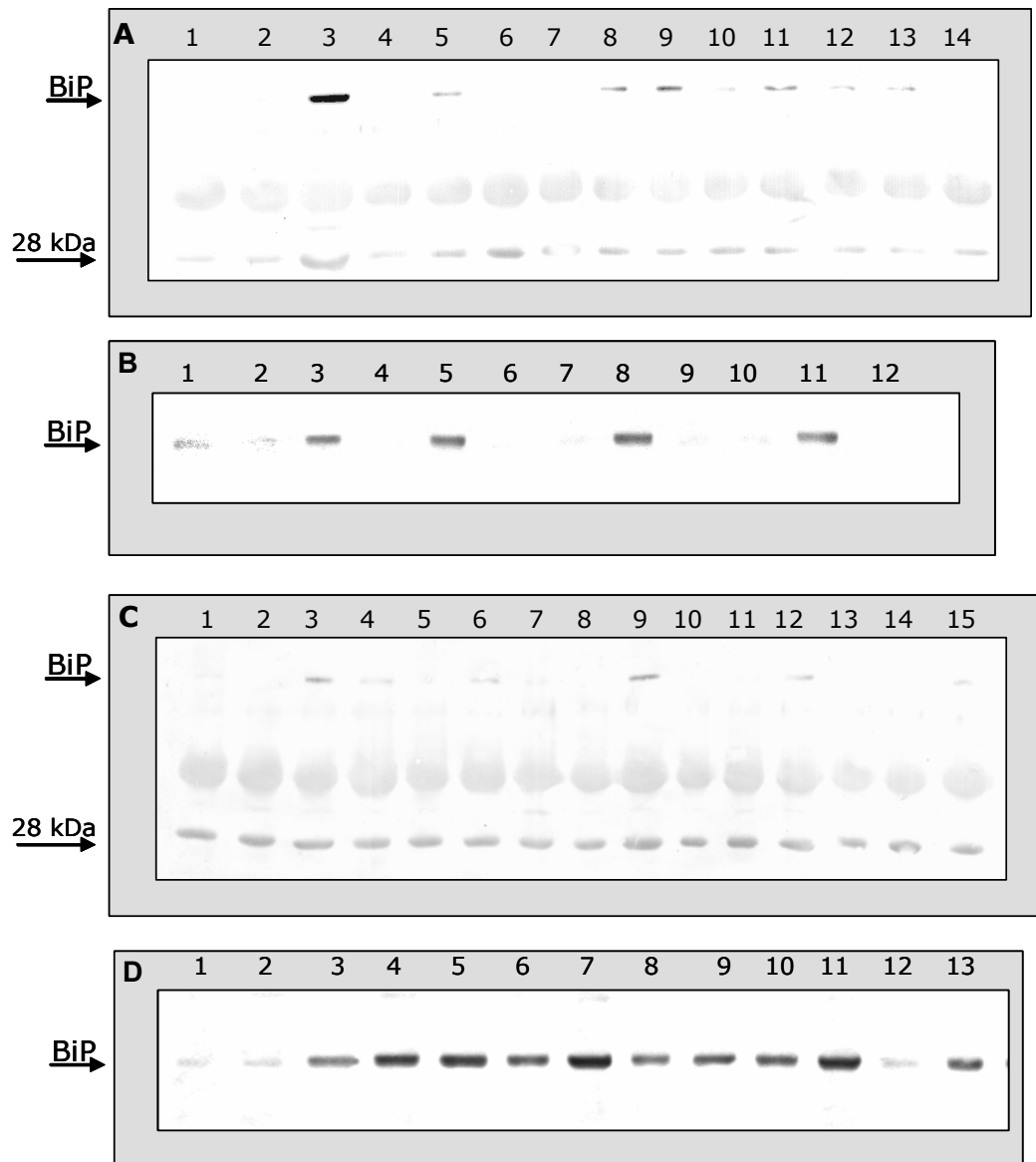


Figura 2 - Análise da expressão de BiP em folhas de soja transgênicas, geração T3.

Quantidades iguais (30 µg) de proteínas totais solúveis foram fracionadas em SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e sondadas com os anticorpos anti-BiP e anti-WSBiP.

A- Linhagem 35S:BiP-1. Os números 1 e 2 correspondem à plantas-controle (WT), 3 a 14 são respectivamente BiP-1.1; BiP-1.2; BiP-1.3; BiP-1.5; BiP-1.6; BiP-1.7; BiP-1.8, BiP-1.9, BiP-1.11; BiP-1.12; BiP-1.13 e BiP-1.14.

B- Linhagem 35S:BiP-2. Os números 1 e 2 correspondem à plantas-controle (WT), 3 a 12 são respectivamente BiP-2.1, BiP-2.2, BiP-2.4, BiP-2.3, BiP-2.5, BiP-2.6, BiP-2.7, BiP-2.8, BiP-2.9 e BiP-2.10.

C- Linhagem 35S:BiP-3. Os números 1 e 2 correspondem à plantas-controle (WT), 3 a 15 são respectivamente BiP-3.1, BiP-3.2, BiP-3.3, BiP-3.4, BiP-3.5, BiP-3.6, BiP-3.7, BiP-3.8, BiP-3.9, BiP-3.10; BiP-3.11; BiP-3.13 e BiP-3.14.

D- Linhagem 35S:BiP-4. Os números 1 e 2 correspondem à plantas-controle (WT), 3 a 13 são respectivamente BiP-4.1, BiP-4.2, BiP-4.3, BiP-4.4, BiP-4.5, BiP-4.6, BiP-4.7, BiP-4.8, BiP-4.9, BiP-4.10 e BiP-4.11.

4.3. Análise molecular da soja transgênica

A análise de expressão protéica foi sempre conduzida para certificar-se de que o gene mantinha estável e expressando em diferentes etapas e gerações. Antes de realizar o *immunoblotting*, a confirmação da inserção do transgene foi geralmente realizada por PCR e algumas vezes a expressão foi confirmada por qRT-PCR. Na Figura 3, apresenta-se a expressão do transgene confirmada por qRT-PCR e *immunoblotting*. Os resultados de ambas as análises foram consistentes entre si. A integridade das proteínas foi verificada por meio de SDS-PAGE (dados não mostrados) imediatamente antes de se realizar um *immunoblotting*. Diferentemente de outras proteínas do retículo endoplasmático, parece haver discrepância, em plantas, entre os níveis da proteína BiP e os seus níveis de mRNA, decorrente de uma possível regulação negativa em nível traducional ou de um mecanismo regulatório que monitora a concentração de BiP no retículo endoplasmático, o que foi constatado em seu estudo em *Nicotiana tabacum*, superexpressando BiP (LEBORGNE-CASTEL et al., 1999). Embora nas plantas de soja os níveis da proteína BiP não se mostraram diretamente relacionados com a concentração do transcrito, as plantas transgênicas, que acumulam níveis de transcrito do transgene também superexpressam a proteína BiP, assim como previamente obtido nas plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum* por Alvim et al. (2001).

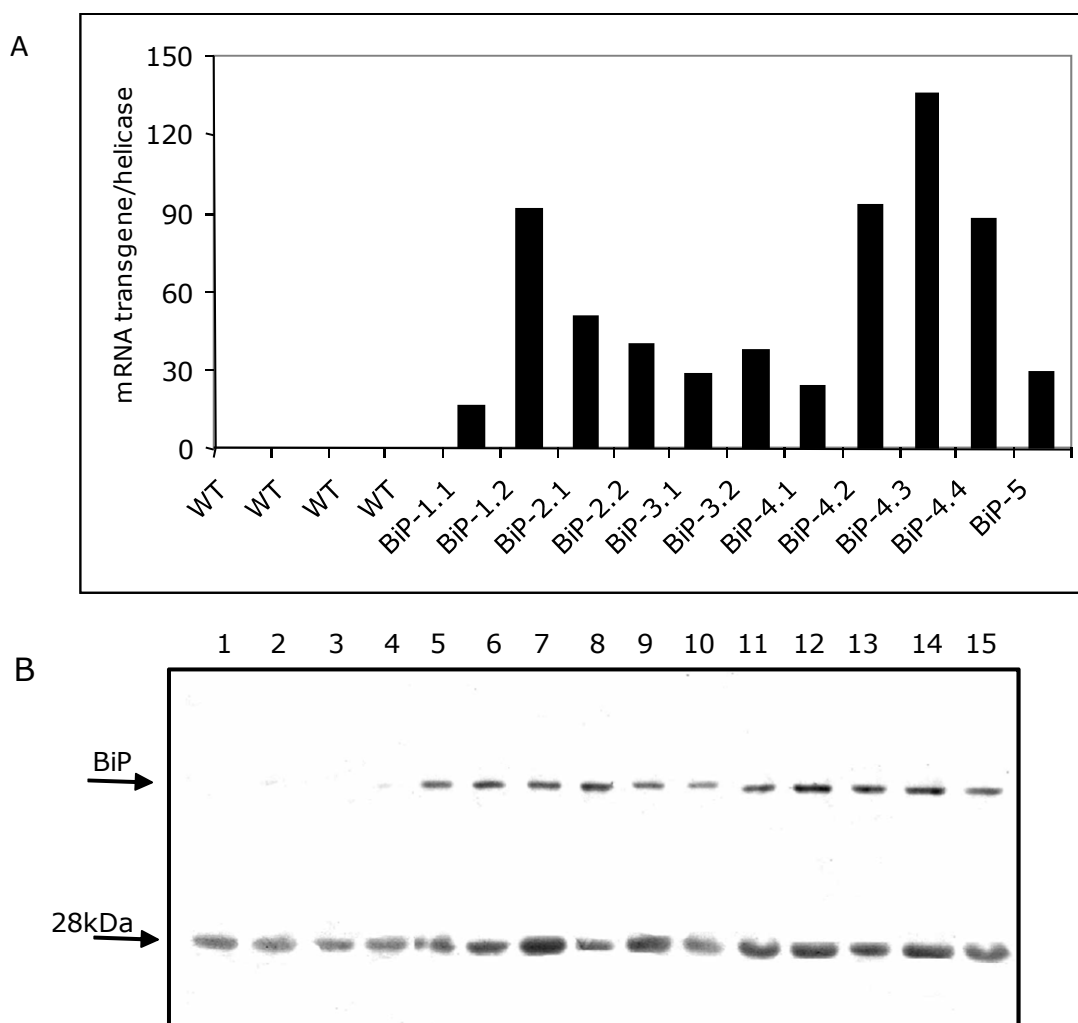


Figura 3 - Análise molecular de linhagens de soja.

A. Expressão de *BiPD* exógeno. A expressão de *BiPD* exógeno foi verificada por PCR em tempo real a partir de cDNA de folhas das plantas de soja transgênicas. O valor de expressão foi obtido usando-se o método $2^{-\Delta Ct}$ e utilizando como controle endógeno *helicase*.

B. Acúmulo da proteína BiP. Quantidades iguais (30 μ g) de proteínas totais de folhas foram fracionadas em SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e sondadas com os anticorpos policlonais anti-BiP e anti-WSBiP. Extratos protéicos de plantas-controle (WT) e plantas transgênicas das linhagens 35S:BiP-1 (BiP-1), 35S:BiP-2 (BiP-2), 35S:BiP-3 (BiP-3), 35S:BiP-4 (BiP-4) e 35S:BiP-5 (BiP-5), geração T3, foram aplicados na seguinte ordem: 1 a 4-WT, 5- BiP-1.1, 6- BiP-1.2, 7- BiP-2.1, 8- BiP-2.2, 9- BiP-3.1, 10- BiP-3.2, 11- BiP-4.1, 12- BiP-4.2, 13- BiP-4.3, 14- BiP-4.4, 15- BiP-5.1, 16- BiP-5.2.

4.4. BiP acumula-se no retículo endoplasmático

A extração microssomal realizada a partir de folhas de soja no estágio V3, seguida de *immunoblotting*, evidenciou uma maior superexpressão de BiP nas plantas senso tanto na fração microssomal quanto na total (Figura 4). O isolamento da fração microssomal possibilitou identificar a localização do transgene.

Para determinar se a superexpressão de BiP se restringe a folhas, essa superexpressão foi analisada por RT-PCR e foi confirmada também nas raízes (Figura 5). O acúmulo do transcrito foi analisado a partir de mRNAs de raízes das linhagens de soja nas gerações T4 e T5, gerações às quais a seleção de plantas de soja transformadas superexpressando BiP foi estendida. Esses resultados estão de acordo com o obtido por Leborgne-Castel et al. (1999) e Alvim et al. (2001) em plantas de tabaco superexpressando BiP.

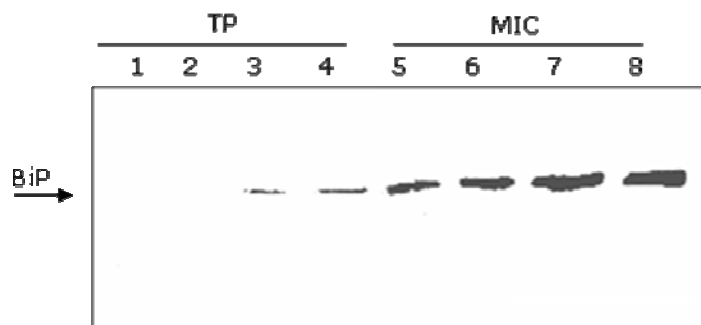


Figura 4 - BiP acumula-se no retículo endoplasmático.

Immunoblotting dos extratos de proteína total (TP) de folhas de soja não transformadas (1 e 2) e de folhas de soja transgênicas da linhagem 35S:BiP-2 (3) e 35S:BiP-4 (4) e do extrato microsomal (MIC) das folhas WT (5 e 6) e das folhas das linhagens 35S:BiP-2 (7) e 35S:BiP-4 (8), sondados com anticorpo anti-BiP. Foram utilizados 20 μg de proteína nas amostras.

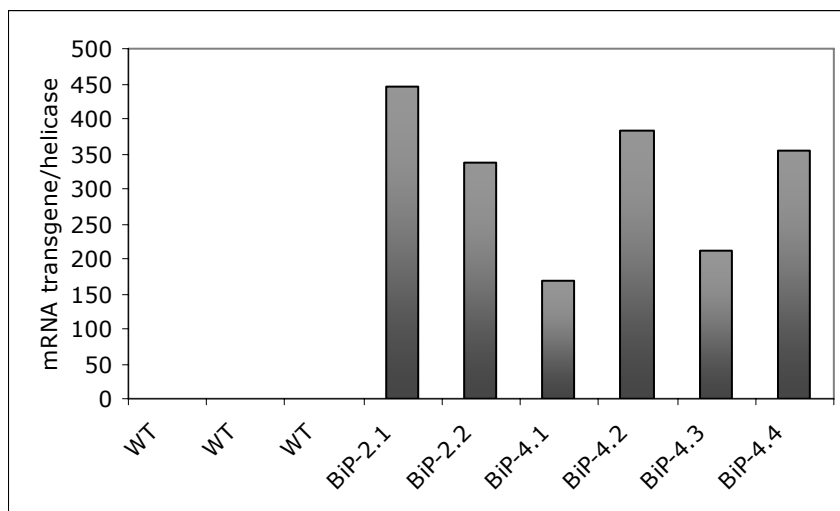


Figura 5 - Expressão de soy*BiPD* exógeno nas raízes das linhagens de soja. A expressão foi analisada por PCR em tempo real a partir de cDNA de raízes das linhagens de soja não transformadas (WT) e transgênicas 35S:BiP-2 na geração T3 e 35S:BiP-4 na geração T4. O valor de expressão foi calculado usando-se o método $2^{-\Delta Ct}$, utilizando-se como controle endógeno a helicase.

4.5. Seleção de plantas transformadas da geração T4 e T5

A seleção de plantas de soja transformadas foi estendida às gerações seguintes na busca por linhagens em homozigose, sendo conduzida nas linhagens previamente selecionadas. A expectativa foi maior com a linhagem 35S:BiP-4, porque apresentou os melhores resultados de frequência da superexpressão do gene *BiP*. Desse modo, foi analisada a superexpressão do transgene nas plantas da linhagem 35S:BiP-4 na geração T4, que apresentou a mesma frequência inicial de 90% (dados não mostrados). Assim avaliou-se a expressão de BiP na geração T5 (Figura 6) que indicava a obtenção da linhagem em homozigose. Juntamente com a análise dessa linhagem, também foi analisada a linhagem 35S:BiP-2 na geração T4, cuja frequência de superexpressão foi em torno de 60% (Figura 6). Embora ainda pareça distante a obtenção de homozigose nessa linhagem, as plantas 35S:BiP-2 se destacam em termos de desenvolvimento e crescimento em relação às demais, justificando prosseguir a seleção em gerações posteriores até a obtenção de homozigose nessa linhagem. Na geração T4 (dados não mostrados), a linhagem 35S:BiP-5 apresentou aumento na frequência de superexpressão, atingindo 80%.

