

JERUSA ARAÚJO QUINTÃO ARANTES FARIA

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO FATOR DE
TRANSCRIÇÃO *GmNAC6* DE SOJA (*Glycine max*) E PADRÃO
DE EXPRESSÃO DE GENES *GmNACs* EM RESPOSTA A
ESTÍMULOS BIÓTICOS

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

JERUSA ARAÚJO QUINTÃO ARANTES FARIA

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO FATOR DE
TRANSCRIÇÃO *GmNAC6* DE SOJA (*Glycine max*) E PADRÃO
DE EXPRESSÃO DE GENES *GmNACs* EM RESPOSTA A
ESTÍMULOS BIÓTICOS

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

APROVADA: 31 de julho de 2009.

Prof. Luciano Gomes Fietto
(Co-Orientador)

Prof. Marcelo Ehlers Loureiro
(Co-Orientador)

Prof.^a Claudine Márcia Carvalho

Prof.^a Andréa de Oliveira Barros Ribon

Prof.^a Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Orientadora)

Aos meus pais, José Arantes de Faria e Jane Araújo Quintão

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, que me guiou nesta caminhada e pelas oportunidades que tive ao longo da minha vida.

Aos meus pais, pelo carinho, educação e principalmente amor incondicional. Obrigada pelo apoio em todos meus projetos. Aos meus familiares e ao meu irmão.

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

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

À Professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes pela competente orientação, oportunidades e pela confiança depositada em meu trabalho.

Ao Departamento de Bioquímica, professores e funcionários pela boa convivência e ensinamentos. Aos meus co-orientadores Luciano Gomes Fietto e Marcelo Ehlers Loureiro pela discussão e contribuição.

Às Professoras Claudine Márcia Carvalho e Andréa Ribon pela participação na minha banca de defesa.

Os amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas e Laboratório de Proteômica pela excelente convivência e ajuda durante os trabalhos. Em especial ao João, Pedro, Murilo, Lucas, Paola, Kênia e Patinho na ajuda e pelos momentos de diversão.

Ao Túlio, pela boa convivência e pela ajuda em todos os experimentos.

À minha republica nestes dois anos: Jú e Sangin.

Às minhas amigas Taty, Maíra, Rita, Ellen, Larissa e Gí.

Aos meus queridos amigos da Bioquímica 2003 e da Bioquímica Agrícola.

Ao José Carlos, José Cupertino e Newton, pela ajuda na casa de vegetação.

A todos os funcionários do BIOAGRO.

E a todos que não tenha citado, mas que de alguma forma contribuíram com este trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
I – INTRODUÇÃO	1
II - REVISÃO DE LITERATURA	4
1. Resposta de defesa em plantas	4
2. Resposta hipersensível – HR	5
3. Estresse típico do RE e subsequente morte celular induzida	7
4. Proteínas ricas em asparagina – NRPs	11
5. Transfatores de resposta à defesa	14
6. Fatores de transcrição da família NAC	15
7. NAC e estresse abiótico	18
8. NAC e estresse biótico	19
9. Transfatores NACs em soja	21
III - MATERIAL E MÉTODOS	24
1. Material vegetal e tratamentos	24
1.1. Inoculação de bactérias patogênicas	24
1.2. Tratamento com enzimas que degradam a parede celular	24
1.3. Aplicação de ferimento	25
2. Extração de RNA e síntese de cDNA	25
3. RT-PCR em Tempo Real (qRT-PCR)	26
4. Expressão transiente em protoplastos de soja	30
5. Transformação transiente em folhas de tabaco	32
6. Ensaio de MDA (malondialdeído)	33
7. Determinação dos teores de clorofilas e carotenóides	33
8. Isolamento e análise <i>in silico</i> da região promotora de <i>GmNAC6</i>	34
9. Obtenção da construção do promotor NAC6 fusionado ao gene repórter GUS	34
10. Transformação de plantas de tabaco	35
11. Ensaio da atividade de GUS	35
12. Técnicas de Biologia Molecular	36
IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO	37

1. NAC6 induz morte celular	37
2. <i>GmNAC6</i> é induzido por fermento	42
3. <i>GmNAC6</i> é induzido nas folhas infiltradas com enzimas que degradam a parede celular	47
4. <i>GmNAC6</i> é induzido de modo sistêmico na condição que mimetiza o ataque de patógenos	50
5. Expressão dos genes <i>NACs</i> na resposta hipersensível	54
6. <i>GmNAC6</i> é induzido na interação compatível	60
7. Superexpressão de proteínas ricas em asparagina (NRPs) em protoplastos induz a expressão de <i>GmNAC6</i>	68
8. Superexpressão de <i>GmNAC6</i> em protoplastos não altera a expressão de <i>PRs</i>	70
9. Identificação de cis-elementos regulatórios na região promotora de <i>GmNAC6</i> .	75
10. O promotor do gene <i>GmNAC6</i> não é induzido por expressão transiente de <i>NRP-B</i> em folhas de tabaco.	82
V – CONCLUSÕES	85
VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
VII – ANEXOS	106

RESUMO

FARIA, Jerusa Araújo Quintão Arantes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2009. **Caracterização funcional do fator de transcrição *GmNAC6* de soja (*Glycine max*) e padrão de expressão de genes *GmNACs* em resposta a estímulos bióticos.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-orientadores: Luciano Gomes Fietto e Marcelo Ehlers Loureiro.

Os fatores de transcrição da família NAC são específicos de plantas e atuam em eventos de desenvolvimento e resposta de defesa. Além dos sete genes *NACs* previamente caracterizados (*GmNAC1-GmNAC6* e *GmATAF*), quatro novos genes desta família (*Gm82*, *Gm119*, *Gm178* e *Gm258*) foram avaliados em resposta a condições de estresse biótico. *GmATAF*, *GmNAC3* e *GmNAC4* foram induzidos por fatores comuns à patogênese, como ferimento e inoculação de patógenos (interações compatíveis e incompatíveis). *GmNAC1* respondeu transientemente à injúria mecânica das folhas. *Gm82* foi induzido durante a resposta hipersensível e sistêmica, enquanto que *Gm119* foi induzido por interações compatível e incompatível. Em contrapartida, *GmNAC2* e *GmNAC5* não foram regulados transcricionalmente por estímulos bióticos. Expressão de *GmNAC6* resultou em morte celular em folhas de tabaco, evidenciada pelo desenvolvimento de necrose foliar, perda de clorofila, peroxidação de lipídeos e indução de genes *PRs*. Em concordância com a presença de elementos putativos relacionados à defesa na região promotora de *GmNAC6*, este transfator foi induzido por ferimento, patógeno incompatível e na resposta sistêmica. Superexpressão de *NRP-A* e *NRP-B*, os quais são envolvidos no processo de morte celular, resultou no aumento de transcritos de *GmNAC6*. Estes resultados foram consistentes com a cinética de indução precoce de *NRPs* em comparação com a resposta tardia de *GmNAC6* a patógenos. Entretanto, expressão transiente de *GmNAC6* em protoplastos de soja reprimiu a expressão de *NRP-A*. Coletivamente, estes resultados implicam *GmNAC6* como componente da via de sinalização de morte celular em soja mediada por *NRPs*. Experimentos adicionais deverão ser conduzidos para elucidar a sinalização envolvendo *NRPs* e *GmNAC6*.

ABSTRACT

FARIA, Jerusa Araújo Quintão Arantes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2009. **Functional characterization of *GmNAC6* transcription factor from soybean (*Glycine max*) and expression profile of *GmNACs* genes in response to biotic stimuli.** Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-advisers: Luciano Gomes Fietto and Marcelo Ehlers Loureiro.

The plant-specific transcription factors belonging to the NAC family perform functions in development events and defense response. In addition to seven NAC genes previously described (*GmNAC1-GmNAC6* and *GmATAF*), four new genes of the GmNAC family (*Gm82*, *Gm119*, *Gm178* e *Gm258*) were analyzed in response to biotic stress. *GmATAF*, *GmNAC3* e *GmNAC4* were consistently induced by common factors of pathogenesis, such as wounding and pathogen infection (both compatible and incompatible interactions). *GmNAC1* was transiently induced by wounding. *Gm82* was induced during the hypersensitive response and systemic condition, whereas *Gm119* displayed high levels of expression in compatible and incompatible interactions. In contrast, *GmNAC2* and *GmNAC5* were not up-regulated by biotic stimuli. Expression of *GmNAC6* in tobacco leaves resulted in cell death, causing leaf yellowing and necrosis, chlorophyll loss, malondialdehyde production, and induction of the *PRs* defense genes. Consistent with the presence of defense-related putative elements in the *GmNAC6* promoter region, this transfactor was induced by wounding, compatible pathogen and systemic response. Overexpression of *NRP-A* and *NRP-B*, which are involved in cell death events, increased *GmNAC6* transcripts. These results are consistent with the early response of *NRPs* in response to pathogen attack in comparison with the late response of *GmNAC6*. Nevertheless, transient expression of *GmNAC6* down-regulated *NRP-A* expression. All together, these results implicated *GmNAC6* as a downstream component of the *NRPs*- mediated cell death signalling. Further experiments are necessary to elucidate the signaling pathway involved *NRPs* and *GmNAC6*.

I - INTRODUÇÃO

Seca, alta salinidade, baixas temperaturas e ataque de patógenos são alguns dos principais fatores que limitam o crescimento e desenvolvimento das plantas. O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, com produção estimada em 60,3 milhões de toneladas para a safra 2008/2009. As perdas anuais de produtividade por doenças estão estimadas em cerca de 20%, porém, algumas doenças podem ocasionar 100% de perda (CONAB, 2009). Embora, a utilização de produtos químicos tem ajudado no controle das doenças, tal prática é economicamente dispendiosa, além de gerar grande impacto no meio ambiente. Assim, o desenvolvimento de novas estratégias baseadas nos mecanismos de defesa das plantas é fundamental para sustentabilidade da produção agrícola e preservação do meio ambiente (Yang et al., 1997).

Em respostas a estresses, as células vegetais desenvolveram um complexo mecanismo de defesa que atua aumentando a tolerância contra as condições restritivas. Genes induzidos durante as condições de estresse não somente protegem as células do estresse pela produção de proteínas metabolicamente importantes e funcionais, como também atuam na transdução do sinal para ativação da resposta. Exemplos de tais reguladores são as proteínas cinases e os fatores de transcrição (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2005; Nakashima & Yamaguchi-Shinozaki, 2006). Elucidar os mecanismos como as plantas percebem os sinais ambientais e os transmitem a maquinaria celular para ativar uma resposta adaptativa é fundamental para a

biologia das plantas e desenvolvimento de estratégias de tolerância (Hu *et al.*, 2007).

A tolerância de plantas a diferentes estresses bióticos e abióticos é o alvo dos programas de melhoramento de cultivares de relevância econômica, como é o caso da soja. Os fatores de transcrição estão entre os principais alvos para o aumento da resistência a diferentes estresses, uma vez que estas proteínas controlam a expressão de vários genes.

Os genes da família de fatores de transcrição NAC são específicos de plantas e atuam em processos diversos como desenvolvimento e reconhecimento de estímulo ambiental (Olsen *et al.*, 2005). Alguns membros desta família têm sido reportados como alvos interessantes para a manipulação gênica em plantas. Plantas superexpressando genes NACs apresentam elevada tolerância a condições de estresse biótico e resistência a patógenos (Tran *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2006; Nakashima *et al.*, 2007).

Recentemente, foram anotados 101 genes NACs em soja que foram agrupados em 15 subfamílias (Pinheiro *et al.*, 2009). Seis genes, previamente relatados (*GmNAC1-GmNAC6*) por Meng *et al.*, 2007, apresentaram perfis de expressão distintos em resposta a alguns fatores de estresse como hormônios, frio e sal. Em adição, a expressão transiente em tabaco dos transfatores *GmNAC1*, *GmNAC5* e *GmNAC6* resultou em morte celular e na expressão de marcadores de senescência (Pinheiro *et al.*, 2009).

O evento de morte celular em soja está associado à atuação das proteínas ricas em asparagina (NRPs; Costa *et al.*, 2008). *NRP-A* é induzido na reposta hipersensível de plantas inoculadas com bactéria em associação incompatível (Ludwig & Tenhaken, 2001). Assim como *NRP-A*, *NRP-B* é co-

regulado por uma sinalização que integra a resposta ao estresse osmótico à resposta decorrente do estresse no RE (Irsigler *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2008).

A atuação desta via integrativa sugere a potencialização dos mecanismos de defesa para condições diversas de estresse. Neste contexto, há a indução do gene *GmATAF*, que codifica um transfator pertencente a família NAC (Irsigler *et al.*, 2007; Pinhero, 2007).

O presente trabalho teve como objetivo principal caracterizar funcionalmente o gene *GmNAC6* de soja, e o processo de morte celular ao qual está associado. A análise da expressão gênica em resposta a estresses bióticos foi estendida aos transfatores NAC previamente reportados e novos genes *NACs* identificados em soja.