4.6. Obtenção de plantas transgênicas em homozigose

Os dados anteriores fortemente indicam a obtenção de plantas de soja transformadas com o gene *BiPD* em homozigose. Para confirmar, uma análise

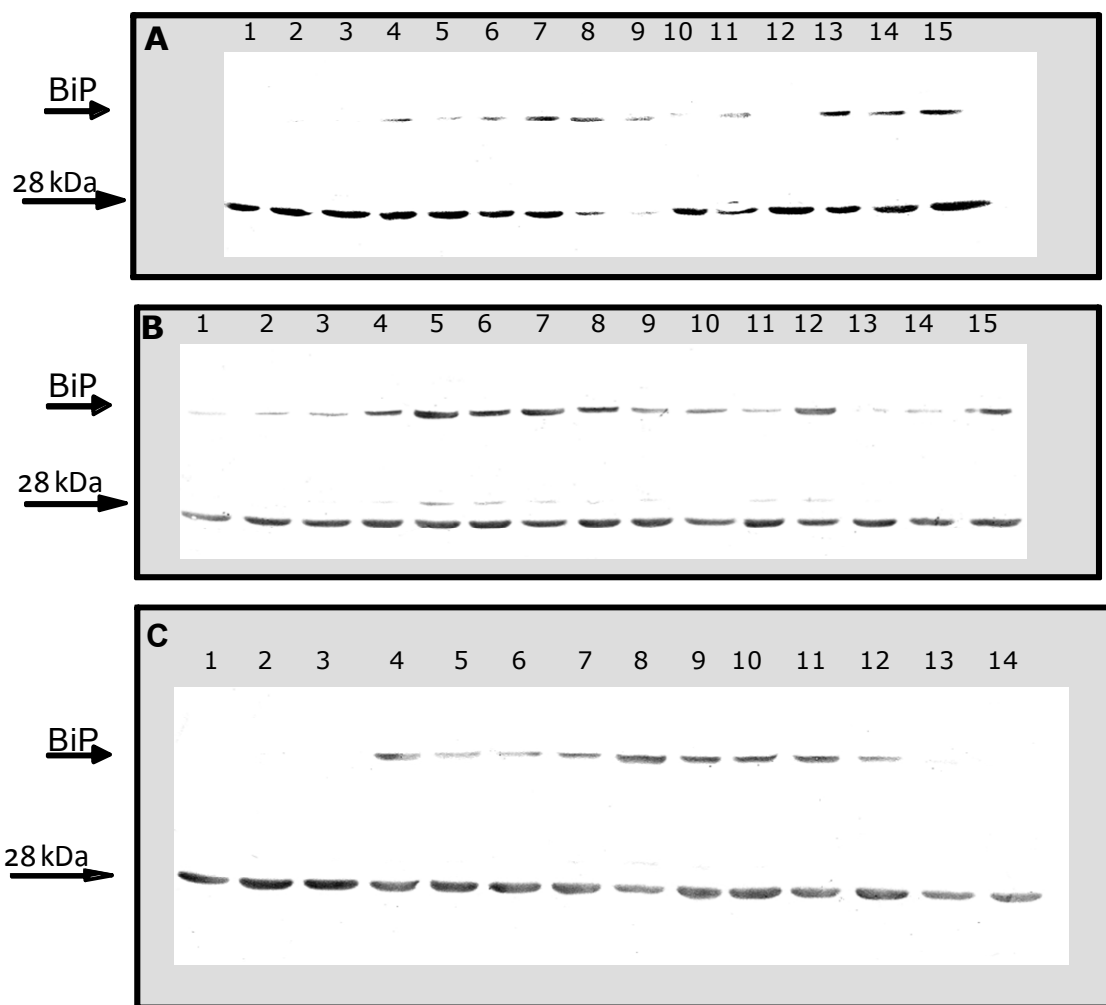


Figura 6 - Análise da expressão de BiP em plantas de soja transformadas. *Immunoblotting* dos extratos protéicos de folhas das linhagens transgênicas T5 35S:BiP-4 e T4 35S:BiP-2. Quantidades iguais de proteínas totais solúveis foram fracionadas em SDS-PAGE, transferidas para membranas de nitrocelulose e sondadas com os anticorpos policlonais anti-BiP e anti-WSBiP. Os números 1, 2 e 3 correspondem a plantas-controle (WT) em todos os *immunoblottings* apresentados.

A- Os números correspondem às seguintes plantas: 4- BiP-4.17.4.17, 5- BiP-4.17.4.12, 6- BiP-4.17.6.20, 7- BiP-4.17.4.20, 8- BiP-4.17.4.6, 9- BiP-4.17.4.19, 10- BiP-2.11.27, 11- BiP-2.11.22, 12- BiP-2.11.26, 13- BiP-2.11.32, 14- BiP-2.11.25 e 15- BiP-2.11.24.

B- A ordem de aplicação é a seguinte: 4- BiP-4.17.6.21, 5- BiP-4.17.4.16, 6- BiP-4.17.4.13, 7-BiP-4.17.4.29, 8- BiP-4.17.6.4, 9- BiP-4.17.6.15, 10- BiP-2.7.6, 11- BiP-2.11.30, 12- BiP-2.11.33, 13- BiP-2.11.12, 14- BiP-2.4.16 e 15- BiP-2.11.10.

C. A ordem corresponde a: 4- BiP-4.17.6.11, 5- BiP-4.17.6.25, 6- BiP-4.17.4.10, 7- BiP-4.17.6.31, 8- BiP-4.17.6.33, 9- BiP-4.17.6.12, 10- BiP-2.11.31, 11- BiP-2.11.5, 12- BiP-2.11.11, 13- BiP-2.11.6 e 14- BiP-2.11.34.

molecular de plantas da linhagem 35S:BiP-4 na geração T6 foi conduzida. A integração do transgene ocorreu em todas as plantas (Figura 7A), que foi detectada por PCR usando oligonucleotídeos específicos. A expressão da proteína BiP se manteve elevada em comparação com a amostra-controle (Figura 7C) em todas as plantas transgênicas analisadas. Tal análise permitiu a identificação de plantas senso individuais, em uma das linhagens de soja, em homozigose. A integridade das proteínas, bem como a quantificação dos extratos foi avaliada por SDS-PAGE (Figura 7B). A determinação da estabilidade do transgene *BiP* foi obtida em *Nicotiana tabacum* na terceira geração por Vaez (2003), enquanto na soja foi conseguida na sexta geração.

O fenótipo das plantas, sob condições normais, mostrou-se similar entre as transgênicas e não-transformadas, embora o crescimento da linhagem 35S:BiP-4 seja inferior ao das plantas não-transformadas (WT). Esse resultado é contrastante ao obtido em plantas de *Nicotiana tabacum* superexpressando BiP obtido por Leborgne et al. (1999), em que as plantas não diferiram entre si; e por Alvim et al. (2001), em que as plantas transgênicas apresentaram altura superior.

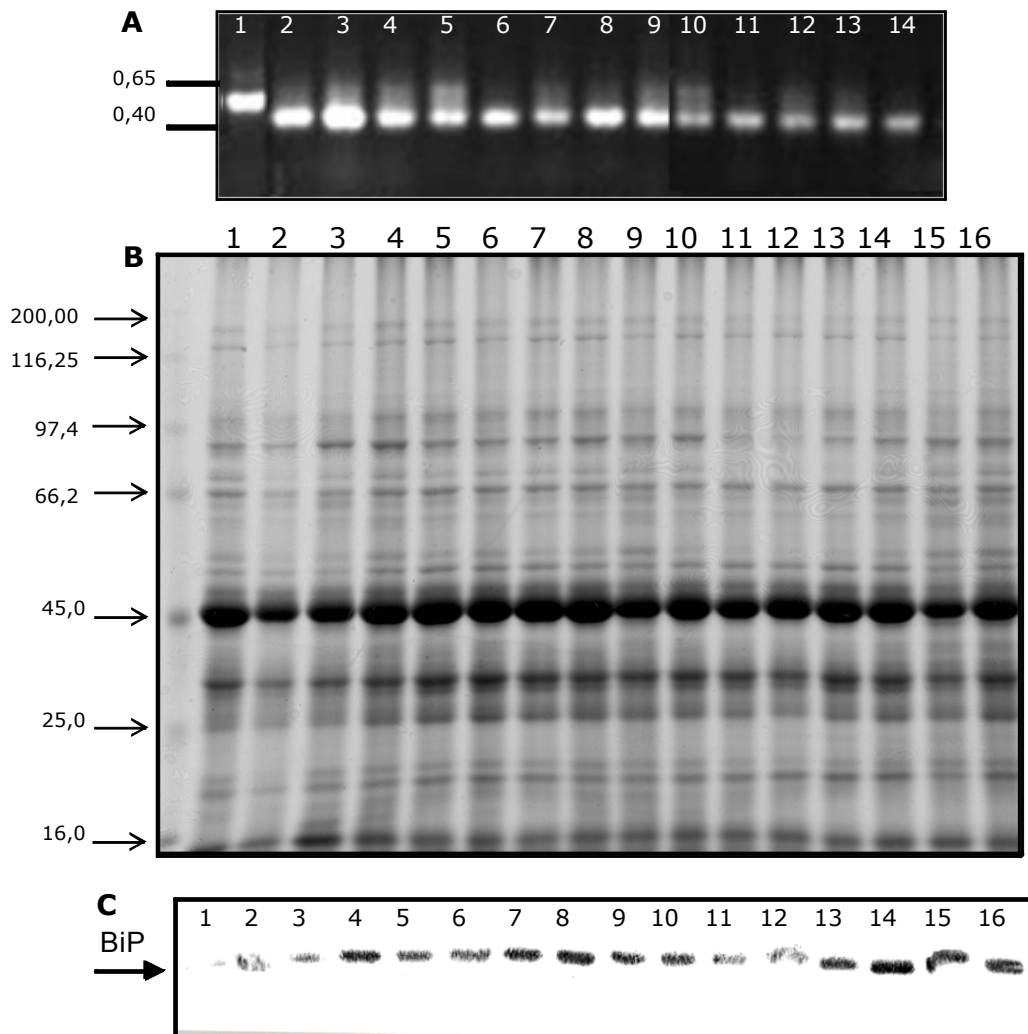


Figura 7 - Obtenção de plantas transgênicas de soja em homozigose.

A. Incorporação do transgene. A incorporação do gene *soyBiPD* exógeno foi analisada por PCR a partir de DNA genômico de folhas de soja, usando-se oligonucleotídeos específicos. A canaleta 1 refere-se à planta não transformada (WT) e as canaletas 2 a 14, a plantas da linhagem de soja T6 35S:BiP-4.17.6.14. Os tamanhos indicados à esquerda estão em kb.

B. SDS-PAGE. Proteínas totais foram extraídas, quantificadas e separadas por SDS-PAGE na seguinte ordem: 1-WT, 2 a 16 correspondem, respectivamente, às diferentes plantas da linhagem T6 35S:BiP-4.17.6.14. M corresponde ao padrão de massa molecular, em kDa.

C. Nível da proteína BiP nas linhagens transgênicas. O acúmulo de BiP foi monitorado por *immunoblotting*. Após a corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose e incubadas com anticorpo anti-BiP. A ordem dos extratos protéicos corresponde à descrita em B.

5. CONCLUSÃO

A avaliação da superexpressão de BiP em plantas de soja da variedade ‘Conquista’, de interesse econômico, foi conduzida nas gerações T3 a T6 das plantas transformadas com o gene *soyBiPD*, e a homozigose foi obtida na linhagem 35S:BiP-4 na geração T6, linhagem que apresentou uma taxa superior de expressão do transgene desde a primeira avaliação. As demais linhagens permanecem segregando, entretanto a linhagem 35S:BiP-5 que inicialmente teve elevado nível de segregação, com menor taxa de plantas superexpressando BiP, mostrou-se mais promissora nas últimas análises, com maiores taxas de superexpressão do gene exógeno. O transgene expresso foi corretamente localizado na fração microsomal das células de folhas das linhagens transgênicas, e o papel da proteína BiP pode ser assim investigado em plantas transgênicas de soja. A localização do gene exógeno no retículo endoplasmático será confirmada por imunolocalização, e o número de cópias do transgene será determinado por *Southern-blotting*. Células em suspensão da linhagem 35S:BiP-4 e de plantas-controle foram obtidas e serão usadas como ferramentas em estudos posteriores.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDER, N.N.; SHEN, Y., BRODSKY, J.L. HEDERSHOT, L.M. JOHNSON, A.E. The molecular mechanisms underlying BiP-mediated gating of the Sec61 translocon of the endoplasmic reticulum. **The Journal of Cell Biology**, v. 168, p. 389-399, 2005.
- ALVIM F.C.; CAROLINO, S.M.B.; CASCARDO, J.C.M.; NUNES, C.C.; MARTINEZ, C.A.; OTONI, W.C.; FONTES, E.P.B. Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. **Plant Physiology**, v. 126, p. 1042-1054, 2001.
- ALVIM, F.C. **Estudos funcionais de BiP em plantas transgênicas de nicotiana tabacum**. Viçosa, MG: UFV, Impr. Univ., 2000. 53f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- ARAGÃO, F.J.L.; SAROKIN, L.; VIANNA, G.R.; RECH, E.L. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) plants at high frequency. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, p. 1-6, 2000.
- 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).
- BAUDOIN, E.; CHARPENTEAU, M.; ROBY, D.; MARCO, Y.; RANJEVA, R.; RANTY, B. Functional expression of a tobacco gene related to the serine hydrolase

- family-esterase activity towards short-chain dinitrophenyl acylesters. **European Journal of Biochemistry**, v. 248, p.700-706, 1997.
- BERLOTTI, A.; ZHANG, Y.; HENDERSHOT, L.M.; HARDING, H.P.; RON, D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. **Nature Cell Biology**, v. 2, p. 326-332, 2000.
- BLOND-ELGUINDI, S.; CWIRLA, S.E.; DOWER, W.J.; LIPSHUTZ,, R.J., SPRANG, S.R., SAMBOOK, J.F., GETHING, M.J. Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveal the binding specificity of BiP. **Cell**, v. 75, p. 717-728, 1993.
- BORGES, J.C.; PEROTO, M.C.; RAMOS, C.H.I. Molecular chaperone genes in the sugarcane expressed sequence database (SUCEST). **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, p. 85-92, 2001.
- BOSTON, R.S.; VIITANEN, P.V. AND VIERLING, E. Molecular chaperones and protein folding in plants. **Plant Molecular Biology**, v. 2, p.191-222, 1996.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.171, p.248-254, 1976.
- BRAY, E.A. Classification of genes differentially expressed during water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: an analysis using microarray and differential expression data. **Annals of Botany**, v. 89, p. 803-811, 2002.
- BRAY, E.A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology**, v.103, p.1035-1040, 1993.

- BRECKENRIDGE, D.G., STOJANOVIC, M., MARCELLUS, R.C., AND SHORE, G.C. Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. **The Journal of Cell Biology**, v. 160, p. 1115-1127, 2003.
- BUCHANAN, C.D., LIM, S., SALZMAN, R.A., KAGIAMPAKIS, I., MORISHIGE, D.T., WEERS, B.D., KLEIN, R.R., PRATT, L.H., CORDONNIER-PRATT, M.M., KLEIN, P.E., MULLET, J.E. Sorghum bicolor's transcriptome response to dehydration, high salinity and ABA. **Plant Molecular Biology**, v. 58, p. 699-720, 2005.
- BUKAU, B.; HORWICH, A.L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. **The Cell**, v. 92, p. 351-366, 1998.
- CAGLIARI, T.C.; TIROLI, A.O.; BORGES, J.C.; RAMOS, C.H.I. Identification and *in silico* expression pattern analysis of Eucalyptus expressed sequencing tags (ESTs) encoding molecular chaperones. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, p. 520-528, 2005.
- CAROLINO, S.M.B. **Caracterização funcional da proteína BiP de soja induzida por estresse osmótico e déficit hídrico**. Viçosa, MG:UFV Impr. Univ., 2001. 77f. Dissertação (Doutorado em Fisiologia Vegetal)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- CAROLINO, S.M.B.; VAEZ, J.R.; IRSIGLER, A.S.T.; VALENTE, M.A.S.; RODRIGUES, L.A.Z.; FONTES, E.P.B. Plant BiP gene family: differential expression, stress induction and protective role against physiological stresses. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 15, p. 59-66, 2003.