II - REVISÃO DE LITERATURA

1. Resposta de defesa em plantas

As plantas crescem em um ambiente dinâmico, sendo submetidas constantemente a condições adversas. Tal fato pode repercutir significativamente em seu crescimento e desenvolvimento. Mediante o ataque de patógenos, as plantas são capazes de ativar uma resposta de defesa efetiva para restringir a infecção. A resistência e a susceptibilidade das plantas às doenças são governadas pela combinação de genótipos do hospedeiro e do patógeno e dependente da troca complexa de sinais entre os mesmos. A interação incompatível ocorre quando a planta é desafiada por um patógeno “estranho” incompatível, isto é, o patógeno é efetivo para outras espécies de plantas e não para a planta em questão. Neste caso, ocorre a manifestação da resposta hipersensível. Por conseguinte, na compatibilidade, o patógeno é específico e induz um processo de infecção característica (Heath, 2000).

Ao longo do processo de co-evolução hospedeiro-patógeno, as plantas têm desenvolvido elaborados mecanismos de escape ao ataque do patógeno. Alguns destes mecanismos de defesa são constitutivos atuando como barreiras físicas e químicas à entrada do microorganismo, enquanto que outros, por sua vez, são induzidos somente após a penetração do patógeno. A indução de uma resposta de defesa eficaz geralmente requer o reconhecimento do patógeno

para ativação da via de transdução de sinal resultando na rápida expressão de genes de defesa (Yang *et al.*, 1997; Glazebrook, 2001; Bostock, 2005).

2. Resposta hipersensível - HR

A resposta de defesa induzida por patógenos é geralmente regulada pelo estabelecimento da resposta hipersensível (HR) e pelo subsequente estabelecimento da resistência adquirida sistêmica (SAR; Heath, 2000; Durrant & Dong, 2004).

A resposta hipersensível é caracterizada pelo processo de morte celular rápido e localizada nas seções adjacentes ao ponto de ataque do patógeno, estando associada à restrição da invasão, bem como, a ativação de genes relacionados à defesa (Dangl *et al.*, 1996). A HR é conceitualmente relacionada ao processo de morte celular apoptótico. As células adjacentes ao local de infecção exibem características apoptóticas como clivagem endonucleolítica. Entretanto, os eventos moleculares associados a este tipo de morte celular programada ainda não foram completamente elucidados (Greenberg & Yao, 2004).

A resistência adquirida sistêmica (SAR), por sua vez, ocorre nas regiões não infectadas das plantas que sofreram uma infecção local e corresponde a uma resistência pré-montada contra futuras infecções para vários patógenos (Figura 1) (Ryals *et al.*, 1996; Durrant & Dong, 2004). Além da SAR, outros processos de resistência sistêmica são caracterizados em plantas como: (1) a

resistência sistêmica induzida (ISR) ativada após a colonização das raízes por estirpes de rizobactérias não patogênicas e (2) a defesa induzida por ferimento após o dano causado por insetos (Pieterse *et al.*, 2002; Kessler & Baldwin, 2002).

A ativação da resposta de defesa inicia-se com o reconhecimento de moléculas codificadas pelo patógeno denominadas elicitores (peptídeos, proteínas, oligossacarídeos e outros). A interação dos elicitores do patógeno com os receptores do hospedeiro ativa uma cascata de transdução de sinal que envolve a fosforilação de proteínas, o fluxo de íons, a formação de espécies reativas de oxigênio (ROSS) e do sinalizador óxido nítrico (NO) (Apel *et al.*, 2004; Romero-Puertas *et al.*, 2004; Huckelhoven, 2007).

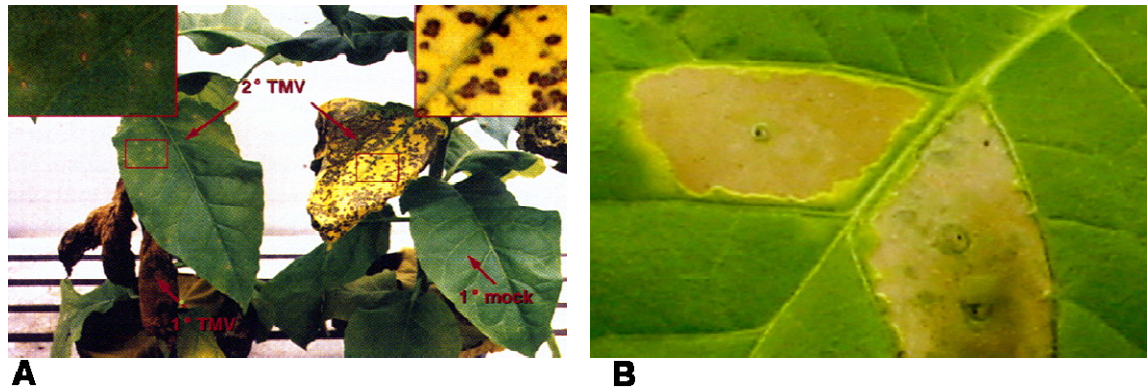


Figura 1. Resposta hipersensível (HR) e resistência adquirida sistêmica (SAR). A. A infecção de TMV (Tobacco Mosaic Virus) em plantas de tabaco carreando o gene de resistência *N* leva ao estabelecimento da HR e o desenvolvimento subsequente da SAR. Em oposição à planta controle (direita), a planta desafiada (esquerda) desenvolve a SAR após a 1ª infecção. Observa-se o decréscimo no tamanho e no número de lesões produzidas após a 2ª infecção (detalhe superior esquerdo). **B.** Detalhe do desenvolvimento macroscópico da HR nas folhas de tabaco infiltradas com *Cladosporium fulvum* efetor Avr9 (Yang *et al.*, 1997; Hofius *et al.*, 2007).

Os mediadores ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno juntamente com ROSs e NO atuam como amplificadores e mensageiros secundários. Os eventos de sinalização culminam na ativação transcricional e/ou pós-traducional de fatores de transcrição que atuam na regulação e expressão de genes de defesa e na resposta de resistência. Dentro deste contexto, há ativação transcricional dos genes relacionados à patogênese (*PR*) como glucanase e quitinase e a produção de moléculas antimicrobianas (defensinas e fitoalexinas) (McDowell & Dangl, 2000; Nurnberger *et al.*, 2004; Hofius *et al.*, 2007).

3. Estresse típico do RE e subsequente morte celular induzida

As proteínas secretórias, bem como, as localizadas na membrana celular ou direcionadas a alguma organela específica são traduzidas por ribossomos localizados na superfície citosólica do retículo endoplasmático (RE). Concomitantemente à tradução, as proteínas são translocadas para o lúmen do RE e sofrem modificações tais como glicosilação e formação de ligações dissulfídicas. Tais modificações pós-traducionais contribuem para o correto enovelamento das proteínas em suas conformações finais específicas (Schroder & Kaufman, 2005; Rasheva & Domingos, 2009).

O comprometimento da função do RE ocorre quando o influxo de cadeias nascentes e/ou quantidade de proteínas mal-dobradas excede a capacidade de dobramento da organela. Alterações no correto enovelamento

protéico advem, por exemplo, da prevenção de modificações pós-traducionais, do desequilíbrio de íons cálcio ou erro na estrutura primária da proteína (Schroder & Kaufman, 2005; Ron & Walter, 2007). Estas situações promovem o acúmulo de proteínas mal-dobradas no lúmen da organela em um evento denominado de estresse do RE.

As condições de estresse no RE acionam um grupo de vias de transdução de sinais coletivamente denominadas UPR (via de resposta a proteínas mal-dobradas). Esta sinalização de proteção contra o estresse promove a comunicação entre o RE e o núcleo, e resulta na ativação de mecanismos para a manutenção da homeostase celular (Bernaes *et al.*, 2006; Ron & Walter, 2007; Lin *et al.*, 2008).

Os principais reguladores da UPR são proteínas transmembranas residentes no RE: IRE1 (“inositol-requiring protein 1”), PERK (“PKR-like endoplasmic reticulum kinase”), ATF-6 (“activating transcription factor”). Estes transdutores possuem um domínio localizado no lúmen do RE, os quais percebem o estresse na organela, e o acopla ao domínio citosólico com função efetora (Calfon *et al.*, 2002; Bernales *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2008).

A ativação da UPR promove o aumento na capacidade de dobramento das proteínas em decorrência da síntese de chaperones residentes no RE. Adicionalmente, ocorre indução de genes codificando componentes da ERAD (degradação de proteínas associada ao RE). Este processo promove a retranslocação das proteínas mal-dobradas para o citoplasma e o direcionamento destas para a degradação mediada por proteossomo. Em contrapartida, há a atenuação da tradução protéica e inibição transcricional dos genes codificando proteínas secretórias (Kozutsumi *et al.*, 1988; Travers *et al.*,

2000; Tsai *et al.*, 2002; Martínez & Chrispeels, 2003; Kamauchi *et al.*, 2005; Malhotra & Kaufman, 2007;).

A análise do transcriptoma de *Arabidopsis* tratada com agentes indutores de estresse no RE mostra a indução de genes que codificam proteínas envolvidas na maquinaria secretória, como chaperones moleculares, proteínas do transporte vesicular e enzimas de modificação pós-traducionais e outros. Paralelamente, há uma repressão dos genes que codificam proteínas extracelulares (Martinez & Chrispeels, 2003).

A detecção das proteínas mal-dobradas no lúmen do RE pelos sensores da UPR parece estar associada ao chaperone molecular BiP (Binding Protein). Neste modelo, BiP atua como possível regulador negativo, controlando o status de ativação dos transdutores da via em leveduras, mamíferos e plantas. Condição de superexpressão do chaperone *BiP* promove uma regulação negativa no nível de mRNA de *BiP* endógeno, bem como inibição da UPR (Leborgne-Castel *et al.*, 1999; Bertolotti *et al.*, 2000; Alvim *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2008; Valente *et al.*, 2009).

Em *Arabidopsis*, dois genes homólogos a IRE1 (*AtIre1a* e *AtIre1b*) possuem peptídeo sinal na região N-terminal e um domínio transmembrana tipo 1 na região interna da sequência. Além disso, a sequência da região C-terminal apresenta alta homologia com o domínio endoribonuclease/cinase de Ire1p presente em leveduras. A região citoplasmática de *AtIre1a* contendo o domínio cinase exibe atividade de autofosforilação (Noh *et al.*, 2002).

Assim também dois genes homólogos ao sensor ATF6 de mamíferos são encontrados em *Arabidopsis* e correspondem aos genes, *AtbZIP60* e *AtbZIP28*. Assim como ATF6, *AtbZIP60* e *AtbZIP28* são proteínas

transmembranas residentes no RE em condições não estressantes. Ativação da UPR promove a clivagem proteolítica de AtbZIP60 e AtbZIP28 liberando os fragmentos com os domínios bZIP, os quais são translocados ao núcleo para a indução de genes responsivos ao estresse no RE, como *PDI* e *BiP*. A forma nuclear de AtbZIP60 ativa os promotores dos genes *BiP* de modo dependente dos cis-elementos P-UPRE (elemento responsivo a UPR em plantas) e ERSE (elemento responsivo a estresse no RE) (Iwata *et al.*, 2008, 2009; Liu *et al.*, 2007; Tajima *et al.*, 2008; Lu & Christopher, 2008).

Em mamíferos, a proteína PERK ativada por estresse no RE causa a fosforilação da subunidade α do fator de iniciação da tradução (eIF-2) e assim atenua a síntese protéica e leva a morte celular (Harding *et al.*, 1999). Embora não se tenha identificado homólogo a PERK de animais em plantas, evidência da sinalização envolvendo PERK decorre da identificação de P58^{IPK} (inibidor de proteína cinase ativada por RNA fita dupla). O silenciamento do inibidor P58^{IPK} em *Arabidopsis* e tabaco causa morte celular nas plantas infectadas com vírus. Este evento de morte celular maciça é associado com a fosforilação de eIF-2 α (Bilgin *et al.*, 2003).

A ativação da UPR induz uma resposta adaptativa para o controle das proteínas mal-dobradas e do estresse no RE. Entretanto, esta resposta pode ser insuficiente para sobrepor o estresse, de tal forma que, o prolongamento da UPR pode desencadear processos de morte celular e senescência foliar em plantas (Malerba *et al.*, 2004; Zuppini *et al.*, 2004; Iwata & Koizumi, 2005; Watanabe & Lam, 2008; Costa *et al.*, 2008). Recentemente, foi demonstrado que a subunidade G β da proteína G heterotrimérica em *Arabidopsis*, localizada na membrana do RE, direciona o evento de morte celular associado à UPR em

resposta a tunicamicina, inibidor da N-glicosilação. Consistente com a localização no RE, a proteína G β é degradada durante a ativação da UPR, possivelmente pelo mecanismo envolvendo a ERAD. Além disso, mutantes nocautes para o gene *G β* são mais tolerantes ao tratamento com tunicamicina (Wang *et al.*, 2007). Porém, os eventos que conectam a sinalização promovida pela proteína G e os mecanismos sensores de estresse no RE permanecem para serem elucidados. Mais recentemente, foi identificada uma via de sinalização que transduz o sinal de morte celular a partir do estresse no RE, mas diverge da via de sinalização UPR que induz a expressão dos chaperones moleculares (Costa *et al.*, 2008). Esta via de sinalização inédita é mediada pelas proteínas NRPs, as quais recebem o sinal integrado do estresse do RE e do estresse osmótico (Isrigler *et al.*, 2007).

4. Proteínas ricas em asparagina – NRPs

As proteínas ricas em asparagina (NRPs) identificadas em soja apresentam uma organização estrutural conservada. Os genes *NRPs* codificam proteínas com dois domínios distintos e característicos: o domínio N-terminal extremamente rico no aminoácido asparagina (25%), e a região C-terminal contendo o domínio relacionado com o desenvolvimento e morte celular específico de plantas, denominado DCD (Development and Cell Death; Ludwig & Tenhaken, 2001; Tenhaken *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2008).

A primeira proteína NRP de soja foi inicialmente descrita por Ludwig & Tenhaken, (2001). Com a recente caracterização de outra NRP (NRP-B) em soja, a primeira passou a ser denominada NRP-A (Costa *et al.*, 2008). O gene que codifica NRP-A foi expresso na fase inicial da interação incompatível da soja e não foi induzido na interação compatível. Este gene não responde diretamente ao ácido salicílico isoladamente e a peróxido de hidrogênio, embora a transcrição de *NRP-A* possa ser amplificada na presença do hormônio SA, o qual é essencial para a morte celular programada (Ludwig & Tenhaken, 2001).

Em soja, as proteínas NRPs são alvos de uma via adaptativa que integra o sinal de estresse osmótico ao do retículo endoplasmático. Esta via de sinalização diverge da via UPR que induz a expressão dos chaperones do RE e transduz um sinal de morte celular programada associada a marcadores de senescência foliar. A superexpressão de NRPs em protoplastos induz a atividade de enzimas similares a caspase-3 e promove a fragmentação do DNA. Além disso, a superexpressão das NRPs está associada a clorose foliar, redução do conteúdo de clorofila, produção de malondialdeído e indução de gene característico da senescência *CP1* (Costa *et al.*, 2008).

As proteínas NRP-A e NRP-B não possuem nenhum sinal de localização subcelular clássico. Utilizando a técnica de fracionamento celular, NRP-A foi detectada na parede celular de células de soja submetidas à HR (Ludwig & Tenhaken, 2001). Entretanto, estes resultados não foram confirmados em experimentos de expressão transiente dos genes *NRPs* fusionados a GFP (green fluorescent protein), quando examinados por microscopia confocal (Costa *et al.*, 2008).

As proteínas contendo o domínio DCD podem ser agrupadas em pelo menos quatro subgrupos. A diferença encontrada entre os subgrupos reside na localização do domínio DCD na estrutura da proteína. NRP-A e NRP-B são enquadradas no subgrupo I e assemelham-se a uma proteína de *Arabidopsis* de função desconhecida codificada por *At5g42050*. Dados de microarranjos revelam a indução deste gene durante a senescência, estresse osmótico e salino e tratamento com cicloheximida (Tenhaken *et al.*; 2005; Costa *et al.*, 2008).

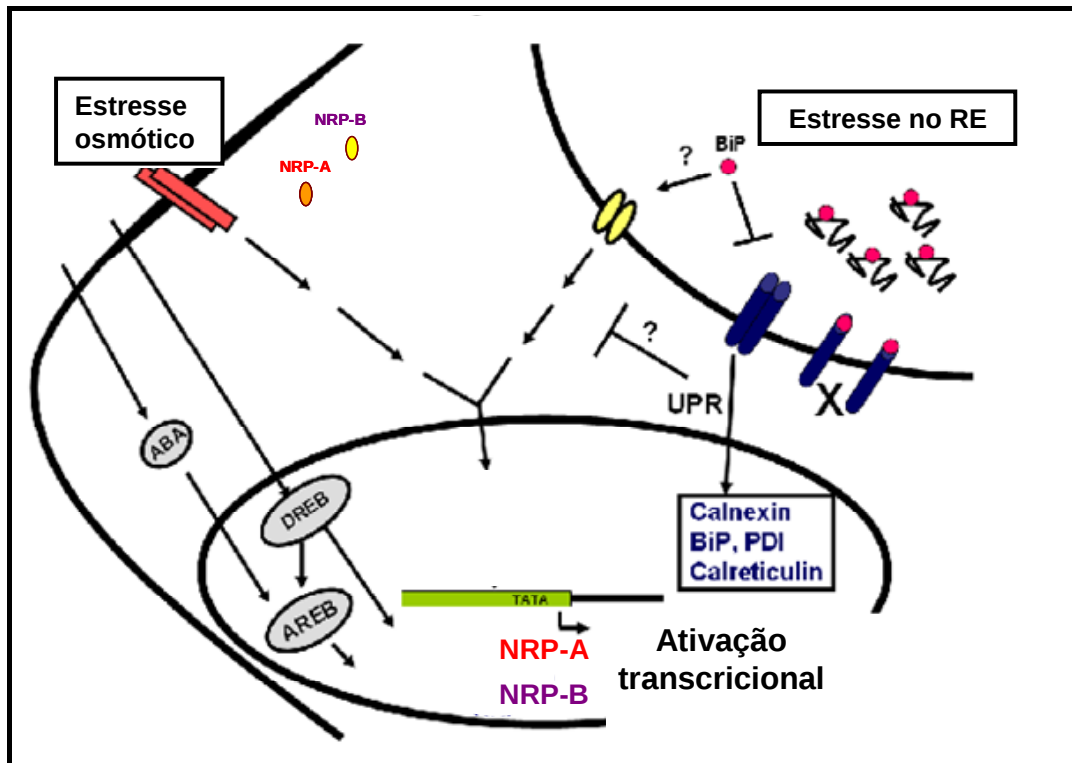


Figura 2. A integração entre as vias de sinalização induzidas em resposta ao estresse osmótico e ao estresse do retículo endoplasmático ativam a expressão dos genes NRPs. Estresse originado no RE por acúmulo de proteínas mal dobradas ativa uma sinalização distinta da UPR que integra ao sinal osmótico de uma maneira convergente no nível de ativação dos genes *GmNRP-A* e *GmNRP-B*. No modelo, é destacada a via UPR, ativada por um receptor transmembrana do RE que é regulado por concentrações de BiP no RE e resulta na ativação dos genes que codificam chaperones moleculares tais como: calreticulina, BiP e calnexina. Em destaque, também, as vias de resposta à seca dependente do hormônio ABA ou mediada por DREB. Figura modificada de Costa *et al.*, 2007.

5. Transfatores de resposta à defesa

A transdução de sinais envolve desde a percepção inicial do estresse até a expressão de genes específicos responsivos a esta condição. Vários

fatores de transcrição e cis-elementos inseridos nos promotores responsivos a estresse atuam não somente como interruptores moleculares da expressão gênica, mas também, como pontos terminais do processo de sinalização (Tran *et al.*, 2009). Em *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* foram reportadas mais de 50 famílias de fatores de transcrição (Riechmann *et al.*, 2000; Xiong *et al.*, 2005; Riaño-Pachón *et al.*, 2007).

As principais famílias de fatores de transcrição de plantas associadas com resposta de defesa são AP2/EREBP, bZIP, Myb e WRKY, que correspondem aos transfatores de resposta de defesa em plantas mais bem caracterizados. Enquanto alguns membros destas famílias estão especificamente envolvidos na regulação de defesa a estresses bióticos, outros despontam por coordenar vias de desenvolvimento das plantas (Park *et al.*, 2001; Pontier *et al.*, 2001b; Vailleau *et al.*, 2002; Chen & Chen 2002; Eulgem *et al.*, 2000). Recentemente, os fatores de transcrição da família NAC emergiram como atuantes tanto na resposta a estresse abiótico quanto na regulação das respostas de defesa e ferimento nas plantas (Hegedus *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2005; Nakashima *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2007, Pinheiro *et al.*, 2009).

6. Fatores de transcrição da família NAC

NAC (acrônimo de NAM, ATAF e CUC) constitui uma grande família de fatores de transcrição específicos de plantas. Análise realizada em *Arabidopsis thaliana* indicou 120 putativos transfatores NAC nesta planta modelo

(Riechmann *et al.*, 2000; Ooka *et al.*, 2003). Recentemente, Fang *et al* (2008) identificaram 140 putativos transfatores NAC e NAC-like em *Oryza sativa* e Pinheiro *et al* (2009) identificaram, em *Glycine max*, 101 proteínas contendo o domínio NAC.

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

O domínio NAC compreende aproximadamente 160 resíduos de aminoácidos, onde blocos conservados se intercalam com blocos de aminoácidos heterogêneos ou *gaps*, definindo cinco subdomínios (A-E), conforme designado por Kikuchi *et al.*, 1999 e Ooka *et al.*, 2003. Os dois subdomínios N-terminais (A e B) exibem uma carga líquida negativa, enquanto os outros subdomínios são positivamente carregados (Xie *et al.*, 1999). Os subdomínios A, C e D são altamente conservados em proteínas NAC de diferentes espécies, já os subdomínios B e E são mais divergentes (Ooka *et al.*, 2003).

Em decorrência da sua alta variabilidade, o domínio C-terminal dos transfatores NAC é considerado o domínio funcional. Este, por sua vez, pode atuar tanto como ativador como repressor transcricional (Tran *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007a). Paralelamente, a região C-terminal pode conter

regiões transmembranas de transfatores NAC associados a membranas intracelulares (Kim *et al.*, 2007b).

Membros da família NAC atuam em muitos processos de desenvolvimento da planta (Olsen *et al.* 2005a; Mao *et al.*, 2007), como na formação e manutenção do meristema do broto apical (Aida *et al.*, 1997; Weir *et al.*, 2004), embriogênese (Duval *et al.*, 2002; Kunieda *et al.*, 2008), controle do período de florescimento (Yoo *et al.*, 2007) e reguladores na formação da parede secundária (Zhong *et al.*, 2006; Mitsuba *et al.*, 2007). Genes NAC podem também atuar na remobilização de nutrientes e no processo de morte celular associado à senescência foliar (Uauy *et al.*, 2006; Guo & Gan, 2006; Kim *et al.*, 2009).

A diversidade funcional dos transfatores NAC pode ser exemplificada na participação destes em eventos de sinalização da planta em processos de desenvolvimento ou de adaptação com o ambiente. Proteínas com domínio NAC estão envolvidas nos mecanismos de sinalização através de hormônios (Aida *et al.*, 2002; Greve *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2000; Bu *et al.*, 2008), na resposta de infecção por patógeno (Collinge & Boller 2001; Nakashima *et al.*, 2007; Oh *et al.*, 2005; Hegedus *et al.*, 2003) e na resposta a estresses abióticos (Hegedus *et al.*, 2003; Tran *et al.*, 2004; Ohnishi *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2006; Christianson *et al.*, 2009).

7. NAC e estresse abiótico

A atuação de proteínas NAC na resposta a estresses abióticos é evidenciada pela indução de diferentes genes *NAC* de *Brassica napus* (Hegedus *et al.*, 2003) e do gene *SsNAC23* de *Saccharum sp.* (Nogueira *et al.*, 2005) por frio e desidratação. A expressão de transfatores NAC em trigo e algodão está também associada a fatores abióticos (Xue *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 2009).

O gene *OsNAC6* de arroz é induzido por ABA, frio, desidratação e salinidade (Ohnishi *et al.*, 2005; Nakashima *et al.*, 2007). Superexpressão de *ONAC063* em *Arabidopsis* promoveu uma maior tolerância a vários estresses ambientais como: alta temperatura, salinidade e estresse osmótico (Yokotani *et al.*, 2009). *SNAC1* (*ONAC33*), específico de células-guarda é induzido por seca, sal e ácido abscísico. A superexpressão deste gene promove o fechamento estomático e aumenta consideravelmente a tolerância à seca (Hu *et al.*, 2006). Superexpressão de *SNAC2*, por sua vez, confere tolerância a frio e sal (Hu *et al.*, 2008).

O cDNA correspondente ao gene *AmNAC1* foi isolado da planta natural de mangue, *Avicennia marina*, em condições de estresse salino. Este transfator NAC é induzido por altas concentrações de NaCl e pelo hormônio ABA (Ganesan *et al.*, 2008). A presença deste hormônio, desidratação e H₂O₂ induzem também a expressão do gene *CarNAC3* em grão de bico (Peng *et al.*, 2009).