- CASCARDO, J.C.; ALMEIDA, R.S.; BUZELI, R.A.; CAROLINO, S.M.; OTONI, W.C.; FONTES, E.P. The phosphorylation state and expression of soybean BiP isoforms are differentially regulated following abiotic stresses. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 12, p. 14494-14500, 2000.
- CASCARDO, J.C.M.; BUZELI, R.A.A.; ALMEIDA, R.S.; OTONI, W.C.; FONTES, E.P.B. Differential expression of the soybean BiP gene family. **Plant Science**, v. 160, p. 273-281, 2001.
- CATTIVELLI, L., BALDI, P., CROSATTI, C., DI FONZO, N., FACCIOLI, P., GROSSI, M., MASTRANGELO, A.M., PECCHIONI, N., STANCA, A.M., Chromosome regions and stress-related sequences involved in resistance to abiotic stress in Triticeae. **Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 649-665, 2002.
- CATTIVELLI, L.; RIZZA, F.; BADECK, F.; MAZZUCOTELLI, E.; MASTRANGELO, A.M.; FRANZIA, E.; MARE, C.; TONDELLI, A.; STANCA, M. Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. **Field Crops Research**, v. 105, p. 1-14, 2008.
- CHAVES, M.M.; MAROCO, J.P.; PEREIRA, J.S. Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, v. 30, p. 239-264, 2003.
- COMPANHIA NACIONAL DO ABASTECIMENTO. Indicadores agropecuários. <http://www.conab.gov.br> (24 fev. 2003).
- COSTA, M.D.L.; REIS, P.A.B.; VALENTE, M.A.S.; IRSIGLER, A.S.T.; CARVALHO C.M.; LOUREIRO, M.E. ; ARAGAO, F.J.L.; BOSTON, R.S.; FIETTO, L.G. ; FONTES, E.P.B. A new branch of endoplasmic reticulum-stress

signaling and the osmotic signal converge on plant specific asparagine-rich proteins to promote cell death. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 20209-20219, 2008.

CREDLE, J.J.; FINER-MOORE, J.S.; PAPA, F.R.; STROUD, R.M.; WALTER, P. On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 102, p. 18773-18784, 2005.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant DNA miniprep: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 1, p. 19-21, 1983.

DENECKE, J. Soluble endoplasmic reticulum resident proteins and their function in protein synthesis and transport. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 34, p.197-205, 1996.

DENECKE, J.; GOLDMAN, M.H.; DEMOLDER, J.; SEURINCK, J.; BOTTERMAN, J. The tobacco luminal binding protein is encoded by a multigene family. **Plant Cell**, v. 3, p. 1025-1035, 1991.

FAO. **Statistical databases:** Faostat> agriculture. [http:// www.fao.org](http://www.fao.org). (01 Mar. 2003).

FIETTO, L.G.; COSTA, M.D.L.; CRUZ, D. C.; SOUZA, A.A.; MACHADO, M.A.; FONTES, E.P.B. Identification and in silico analysis of the Citrus HSP70 molecular chaperone gene family **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n.º 3, p.881-887, 2007.

FIGUEIREDO J.E.F.; CASCARDO, J.C.M.; CAROLINO, S.M.B.; ALVIM, F.; FONTES, E.P.B. Water-stress regulation and molecular analysis of the soybean BiP gene family. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 9, p. 103-110, 1997.

- FISCHER, R.A., WOOD, J.T.. Drought resistance in spring wheat cultivars. iii. yield association with morpho-physiological traits. **Journal of Agricultural Research**., v. 30, p. 1001-1020, 1979.
- FONTES, E.P.B.; CARLOS, C.J.; CAROLINO, S.M.B.; FIGUEIREDO, J.E.F.; BATISTA, D.P.O. A soybean BiP (Binding Protein) homolog is temporally regulated in soybean seeds and associates detectably with normal storage proteins in vitro. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, p. 305-312, 1996.
- FONTES, E.P.B.; SHANK, B.B.; WROBEL, R.L.; MOOSE, S.P.; OBRIAN, G.; BOSTON, R.S. Characterization of an immunoglobulin binding protein in the maize floury-2 mutant. **Plant Cell**, v. 3, p. 483-496, 1991.
- FOYER, C.H. Prospects for enhancement of the soluble antioxidants, ascorbate and glutathione, **Biofactors**, v. 15, p. 75-78, 2001.
- GETHING, M.J. Role and regulation of the ER chaperone BiP. **Developmental Biology**, v 10, p. 465-472, 1999.
- GETHING, M.J.; SAMBROOK, J. Protein Folding in the Cell. **Nature**, v. 355, p. 33-45, 1992.
- GÖRG, A.; POSTEL, W.; GUNTHER, S. Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 9, p.531-546, 1988.
- GÜLOW, K.; BIENERT, D.; HAAS, I.G. BiP is feed-back regulated by control of protein translation efficiency. **Journal of Cell Science**, v. 115, p. 2443-2452, 2002.
- GUY, C.L. AND LI, Q.B. The organization and evolution of the spinach stress 70 molecular chaperone gene family. **Plant Cell**, v. 10, p. 539-556, 1998.

- HAAS, I.G.; MEO, T. cDNA cloning of the immunoglobulin heavy chain binding protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.85, p. 2250-2254, 1988.
- HAIGH, N.G.; JOHNSON, A.E. A new role for BiP: closing the aqueous translocon pore during protein integration into the ER membrane. **Cell Biology**, v. 156, p. 261-270, 2002.
- HAMMAN, B.D.; HENDERSHOT, L.M.; JOHNSON, A.E. BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. **The Cell**, v. 92, p. 747-758, 1998.
- HAMMOND, C.; HELENIUS, A. Quality control in the secretory pathway. **Current Opinion in Cell Biology**, v.7, p.523-529, 1995.
- HAMPTON, R.Y., 2002. ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 14, p. 476-482, 2002.
- HARDING, H.P.; CALFON, M.;URANO, F.; NOVOA, I. TON, K. Transcriptional and translational control in the mammalian unfolded protein. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 18, p. 575-599, 2002.
- HARDING, H.P.; ZHANG, I.; RON, D. Protein translational and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-residence kinase. **Nature**, v. 397, p.271-274. 1999.
- HARDING, H.P.; ZHANG, Y.; ZENG, H.; ZENG, H.; RON, D. *Perk* is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. **Molecular Cell**, v. 5, p. 897-904. 2000.

- HASEGAWA P.M.; BRESSAN, R.A.; ZHU, J.K.; BOHNERT, H.J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular**, v. 51 p. 463-499, 2000.
- HAZE, K., H. YOSHIDA, H. YANAGI, T. YURA, AND K. MORI. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. **Molecular Biology of the Cell**, v. 10, p.3787-3799, 1999.
- HAZEN, S.P.; PATHAN, M.S.; SANCHEZ, A.; BAXTER, I.; DUNN, M.; ESTES, B.; CHANG, H.S.; ZHU, T.; KREPS, J.A.; NGUYEN, H.T. Expression profiling of rice segregating for drought tolerance QTLs using a rice genome array. **Functional & Integrative Genomics**, v. 5, p. 104–116, 2005.
- HENDERSHOT, L.M.; WEI, J.; GAUT, J.; MELNICK, J.; AVIEL, S. ARGON, Y. Inhibition of immunoglobulin folding and secretion by dominant negative BiP ATPase mutants. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 93, p. 5269-5274, 1996.
- HOLLIEN, J.; WEISSMAN, J.S.. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. **Science**, v. 313, p. 104-107, 2006.
- HOLLUNG, K.; ESPELUND, M.; SCHOU, K.; JAKOBSEN, K.S. Developmental, stress and ABA modulation of mRNA levels for bZIP transcription factors and Vp1 in barley embryos and embryo-derived suspension cultures. **Plant Molecular Biology**, v. 35, p. 561-571, 1997.

- HURTLEY, S. M; BOLE, D.G. HOOVER-LITTY, H.; HELENIUS, A.; COPELAND, C.S. Interactions of misfolded influenza virus hemagglutinin with binding protein (BiP). **The Journal of Cell Biology**, v. 108. p. 21117-2126, 1989.
- INGRAM, J.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 47, p. 377-403, 1996.
- IRSIGLER, A.S.T.; COSTA, M.D.L.; ZHANG, P.; REIS, P.A.B.; DEWEY, R.E.; BOSTON, R.S.; FONTES, E.P.B. Expression profiling on soybean leaves reveals integration of ER- and osmotic-stress pathway. **BMC Genomics**, v. 8, p. 431-446, 2007.
- IWATA, Y., AND KOIZUMI, N. An Arabidopsis transcription factor, AtbZIP60, regulates the endoplasmic reticulum stress response in a manner unique to plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 102, p. 5280-5285, 2005.
- IWATA, Y., KOIZUMI, N. Unfolded protein response followed by induction of cell death in cultured tobacco cells treated with tunicamycin. **Planta**, v. 220, p. 804-807, 2005.
- JALEEL, C.A.; GOPI, R.; MANIVANNAN, P.; KISHOREKUMAR, A.; SANKAR, B.; PANNEERSELVAM, R Paclobutrazol influences vegetative growth and floral characteristics of *Catharanthus roseus* (L.) G. **Journal of Applied and Pure Biology**, v.21, p. 369-372, 2006.
- JALEEL, C.A.; MANIVANNAN, P.; KISHOREKUMAR, A.; SANKAR, B.; GOPI, R.; SOMASUNDARAM, R.; PANNEERSELVAM, R. Alterations in osmoregulation, antioxidant enzymes and indole alkaloid levels in *Catharanthus*

- roseus* exposed to water deficit. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 59, p. 150-157, 2007.
- JIANG, J., PRASAD, K., LAFER, E.M., AND SOUSA, R. Structural Basis of Interdomain Communication in the Hsc70 Chaperone. **Molecular Cell**, v. 20, p. 513-524, 2005.
- KAMAUCHI, S., NAKATANI, H., NAKANO, C., AND URADE, R. Gene expression in response to endoplasmic reticulum stress in *Arabidopsis thaliana*. **The FEBS Journal**, v. 272, p. 3461-3476, 2005.
- KARAMANOS, A.J., PAPTAEHARI, A.Y., Assessment of drought resistance of crop genotypes by means of the Water Potential Index. **Crop Science**, v. 39, p. 1792-1797, 1999.
- KAUFMAN, R.J.; SCHEUNER, D.; SCHRODER, M.; SHEN, X.; LEE, K.; LIU, C.Y. ARNOLD, S.M. The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiations. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, p. 411-421, 2002.
- KIMATA, Y.D.; OIKAWA, Y.; SHIMIZU, Y.; ISHIWATA-KIMATA, KOHNO, K. A role for BiP as an adjustor for the endoplasmic reticulum stress-sensing protein Ire1. **The Journal of Cell Biology**, v. 167, p. 445-456, 2004.
- KIMATA, Y.; KIMATA, Y.I.; SHIMIZU, Y.; ABE, H.; FARCASANU, I.C.; TAKEUCHI, M., ROSE, M.D.; KOHNO, K. Genetic evidence for a role of BiP/Kar 2 that regulates Ire 1 in response to accumulation of unfolded protein. **Molecular Biology Cell**, v. 14 , p. 2559-2569, 2003.

- KIZIS, D., PAGES, M. Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in rab17 regulation through the drought-responsive element in an ABA-dependent pathway. **Plant Journal**, v. 30, p. 679–689, 2002.
- KNARR, G.; GETHING, M.J.; MODROW, S.; BUCHNER, J. BiP-binding sequences in antibodies. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 270, n.º 46, p. 27589-27594, 1995.
- KNARR, G.; KIES, U.; BELL, S.; MAYER, M. Interaction of the chaperone BiP with an antibody domain: implications for the chaperone cycle. **Journal of Molecular Biology**, v. 318, p. 611-620, 2002.
- KOIZUMI, N., MARTÍNEZ, I.M., KIMATA, Y., KOHNO, K., SANO, H., AND CHRISPPEELS, M.J. Molecular characterization of two Arabidopsis Ire1 homologs, endoplasmic reticulum-located transmembrane protein kinases. **Plant Physiology**, v. 127, p. 949-962, 2001.
- KOLLIPARA, K.P., SAAB, I.N., WYCH, R.D., LAUER, M.J., SINGLETARY, G.W., Expression profiling of reciprocal maize hybrids divergent for cold germination and desiccation tolerance. **Plant Physiology**, v. 129, p. 974–992, 2002.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, n. 227, p.680-685, 1970.
- LEBORGNE-CASTEL, N.; EDITH P. W. M. JELITTO-VAN DOOREN, E.P.W.M.J.; CROFTS, A.J.; DENECKE, J. Overexpression of BiP in Tobacco Alleviates Endoplasmic Reticulum Stress. **The Plant Cell**, v. 11, p. 459-469, 1999.
- LEE, A.S. The ER chaperone and signaling regulator GRP/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. **Methods**, v. 35, p. 373-381, 2005.

- LI, X.P., TAIN, A.G., LUO, G.Z., GONG, Z.Z., ZHANG, J.S., CHAN, S.Y. Soybean DRE-binding transcription factors that are responsive to abiotic stresses. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 110, p.1355–1362, 2005.
- LIU, J.; SRIVASTAVA, R.; CHE, P.; HOWELL, S. H. An Endoplasmic Reticulum Stress Response in Arabidopsis Is Mediated by Proteolytic Processing and Nuclear Relocation of a Membrane-Associated Transcription Factor, bZIP28. **The Plant Cell**, v. 19, p 4111–4119, 2007.
- LIU, S.Y.; KAUFMAN, R.J. The unfolded protein response. **Cell Science**, v. 116, p. 1861-1862, 2003.
- Ma, Y.; Hendershot, L.M. ER chaperone functions during normal and stress conditions. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 28, p. 51-65, 2004.
- Ma, Y.; HENDERSHOT, L.M. The unfolded tale of the unfolded protein response. **The Cell**, v. 107, p.827-830, 2001.
- MARE`, C., MAZZUCOTELLI, E., CROSATTI, C., FRANZIA, E., STANCA, A.M., CATTIVELLI, L. Hv-WRKY38: a new transcription factor involved in cold- and drought-response in barley. **Plant Molecular Biology**, v. 55, 399-416, 2004.
- MARTINEZ, I.M., CHRISPPEELS, M.J. Genomic analysis of the unfolded protein response in Arabidopsis shows its connection to important cellular processes. **Plant Cell**, v. 15, p. 561–576, 2003.
- McKAY, D.B. Structure and mechanism of 70-kDA heat-shock-related proteins. **Advances in Protein Chemistry**, v. 44, p. 67-80. 1993.

- MOLINARI, M.; GALILI, C., PICCALUGA, V.; PIEREN, M.; PAGANETTI, P.
Sequential assistance of molecular chaperones and transient formation of covalent
complexes during protein degradation from the ER. **The Journal of Cell Biology**,
v. 158 (2), p. 247-257, 2002.
- NAKAGAWA, H.; OHMIYA, K.; HATTORI, T. A rice bZIP protein, designated
OSBZ8, is rapidly induced by abscisic acid. **Plant Journal**, v. 9, p. 217-227, 1996.
- Ni, M.; LEE, A.S. ER chaperones in mammalian development and human diseases.
The **FEBS Letters**, v. 581, p. 3641-3651, 2007.
- NISHITOH, H.; MATSUZAWA, A.; TOBIUME, K.; SAEGUSA, K.; TAKADE, K.;
INOUE, K.; HORI, S.; KAKIZUKA, A.; ICHIJO, H.. ASK1 is essential for
endoplasmatic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded
polyglutamine repeats. **Genes and Development**, v. 16, p. 1345-1355, 2002.
- ODA Y.; HOSOKAWA N.; WADA I.; NAGATA K. EDEM as an acceptor of
terminally misfolded glycoproteins released from calnexin. **Science**, v. 299,
p.1394-1397, 2003.
- OKADA, T.; HAZE, K.; NADANAKA, S.; YOSHIDA, H.; SEIDAH, N.G.; HIRANO,
Y.; SATO, R.; NEGHISI, M.; MORI, K.. A serine protease inhibitor prevents
endoplasmatic reticulum stress-induced cleavage but not transport of the
membrane-bound transcription factor ATF6. **The Journal of Biological
Chemistry**, v. 278, p. 31024-31032, 2003.
- OKUSHIMA, Y., KOIZUMI, N., YAMAGUCHI, Y., KIMATA, Y., KOHNO, K.,
AND SANO, H. Isolation and characterization of a putative transducer of

- endoplasmic reticulum stress in *Oryza sativa*. **Plant Cell Physiology**, v. 43, p. 532-539, 2002.
- PATIL, C.; WALTER, P. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 13, p. 349-355, 2001.
- PILON M.; SHECHEKMAN R. Protein translocation: how Hsp 70 pulss it off. **The Cell**, v. 7, p. 679-682, 1999.
- PONTIER, D.; TRONCHET, M.; ROGOWSKY, P.; LAM, E.; ROBY, D. Activation of hsr203, a plant gene expressed during incompatible plant-pathogen interactions, is correlated with programmed cell death. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 11, p.544-554, 1998.
- RAMANJULU, S.; BARTELS, D. Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, p.141–151, 2002.
- REDDY, A.R.; CHIATANYA, K.V ; VIVEKANANDAN, M. Drought induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **The Journal of Plant Physiology**, v. 161, p. 1189-1202, 2004.
- RIPP, K.G.; VIITANEN, P.B.; HITZ, W.D.L. Identification of a membrane protein associated with sucrose transport into cells of developing soybean cotyledons. **Plant Physiology**, v. 88, n.º 5, p. 1435-1445, 1988.
- SANDERS, S.I.; WHITFIELD, K.M.; VOGEL, J.P.; ROSE, M.D.; SCHCKMAN, R.W. Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER. **Cell**, v. 69, p. 353-365, 1992.

- SCORRANO, L; OAKES, S.A.; OPFERMAN, J. T.; CHENG, E.H.; SORCINELLI, M.D.; TULLIO POZZAN, T.; KORSMEYER, S. J. BAX and BAK Regulation of Endoplasmic Reticulum Ca²⁺: A Control Point for Apoptosis. **Science**, v. 300 (5616), p. 135, 2003.
- SEKI, M.; KAMEI, A.; YAHMAGUCHI-S SHINOZAKI., K.; SINHOZAKI, K. Molecular responses to drought, salinitu and frost: common and different paths for plant protection. **Current Opinion in Biotechnology**, v.14, p. 194-199, 2003.
- SERRAJ, R., SINCLAIR, T.R. Osmolyte accumulation: can it really increase crop yield under drought conditions? **Plant Cell Environment**, v. 25, p. 333–341, 2002.
- SHAO, H.B.; CHU, L.Y.; JALEEL, C.A.; ZHAO, C.X. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants **Campts Rendus Biologies**, v. 331, p. 215-225, 2008.
- SHAO, H.B.; CHU, L.Y.; ZHAO, C.X.; GUO, Q.J.; LIU, J.-M. X.A. Ribaut, Plant gene regulatory network system under abiotic stress, **Acta Biol Sezeged**, v. 50, p.1-9, 2006.
- SHEN, J.; CHEN, X. HENDERSHOT, L., PRYWES, R. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization. **Developmental Cell.**, v. 3, p. 99-111, 2002.
- SHEN, Y.G., ZHANG, W.K., HE, S.J., ZHANG, J.S., LIU, Q., CHEN, S.Y. An EREBP/AP2-type protein in *Triticum aestivum* was a DRE-binding transcrAiption factor induced by cold, dehydration and ABA stress. **Theoretical and pplied Genetics.**, v. 106, p. 923-930, 2003.

- SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SEKI, M. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 410-407, 2003.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. GENE EXPRESSION AND SIGNAL TRANSDUCTION IN WATER STRESS RESPONSE. **Plant Physiology**, v. 115, p. 327-334, 1997.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K: Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, p. 217-223, 2000.
- SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to drought stress. In: Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants. **Biotechnology Intelligence Unit**, R.G. Landes Company, Austin, Texas, USA. 1999.
- SKOWRONEK, M. H., HENDERSHOT, L. M. and HAAS, I.G. The variable domain of nonassembled Ig light chains determines both their half-life and binding to the chaperone BiP. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 95, p. 1974-1578, 1998.
- SNOWDEN, C.J.; LEBORGNE-CASTEL, N.; WOOTTON, L.J.; HALINGTON, J.L.; DENECKE, J. *In vivo* analysis of the luminal binding protein (BiP) reveals multiple functions of its ATPase domain. **The Plant Journal**, v.52, p. 987-1000, 2007.
- SUNG, D.Y.; KAPLAN, F. and GUY, C.L. Plant Hsp70 molecular chaperones: Protein structure, gene family, expression and function. **Physiologia Plantarum**, v. 113, p. 443-451, 2001a.

- SUNG, D.Y.; VIERLING, E. AND GUY, C.L. Comprehensive expression profile analysis of the Arabidopsis Hsp70 gene family. **Plant Physiology**, v. 126 p. 789-800, 2001b.
- THOMASHOW, M.F. Annu. Rev. Plant Physiol. **Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 571-599, 1999.
- TUBEROSA, R.; SALVI, S. Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. **Trends in Plant Science**, v. 11, p. 405–412, 2006.
- UMEZAWA, T.; FUJITA, M.; FUJITA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, p. 113-122, 2006.
- URADE, R. Cellular response to unfolded proteins in the endoplasmic reticulum of plants. **The FEBS Journal**, v. 274, p. 1152-1171, 2007.
- VAEZ, J.R. **Tolerância ao estresse hídrico mediada pela proteína BiP de soja em plantas transgênicas de tabaco**. Viçosa, MG: UFV, Impr. Univ., 2003. 60f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- VIERLING, E. The roles of heat shock proteins in plants. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.**, 42:579-620, 1991.
- VITALE, A.; DENECKE, J. The endoplasmic reticulum-gateway of the secretory pathway. **The Plant Cell**, v. 11, p. 615-628, 1999.

- VOELTZ, G.K.; ROLLS, M.M.; RAPOPORT, T.A. Structural organization of the endoplasmatic reticulum. **EMBO Reports**, v.3, n.º10, p.944-950, 2002.
- VOGEL, J.P., MISRA, L.M. ROSE, M.D. Loss of BiP/GRP78 function blocks translocation of secretory proteins in yeast. **The Journal of Cell Biology**, v.110, p. 1885-1895, 1990.
- WATANABE, N.; LAM, E. BAX Inhibitor-1 Modulates Endoplasmic Reticulum Stress-mediated Programmed Cell Death in *Arabidopsis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.283, p.3200-3210, 2008.
- WROBEL, R.L.; O'BRIAN, G.R.; BOSTON, R.S. Comparative analysis of BiP gene expression in maize endosperm. **Gene**, v. 204, p.105-113, 1997.
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K; SHINOZAKI, K. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. **Trends in Plant Science**, v. 10, p. 88-94, 2005.
- YANJUN, M; HENDERSHOT, L. M. ER chaperone functions during normal and estresse conditions. **Journal of Chemistry Neuroanatomy**, p. 1-13, 2003.
- YONEDA, T.; IMAIZUMI, K.; OONO, K.; YUI, D. GOMI, F.; KATAYAMA, T.; TOHIAMA, M. Activation of caspase-12, an endoplasmatic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor – depended mechanism in response to the ER stress. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 13935-13940, 2001.
- YOSHIDA, H.; OKADA, T.; HAZE, K.; YANAGI, H.; YURA, T.; NEGISHI, M.; MORI, K.. ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF- κ B (CBF)

directly to the *cis*-acting element responsible for the mammalian protein response.

Molecular Cell Biology, v. 20, p. 6755-6767, 1988.

ZHOU, J., C.Y. LIU, S.H. BACK, R.L. CLARK, D. PEISACH, Z. XU, AND R.J. KAUFMAN. The crystal structure of human IRE1 luminal domain reveals a conserved dimerization interface required for activation of the unfolded protein response. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 103, p. 14343-14348, 2006.

ZHU, J.K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 247-273, 2002.

ZHU, X., ZHAO, X., BURKHOLDER, W.F., GRAGEROV, A., OGATA, C.M., GOTTESMAN, M.E., AND HENDRICKSON, W.A. Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. **Science**, v. 272, p.1606-1614, 1996.

7. APÊNDICE

7.1. Tabela de conversão para uso em publicações de artigos:

Nomenclatura Usada no Laboratório	Nomenclatura Usada em Publicações
35S:BiPA6	35S:BiP-1
35S:BiPA8	35S:BiP-2
35S:BiPC5	35S:BiP3
35S:BiPC9	35S:BiP-4
35S:BiPH8	35S:BiP-5
35S:BiPB	35S:BiP-6

CAPÍTULO II

BINDING PROTEIN MEDIATES AN APPARENT INCREASE IN DROUGHT TOLERANCE BY DELAYING LEAF SENESCENCE

Maria Anete S. Valente¹, Jerusa A. Q. A. Faria¹, Pedro A. B. Reis¹, Guilherme L. Pinheiro¹, Newton D. Piovesan¹, Angélica T. Morais², Carlos C. Menezes³, Marco A. O. Cano⁴, Marcelo E. Loureiro⁴, Francisco J. L. Aragão², Elizabeth P. B. Fontes¹

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, 36571.000, Viçosa, MG, Brazil. ²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB W5 Norte, 70770-900, Brasília, DF, Brazil. ³Universidade de Rio Verde, Fazenda Fontes do Saber, 75901-970, Rio Verde, GO, Brazil. ⁴Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, 36571.000, Viçosa, MG, Brazil.

Running title: BiP overexpression delays drought-induced leaf senescence

1. ABSTRACT

Despite extensive studies about the protective function of the ER-resident molecular chaperone BiP (binding protein) in animal systems, information about BiP-mediated protection in plants against environmental aggressors is lacking. We have previously demonstrated that BiP confers tolerance to drought in the plant model system *N. tabacum*. Here we further examined the mechanism by which BiP mediates stress tolerance and we showed that BiP-overexpressing soybean lines displayed an enhanced tolerance to drought as well. The transgenic lines kept shoot turgidity, retained photosynthesis activity during drought and displayed a higher recovery rate after rewatering as compared to wild type. The apparent increase in drought tolerance mediated by BiP was neither associated with typical short-term and long-term avoidance responses nor with tolerance responses. In fact, overexpression of BiP did not affect stomatal regulation or root growth dynamics under restricted water regimes and the accumulation of osmolites and drought-induced transcripts in overexpressing lines were lower than in wild type plants during drought. Nevertheless, BiP overexpression delayed drought-induced leaf senescence in both tobacco and soybean transgenic lines resembling the drought tolerance phenotype that results from suppression in leaf senescence. Under drought, the extents of chlorophyll loss, reduction in protein content, lipid peroxidation and induction of senescence-associated genes in overexpressing lines were significantly lower than in wild type lines. Furthermore, a higher sensitivity of BiP antisense lines to drought was correlated with accelerated drought-induced senescence. Collectively, these results suggest that a delay in leaf senescence in overexpressing lines may account for the BiP-mediated drought tolerance.

2. INTRODUCTION

Due to their sessile nature, plants under natural conditions are continually subject to environmental stress conditions that adversely affect growth and productivity. As consequence, they evolved a variety of adaptive and molecular responses to cope with abiotic stresses. These responses imply in sophisticated mechanisms for sensing variations in growth conditions with the subsequent activation of signaling cascades that lead to the induction of stress-responsive genes and consequent biochemical and physiological adaptation. Water deficit is among the major environmental limitations to crop productivity and distribution worldwide. Different strategies to increase water stress tolerance in plants have been undertaken by reprogramming the expression of stress-related genes involved in biochemical pathways or signaling cascades (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007). In general, strategies targeting expression of transcription factors and other regulatory genes have been effective by the consequent up-regulation of many downstream genes (Kasuga et al., 1999; Hsieh et al., 2002; Hu et al., 2006; Umezawa et al., 2007). Nevertheless, engineered overexpression of a single downstream target, such as biosynthetic enzymes for osmoprotectants, enzymes of the antioxidant system, late embryogenesis abundant (LEA) proteins, and molecular chaperones, has also been shown to increase water deficit tolerance in plant model systems (Gupta et al., 1993; Wehmeyer and Vierling, 2000; Rodrigues et al., 2006; Ashraf and Foolad, 2007). Accordingly, the endoplasmic reticulum (ER)-resident molecular chaperone BiP (binding protein) has been shown to confer drought tolerance when constitutively overexpressed in *N. tabacum* (Alvim et al., 2001). However, the underlying mechanism for BiP-mediated increases in water stress tolerance and the

effectiveness of this strategy on economically relevant crops are unknown and constitute the major focus of the present investigation.

As a molecular chaperone, BiP assists the folding of secretory proteins as they enter the lumen of ER and also acts in the quality control mechanism that recognizes and disposes abnormally folded proteins from the organelle (Ma and Hendershot, 2004). Conditions that promote accumulation of malfolded proteins in the ER activate a protective signaling cascade, designated unfolded protein response (UPR), that allows the ER processing and folding capacities to be balanced with the cell secretory activity (Malhotra and Kaufman, 2007). BiP also plays a major role as an indirect sensor of alterations in the ER homeostasis by regulating the activity of the UPR proximal transducers, PERK, URE1 and ATF6, as described in mammalian cells (Malhotra and Kaufman, 2007). The BiP regulatory function along with its chaperone activity may underlie its protective properties against abiotic stresses. In fact, overexpression of BiP in mammalian cultured cells (Morris et al., 1997) and tobacco protoplasts (Leborgne-Castel et al., 1999) increases cell tolerance to ER stress. Furthermore, antisense down regulation of *BiP* mRNA has been shown to increase the sensitivity of transfected cells to ionophores (Li and Lee, 1991; Li et al., 1992) and oxidative stress (Gomer et al., 1991).

The protective role of plant BiP against abiotic stresses has also been examined at the whole plant level (Alvim et al., 2001). The effect of BiP overexpression on a typical ER stress response has been investigated using a germination/survival assay in the presence of tunicamycin, a potent activator of UPR. Transgenic seeds expressing the soybean BiP gene recover after removing tunicamycin whereas those lacking the transgene fail to germinate and eventually die (Alvim et al., 2001). Like in mammalian cells, in plants the BiP-mediated protection against ER stressors has been shown to be

due to restoration of the protein synthetic capability under ER stress conditions (Morris et al., 1997; Laitusis et al., 1999; Leborgne-Castel et al., 1999; Alvim et al., 2001). In addition to alleviating ER stress, overexpression of plant BiP has also been shown to increase tolerance of plants to water deficit (Alvim et al., 2001). Although the mechanism of BiP-mediated water stress tolerance has yet to be elucidated, antioxidative defenses were not induced in droughted transgenic leaves, suggesting that overexpression of BiP in tobacco may prevent endogenous oxidative stress. Here we demonstrate that overexpression of BiP improves the drought stress tolerance in soybean by altering the mechanisms of sensing and responding to soil drying treatments. Our results suggest that BiP mediates an apparent increase in water stress tolerance by preventing stress build-up and delaying leaf senescence.

3. MATERIAL AND METHODS

3.1. Soybean transformation

A plant expression cassette containing the *soyBiPD* gene (GeneBank accession number AF031241) was constructed by insertion of the 2.0-kb *XbaI* cDNA insert of pUFV42 (Alvim et al., 2001) into the pBS35SdAMVNOS2 vector. The resulting clone pBS35SdAMVNOS2-BiP contains the BiP cDNA under control of a duplicated cauliflower mosaic virus 35S promoter with an enhancer region from the alfalfa mosaic virus and the polyadenylation signal of the *nos* gene. The *Arabidopsis thaliana ahas* gene (that confers tolerance to the herbicide imazapyr) was removed from the vector pAC321 (Aragão et al. 2000) with *XbaI* and inserted into the vector pFACM1 to generate pFACMahas. The *BiPD* expression cassette was released with *SalI* and *NotI* from pBS35SdAMVNOS2-BiP and cloned into the vector pFACMahas to yield pahasBip. The vector pahasBip was used to transform soybean (cv. Conquista) as previously described (Aragão et al., 2000). Primary transformants were selected by PCR. Segregation analyses of independently transformed soybean lines (35S:BiP-1, 35S:BiP-2, 35S:BiP-3, 35S:BiP-4) were performed by PCR and accumulation of BiP was monitored in each subsequent generation by immunoblottings.