Os genes de *Arabidopsis* *AtNAC2*, *ANAC019*, *ANAC055* e *ANAC072* (*RD26*) estão relacionados a estresse abiótico. O produto dos genes *ANAC019*, *ANAC055* e *ANAC072* ligam-se especificamente ao motivo CATGTG na região promotora do gene *ERD1*. *ANAC072* (*RD26*) parece estar envolvido em uma via de sinalização dependente de ABA. A resposta a estresse salino de *AtNAC2* requer a atuação de vias de sinalização de auxinas e etileno (Tran *et al.*, 2004; Fujita *et al.*, 2004; He *et al.*, 2005).

ATAF1, um dos primeiros genes NAC identificados em *Arabidopsis*, é induzido por seca e tratamento com ABA exógeno. Em ensaio de perda de função, uma maior tolerância a déficit hídrico é observada nos mutantes *ataf1*. Consistente com a tolerância, plantas mutantes em condições de seca possuem elevada expressão de genes responsivos a estresse. Em suma, *ATAF1* parece atuar como regulador negativo na sinalização a estresse hídrico (Lu *et al.*, 2007).

8. NAC e estresse biótico

Proteínas NACs foram identificadas em decorrência das suas participações na infecção por patógeno. As proteínas GRAB1 e GRAB2 (*Geminivirus RepA Binding*) foram identificadas em trigo (*Triticum* sp.) por sua capacidade de interagir com a proteína RepA de *Wheat dwarf geminivirus* e reprimir a replicação do vírus (Xie *et al.*, 1999). Similarmente, a proteína TIP (*TCV-interacting protein*) foi identificada em *Arabidopsis* por sua interação com

a proteína do capsídeo (CP) do vírus TCV (*Turnip crinkle virus*). A habilidade do TCV de induzir resposta hipersensível em *Arabidopsis* é dependente da interação entre CP do vírus e TIP (Ren *et al.*, 2000). A proteína SINAC1 (*Solanum lycopersicum* NAC1) interage com a proteína REn (*replication enhancer*) de TLCV (*Tomato leaf curl virus*). REn induz a expressão de SINAC1, o que por sua vez resulta em aumento do acúmulo do DNA viral (Selth *et al.*, 2005).

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

CaNAC1 é induzido durante a resposta hipersensível como mecanismo de defesa contra patógenos bacterianos (Oh *et al.*, 2005). Em *Brassica napus*, novos membros da família NAC (*BnNACs*) foram diferentemente expressos após ataque de herbívoros e baixa temperatura (Hegedus *et al.*, 2003).

Bu *et al.*, 2008 demonstraram que os genes *ANAC019* e *ANAC055* podem atuar como ativadores transcricionais na regulação de genes induzidos por ácido jasmônico. A expressão destes genes é induzida após inoculação de fungo necrotrófico *Botrytis cinera*.

Análises de microarranjos revelaram uma indução rápida e local do gene *ATAF2* de *Arabidopsis* após ferimentos, seguido por um decréscimo até os níveis basais de expressão (Delessert *et al.*, 2005). *ATAF2* também é induzido por metil-jasmonato, ácido salicílico (Delessert *et al.*, 2004) e infecção por

bactérias (Hauck *et al.*, 2003), mas não por ABA (Delessert *et al.*, 2005). Interessantemente, plantas superexpressando *ATAF2* apresentam maior susceptibilidade a *Fusarium oxysporum*. A análise das linhagens transgênicas indicou que *ATAF2* atua na repressão de genes relacionados à patogênese (PR-genes; Delessert *et al.*, 2005). A expressão de *ATAF1*, outro membro da subfamília ATAF em *Arabidopsis*, está relacionada a fermento e infecção por *Alternaria brassicicola* (Collinge & Boller, 2001; Schenk *et al.*, 2003).

9. Transfatores NACs em soja

Um número elevado de genes NAC tem sido relatado nos genomas de *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* (Ooka *et al.*, 2003). Em soja, 111 membros da família NAC foram identificados pelo banco de dados Soybean Transcription Factor database (<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/web/index.php?sp=gm>). Dentre estes, foram clonados 31 genes NAC de soja denominados GmNAC001 a GmNAC031 (Tran *et al.*, 2009). Recentemente, um inventário de fatores NAC em soja foi conduzido em nosso laboratório e 101 ORFs completas codificando proteínas contendo domínio NAC foram agrupadas em 15 diferentes subgrupos (Pinheiro *et al.*, 2009).

As seis proteínas NAC de soja (GmNAC1-GmNAC6), previamente descritas por Meng *et al.*, 2007, apresentaram localização nuclear (Pinheiro *et al.*, 2009). Além disso, ensaio em leveduras confirmou que *GmNAC2-GmNAC5* funcionam como transativadores (Pinheiro *et al.*, 2009). Paralelamente, as

regiões C-terminal de *GmNAC1* e *GmNAC6* atuaram como domínios transativadores em leveduras (Tran *et al.*, 2009).

GmNAC2, *GmNAC3* e *GmNAC4* apresentaram forte indução por estresse osmótico. *GmNAC3* e *GmNAC4* foram induzidos também por salinidade e pelos hormônios ABA e JA (Pinheiro *et al.*, 2009).

Os genes NAC de soja possuem perfis de expressão distintos nos tecidos e órgãos, sendo que a maioria é preferencialmente expressa em um dado órgão/tecido. Tal característica sugere que os produtos destes genes desempenham funções diversificadas no crescimento e desenvolvimento da planta (Meng *et al.*, 2007; Pinheiro, 2007; Tran *et al.*, 2009).

Adicionalmente, um novo transfator NAC de soja foi identificado sendo co-regulado por estresse osmótico e do retículo endoplasmático (Irsigler *et al.*, 2007). Em decorrência da alta identidade e similaridade com os genes *ATAF1* e *ATAF2* de *Arabidopsis*, este gene foi denominado *GmATAF*. Como regulador transcricional, *GmATAF* atuaria como um repressor, regulando negativamente vias de resposta a estresse osmótico e do RE (Pinheiro, 2007).

A caracterização funcional dos genes NAC em soja forneceu evidências da participação destes transfatores no processo de morte celular programada (PCD). A expressão transiente dos genes *GmNAC1*, *GmNAC5* e *GmNAC6* em tabaco induziu clorose foliar e aumentou a expressão de marcadores de senescência. Adicionalmente, *GmATAF*, *GmNAC1* e *GmNAC6* foram induzidos por cicloheximida, um potente indutor de morte, e reprimidos por inibidores de senescência (Pinheiro *et al.*, 2009; Pinheiro, 2007). Entretanto, os mecanismos de ação do gene *GmNAC6* em eventos de morte celular programada e sua conexão com a via de sinalização de morte celular originada no RE e mediada

pelas proteínas NRPs não foram determinados e constituem os objetivos primordiais da presente dissertação.

III - MATERIAL E MÉTODOS

1. Material vegetal e tratamentos

1.1. Inoculação de bactérias patogênicas

Nos experimentos de desafio das plantas com bactérias fitopatogênicas, foram usadas plantas de soja da variedade Conquista no estágio VC (as folhas unifoliadas completamente expandidas). As bactérias *Pseudomonas syringae* *patovar* *Tomato* e *Ralstonia solanacearum* foram cultivadas a 28°C em meio 523 (Kado & Heskett, 1970) e meio LB (Luria-Bertani Broth), respectivamente. Após centrifugação, as culturas bacterianas foram ressuspensas em 10mM MgCl₂. As folhas foram inoculadas através de uma leve pressão na epiderme abaxial com as suspensões bacterianas em valor de D.O. 600nm de 0,2 (correspondente a aproximadamente 1×10^7 cel/ml; Bogdanove *et al.*, 1998). Em períodos determinados, o material vegetal foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C até as análises.

1.2. Tratamento com enzimas que degradam a parede celular

A aplicação de enzimas hidrolíticas nas folhas de soja foi conduzida segundo a metodologia proposta por Jelitto-Van Dooren *et al.*, 1999. Folhas de soja no estágio VC (duas folhas unifoliadas opostas no período de abertura dos cotilédones conforme descrito na escala fenológica de Fehr & Caviness, 1977)

foram infiltradas com solução enzimática (0,4% celulase, 0,2% de macerozima, 0,6% manitol, MES 20mM; pH 5,5) ou com tampão (0,6% manitol, MES 20mM; pH 5,5) (controle). Decorridos os diferentes tempos de inoculação (3, 10 e 24 horas), as folhas infiltradas foram coletadas para estudo dos efeitos locais. Adicionalmente, as folhas não tratadas no lado oposto às infiltradas foram utilizadas para monitorar o efeito sistêmico do referido tratamento.

1.3. Aplicação de ferimento

A indução do ferimento foi realizada nas plantas de soja no estágio V1 (o 1º trifolíolo completamente expandido). Com o uso de uma espátula, todas as folhas foram pressionadas várias vezes na lâmina apical. Tal metodologia resultou em uma área ferida correspondente a 50% da área foliar (Oh *et al.*, 2005).

2. Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. Para eliminação do DNA contaminante, o RNA total foi tratado com uma unidade de DNase livre de RNase (Invitrogen). O RNA foi quantificado (DU 650 BECKMAN Spectrophotometers) e analisado em gel de agarose desnaturante 1,5 % (p/v), corado com brometo de etídeo 0,1 µg/mL. A síntese de cDNA foi realizada utilizando 4 µg de RNA total, oligo-dT(18) e Transcriptase Reversa M-MLV (Invitrogen), segundo as especificações do fabricante.

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

Todo o procedimento de PCR em Tempo Real, incluindo testes, validações e experimentos foram conduzidos seguindo os manuais da *Applied Biosystems*. As reações de PCR em tempo real foram conduzidas utilizando o aparelho 7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems), oligonucleotídeos específicos (Tabelas 1 e 2), cDNAs dos tratamentos e SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). As condições de amplificação foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, e 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Para a quantificação da expressão gênica, foram utilizados os métodos comparativos de Ct: $2^{-\Delta Ct}$ e $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Como controle endógeno para normalização dos dados do qRT-PCR, foi utilizado o primer específico para RNA helicase de soja, que apresentou baixa variação de expressão entre os tratamentos avaliados em Irsigler *et al.*, 2007. Adicionalmente, o primer específico para o gene de soja *SEB* (Selene Binding Protein; AW101647) foi validado como outro gene normalizador pelo programa geNorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>; Vandesompele *et al.*, 2002) e confirmado para condições experimentais como fermento, aplicação de solução enzimática e patógenos. Como controle endógeno das amostras de tabaco foi utilizado o primer específico para a Actina (Costa *et al.*, 2008).

Tabela 1 – Listagem dos oligonucleotídeos para qRT-PCR em soja

Oligonucleotídeo	Seqüência (5' – 3')	Gene	Número de acesso
HELIC Fw	TAACCCTAGCCCCTTCGCCT	Helicase	AI736067
HELIC Rv	GCCTTGTCGTCTTCCTCCTCG		
NAM Fw	ACGGAGACTTCAGATTCGGTGC	ATAF	AW459852
NAM Rv	CATCGTTATTCCACTTGGGGTCGC		
Nac1 Fw	GGACTACCCAATAGCCCAAATCA	Nac1	AY974349 Gm0129x00049*
Nac1 Rv	GACCCAAGTAATCCATTTCCAAAAG		
Nac2 Fw	GGGTGCTTTGCCGTATTTACAA	Nac2	AY974350 Gm0026x00071*
Nac2 Rv	CTCCTCCGCTTTTCAGAATCTC		
Nac3 Fw	GAATGCAGCAATGGGTCATCA	Nac3	AY974351 Gm0027x00010*
Nac3 Rv	ATCCTGCTGGTGCATTGTTCTG		
Nac4 Fw	TGACCTCTATGTCCCTGCGTTA	Nac4	AY974352 Gm0178x00114*
Nac4 Rv	CCCCTGTGTGAAATCATTCTGA		
Nac5 Fw	CCCCAAACTGCAAAGAATGAG	Nac5	AY974353 Gm0083x00164*
Nac5 Rv	GTGAGAGGTGGCAAAGCAGAAG		
Nac6 Fw	CCAACAAAAGCACTTGTGGCA	Nac6	AY974354 Gm0098x00246*
Nac6 Rv	GGACTATTCAACTGAGCCCAAAAG		
BiPD Fw	ATCTGGAGGAGCCCCAGGCGGTGG	BiPD	AF031241
BiPD Rv	CTTGAAGAAGCTTCGTCTGTAATACTAAG		
CALN Fw	TGATGGGGAGGAGAAGAAAAAGGC	CALN	AW508066
CALN Rv	CACTTGGGTTTGGGATCTTGGCTC		
NRP Fw	GGCACAAGACTGGTGCTGAGA	NRP-A	AJ875407
NRP Rv	CTCTGTATCGTGGAGGCAGACC		
NRich Fw	TACAGGCATCCAATTTGGCGAACC	NRP-B	AI973541
NRich Rv	TGACTTGAAAGAGTTGATCTCACCCC		
PDI1 Fw	TTGGTTGAAGGCGTACAAGGATGG	PDI1	AW567827
PDI1 Rv	ACTCCAGCAGAACATTCTTCCCAG		

Tabela 1 (Continuação) – Listagem dos oligonucleotídeos para qRT-PCR em soja

Oligonucleotídeo	Sequência (5' – 3')	Gene	Número de acesso
GST Fw	CGGTTCTCATCCACAATGGCAAAC	GST	AAC18566
GST Rv	CAGCCCAGAATCTAGCCTGAGC		
Gm82x223 Fw	CGGAAGGAAAACCAAATGGAA	Gm82	Gm0082x00223*
Gm82x223 Rv	CAAGCTGAATTCGTGCCTCAA		
Gm119x75 Fw	AAGCCTCCTAATGGATCCAGAAC	Gm119	Gm0119x00075*
Gm119x75 Rv	GGGAACAACATGGCTCTGAGA		
Gm178x115 Fw	GTCACCCATGGAGCATGAAAG	Gm178	Gm0178x00115*
Gm178x115 Rv	ATGATGAAACCTCGCACTCATGT		
Gm258x14 Fw	AACTGGAGCTGGGTTCTGGAA	Gm258	Gm0258x00014*
Gm258x14 Rv	CCTTTGGCAGCTCTACCTTTGT		
GmPR1 Fw	AACTATGCTCCCCCTGGCAACTATATTG	PR1	BU577813
GmPR1 Rv	TCTGAAGTGGCTTCTACATCGAAACAA		
GmPR2 Fw	TGAAATAAGGGCCACGAGTCCAAATG	PR2	M37753
GmPR2 Rv	ATGGTACATGCAGACTTCAAGAATGCAGAT		
GmPR3 Fw	AACTACAATTACGGGCAAGCTGGCAA	PR3	AF202731
GmPR3 Rv	TTGATGGCTTGTTTCCCTGTGCAGT		
GmPR4 Fw	TGCGGGTGACAAATACAGGAA	PR4	AK246040
GmPR4 Rv	TGCTGCACTGATCTACGATTCTC		
GmPR5 Fw	GCGCTTGCTCCGCTTTCAACT	PR5	BU765509
GmPR5 Rv	CTTGGAATAGACGGTGGGCTTGC		
GmCYSTP Fw	TGGAAAGCAACTCAATCATGGT	CystP	Gm0106x00069*
GmCYSTP Rv	CCCCATGAGTTCTTCACAATCC		
GmDID Fw	TCGGGTGTGAGCTTGGTAAAA	DiD	Gm0013x00192*
GmDID Rv	GCCATGTCTGTGAGTCCAGTGA		
GmSEB Fw	AAGGCAGTATAACATCGAGG	SEB	AW101647
GmSEB Rv	TGCCATGTTTCACCATCATC		

Tabela 2 – Listagem dos oligonucleotídeos para qRT-PCR em tabaco

Oligonucleotídeo	Sequência (5' – 3')	Gene	Número de acesso
TobActin Fw	AGCAAGGAAATTACCGCATTAGC	Actina	AB158612
TobActin Rv	ACCTGCTGGAATGTGCTGAGA		
NTPR1 Fw	CTGCTAAGGCCGTCGAGATGT	PR1	D90197
NTPR1 Rv	GAACCGAGTTACGCCAAACCA		
NTPR4 Fw	AGAGCGCCACAAACGTGAGAT	PR4	X58546
NTPR4 Rv	GCCATGCGAGAGGCTTGTC		
NTChitinase Fw	GTGGCGTAGGTCCGAATGC	Chitinase	X51426
NTChitinase Rv	GGGCGAAGTTCCTTTGGTTGTA		
NTGlucanase Fw	CTCAACGCCATGCGAAACATT	Glucanase	X54456
NTGlucanase Rv	CCCATTTGATGGAGGAGAAGTGT		

Os símbolos (*) nos números de acessos correspondem às sequências ID Glyma0 (<http://www.soybeangenome.org/documents/Glyma0.1.cds.fa.txt>).

Os primers foram desenhados utilizando o programa Primer Express 3.0 (*Applied Biosystems*).

4. Expressão transiente em protoplastos de soja

Os protoplastos foram preparados em ambiente estéril a partir de células de soja, conforme descrito anteriormente (Fontes *et al.*, 1994), com algumas modificações (Costa *et al.*, 2008). Cinco dias após a repicagem, as células foram lavadas duas vezes em tampão de lavagem (manitol 0,6 M; MES 20mM; pH 5,5), centrifugadas a 500 rpm por 2 minutos, ressuspensas em igual

volume de solução enzimática [celulase 0,5% (p/v), macerozima R-10 0,5% (p/v), pectoliase Y23 0,1% (p/v), manitol 0,6 M; MES 20 mM; pH 5,5] e incubadas por 3 horas sob agitação de 40 rpm. A digestão foi acompanhada a cada 30 minutos por microscopia. Em seguida, os protoplastos foram filtrados em peneira de 65 μ m e coletados por centrifugação a 500 rpm por 2 minutos, sendo lavados 2 vezes com tampão de lavagem. Os protoplastos foram novamente coletados por centrifugação por 2 minutos a 500 rpm, ressuspensos em 2 mL de tampão de lavagem e transferidos para um outro tubo contendo tampão gradiente [sacarose 20% (p/v); manitol 0,6M; MES 20 mM; pH 5,5]. O material foi centrifugado por 5 minutos a 500 rpm, sendo coletada a banda na interface, que corresponde aos protoplastos viáveis. Estes foram lavados 2 vezes com tampão de eletroporação (Hepes-KOH 25mM pH 7,2, KCl 10 mM, $MgCl_2$ 15 mM, manitol 0,6M) e ressuspensos em 2 mL do mesmo tampão.

Os protoplastos foram contados em microscópio usando uma câmara de Neubauer. Os ensaios de expressão transiente foram conduzidos por meio de eletroporação de $2 \times 10^5 - 5 \times 10^6$ protoplastos com 10 μ g de DNA (cassete de expressão) e 30 μ g de DNA carreador de esperma de salmão (*ssDNA*), em um volume final de 800 μ l, a 25 μ F de capacitância e 250 volts (Gene Pulser – BIORAD).

Os protoplastos foram eletroporados com o gene *NAC6* clonado no vetor binário de transformação em plantas 35S-pYFP-casseteA-NOS-pCambia1300 (cedido gentilmente pelo Prof. Chris Hardes – Oxford Brookes University (pUFV915) e com o cassete YFP vazio (pUFV 1024). Adicionalmente, os protoplastos foram eletroporados com os genes *GmNRP-A* (pUFV849) e

GmNRP-B (pUFV967) clonados em pMON921, e o vetor pMON921 vazio como controle.

Os protoplastos recém eletroporados foram mantidos no gelo por 15 minutos e transferidos para 8 mL de meio MS Soja contendo 0,6 M de manitol, pH 5,5. Para a expressão transiente, os protoplastos foram incubados por 30 horas no escuro. Após esse período, as amostras foram lavadas com tampão de lavagem, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até o procedimento de extração de RNA.

5. Transformação transiente em folhas de tabaco

A transformação transiente de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. havana) foi realizada por meio de agroinoculação (Kotzer *et al.*, 2004). As culturas de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 transformadas com as construções pYFP-NRP-B (pUFV969), pYFP-rpL18 (pUFV959), pYFP-NAC1 (pUFV945) pYFP-NAC5 (pUFV947) pYFP-NAC6 (pUFV948) e pK7WG2-NIG (pUFV1177) foram crescidas em 4 mL de meio com antibióticos adequados, a 28°C por 16 horas, e centrifugadas a 8000 RPM por 5 min. O pellet foi lavado 2 vezes com tampão de infiltração (MgCl₂ 10 mM, MES 10 mM pH 5,6 e acetoseringona 10 µM) e ressuspendido em 1 mL do mesmo tampão. Utilizando seringas estéreis sem agulha, folhas jovens de tabaco foram infiltradas com a cultura de *A. tumefaciens* em uma D.O. de 0,2, por meio de uma gentil pressão através dos estômatos da epiderme inferior. As seções foliares infiltradas foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em *freezer* a -80 °C até o processamento das amostras.

6. Ensaio de MDA (malondialdeído)

A quantificação de malondialdeído (MDA) foi conduzida segundo a metodologia de Hodges, 1993. Foram utilizados 150 mg de folhas de tabaco expressando transientemente a proteína NAC6 de soja e NIG de *Arabidopsis*, como controle. O material vegetal foi triturado com 2 mL de Ácido Tricloroacético 0,1 % (p/v) e centrifugado a 10000g por 15 minutos a 4°C. 1,5 mL da solução de ácido tiobarbitúrico (TBA 0,5 % em TCA 20 %) e 500 µL do sobrenadante foram incubados por 20 minutos a 90 °C. A reação foi parada em banho de gelo. Após centrifugação a 10000g por 4 minutos, o sobrenadante foi submetido à absorvância de 532 nm em espectrofotômetro (DU 650 BECKMAN Spectrophotometers).

7. Determinação dos teores de clorofilas e carotenóides

A quantificação de pigmentos fotossintéticos foi realizada segundo a metodologia proposta por Lichthenthaler, 1987. Aproximadamente 100 mg das folhas de tabaco agroinoculadas foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em acetona 80% (v/v) na presença 1 mg de Na₂CO₃. Após a separação dos sedimentos por filtração, o extrato foi quantificado por meio da leitura espectrofotométrica nos comprimentos 470nm, 646,8nm e 663,2nm. O resultado final considera o valor de massa fresca utilizada no ensaio para cada amostra.

8. Isolamento e análise *in silico* da região promotora de *GmNAC6*

A sequência do promotor do gene *GmNAC6* foi obtida mediante uma busca no banco de dados Phytozome (<http://www.phytozome.net/soybean>). A sequência promotora foi isolada através da Reação em Cadeia da Polimerase utilizando *Taq Platinum* de alta fidelidade, DNA genômico extraído de folhas de soja e oligonucleotídeos que flanqueiam as extremidades da sequência. Neste contexto, foram utilizados os oligonucleotídeos pNAC6Fwd (5'-GAATTCGTCATTTGATTTAAGG-3', criando um sítio para *EcoRI*) e pNAC6Rv (5'- AGATCTTCCATGGTTGCCATAT-3', que cria um sítio para *BglII*). O fragmento, correspondente à região de 1Kb do promotor foi purificado e clonado no vetor pCAMBIA1381Z.

A identificação de cis-elementos putativos na região promotora de *GmNAC6* foi realizada utilizando o software *PLACE – Plant Cis-acting Regulatory DNA elements* (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) (Higo *et al.*, 1999). Adicionalmente, a sequência promotora foi analisada no sistema assistido por banco de dados, *PlantPAN –Plant promoter analysis navigator* (<http://PlantPAN.mbc.nctu.edu.tw>; Chang *et al.*, 2008).

9. Obtenção da construção do promotor NAC6 fusionado ao gene repórter GUS

O fragmento de 1Kb do promotor do gene *GmNAC6* foi digerido com enzimas de restrição apropriadas (*EcoRI* e *BglII*) e clonado nos sítios correspondentes do vetor binário de expressão em plantas, pCAMBIA1381Z,

originando o clone pUFV1255 (pNAC6:*GUS*). O clone obtido foi confirmado por seqüenciamento.

10. Transformação de plantas de tabaco

O clone gerado pNAC6:*GUS* e o vetor vazio (pCAMBIA1381Z) foram utilizados para transformar plantas de *Nicotiana tabacum* L. cv. Havana, por meio de transformação de discos foliares mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Alvim *et al.*, 2001). As plantas transformadas foram regeneradas em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), contendo 50 mg.L⁻¹ de higromicina (Buzeli *et al.*, 2002). Os regenerantes foram testados pela incorporação dos genes *hptII* (resistência à higromicina) e da sequência promotora de *GmNAC6*. Os transformantes primários (T0) foram mantidos *in vitro* ou transferidos para o solo e crescidos em casa de vegetação para obtenção de sementes.

11. Ensaio da atividade de GUS

O ensaio fluorimétrico para avaliar a atividade da β -glucuronidase foi conduzido segundo Jefferson *et al.*, 1987, utilizando methylumbelliferone (MU) como padrão. As amostras foram trituradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 500 μ l de tampão GUS [100mM NaH₂PO₄ pH 7.0, 10mM EDTA, 0,1% (p/v) sarcosil, 0,1% (v/v) Triton X-100]. Para a reação, 25 μ l do extrato foi adicionado a 25 μ l do tampão GUS contendo como substrato 2mM de 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG). A mistura foi incubada a 37°C

por 30 minutos e a atividade de GUS mensurada utilizando o DYNA Quant 200 Fluorometer (Amersham Pharmacia Biotech).