3.2. PCR analysis of transgenic plants

PCR was carried out on 20 ng of genomic DNA isolated from 4-week old greenhouse grown transgenic plants, using 200 nM each of BiP gene-specific primers and 5 U of Taq polymerase (Invitrogen) in a final volume of 25 μ L. The PCR reactions were conducted for 35 cycles (60 s at 95 °C, 60 s at 50 °C and 60 s at 72 °C) with a final extension at 72 °C, for 5 min. The *soyBiPD*-specific primers, bipsoy235 (5'-GAGAGACTAATTGGAGAGGCTG-3') and bipsoy645c (5'-ATAGGCAATGGCAGCAGCAGTG-3'), amplify a 410 bp sequence from the *BiPD* gene coding region and cover an intron region from genomic *BiPD* sequence.

3.3. Immunoblot analysis

Total protein was extracted from leaves of untransformed or transformed soybean plants as previously described (Cascardo et al., 2000). SDS-PAGE was carried out and the proteins were transferred from 10% SDS-polyacrylamide gels to nitrocellulose membranes by electroblotting. Immunoblot analyses were performed using polyclonal BiP antibodies prepared against a purified protein fraction from soybean seeds, at a 1:1000 dilution and a goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate (Sigma) at a 1:5000 dilution. Alkaline phosphatase activity was assayed using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (Sigma) and p-nitro blue tetrazolium (Sigma).

3.4. Isolation of microsomal fraction

The isolation of a microsomal fraction from soybean leaves was performed as described (Pirovani et al., 2002). Briefly, soybean leaves were homogenized with 25 mM Tris/HCl, pH 7.0, 250 mM sucrose, 2.5 mM dithiothreitol, 10 mM EDTA and 0.5 mM phenylmethanesulfonyl fluoride in the ratio of 1g tissue/ 5mL buffer. The homogenate was filtered and centrifuged for 15 min at 14 000 g and 4 °C. Microsomal preparations were isolated by centrifugation at 80.000 g for 50 min at 15 °C and the pellet was washed twice with 10 mM MES-KOH pH 6.8, 2.5 mM DTT, resuspended in 100 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 7.5 and stored at -80 °C.

3.5. Plant growth and water stress induction

Soybean seeds of wild type (*Glycine max* cv. Conquista) and transgenic lines were germinated in soil, transferred to 3-L pots containing a mixture of soil, sand and dung (3:1:1) and grown in greenhouse conditions under natural conditions of light, relative humidity (65–85%) and temperature (15–35 °C) and approximately equal day and night length. A slow soil drying experiment was imposed in 50% of wild type and transgenic lines at the V6 stage of development by reducing the irrigation level to 40% of the normal water supply during 18 days. After this period of drought, the plants were rewatered during two weeks. The remaining 50% of plants received normal water supply continuously. All the experiments were conducted with five clones from at least four independently transformed lines. For the fast soil drying experiment, after 30 days

of growth with normal water supply (V3 stage of development), severe drought stress was induced by withholding irrigation for one-week from one-half of 35S:BiP-A8 (T4 generation), 35S:BiP-C9 (T5 generation) and wilt type plants.

Drought experiments were also conducted using the T4 generation of transgenic control (pBI121 vector alone), transgenic sense (35S-BiPS lines), and transgenic antisense (35S-BiPAS lines) tobacco plants (Alvim et al., 2001). In this case, 2-week-old seedlings were transplanted individually to pots and grown in a growth chamber with a 12-h photoperiod at a 23 °C day/18 °C night temperature cycle, 240 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ irradiance, and a relative air humidity of 60%. After four weeks of growth with normal water supply, one half of the transgenic plants received 30% of the normal irrigation (restricted water regime) during 35 days and the remaining transgenic plants received normal water supply continuously (control).

For the PEG-induced dehydration experiment, soybean seeds from 35S:BiP-C9 and 35S:BiP-A8 transgenic lines as well as untransformed soybean seeds were germinated in MS medium (Murashige and Skoog, 1962) without and with 1% (w/v) or 2% (w/v) PEG. After 30 days, the dry weight (g) of roots were determined.

3.6. Real-time RT-PCR analysis

For quantitative RT-PCR, total RNA was extracted from frozen leaves with TRIzol (Invitrogen) according to the instructions from the manufacturer. The RNA was treated with 2 units of RNase-free DNase (Promega) and further purified through RNeasy Mini Kit (QIAGEN) columns. First-strand cDNA was synthesized from 4 μg of

total RNA using oligo-dT(18) and Transcriptase Reversa M-MLV (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions.

Real-time RT-PCR reactions were performed on an ABI7500 instrument (Applied Biosystems), using SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). The amplification reactions were performed as follows: 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C, and 40 cycles of 94 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. To confirm the primer quality and specificity, we verified the size of the amplification products after electrophoresis through a 1.5% agarose gel, and analyzed the T_m (melting temperature) of amplification products in a dissociation curve, performed by the ABI7500 instrument. The primers used are listed in Table I. For quantitation of gene expression in soybean leaves, we used RNA helicase (Isrgler et al., 2007) as the endogenous control gene for data normalization in real-time RT-PCR analysis. For quantitation of gene expression in tobacco leaves, we used actin as a control gene.

Fold variation, which is based on the comparison of the target gene expression (normalized to the endogenous control) between experimental and control samples, was quantified using the comparative Ct method: $2^{-(\Delta Ct_{\text{Treatment}} - \Delta Ct_{\text{Control}})}$. Absolute gene expression was quantified using the $2^{-\Delta CT}$ method and values were normalized to the endogenous control.

Table I. Genes analyzed and primers for qRT-PCR

Clone description	Clone accession	Forward primer	Reverse primer
Calnexin	AW508066	TGATGGGGAGGAGAAGAAAAGGC	CACTGGGTTTGGGATCTTGGCTC
BiPD	AF031241	ATCTGGAGGAGCCCCAGGCGGTGG	CTTGAAGAAGCTTCGTCGTAAAACTAAG
Lea	AW397921	GCCGAAGTGAAGAAAAGACGAACC	CTTGGGCTGTTTGTGGGTCTTC
BiP transgene	BIPD-nos	ATCTGGAGGAGCCCCAGGCGGTGG	CATCGCAAGACCGGCAACAGGAT
RNA helicase	AI736067	TAACCCTAGCCCCTTCGCCT	GCCTTGTCGTCTTCCTCCTCG
GST	AACI8566	CGGTTCTCATCCACAATGGCAAAC	CAGCCCAGAATCTAGCCTGAGC
Nac3	AY974351	GAATGCAGCAATGGGTCATCA	ATCCTGCTGGTGCATTGTTCTG
Nac4	AY974352	TGACCTCTATGTCCCTGCGTTA	CCCCTGTGTGAAATCATTCTGA
Antiquitin	AY250704	CGAAAAGGGAGAGGAGGACTTC	TCTGGGTCACCGAAAGGCAA
PDI3	AW277660	CGAAAAGGGAGAGGAGGACTTC	TCTGGGTCACCGAAAGGCAA
Actin	AB158612	AGCAAGGAAATTACCGCATTAGC	ACCTGCTGGAATGTGCTGAGA
Cysteine protease	AB032168	GTGGACTGTGCTGGAGCTTTTAAT	ATAAGCCATTCTTGCCAGTGTATG
DidA9	AAZ23261	AACCCCACTTCTTGGAACAAG	AGCAATGTCAGTCACCCCAGTA

3.7. Physiological measurements

Photosynthetic CO₂ assimilation (A), transpiration rate (E) and stomatal conductance (gs) of the third fully expanded leaf were measured by IR gas analysis using a analyzer (IRGA) model LI-6400 (LiCor, Nebraska, EUA), at 1000 μmol m⁻²s⁻¹ irradiance during the experiment. Relative water content of leaves was determined by the relative water content (Catsky, 1974). Initial fluorescence (Fo) and maximum

fluorescence (Fm) were determined using a fluorometer (Plant Effice Analyzer, Hansatech, Ltda, UK). All measurements were performed between 08:30 and 11:30 am.

3.8. Proline content determination

Proline content was determined spectrophotometrically after quantitative extraction with 80% (v/v) ethanol, reaction with ninhydrine followed by quantitative extraction with toluene, as described by Bates et al. (1973) and using L-proline (Sigma) as standard.

3.9. Determination of chlorophyll content and lipid peroxidation

Total chlorophyll content was determined spectrophotometrically at 663 and 646 nm after quantitative extraction from individual leaves with 80% (v/v) acetone in the presence of approximately 1 mg of Na₂CO₃ (Lichtenthaler, 1987). The extent of lipid peroxidation in leaves was estimated by measuring the amount of malondialdehyde (MDA), a decomposition product of the oxidation of polyunsaturated fatty acids. The MDA content was determined by the reaction of thiobarbituric acid (TBA) as described by Hodges et al. (1999).

3.10. Data analyses

Statistical analysis of data was performed using an oneway analysis of variance and the least statistic difference (LSD) test for multiple pairwise comparisons at $P < 0.05$ with the Software Scientific (SOC) package (EMBRAPA, Brazil). Means were also compared by the Tukey test at 5% probability.

4. RESULTS

4.1. Generation of soybean transgenic lines

To examine the protective function of BiP against dehydration in soybean, we generated transgenic plants that constitutively express *soyBiPD* under the control of the 35S cauliflower mosaic virus promoter. Several independent transgenic lines were established; the expression level of the transgene was analyzed by RT-PCR and accumulation of BiP was monitored in each subsequent generation by immunoblottings. The independently transformed overexpression (OE) lines constitutively accumulated higher levels of *BiPD* mRNA (Figures 1A) and protein (Figure 1B) than untransformed, wild type controls. The antibody prepared against purified BiP from soybean seeds cross-reacted with a 28-kDa polypeptide that persisted as a contaminant in the purified BiP fraction used as antigen. Thus, in our immunoblottings, this contaminating protein served as an efficient internal control for loading and provided the means to accurately select for overexpressing progenies in segregation analyses of the subsequent generations. To examine whether the ectopically expressed BiP protein was correctly localized in transgenic cells, microsomal fractions were prepared from soybean leaves at V3 developmental stage and immunoblotted with an anti-BiP serum (Figure 1C). As expected, BiP was detected in microsomal membrane-enriched fractions from wild type leaves (lanes 5 and 6) and to a higher extent in microsomal fractions from 35S:BiP-2 and 35S:BiP-4 leaves (lanes 7 and 8). These results indicate that high levels of ectopically expressed BiP were correctly localized in the ER of soybean transgenic leaf

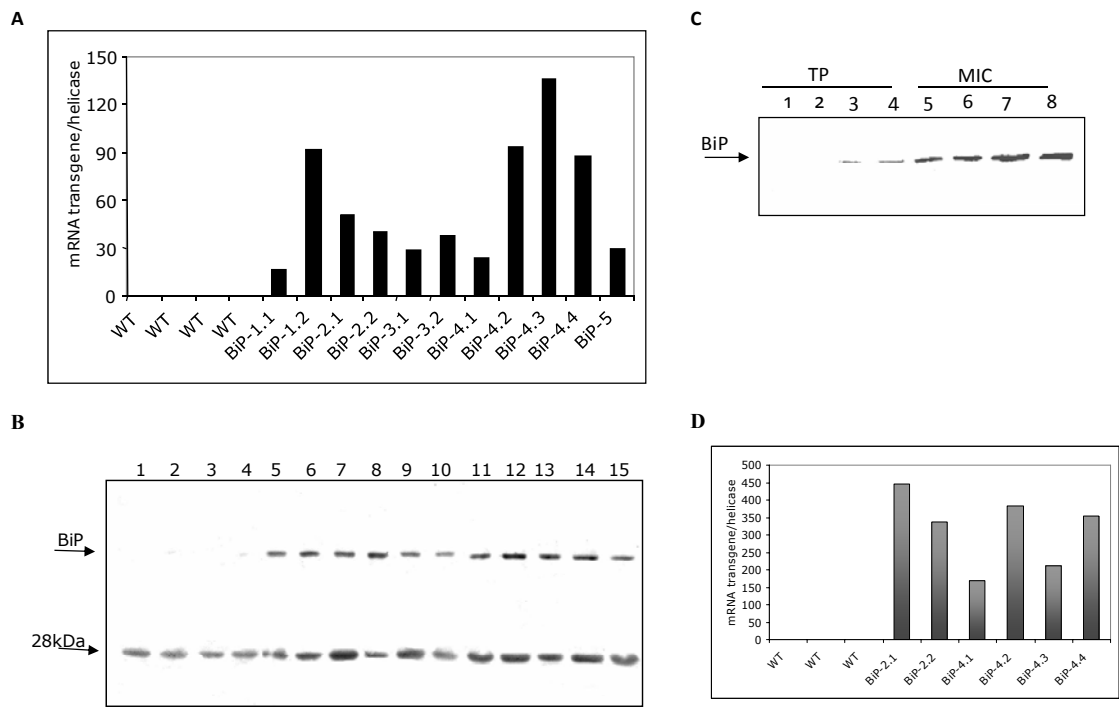


Figure 1. Ectopic expression of *soyBiPD* in soybean plants.

A. Expression analysis of *soyBiPD* transgene. Total RNA was isolated from leaves of wild type (WT) plants and transformed soybean lines (35S:BiP-1, 35S:BiP-2, 35S:BiP-3 and 35S:BiP-4) and *BiP* transgene transcript levels were quantified by real time PCR, using transgene-specific primers. In the nomenclature of transgenic lines, the first number indicates independent events of transformation and the second number indicates different plants in a segregating population.

B. Enhanced levels of BiP in soybean transgenic lines. Equal amount of total proteins (30 μ g) extracted from leaves of wild type (WT) plants and soybean transgenic lines (as in A) were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with an anti-BiP serum. The arrows indicate the positions of BiP and a cross-reacting 28-kDa polypeptide that serves as internal control for protein loading.

C. Immunoblottings of microsomal fractions of soybean leaves. Whole cell protein extracts (TP) from wild type (lanes 1 and 2), 35S:BiP-2 (lane 3) and 35S:BiP-4 (lane 4) leaves as well as microsomal fractions from wild type (lanes 5 and 6), 35S:BiP-2 (lane 7) and 35S:BiP-4 (lane 8) leaves were immunoblotted with anti-BiP serum.

D. Transcript accumulation of *soyBiPD* transgene in soybean transgenic roots. Total RNA was isolated from roots of wild type (WT) plants and independently transformed

soybean lines (as indicated) and *BiP* transgene transcript levels were quantified by real time PCR, using transgene-specific primers.

cells. Transgene expression, analyzed by RT-PCR, was also higher in roots of independently transgenic lines (Figure 1D).

4.2. Stress tolerance in 35S:BiP transgenic lines

To investigate whether overexpression of BiP was correlated with water stress tolerance in soybean transgenic lines, either T3 transgenic plants at V6 developmental stage or T4 transgenic plants at V3 developmental stage were subjected to two distinct water deficit regimes, slow and fast soil drying treatments. In the first one, water deficit was induced by reduction of irrigation to a 40% level during 18 days. This slow soil drying experiment was intended to mimic more accurately field conditions and to allow physiological and molecular responses to low water potential (ψ_w) be examined for a longer period. The soil water content of all samples was progressively recorded as a function of time to ensure that the extent of soil drying or the severity of plant water stress was similar for all samples analyzed. Under water deprivation, while the wild-type leaves were completely wilted, the transgenic lines kept the leaf turgidity to normal levels (Figure 2A). Accordingly, leaf water potential (ψ_w) of stressed wild type plants declined to a maximum stress of -2.2 MPa, whereas leaf ψ_w of transgenic plants remained near -0.5 to -0.7 MPa (Figure 2B). This was not a direct result of stimulation of stomatal closure because in independent transgenic lines, under stress conditions, the

stomatal conductance and transpiration rate were kept at significantly higher levels as compared to wild type lines (Figure 2D and 2E). The stomatal conductance, transpiration and photosynthetic rate did not differ in well-watered wild type and transgenic lines (Figure 2); the transgenic lines displayed normal growth and were undistinguishable from the wild type counterpart. However, under water deprivation, the gas exchange performance of transgenic lines was superior to that of control lines and the photosynthetic rate in the droughted transgenic leaves decreased to a significantly less extent than in control leaves (Figure 2C). Under progressive drought stress, the photochemical efficiency (F_v/F_m ratio) of transgenic and wild type leaves remained unaltered and was similar to that of the well-watered counterparts (data not shown). After the 18-d period of progressive stress, the plants were rewatering and the recovery efficiency evaluated (Figure 2). In contrast to the wild type plants that required 14 days to recovery (RW-14d), the transgenic lines recovered fully in a 5-d period of normal watering when they displayed photosynthetic rate, stomatal conductance and transpiration rate similar to the irrigated counterparts and significantly higher than the stressed wild type line under the same recovering period.