12. Técnicas de Biologia Molecular

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

IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 - NAC6 induz morte celular

Entre os seis genes *NACs* de soja, previamente descritos por Meng *et al.*, 2007 (*GmNAC1-GmNAC6*), evidências recentes na literatura indicam que os genes *GmNAC1*, *GmNAC5* e *GmNAC6* estão envolvidos em processo de morte celular (Pinheiro *et al.*, 2009). Em células de soja, o tratamento com cicloheximida, potente indutor de morte celular, induziu fortemente a expressão dos três genes *NACs*, enquanto que os inibidores de senescência BAP (6-benzilaminopurina) e zeatina promoveram a repressão destes genes (Pinheiro, *et al.*, 2009). Adicionalmente, a expressão transiente de *GmNAC1*, *GmNAC5* e *GmNAC6* em folhas de tabaco causou amarelecimento das folhas, sendo que a expressão de *GmNAC6* conferiu um fenótipo característico de necrose.

Com o objetivo de caracterizar o processo de morte celular envolvendo *GmNAC6* foi utilizada a metodologia de expressão transiente mediada por *Agrobacterium tumefaciens* em folhas de tabaco. A expressão transiente de *GmNAC6*, sob o controle do promotor 35S, resultou no fenótipo acentuado de clorose nas regiões agroinoculadas (Figura 1A), o qual progrediu para necrose foliar cerca de 7 dias após a agroinoculação (Figura 1C). NIG (NSP-interacting GTPase), uma GTPase de *Arabidopsis* envolvida no transporte núcleo-citoplasmático, foi usada como controle (Carvalho *et al.*, 2008).

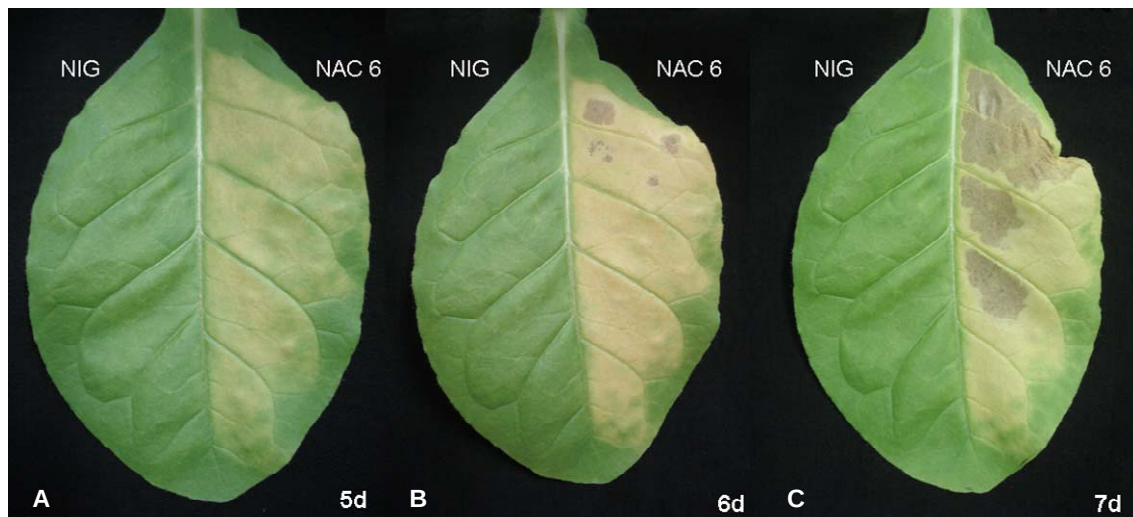


Figura 1. **Expressão transiente do gene *GmNAC6* em folhas de tabaco induz necrose foliar.** As secções foliares de tabaco foram agroinoculadas com a construção pYFP-*GmNAC6* e com o cassete para expressão do gene *NIG* de *Arabidopsis*, utilizado como controle. As fotografias correspondem a 5, 6 e 7 dias após a infiltração.

O desenvolvimento de clorose e morte celular nas secções agroinoculadas com a construção pYFP-*GmNAC6* foi associado à degradação de clorofila (Figura 2A) e à oxidação de lipídios da membrana plasmática (Figura 2C). Enquanto o teor de clorofila total foi significativamente reduzido nas secções expressando transientemente o gene *GmNAC6*, não houve alteração nos pigmentos carotenóides nos dois tratamentos analisados (Figura 2A e B). Durante a senescência foliar, a degeneração dos cloroplastos e, consequentemente, o catabolismo de clorofilas corresponde à mudança inicial e mais significativa neste evento. Desta forma, a determinação do conteúdo de clorofila representa um marcador de senescência bem estabelecido (Lim *et al.*, 2007; Hortensteiner, 2006).

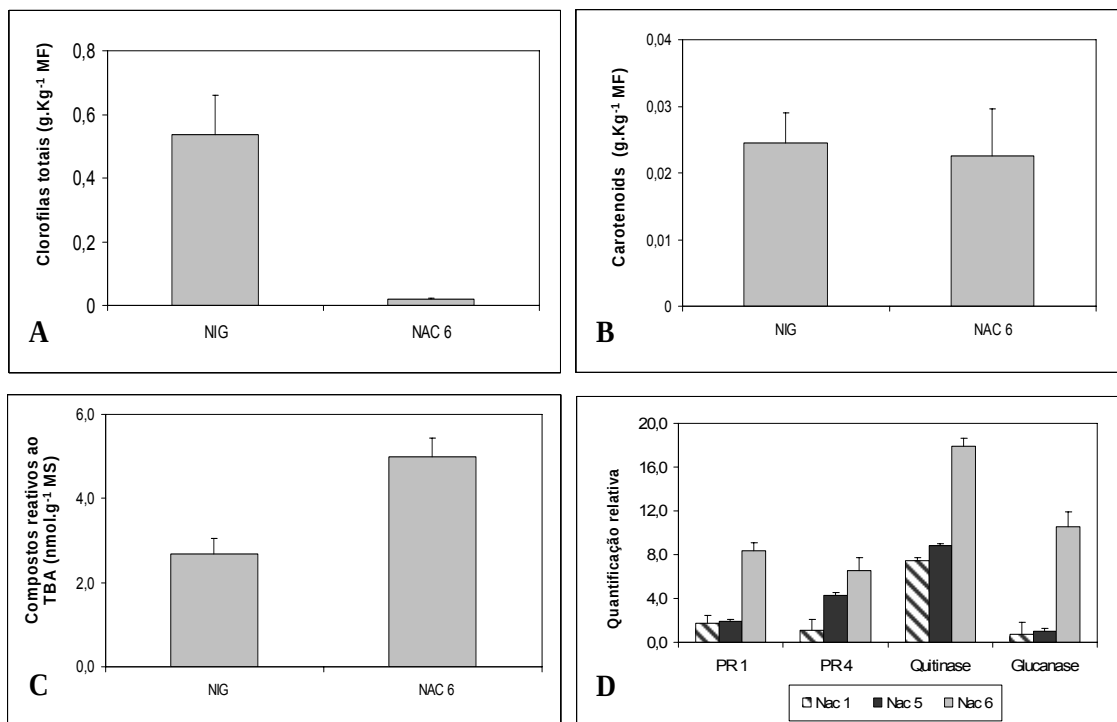


Figura 2. **Expressão transiente de *GmNAC6* em tabaco promove morte celular.** O teor de clorofila total (A), carotenóides (B) e a peroxidação de lipídios (C) foram avaliados nas folhas agroinoculadas com os genes *GmNAC6* e *AtNIG*. A análise de variância para o resultado de clorofila e peroxidação de lipídios (teste de MDA) utilizando o teste de Tukey apontou a diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,01$). Em contrapartida, não houve diferença significativa entre os valores de carotenóides (DP+, $n = 3$ réplicas biológicas). (D) *GmNAC6* induz a expressão de genes relacionados à patogênese. Folhas de tabaco expressando transientemente *AtNIG*, *GmNAC1*, *GmNAC5* e *GmNAC6* foram utilizadas para avaliar a expressão dos genes *PR* (*PR1*, *PR4*, *Quitinase*, *Glucanase*) por RT-PCR em tempo real. O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando como controle endógeno a actina, e normalizado para a expressão do gene *AtNIG*. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de um pool de 2 réplicas biológicas ($n = 2$ réplicas manuais).

Nas secções agroinoculadas expressando *AtNIG* e *GmNAC6*, a extensão de peroxidação de lipídios associada com senescência foi avaliada

por meio da determinação do acúmulo de compostos reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBA). Amostras de folhas superexpressando *GmNAC6* acumularam níveis de compostos reativos ao TBA significativamente superiores aqueles das amostras controle (*AtNIG*) (Figura 2C). Enzimas que degradam lipídios tais como fosfolipase D, ácido fosfatídico fosfatase e lipoxigenase estão associados à hidrólise e metabolismo de lipídios de membrana nas folhas senescentes (Thompson *et al.*, 1998; Thompson *et al.*, 2000). Além disso, a peroxidação lipídica pode ser decorrente da ação de espécies reativas de oxigênio (ROS), geradas no estabelecimento da resposta hipersensível (HR) e de senescência (Dhindsa *et al.*, 1981; Mittler *et al.*, 1999; Kawasaki *et al.*, 1999).

Recentemente, Pinheiro *et al.* (2009) demonstraram que a expressão transiente de *GmNAC1*, *GmNAC5* e *GmNAC6* em folhas de tabaco induz morte celular e a expressão de marcadores de senescência. Entretanto, os resultados dessa investigação prévia indicaram que os três genes *NACs* estariam envolvidos em diferentes eventos de morte celular. Para investigar em maiores detalhes o processo de morte celular associado à expressão de *GmNAC6*, os níveis dos transcritos de quatro genes *PRs* foram avaliados nas secções foliares de expressão transiente de *GmNAC6* e também de *GmNAC1* e *GmNAC5* para comparação (Figura 2D).

A escolha dos genes *PRs* foi fundamentada na observação de que as proteínas relacionadas à patogênese (*PRs*) correspondem à principal mudança quantitativa nas proteínas solúveis durante a resposta de defesa associada à HR (Stintzi *et al.*, 1993; Van Loon *et al.*, 2006). Elevada indução na expressão de genes *PRs* foi correlacionada à superexpressão de *GmNAC6* (Figura 2D). O

agrupamento hierárquico realizado entre proteínas NAC com funções estabelecidas e NAC de soja, revelou similaridade de *GmNAC6* com o gene que codifica para a proteína TERN (*Tobacco elicitor-responsive gene encoding NAC-domain protein*; Pinheiro *et al.*, 2009). Coletivamente, estes resultados sugerem a possível atuação de NAC6 no processo de morte celular relacionada a patógenos. Recentemente, foi identificado um gene NAC em arroz que atua como regulador positivo da morte associada à HR. Superexpressão de *OsNAC4* promove morte celular característica da HR, com perda na integridade da membrana plasmática e fragmentação do DNA nuclear (Kaneda *et al.*, 2009).

A superexpressão de *GmNAC1* e *GmNAC5* levou à considerável indução de quitinase (Figura 2D). *GmNAC1* parece estar relacionado ao evento de senescência, apresentando elevada expressão em folhas senescentes (Valente *et al.*, 2008; Pinheiro, 2007). Vários genes relacionados à defesa incluindo os genes *PRs* são induzidos durante a senescência (Quirino *et al.*, 2000; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2004). Recentes estudos têm sugerido a sobreposição na sinalização da morte celular induzida por patógeno e senescência. (Quirino *et al.*, 2000; Maleck *et al.*, 2000; Schenck *et al.*, 2005). O mesmo transfator pode atuar nos dois eventos como é o caso de *AtWRKY70* (Ulker *et al.*, 2007) e, possivelmente, *GmNAC1* em soja.

Proteínas *PRs* são expressas em estádios e/ou órgãos específicos durante o desenvolvimento da planta. A atividade hidrolítica destas enzimas pode contribuir para a geração de moléculas sinais que atuam como fatores morfogênicos. Em embriões de cenoura, endoquitinases das classes IV são requeridas para transição do estagio globular na embriogênese (Van Loon *et*

al., 2006; Van Hengel *et al.*, 2001; Kragh *et al.*, 1996). A expressão de quitinase em *Arabidopsis* é relacionada ao programa de morte celular (Passarinho *et al.*, 2001). Adicionalmente, a transição do estágio PEM (massa pró-embriônica) para o embrião somático caracteriza-se por um processo intenso de morte celular e uma forte indução de quitinase em *Picea abies* (Wiweger *et al.*, 2003).

A indução de quitinase e o fenótipo de morte celular associado à expressão transiente de *GmNAC5* reforçam a postulação prévia sugerida em Pinheiro *et al.*, 2009, de que *GmNAC5* pode estar associado ao evento de morte celular que ocorre na diferenciação do embrião. Em concordância, registra-se uma alta expressão deste gene em diferentes estágios de desenvolvimento da semente (Meng *et al.*, 2007; Pinheiro, 2007; Tran *et al.*, 2009).

2. *GmNAC6* é induzido por ferimento

Com o objetivo de avaliar o perfil de expressão do gene *GmNAC6* em resposta a injúria mecânica, as folhas de soja foram feridas e a análise da expressão gênica avaliada por qRT-PCR (Figura 3). Os demais genes *NACs* de soja descritos foram incluídos no ensaio para comparação. Os resultados revelam um perfil de expressão distinto para os genes *NACs* avaliados (Figura 3A).

GmATAF apresentou uma forte indução transiente e inicial (60 minutos), sendo que 3 horas após o estresse os níveis deste transcrito reduziu

consideravelmente (Figura 3A). O agrupamento hierárquico realizado entre proteínas NACs de diversas plantas indicou a relação de *GmATAF* (subfamília StNAC) e genes pertencentes aos grupos ATAF1 e ATAF2 (Pinheiro *et al.*, 2009). De fato, o perfil de expressão apresentado por *GmATAF* assemelha-se à regulação a nível transcricional dos genes NACs pertencentes a esta subfamília em outras espécies.

OsNAC6, *CaNAC1* e *StNAC* pertencentes a subfamília StNAC são induzidos de modo intenso e transiente em condição de ferimento (Ohnishi *et al.*, 2005; Oh *et al.*, 2005; Collinge & Boller, 2001). *ATAF1* e *ATAF2* de *Arabidopsis* são induzidos transientemente (30 minutos) após ferimento, sendo que *ATAF2* apresenta uma elevação na expressão na ordem de 13 vezes, a qual reduz para valores basais 5 horas após a aplicação do tratamento (Collinge & Boller, 2001; Delessert *et al.*, 2004). Além disso, as proteínas do subgrupo ATAF possuem um motivo conservado (motivo V) nas regiões de ativação transcricional (C-terminal; Ooka *et al.*, 2003). Esta sequência conservada (EVQSDPKW) foi também observada no domínio de transativação (C-terminal) de *GmATAF* (dado não mostrado).

GmATAF e *ATAF2* são induzidos por desidratação, o último fortemente induzido no tecido adjacente ao ferimento. Uma vez que, muitos genes induzidos adjacentes à ferida são também induzidos por desidratação, a indução *GmATAF* pode ser localizada neste grupo de células em especial (Delessert *et al.*, 2004; Pinheiro, 2007; Reymond *et al.*, 2000). Coletivamente, estes resultados apontam para a possível conservação funcional das proteínas das subfamílias StNAC, ATAF1 e ATAF2 na resposta a estímulo externo.

De forma similar à *GmATAF*, destaca-se a expressão elevada de *GmNAC3* nos períodos iniciais da resposta ao ferimento (Figura 3A). A caracterização prévia de *GmNAC3* indica o possível envolvimento deste transfator nos mecanismos de resposta a estresses abióticos. *GmNAC3* é similar aos genes ANACs pertencentes à subfamília AtNAC3 (Ooka *et al.*, 2003) ou subfamília “Stress NAC” (Pinheiro *et al.*, 2009).

A expressão dos genes ANACs está relacionada a estresse osmótico, desidratação e ácido jasmônico (Tran *et al.*, 2004). Há indução de *GmNAC3* após tratamento com PEG, ABA e JA (Pinheiro *et al.*, 2009). Ácido jasmônico é um importante componente da resposta induzida por ferimento. Em adição, análise de microarranjo indicou muitos genes co-induzidos por ferimento e desidratação (Reymond *et al.*, 2000). A expressão de *GmNAC3* sugere a possível atuação deste transfator como regulador positivo de mecanismos de defesa a diferentes sinais estressores que compartilham o componente ferimento.

GmNAC1 e *GmNAC6* apresentaram padrão de expressão similar, com forte indução após 3 horas de aplicação do ferimento. Diferentemente, *GmNAC2*, *GmNAC4* e *GmNAC5* apresentaram baixos níveis de expressão nesta condição (Figura 3A).

Estresse no retículo endoplasmático (RE) promove a ativação das vias de sinalização coletivamente denominada UPR (unfolded protein response), o que resulta na indução dos genes residentes no RE, os quais auxiliam o correto enovelamento protéico (Schroder & Kaufman, 2005; Ron & Walter, 2007). Aplicação de ferimento nas folhas de soja induz o estresse no RE, e consequentemente a expressão dos genes responsivos (Kalinski *et al.*, 1995),

como verificado na indução de *BiPD*, *calnexina*, e do gene codificando glutathione S-transferase (GST; Figura 3B). O perfil transiente na expressão de *BiP* após injúria foi também observado por Kalinski *et al.*, 1995 e Jelitto-Van Dooren *et al.*, 1999. A sinalização da resposta a ferimento parece não envolver uma expressiva ativação transcricional dos genes *NRPs* (*GmNRP-A* e *GmNRP-B*) em soja, mas claramente eles antecedem a indução dos chaperones moleculares e de *GmNAC6* (Figura 3).

A elevação na atividade da rota secretória decorre da indução expressiva de genes relacionados à defesa como os genes *PRs* (*PR1* e *PR3*; Figura 3C). A expressão de proteínas relacionadas à defesa não se restringe somente ao desafio com patógenos sendo induzidas em condições de estresses abióticos como frio, estresse osmótico, seca e ferimento (Griffith & Yaish, 2004; Van Loon *et al.*, 2006). A ferida expõe um sítio potencial para a infecção de microorganismos, assim, a expressão dos genes *PRs* constitui uma barreira contra patógenos oportunistas (Reymond *et al.*, 2000).

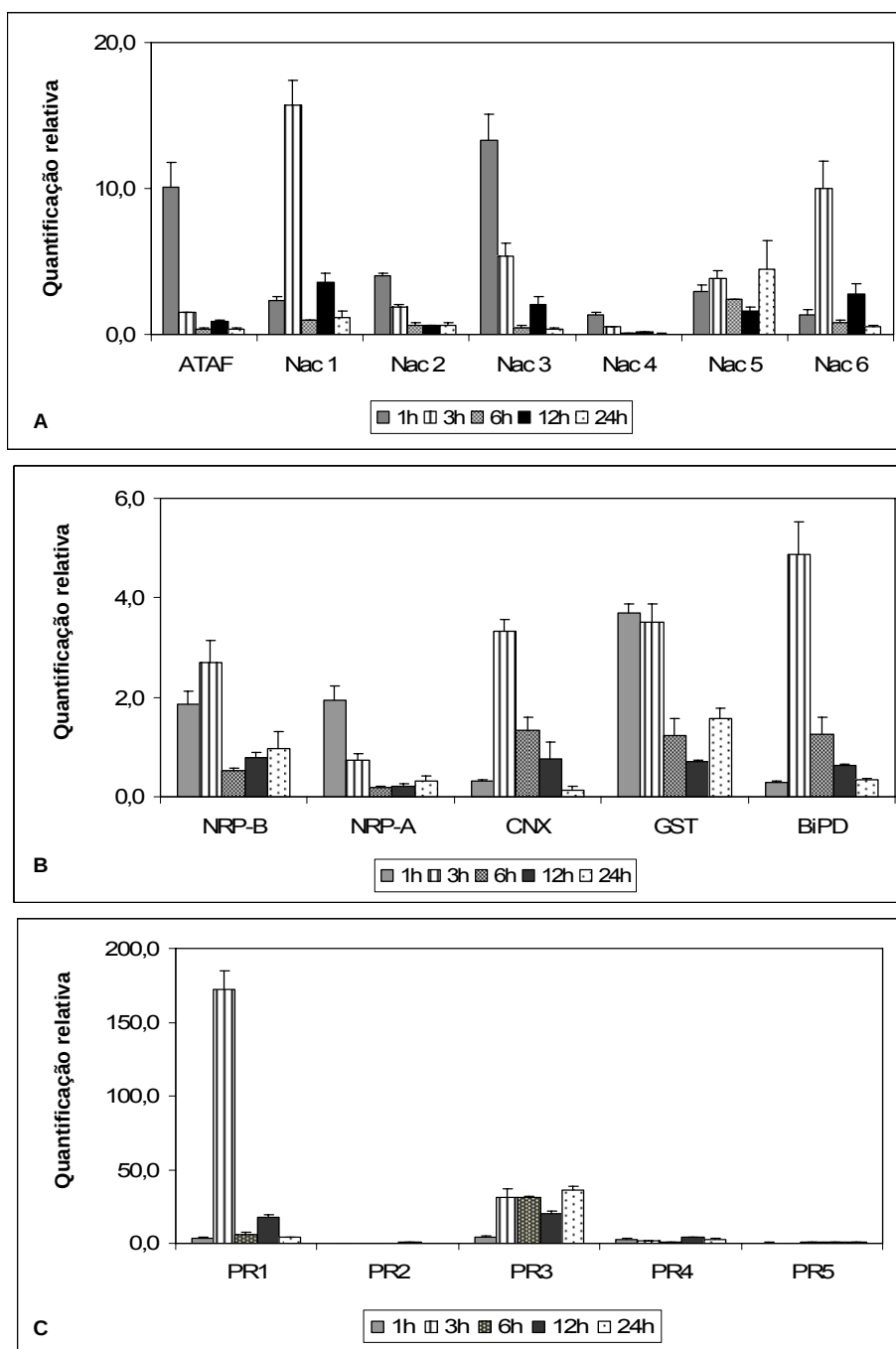


Figura 3. **Avaliação da expressão gênica em folhas de soja feridas.** A epiderme superior das folhas foi pressionada com uma espátula levando ao ferimento de 50% da área foliar. (A) A expressão dos genes *NACs* foi avaliada por meio de RT-PCR em tempo real. (B) Expressão dos genes marcadores de estresse no RE (*NRP-A*, *NRP-B*, *CNX*, *GST* e *BiPD*). (C) Análise da expressão dos genes *PRs* (*PR1-PR5*). O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando como controle endógeno a helicase, e normalizado com o tratamento controle (folhas sem ferimento). Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de um pool de 2 réplicas biológicas (n = 2 réplicas manuais). *CNX* corresponde à Calnexina; *GST*, Glutathione S-transferase; *BiPD* corresponde a chaperona molecular BiP, isoforma D.

3. *GmNAC6* é induzido nas folhas infiltradas com enzimas que degradam a parede celular

Alguns fitopatógenos secretam enzimas que atuam na degradação da parede celular facilitando a penetração no tecido vegetal, bem como, utilizando estes produtos da degradação como nutrientes (Benhamou, 1996; McDowell & Dangi, 2000). O tratamento das folhas com pectinase e celulase [enzimas que degradam a parede celular (CDEs)] mimetiza o ataque de microorganismos, e induz uma resposta de defesa local e sistêmica (Vidal *et al.*, 1998; Jelitto-Van Dooren *et al.*, 1999).

Como descrito na escala fenológica de Fehr & Caviness, 1977, as plantas de soja apresentam duas folhas unifoliadas opostas no período de abertura dos cotilédones (estádio VC). Plantas de soja no estágio de desenvolvimento VC (Fehr & Caviness, 1977) foram utilizadas para o ensaio de resposta local e sistêmica ao tratamento com enzimas hidrolíticas. Deste modo, as folhas infiltradas com a solução enzimática foram usadas para avaliação local da expressão gênica (Figura 4). Paralelamente, as folhas opostas àquelas infiltradas foram coletadas para avaliar a resposta sistêmica (Figura 5).

A aplicação do extrato enzimático promoveu a expressão local dos genes relacionados à patogênese (*PR1* e *PR3*), como observado na Figura 4A. A indução de *PR3*, gene que codifica uma quitinase classe I, corrobora com a atuação das proteínas de defesa ao ataque do patógeno, em especial na hidrólise da parede celular dos microorganismos (Stintzi *et al.*, 1993; Van Loon *et al.*, 2006).