For the fast soil drying treatment, wild type, 35S:BiP-2 and 35S:-BiP-4 lines were allowed to reach the V3 stage of development when drought was rapidly induced by withholding irrigation for 7 days. After the 7-d period, the leaves of wild type lines were completely wilted, whereas the transgenic leaves kept the turgidity to a normal level (Figure 3A) that was associated with a relative water content significantly higher

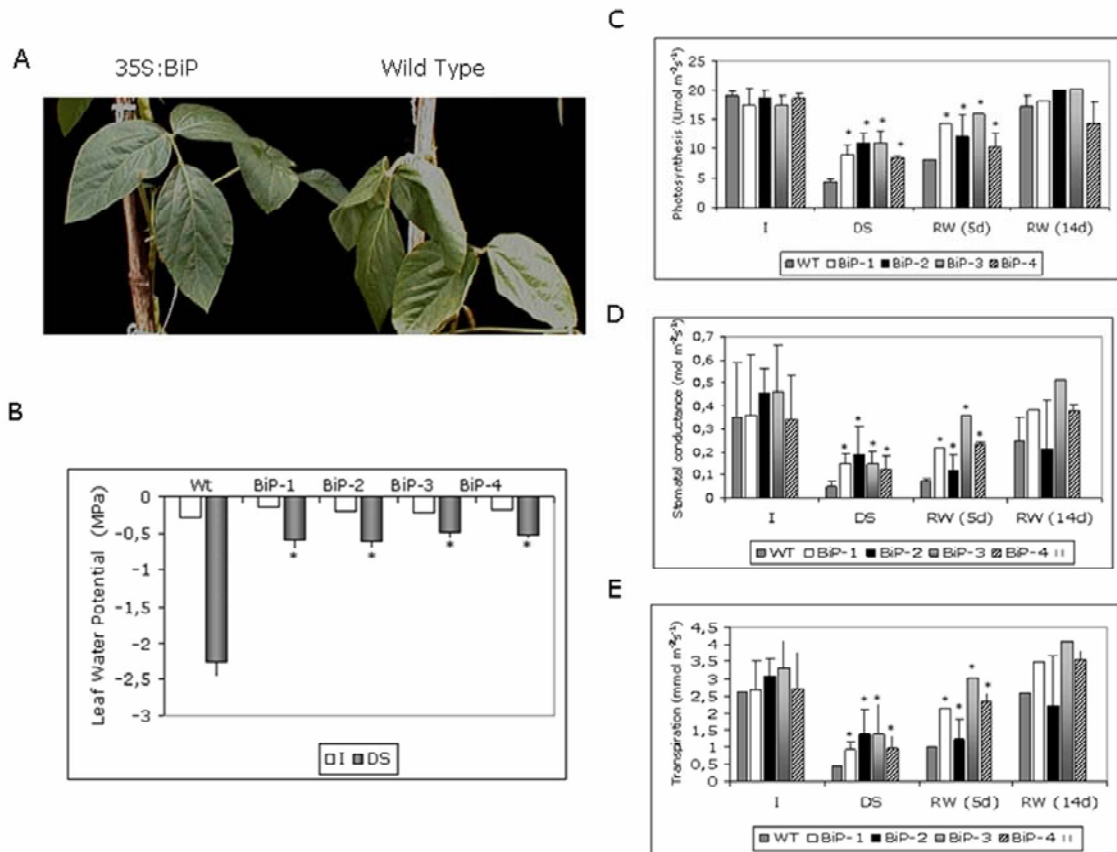


Figure 2. Elevated levels of BiP are positively correlated with drought tolerance to soybean plants under a restricted water regime.

A. Overexpression of BiP retains leaf turgidity under drought. Drought stress was induced by reducing irrigation to a 40% level of normal water supply during 18 days when the stressed leaves were photographed.

B. Leaf water potential of transgenic leaves under water deprivation. Each value represents the mean \pm SD of five replicates from three independent experiments. The asterisks indicate significant differences at $P \leq 0.05$ as compared to the wild type counterpart.

C, D, E. Physiological measurements of soybean transgenic lines continuously irrigated or exposed to a restricted water regime. Photosynthetic rate (C), stomatal conductance (D) and transpiration rate (E) of the third fully expanded leaf of WT and transgenic lines

(as indicated) were measured by the LI-6400 infrared (IR) gas analyzer at $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ irradiance. I denotes irrigated leaves that received normal water supply and DS, drought stressed leaves for 18 days under a 40% level of irrigation. After 18 days under the restricted water regime, the plants were rewatered with a normal water supply for 5d (RW-5d) and 14d (RW-14d). Each value represents the mean \pm SD of five replicates from three independent experiments. The asterisks indicate significant differences at $P \leq 0.05$ as compared to the wild type counterpart.

than that of wild type leaves (Figure 3B). Drought-induced variations on photosynthetic rate, stomatal conductance and transpiration rate in transgenic (35S:BiP-4) and wild type lines followed the same pattern as observed during mild water stress (see above), although, under severe drought, the differences between wild type and transgenic lines were lower but yet statistically significant (Figures 3C, 3D and 3E). Collectively, these results indicate that ectopic expression of BiP in soybean confers similar water stress tolerance as in *N. tabacum* (Alvim et al., 2001).

4.3. Ectopic expression of BiP in soybean does not promote typical stress avoidance responses

Under water stress conditions, the relative water content in OE lines were maintained close to unstressed levels (data not shown and Figure 3B), suggesting that a stress avoidance mechanism could account at least in part for the apparent increase in water stress tolerance mediated by BiP. A balance between the rates of water uptake and water loss can be achieved by limiting water loss (stomatal closure) or increasing water

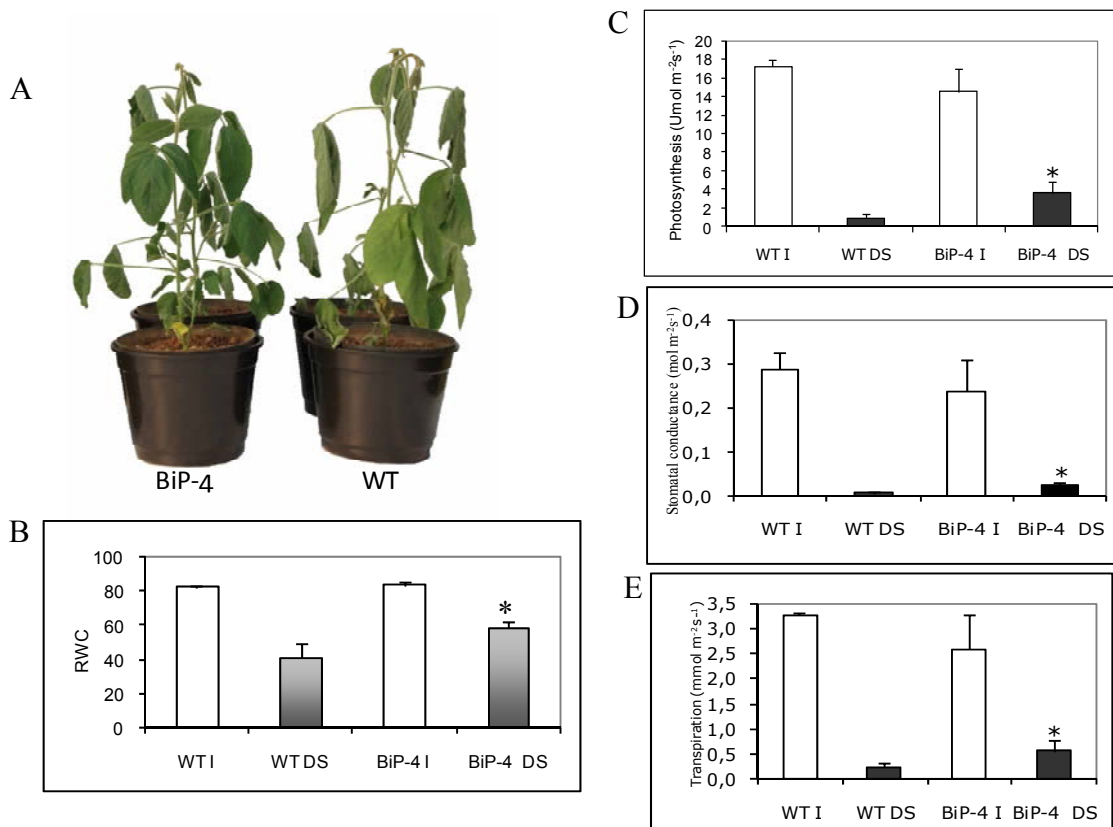


Figure 3. Enhanced drought tolerance in BiP-overexpressing soybean lines exposed to 7 d of water deprivation.

A. Water stress tolerant phenotype of transgenic lines. Water stress conditions was induced in wild type and 35S:BiP-4 transgenic line at V3 developmental stage by withholding irrigation for 7 d when the plants were photographed.

B. Relative water content of wild type and transgenic leaves. The relative water content of well-watered (I) and drought-stressed 35S:BiP-4 (DS) was measured on the 7th day of experiment. The asterisk indicates significant differences at $P \leq 0.05$ as compared to the wild type counterpart.

C, D, E. Physiological measurements of soybean transgenic lines continuously irrigated (I) or exposed to a 7 d period of suspension of irrigation (DS). Photosynthetic rate (C), stomatal conductance (D) and transpiration rate (E) of the third fully expanded leaf of

WT and 35S:BiP-4 lines were measured by the LI-6400 infrared (IR) gas analyzer at 1000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ irradiance. The asterisks indicate significant differences at $P \leq 0.05$ as compared to the wild type counterpart.

uptake (changes in root/shoot growth). However, under stress conditions, the stomatal conductance and transpiration rate in the OE lines were significantly higher than those in untransformed lines indicating that overexpression of BiP did not affect stomatal regulation (Figures 2D, 2E, 3D and 3E). We then asked whether modification in root growth to maximize water uptake could explain the apparent drought tolerance of OE lines. We used PEG for inducing a low ψ_w stress and mimicking the stress imposed by a drying soil. In the absence of PEG, the germination efficiency of wild type and OE lines were similar and their seedlings developed roots at similar growth rates (Figure 4A). However, 1% and 2% PEG stimulated root growth of wild type seedlings that displayed a significant increase in root dry weight (Figures 4B and 4C). In contrast, treatment of OE seedlings with PEG did not alter significantly root morphology and development. This result suggests that regulation of root growth was not a determinant of BiP-mediated increases in water stress tolerance.

To examine whether the observed root response of soybean plants to PEG-induced osmotic stress also exists for plants growing in soil under drought stress, wild type and OE lines were subjected to the 7-D period of severe drought treatment when the root growth was measured (Figure 4D). Drought stress treatment stimulated root growth in wild type plants, because stressed plants had a significantly higher root size

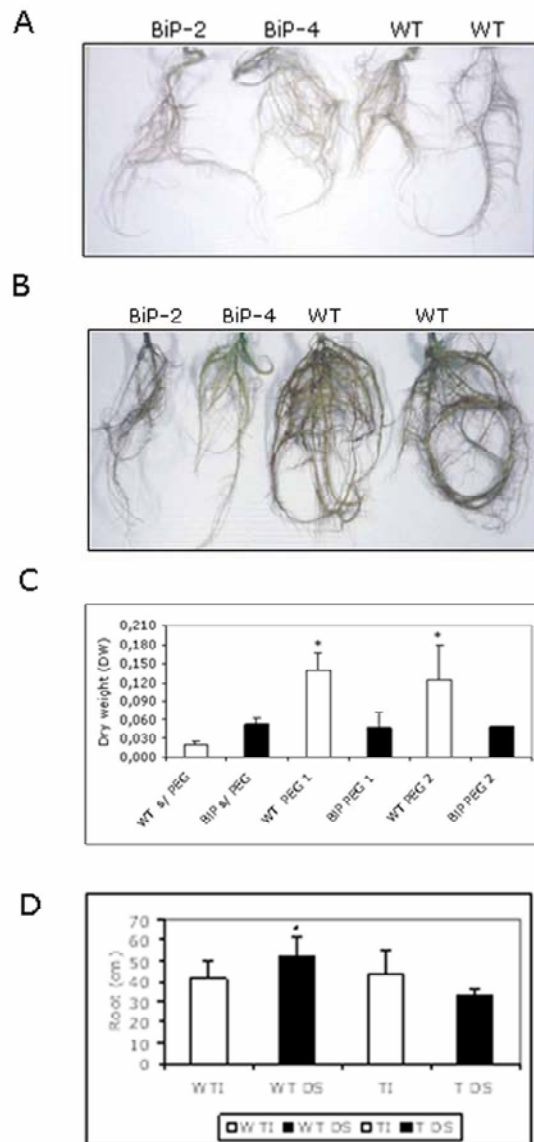


Figure 4. Root growth dynamics of soybean seedlings exposed to a low water potential.

Wild type, 35S:BiP-2 and 35S:BiP-4 soybean seedlings were grown on MS solid medium in the absence (A) and presence of 1% PEG (B) for four weeks when the roots were photographed. In C, the root dry weight of four-week-old seedlings grown in MS medium supplemented with 1% (PEG 1) or 2% PEG (PEG 2) was measured. D. Root growth of transgenic lines exposed to a drying soil. Water stress conditions was induced in wild type and 35S:BiP-4 transgenic lines at V3 developmental stage by withholding

irrigation for 7 d when the root size was measured. Asterisks indicate significant differences at $P \leq 0.05$ as compared among stressed lines.

than the well-watered wild-type plants. In contrast, the root size of OE lines (35S:BiP-4) under drought stress was slightly smaller than that of their irrigated counterparts. Therefore, overexpression of BiP prevented the root response to soil water depletion. These results further substantiate the notion that adaptive changes in root growth as long-term response did not account for the apparent drought tolerant phenotype of OE lines.

Proline is one of the major organic osmolytes that accumulates in a variety of plant species in response to drought, as a mechanism of dehydration avoidance (Porcel and Ruiz-Lozano, 2004; Ashraf and Foolad, 2007). Under drought conditions, both wild type and transgenic (35S:BiP-4) lines accumulated free proline in leaves to a higher level than their well-watered counterparts (Figure 5A). Nevertheless, the proline level in stressed wild type leaves was significantly greater than in stressed transgenic leaves. We also measured soluble sugar content in leaves from independently transgenic lines as osmoprotectants (Porcel and Ruiz-Lozano, 2004). Water stress induced accumulation of sucrose in wild type leaves to a higher extent than in OE leaves and there were no clear differences between glucose levels of wild type and transgenic lines (Figures 5B and 5C). These results indicated that changes in soluble sugars and proline levels were not associated with the high turgidity of transgenic leaves under drought.

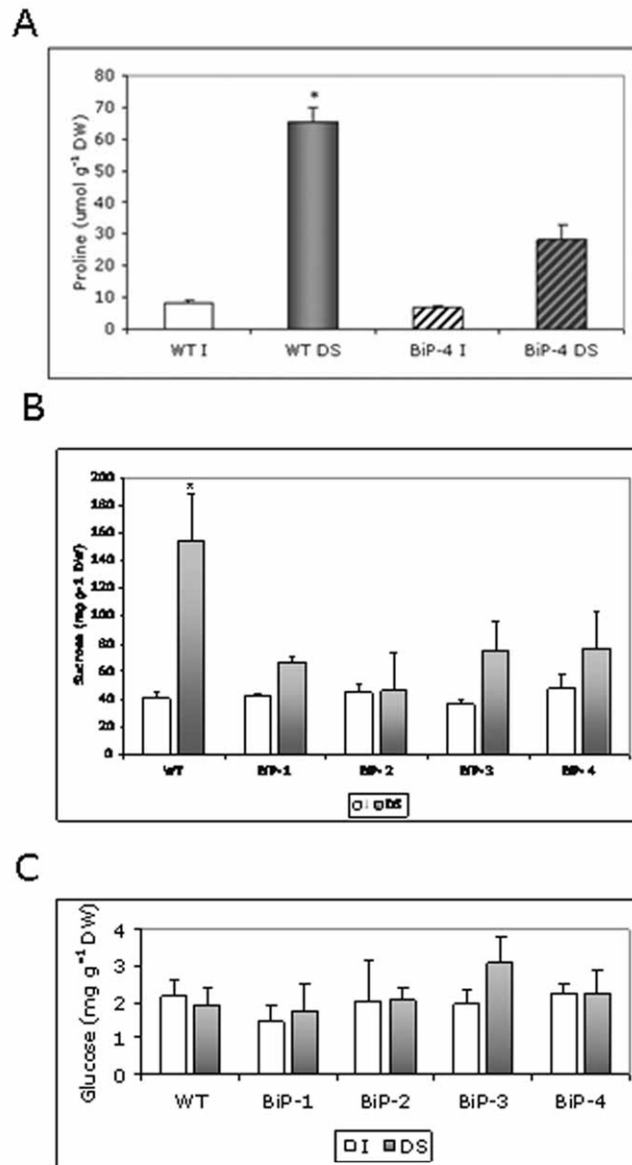


Figure 5. Drought-induced accumulation of osmolites in soybean transgenic lines.

A. Proline content in leaves of wild type and 35S:BiP-4 transgenic lines under drought. Drought was induced in soybean plants at the V3 developmental stage by withholding irrigation for 7 days (DS) when the proline content of the leaves was determined. I denotes continuously irrigated plants.

B, C. Soluble sugars content in leaves of wild type and independently transgenic lines (as indicated) cultivated under a restricted water regime. Drought stress (DS) conditions were imposed by reducing irrigation to a 40% level of the normal water supply for 18

days. I represents continuously irrigated counterparts. After 18 days of treatment the leaf content of sucrose (B) and glucose (C) was measured. Asterisks indicate significant differences at $P \leq 0.05$

4.4. Overexpression of BiP inhibits induction of stress-responsive gene expression

As an ER-resident molecular chaperone, BiP might facilitate proper folding and maturation of a selected group of water stress-induced secretory proteins, which are probably involved in the osmotic-stress response. This hypothesis predicts that overexpression of BiP may indirectly affect stress tolerance by allowing the cells to control more efficiently the expression of specific defense genes. To address this possibility we determined the induction of a sub-set of water-stress responsive genes, such as *Lea* (AW397921), *GST* (glutathione-S-transferase; AAC18566), *NAC3* (DQ028771), *NAC4* (AY974352), *PDI3* (protein disulfide isomerase, isoform 3; AW277660) (Isrigler et al., 2007) and antiquitin (AY250704; Rodrigues et al., 2006). *Lea*, *GST* and *PDI3* are representatives of secretory protein genes, *NAC3* and *NAC4* encode nuclear transactors and antiquitin encodes a cytosolic aldehyde dehydrogenase. Regardless of the subcellular localization of the encoded protein, the extent of their mRNA accumulation in response to drought was much less pronounced in OE lines than in wild type plants (Figure 6). These results indicate that overexpression of BiP inhibits the induction of different classes of stress-responsive genes, a scenario that disfavors a direct involvement of BiP as mediator of drought tolerance response. More likely, BiP affects stress sensing rather than stress tolerance mechanisms.

4.5. Overexpression of BiP prevents down-regulation of ER-stress specific targets by severe drought conditions

UPR target genes that encode components of the ER protein processing machinery have been shown to exhibit a differential and antagonistic regulation by ER-stress inducers and PEG-induced dehydration (Irsigler et al., 2007). ER-resident molecular chaperone genes, such *BiP* and *CNX* (calnexin), are down-regulated by prolonged stress induced by PEG treatment. Accordingly, severe drought conditions inhibited the expression of UPR-specific targets, such *BiP* and *CNX* genes in wild type plants (Figure 6). We also observed that under normal conditions, overexpression of *BiP* transgene repressed expression of endogenous *BiP* and *CNX* genes, as the OE lines accumulated much less transcripts than wild type. This result is consistent with the negative regulation of *BiP* on UPR-specific targets (Leborgne-Castel et al., 1999; Malhotra and Kaufman, 2007; Costa et al., 2008). However, severe drought relieved the BiP-mediated repression of UPR targets and the stressed OE lines accumulated similar levels of *BiP* and *CNX* transcripts as unstressed wild type plants. These results indicate that overexpression of *BiP* suppresses the water deficit induced-down regulation of

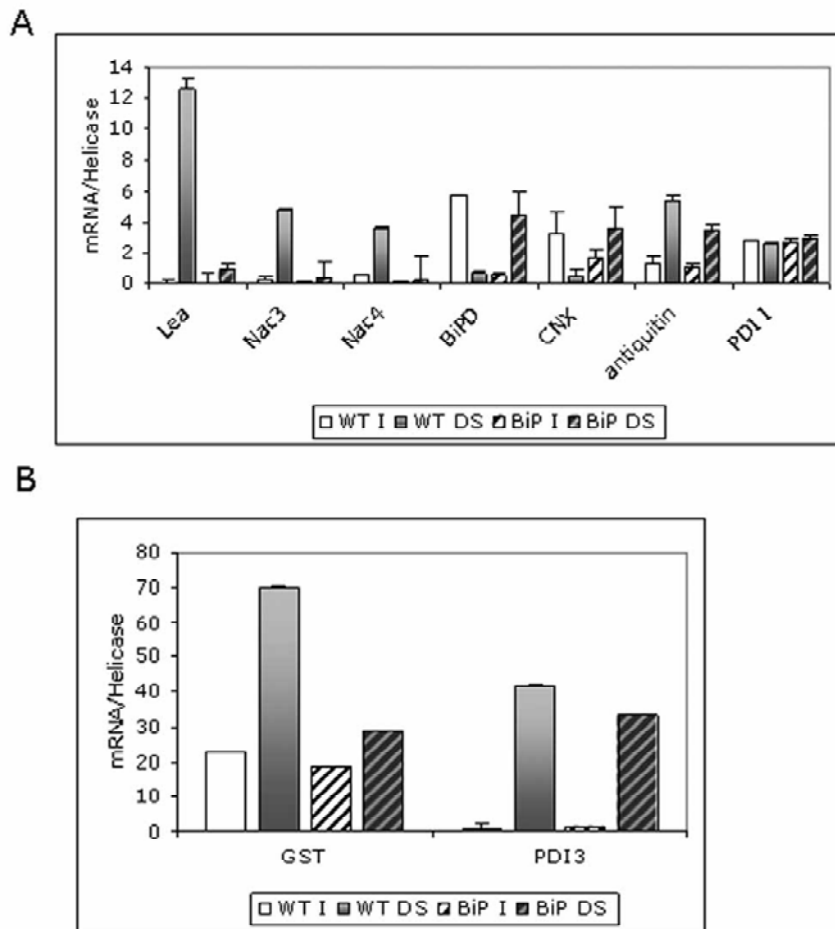


Figure 6. Induction of drought-responsive genes in transgenic lines

A and B. Drought was induced in soybean plants at the V3 developmental stage by withholding irrigation for 7 days. Total RNA was isolated from leaves of wild type (WT) and 35S:BiP-4 lines and the transcript levels of selected genes (as indicated) were quantified by real time PCR, using gene-specific primers. I denotes continuously irrigated plants and DS, drought-stressed plants. Values represent the mean \pm SD of three replicates.

transcripts encoding ER-resident molecular chaperones, a condition that would optimize protein and membrane structure protection under dehydration.

4.6. Expression of leaf senescence-associated markers in wild type and OE lines during drought

Drought accelerates senescence affecting crop productivity. Recently, it has been demonstrated that the suppression of drought-induced leaf senescence by controlled expression of *Agrobacterium* isopentenyltransferase gene remarkably promotes drought tolerance in tobacco (Rivero et al., 2007). We examined whether the drought tolerant phenotype mediated by overexpression of BiP could be associated with a delay in leaf senescence. For these experiments, we also analyzed our transgenic tobacco plants ectopically expressing *BiP* in the sense or antisense orientations (Alvim et al., 2001). Transgenic soybeans were exposed to a fast soil drying regime and we assayed for hallmarks of senescence. After 7 days of progressive drought, wild type leaves displayed much more accentuated loss of chlorophyll than did OE lines (Figure 7A). Likewise, in wild type stressed leaves, total protein content was significantly lower than in stressed OE leaves (Figure 7B). We further examined the drought-induced senescence phenotype by measuring the accumulation of malondialdehyde (MDA), a major product of lipid peroxidation that, along with generation of active oxygen species, is associated with chlorophyll loss (Dhindsa et al., 1981). A significant enhanced accumulation of reactive aldehydes derived from lipid peroxidation was observed in wild type leaves in comparison with OE lines (Figure 7C). The relative content of the

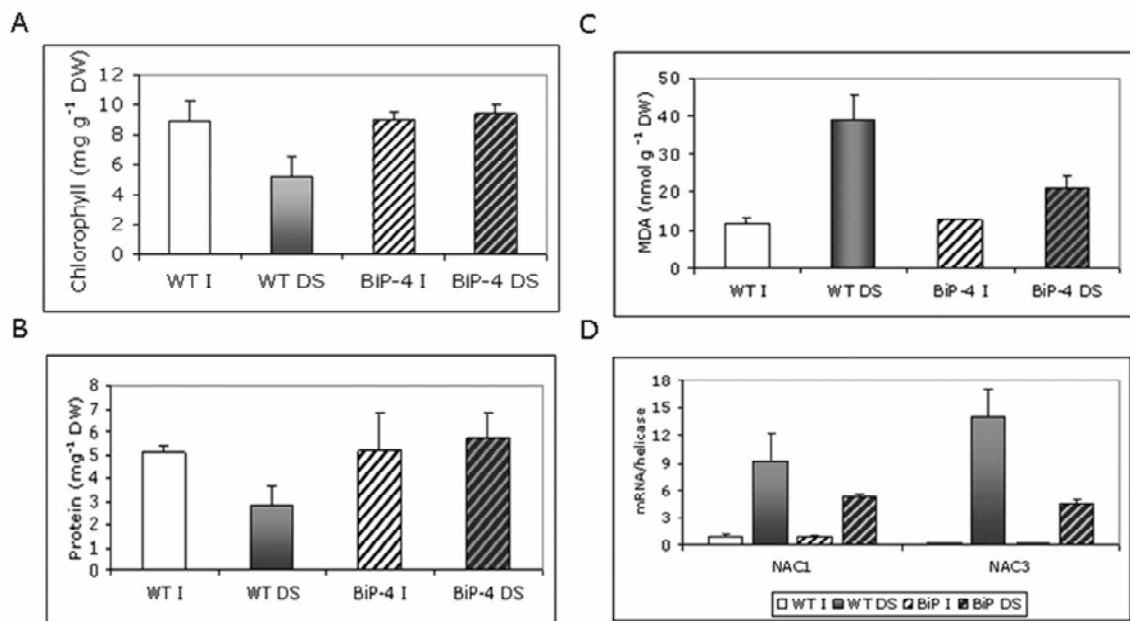


Figure 7. Ectopic expression of BiP delays drought-induced leaf senescence in soybean plants. Drought was induced in wild type and 35S:BiP-4 plants at the V3 developmental stage by withholding irrigation for 7 days. I denotes continuously irrigated plants and DS, drought-stressed plants. Values are given as mean \pm SD from three replicates.

A. Chlorophyll loss induced by drought in wild type and 35S:BiP-4 transgenic lines

B. Total protein content of wild type and transgenic leaves exposed to a 7-d period of drought

C. Lipid peroxidation in wild type and 35S:BiP-4 leaves. The extent of lipid peroxidation in leaves was monitored by determining the malondialdehyde (MDA) content.

D. Induction of the senescence-associated gene *NAC1* and *NAC3* by drought. Total RNA was isolated from irrigated and drought-stressed leaves of wild type and 35S:BiP-4 lines and gene induction was monitored by quantitative RT-PCR using gene-specific primers.

leaf senescence parameters were consistent with delayed leaf senescence in OE lines. In addition to the physiological responses related to senescence, we assayed expression of the senescence-associated marker genes, *NAC1* and *NAC3*, by quantitative RT-PCR (Figure 7D). Drought induced the expression of both *NAC1* and *NAC3* to higher levels in wild type leaves than in OE lines. Collectively, these results suggest that a delay in leaf senescence in OE lines may account for the BiP-mediated drought tolerance.

We predicated that if overexpression of BiP was the basis for the delay in leaf senescence, antisense repression should accelerate the onset of drought-induced leaf senescence. To further examine this possibility we exposed our sense and antisense tobacco transgenic lines (Alvim et al., 2001) to a slow soil drying regime for 35 days and assessed for chlorophyll loss and expression of the senescence-associated genes, *DidA9* (AAZ23261; Simon-Mateo et al., 2006), and Cysteine protease, *CytP* (Ueda et al., 2000; Figure 8). While progressive drought promoted an accentuated increase in the expression of the senescence-associated genes in wild type plants, their expression were not altered by drought in BiP-overexpressing transgenic lines (Figures 8A and 8B). Likewise, drought induced chlorophyll loss in OE lines although to a much less extent than in wild type (Figures 8C and 8D). In contrast, these senescence parameters (chlorophyll loss and expression of senescence-associated genes) were much more pronounced in antisense lines than in wild type plants, indicating that decreased expression of endogenous BiP gene accelerated drought-induced leaf senescence. These results further substantiate the argument that BiP-mediated drought tolerance may be linked to leaf senescence because a deficiency in stress induction of BiP in antisense plants has been shown to correlate with an increase in water stress sensitivity over that of control plants (Alvim et al., 2001).

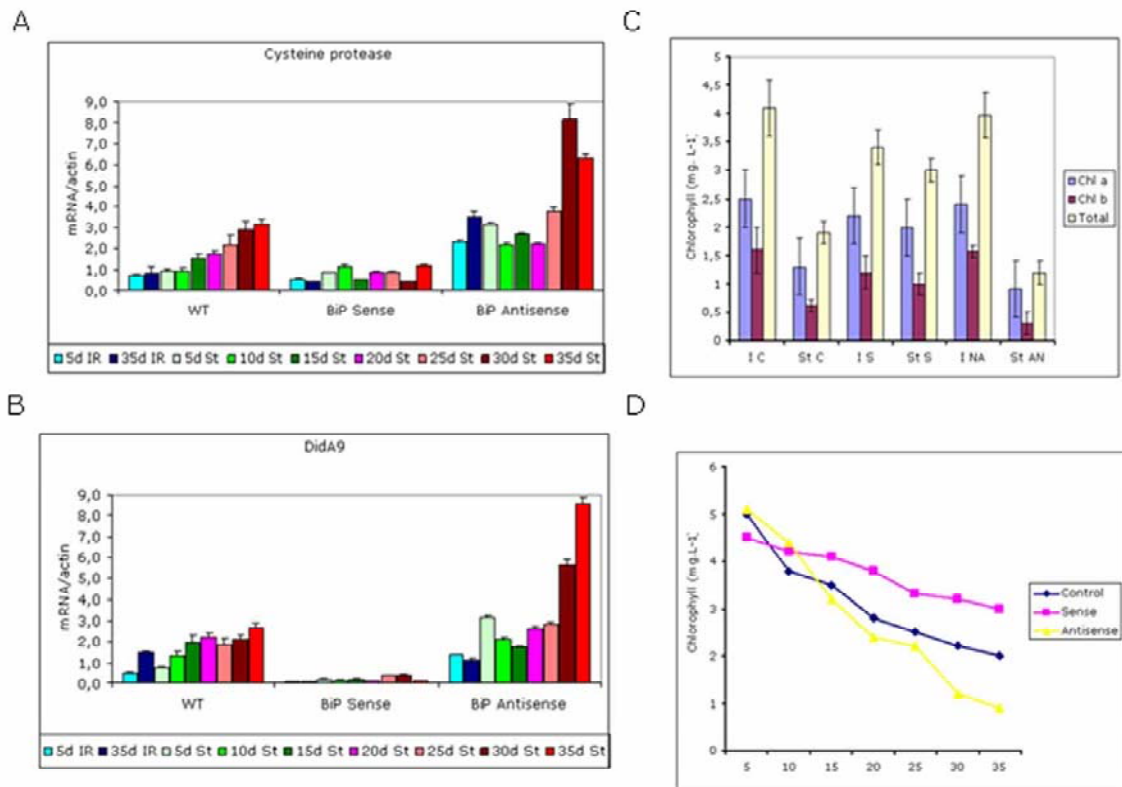


Figure 8. The onset of leaf senescence is associated with the levels of BiP expression in tobacco transgenic lines under a restricted water regime. Tobacco transgenic lines expressing BiP cDNA either in the sense or antisense orientations were exposed to progressive drought by reducing irrigation to a 30% level of the normal water supply during 35 days. IR denotes continuously irrigated plants and St, plants under the restricted water regime for the indicated period of time in days.

A and B. Induction of the senescence-associated genes cysteine protease and *DidA9* under progressive drought. Total RNA was isolated from irrigated and drought-stressed leaves of wild type, sense and antisense tobacco lines at the indicated period of treatment and gene induction was monitored by quantitative RT-PCR using gene-specific primers. Values represent the mean \pm SD of two replicates.

C. Chlorophyll loss induced by drought for 35 d of restricted water regime. C indicates wild type plants, S, sense transgenic lines and AN, antisense lines. I denotes continuously irrigated controls and St, drought-stressed plants after 35 days under water restriction. Values represent the mean \pm SD of three replicates.

D. Chlorophyll content during progressive drought. The chlorophyll content was measured in leaves of wild type (control), sense and antisense transgenic lines at the indicated period of drought in days.

5. DISCUSSION

We have previously demonstrated that the ER-resident molecular chaperone BiP from soybean exhibits an unusual response to drought. The members of the soybean *BiP* gene family are differentially regulated by osmotic stress (Cascardo et al., 2000) and soybean *BiP* confers tolerance to drought in the plant model system *N. tabacum* (Alvim et al., 2001). Here we further characterized the BiP-mediated drought tolerant phenotype and mechanism in an agronomically relevant crop. We showed that *BiP* overexpressing soybean lines displayed an enhanced tolerance to drought as shown by their superior physiological performance under water deficit regimes as compared to wild type plants. The OE lines kept shoot turgidity, retained photosynthesis activity (although to a reduced level) during drought and displayed a faster recovery rate after rewatering. Nevertheless, the apparent increase in drought tolerance mediated by BiP was not associated with typical short-term or long-term avoidance responses. In fact, overexpression of BiP did not promote a more accentuated decrease in stomatal conductance and did not affect root growth dynamics under water stress conditions. Likewise, the underlying mechanism by which BiP improves plant physiological performance under progressive drought was not associated with typical tolerance responses, as the accumulation of osmolites and water-stress induced transcripts in OE lines was lower than in wild type plants during drought. The only BiP-induced variations that could account for the improved stress tolerance of OE lines were a delay in drought-induced leaf senescence and an inhibition of the drought-mediated down-regulation of ER molecular chaperone transcripts.

Recent studies have demonstrated that the suppression of drought-induced senescence by ectopic expression of an isopentenyltransferase (*IPT*) gene results in drought tolerance of the transgenic tobacco lines (Rivero et al., 2007). Accordingly, the present investigation demonstrated that overexpression of *BiP* in soybean and tobacco transgenic lines enhanced drought tolerance in concert with a delay in drought induced-leaf senescence. Drought stress accelerates leaf senescence at the expense of crop yields (Gan and Amasino, 1997) and delayed leaf senescence may explain the drought tolerant phenotype displayed by the *BiP* overexpressing lines. The question that remains unanswered is how *BiP* would be involved in controlling stress-induced leaf senescence in plants. In addition to its role as molecular chaperone, in mammalian cells, *BiP* has been shown to function as an indirect sensor of alterations in the ER environment that activate the cytoprotective unfolded protein response (Malhotra and Kaufman, 2007). *BiP* regulates UPR by controlling the activation status of the three transducers, IRE1, PERK and ATF6 which act in concert to reduce the unfolded protein load into ER by attenuating protein synthesis and promoting protein folding, secretion and degradation (Malhotra and Kaufman, 2007). *BiP* has also been demonstrated to regulate proapoptotic pathways that are emanated from the ER when ER homeostasis cannot be restored (Reddy et al., 2003; Malhotra and Kaufman, 2007). Given that leaf senescence is under the control of a developmental program triggered by programmed cell death signals it is not surprising that plant *BiP* may protect plants from stress-induced senescence as would be expected from a modulator of UPR activation. In support of this, plant *BiP* has been shown to regulate negatively UPR (Leborgne-Castel et al., 1999; Costa et al., 2008) and prolonged ER stress has been shown to induce cell death, apoptotic-like responses and leaf senescence in plants (Crosti et al., 2001; Malerba et al., 2004; Zuppini et al., 2004, Wang et al., 2007; Costa et al., 2008; Watanabe and

Lam, 2008). A link between unfolded protein response and leaf senescence has been recently identified through subunit G β signaling (Wang et al., 2007). Disruption of the G β gene impairs ER stress-induced leaf cell death and attenuates UPR in the same fashion as BiP overexpression. It would be interesting to determine whether BiP intercepts and affects the cell death-inducing G β signaling.

PEG-induced dehydration has been demonstrated to promote a coordinate down-regulation of ER molecular chaperones and folding catalysts in young soybean plants (Isrigler et al., 2007). Our results showed that severe drought imposed by a drying soil also represses the expression of UPR-specific targets, such as *BiP* and *CNX*, in soybean plants. These results indicated that drought stress inversely regulates UPR-specific targets, impairing the ER folding capacity. However, overexpression of BiP prevented the drought-mediated down-regulation of UPR genes and the levels of *BiP* and *CNX* transcripts in droughted OE leaves were as high as those detected in wild type leaves under normal growth conditions. Thus, *BiP* overexpression may prevent the cell from sensing osmotic stress-induced variations in ER function by keeping ER basic activities to a normal level under severe drought conditions. This would also promote protein and membrane structure protection under dehydration, a condition that would prevent or delay intracellular stress build-up. Consistent with this hypothesis, regardless the severity of the restricted water regime imposed to soybean (this work) and tobacco plants (Alvim et al., 2001), the apparent drought tolerant phenotype displayed by our BiP-OE lines resulted in attenuation of stress avoidance and tolerance responses as well as in delayed leaf senescence. Because ER function is tightly linked to the synthesis of secretory drought-induced proteins, the stress-induced variations in ER specific activities, which are prevented by BiP overexpression, may serve as a primary sensing mechanism of osmotic stress. A similar connection between ER stress sensing and

induction of pathogenesis-related genes has been previously observed (Jelitto-Van Dooren et al., 1999). Additional experiments will be required to evaluate whether the kinetics of down-regulation of ER molecular chaperones by drought is linked to the onset of drought-induced senescence.

Alternatively or additionally, BiP-mediated increases in water stress tolerance may be connected to Ca^{2+} signaling responses. This possibility was raised based on several observations. Firstly, BiP has been demonstrated to play a direct and relevant role in the storage of a rapidly exchanging pool of Ca^{2+} within the ER lumen, and variations on the protein level induced adjustment of the cellular Ca^{2+} homeostasis (Lièvremonet et al., 1997). Thus, overexpression of BiP in sense plants may increase the ER Ca^{2+} storage capacity modulating Ca^{2+} signaling in response to drought and hence altering stress perception and response. Secondly, the cytoplasmic Ca^{2+} signal transduction pathway is thought to regulate turgor pressure of plant cells and to coordinate stomatal responses to leaf dehydration (for review, see Shinozaki and Yamaguchi- Shinozaki, 1997). Thirdly, elevation of concentration of cytosolic free calcium is involved in signal transduction leading to programmed cell death in plants, as for the hypersensitive response (Xu and Heath, 1998). Fourthly, in mammalian cells, the control of Ca^{2+} release from the ER by BiP overexpression prevented oxidative stress and cell death (Liu et al., 1997, 1998). Finally, drought promotes a rapid and excessive accumulation of reactive oxygen species (ROS) in plant cells that in turn causes a lipid peroxidation chain reaction resulting in chemically reactive cleavage products, largely represented by aldehydes (Bartels, 2001). Under drought, a significant reduced accumulation of lipid peroxidation-derived reactive aldehydes was observed in BiP OE lines as compared to wild type lines. Thus, BiP overexpression attenuated the magnitude of drought-induced oxidative stress that may account in part for the delay in

leaf senescence. By functional analogy with the mammalian counterpart, the plant BiP influence on oxidative stress and leaf senescence may be associated with a capacity to control Ca^{2+} release from the ER. Therefore, the potential BiP control on ER Ca^{2+} homeostasis may provide a link for the apparently pleiotropic physiological effects of BiP protective properties under water stress and this hypothesis warrants further investigation.

6. ACKNOWLEDGEMENTS

We thank all the members of the Plant Molecular Biology Laboratory at BIOAGRO/UFV for technical assistance and for reading the manuscript.

7. LITERATURE CITED

- Alvim FC, Carolino SMB, Cascardo JCM, Nunes CC, Martinez CA, Otoni WC, Fontes EPB** (2001) Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. *Plant Physiol* **126**: 1042-1054
- Aragão FJL, Sarokin L, Vianna GR, Rech EL** (2000) Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) plants at high frequency. *Theor Appl Genet* **101**: 1-6.
- Ashraf M, Foolad MR** (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ Exp Bot* **59**: 206–216
- Bates L, Waldren RP, Teare ID** (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil*, **39**: 205-207
- Bartels D** (2001) Targeting detoxification pathways: an efficient approach to obtain plants with multiple stress tolerance. *Trends Plant Sci* **7**: 284–286
- Cascardo JCM, Almeida RS, Buzeli RAA, Carolino SMB, Otoni WC, Fontes EPB** (2000) The phosphorylation state and expression of soybean BiP isoforms are differentially regulated following abiotic stresses. *J Biol Chem* **275**: 14494–14500
- Catsky J** (1974) Water saturation deficit (relative water content). *In* N Slavik ed, *Methods of Studying Plant Water Relations*. Springer Verlag, New York, pp 136–154
- Costa MDL, Reis PAB, Valente MAS, Irsigler AST, Carvalho CM, Loureiro ME, Aragão FJL, Boston RS, Fietto LG, Fontes EPB** (2008) A new branch of ER-stress

signaling and the osmotic signal converge on plant specific NRPs to promote cell death. *J. Biol. Chem.*, 283: 20209-20219.

Crosti P, Malerba M, Bianchetti R (2001) Tunicamycin and brefeldin A induce in plant cells a programmed cell death showing apoptosis features. *Protoplasma* 216: 31–38.

Dhindsa RS, Plumb-Dhindsa P, Thorpe TA (1981) Leaf senescence: Correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J Exp Bot* 32: 93–101

Gan S, Amasino RM (1997) Making sense of senescence. *Plant Physiol.* 113: 313–319

Gomer CJ, Ferrario A, Rucker N, Wong S, Lee AS (1991) Glucose regulated protein induction and cellular resistance to oxidative stress mediated by porphyrin photosensitization. *Cancer Res* 51: 6574–6579

Gupta A, Heinen J, Holaday A, Burke J, Allen R (1993) Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide-dismutase. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 90: 1629-1633

Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat Biotechnol* 17: 287-291

Hodges DM, Delong JM, Forney CF, Prange RK (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207: 604-611.

- Hsieh T, Lee J, Charng Y, Chan M** (2002) Tomato plants ectopically expressing Arabidopsis CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. *Plant Physiol.* 130: 618-626
- Hu H, Dai M, Yao J, Xiao B, Li X, Zhang Q, Xiong L** (2006) Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 103: 12987-12992
- Jelitto-Van Dooren E PWM., Vidal S., Denecke J** (1999) Anticipating endoplasmic reticulum stress: a novel early response before pathogenesis-related gene induction. *Plant Cell* 11: 1935–1943
- Irsigler AS, Costa MD, 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
- Laitusis AL, Brostrom MA, Brostrom CO** (1999) The dynamic role of GRP78/BiP in the coordination of mRNA translation with protein processing. *J Biol Chem* 274: 486–493
- Leborgne-Castel N, Jelitto-Van Dooren EPWM, Crofts AJ, Denecke J** (1999) Overexpression of BiP in tobacco alleviates endoplasmic reticulum stress. *Plant Cell* 11: 459–469
- Li LJ, Li XA, Ferrario A, Rucker N, Liu ES, Wong S, Gomer CJ, Lee AS** (1992) Establishment of a Chinese hamster ovary cell line that expresses grp78 antisense transcripts and suppresses A23187 induction of both GRP78 and GRP94. *J Cell Physiol* 153: 575–582

- Li XA, Lee AS** (1991) Competitive inhibition of a set of endoplasmic reticulum protein genes (GRP78, GRP94 and Erp72) retards cell growth and lowers viability after ionophore treatment. *Mol Cell Biol* **11**: 3446–3453
- Lichtenthaler HK** (1987) Chlorophylls and carotenoids – pigments of photosynthetic biomembranes. *Meth Enzymol* **148**: 350-382
- Lièvremon J-P, Rizzuto R, Hendershot L, Meldolesi J** (1997) BiP, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca²⁺. *J Biol Chem* **272**: 30873–30879
- Liu H, Bowes RC III, van de Water B, Sillence C, Nagelkerke JF, Stevens JL** (1997) Endoplasmic reticulum chaperones GRP78 and calreticulin prevent oxidative stress, Ca²⁺ disturbances, and cell death in renal epithelial cells. *J Biol Chem* **272**: 21751–21759
- Liu H, Miller E, van de Water B, Steven JL** (1998) Endoplasmic reticulum stress proteins block oxidant-induced Ca²⁺ increases and cell death. *J Biol Chem* **273**: 12858–12862
- Ma Y, Hendershot LM** (2004) ER chaperone functions during normal and stress conditions. *J. Chem. Neuroanatomy* **28**: 51–65
- Malerba M, Cerana R, Crosti P** (2004) Comparison between the effects of fusicoccin, tunicamycin, and brefeldin A on programmed cell death of cultured sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) cells. *Protoplasma* **224**: 61–70
- Malhotra JD, Kaufman RJ** (2007) The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin Cell Dev Biol*. **18**: 716-731

- Morris JA, Dorner AJ, Edwards CA, Hendershot LM, Kaufman J** (1997) Immunoglobulin binding protein (BiP) function is required to protect cells from endoplasmic reticulum stress but is not required for the secretion of selective proteins. *J Biol Chem* **272**: 4327–4334
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473–497
- Pirovani CP, Macêdo JNA, Contim LAS, Matrangolo FSV, Loureiro ME, Fontes EPB** (2002) A sucrose binding protein homologue from soybean exhibits GTP-binding activity that functions independently of sucrose transport activity. *Eur J Biochem* **269**: 3998–4008
- Porcel R, Ruiz-Lozano JM** (2004) Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. *J Exp Bot* **55**: 1743–1750
- Reddy RK, Mao C, Baumeister P, Austin RC, Kaufman RJ, Lee AS** (2003) Endoplasmic Reticulum Chaperone Protein GRP78 Protects Cells from Apoptosis Induced by Topoisomerase Inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. *J Biol Chem*. **278**: 20915–20924
- Rivero RM, Kojima M, Gepstein A, Sakakibara H, Mittler R, Gepstein S, Blumwald E** (2007) Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proc Natl Acad Sci, USA* **104**: 19631-19636
- Rodrigues SM, Andrade MO, Gomes APS, DaMatta FM, Baracat-Pereira MC, Fontes EPB** (2006) Arabidopsis and tobacco plants ectopically expressing the

soybean antiquitin-like ALDH7 gene display enhanced tolerance to drought, salinity, and oxidative stress. *J Exp Bot.* **57**: 1909-1918

Simon-Mateo C, Depuydt S, de Oliveira Manes CL, Cnudde F, Holsters M, Goethals K, Vereecke D (2006) The phytopathogen *Rhodococcus fascians* breaks apical dominance and activates axillary meristems by inducing plant genes involved in hormone metabolism. *J Mol Plant Pathol* **7**: 103-112

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (1997) Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol* **115**: 327–334

Shinozaki, K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J Exp Bot* **58**: 221–227

Ueda T, Seo S, Ohashi Y, Hashimoto J (2000) Circadian and senescence-enhanced expression of a tobacco cysteine protease gene. *Plant Mol Biol* **44**: 649-657

Umezawa T, Yoshida R, Maruyama K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2007) SRK2C, a SNF1-related protein kinase 2, improves drought tolerance by controlling stress-responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **101**: 17306–17311

Xu H, Heath MC (1998) Role of Calcium in Signal Transduction during the Hypersensitive Response Caused by Basidiospore-Derived Infection of the Cowpea Rust Fungus. *Plant Cell* **10**: 585–597

Wang S, Narendra S, Fedoroff N (2007) Heterotrimeric G protein signaling in the *Arabidopsis* unfolded protein response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 3817-3822

Watanabe N, Lamb E (2008) BAX Inhibitor-1 modulates endoplasmic reticulum stress-mediated programmed cell death in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **283**: 3200-3210

Wehmeyer N, Vierling E (2000) The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. *Plant Physiol* **122**: 1099-1108

Zuppini A, Navazio L, Mariani P (2004) Endoplasmic reticulum stress-induced programmed cell death in soybean cells. *J Cell Sci* **117**: 2591-2598