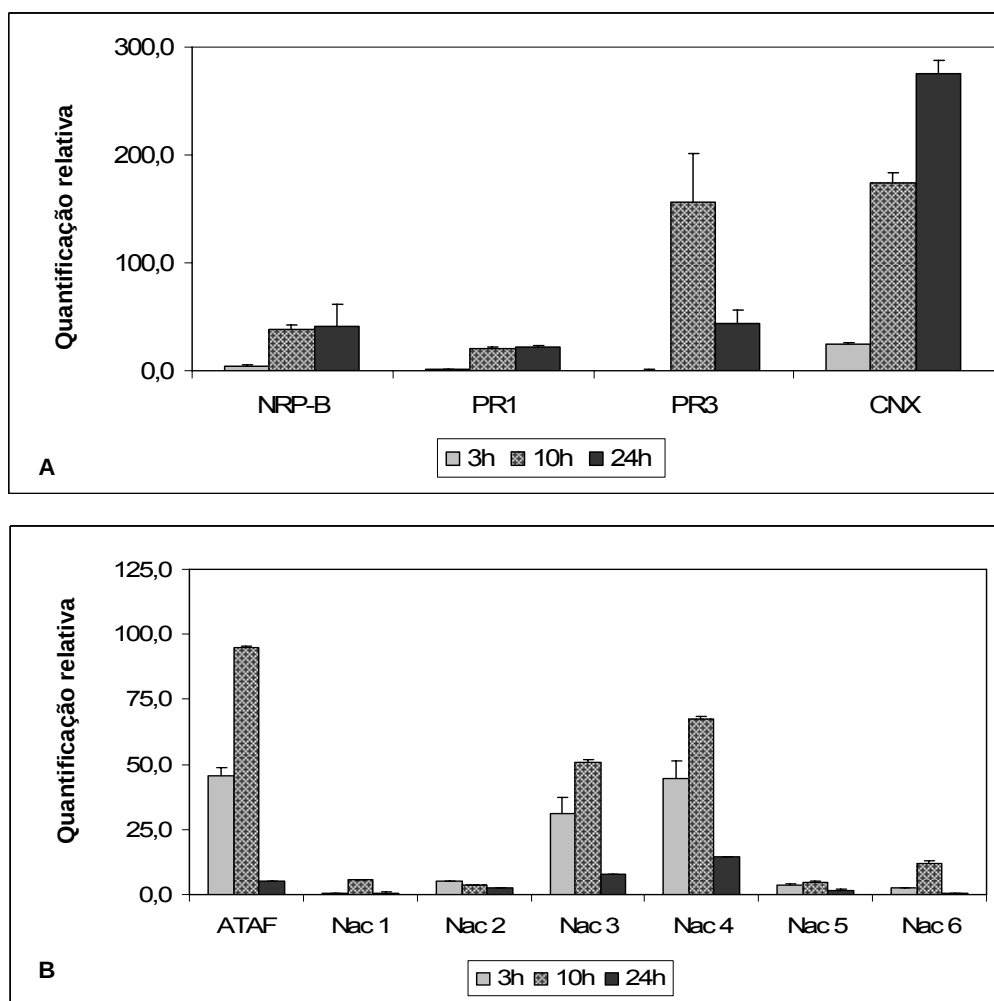


Figura 4. **Análise da expressão gênica nas folhas infiltradas com enzimas que degradam a parede celular (CDE).** (A) Após o tratamento das folhas com a solução enzimática nos períodos indicados, a expressão de genes controle, marcadores de estresse no RE (*NRP-B* e *CNX*) e *PRs* foi monitorada por PCR em tempo real. (B) A análise da expressão dos genes *NACs* de soja também foi conduzida nas folhas infiltradas com a solução CDE. O valor de expressão foi determinado com base no método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, usando a helicase como controle endógeno. A normalização foi realizada utilizando tratamentos controle (folhas infiltradas com solução tampão sem adição das enzimas nos tempos avaliados). Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de um pool de 2 réplicas biológicas (n = 2 réplicas manuais).

O tratamento com solução enzimática resultou na indução local dos genes *NRP-B* e *Calnexina* (Figura 4A). A indução dos genes que codificam proteínas residentes no RE como BiP, PDI e calnexina ocorre nas infecções com patógenos, assim como, nas condições que mimetizam a interação, como é o caso das enzimas hidrolíticas. As plantas antecipam a necessidade do aumento na expressão dos genes do RE através de uma sinalização rápida, distinta da UPR, a qual se configura como um mecanismo de feedback (Wang *et al.*, 2005; Vidal *et al.*, 1998; Jelitto-Van Dooren *et al.*, 1999).

A indução de *NRP-B* foi caracterizada na ativação da via que integra o estresse osmótico e do RE. A resposta envolvendo o estresse no RE nesta via é também independente da UPR (Costa *et al.*, 2008). A forte indução local de *NRP-B* na sinalização responsiva a CDE supõe uma possível convergência ou mesmo sobreposição dos eventos envolvendo a via integrativa e a resposta a CDE.

A aplicação das enzimas hidrolíticas promoveu uma forte expressão de *GmATAF*, *GmNAC3* e *GmNAC4*, os quais apresentaram cinética de expressão similares (Figura 4B). Em contrapartida, este tratamento alterou muito pouco a expressão de *GmNAC1*, *GmNAC2* e *GmNAC5*. *GmNAC6* apresentou um pico acentuado de expressão após 10 horas de infiltração com a solução enzimática (variação de 12 vezes; Figura 4B).

Em comparação a *GmNAC6*, a cinética de indução dos genes marcadores de estresse no RE em resposta a CDE é mais rápida, ocorrendo indução de *CNX* após 3 horas de tratamento, divergindo da cinética tardia de indução de *GmNAC6* (10 horas após tratamento). O padrão de cinética de indução de *CNX* e *GmNAC6* em resposta a enzimas hidrolíticas se assemelha

ao exibido por BiP e proteínas relacionadas à patogênese (PRs), descrito por Jelitto-Van Dooren *et al.*, 1999, e neste experimento para *CNX* e genes *PR1* e *PR3*. Assim em resposta ao ataque de patógenos a indução de chaperones moleculares residentes no RE precede à indução de genes *PRs*, antecipando o estresse causado pela elevação na atividade da rota secretória decorrente da indução expressiva de genes relacionados à defesa.

4. *GmNAC6* é induzido de modo sistêmico na condição que mimetiza o ataque de patógenos

O mecanismo de defesa das plantas não se restringe aos pontos iniciais de infecção pelo patógeno. As plantas podem coordenar uma resposta sistêmica que estabelece um aumento na capacidade de defesa em tecidos distantes (Sticher *et al.*, 1997; Durrant & Dong, 2004).

Para avaliar a indução sistêmica de alguns transcritos em resposta a CDE, as folhas opostas às infiltradas com a solução enzimática foram analisadas (Figura 5). No período inicial da resposta sistêmica há um elevado acúmulo do transcrito *GmNAC4*, o qual reduz consideravelmente em poucas horas (Figura 5A).

De uma maneira geral, os transfatores NACs relacionados a uma forte indução local pelo tratamento estão também associados a uma expressão sistêmica. *GmNAC3*, *GmNAC4* e *GmNAC6* foram induzidos nas folhas sistêmicas, ao passo que, *GmNAC1*, *GmNAC2* e *GmNAC5* não foram

induzidos consideravelmente. Não obstante, o perfil de expressão de *GmATAF* diferiu nas duas condições. Este gene parece responder intensamente a um tratamento local como observado na expressão de ordem 50 a 100 vezes (Figura 4B), em oposição à condição sistêmica (6 vezes de aumento; Figura 5A).

Gm82 é a denominação da sequência *Gm0082x00223* que codifica uma nova proteína com domínio NAC, agrupada juntamente com *GmNAC6* na subfamília TERN (Pinheiro *et al.*, 2009). Similar a *GmNAC6*, *Gm82* é induzido na resposta sistêmica à aplicação de enzimas hidrolíticas (Figura 5A).

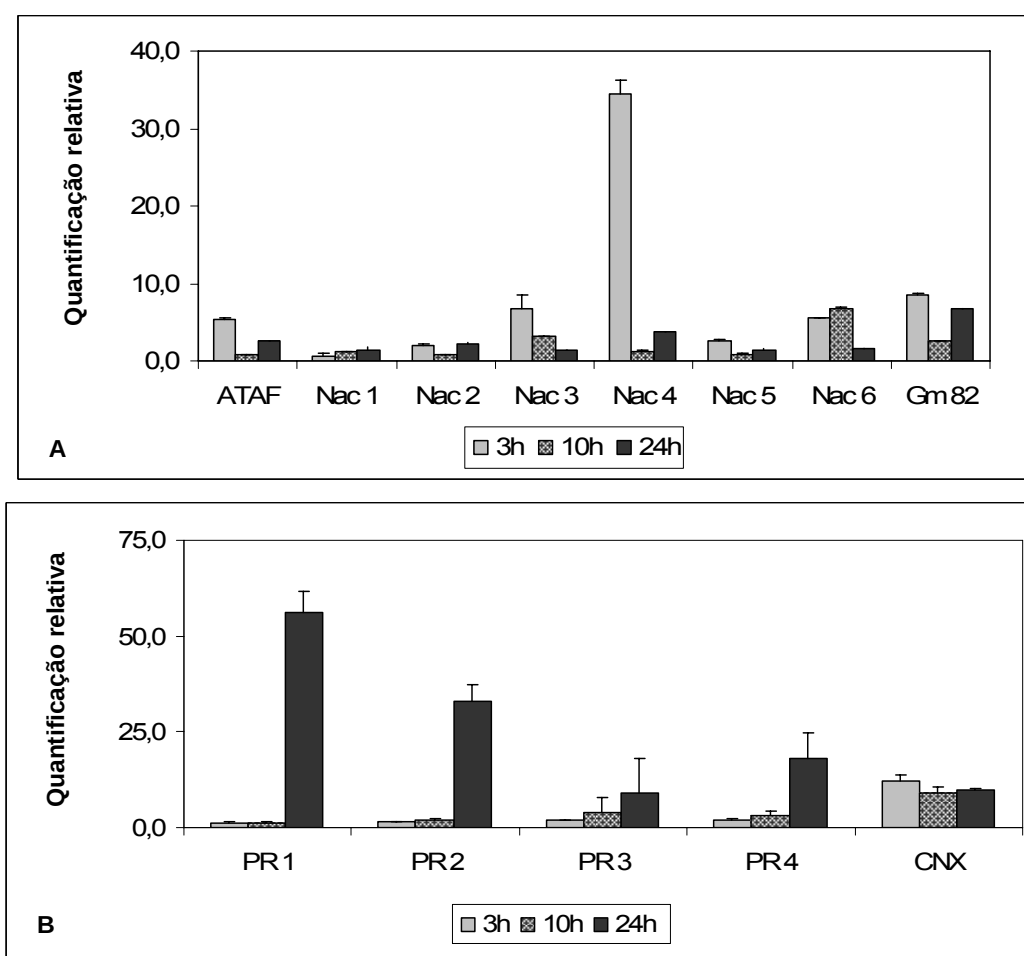


Figura 5. **Avaliação da expressão gênica na resposta sistêmica às enzimas que degradam a parede celular (CDE).** (A) A expressão dos genes *NACs* foi avaliada nas folhas não infiltradas com enzimas hidrolíticas (CDE) por RT-PCR em tempo real, nos períodos indicados na figura. (B) Ativação tardia dos genes relacionados à patogênese (*PR1-PR4*) nas folhas sistêmicas tratadas com CDE. O valor de expressão foi determinado com base no método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, usando a helicase como controle endógeno. A normalização foi realizada utilizando os tratamentos controles respectivos (folhas opostas às infiltradas com solução tampão sem adição das enzimas hidrolíticas). Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de um pool de 2 réplicas biológicas (n = 2 réplicas manuais).

A expressão transiente dos genes *NRPs* induz morte celular em protoplasto de soja e folhas de tabaco, e *NRP-A* é induzida na resposta hipersensível em soja (Costa *et al.*, 2008; Ludwig & Tenhaken, 2001). A ativação de uma resposta associada à morte das células não corresponde a

uma estratégia de resistência sistêmica às futuras infecções. Em conformidade, não houve indução dos genes *NRP-A* e *NRP-B* nas folhas sistêmicas do tratamento com CDE (Figura A1, anexos).

O nível de transcritos do gene *Calnexina* eleva-se no início do experimento (3 horas) e assim permanece ao longo do tratamento. De modo distinto, os genes *PRs* (*PR1-PR4*) são induzidos de modo intenso, mas tardio nas folhas sistêmicas (24 horas; Figura 5B). A sinalização da SAR (resistência adquirida sistêmica) envolve elevados níveis do sinalizador ácido salicílico promovendo a ativação da proteína reguladora NPR1 (“Nonexpressor of pathogenesis-related (PR) genes 1”) também denominada NIM1. No núcleo, NPR1 juntamente com fatores de transcrição TGA promovem a expressão de genes *PRs* (Pieterse & Van Loon, 2004; Durrant & Dong, 2004; Van Loon *et al.*, 2006). A intensa síntese de proteínas *PRs* direcionadas ao vacúolo e apoplasto requer uma elevação coordenada na via secretória de modo a assegurar o apropriado dobramento, modificação e transporte das proteínas *PRs*. NPR1 também controla diretamente a expressão de genes que codificam proteínas da via secretória (Wang *et al.*, 2005).

A expressão de genes do RE e dos genes relacionados à defesa parece ser regulada por vias distintas na resposta a CDE. Uma sinalização distinta da UPR e independente de ácido salicílico parece atuar na indução rápida e sistêmica de BiP em tabaco (Jelitto Van Dooren *et al.*, 1999). Além disso, a indução dos genes residente no RE antecede o período de síntese das proteínas *PRs*. Esta coordenação temporal na expressão gênica é necessária para que a maquinaria celular (via secretória) se ajuste frente ao aumento iminente da atividade secretória.

5. Expressão dos genes *NACs* durante a resposta hipersensível

Na interação planta-patógeno, o evento de morte celular parece ser um componente da resposta de resistência prevenindo a colonização e proliferação do patógeno. A morte celular associada à interação incompatível direciona o processo de necrose programado e localizado nas plantas envolvidas na resposta hipersensível (Hofius *et al.*, 2007). O fenótipo de necrose associada à superexpressão de *GmNAC6* suscita a possível participação deste gene no processo de morte celular que caracteriza a HR. Com o intuito de acionar a resposta hipersensível, plantas de soja foram inoculadas com bactéria *Pseudomonas syringae* patovar *tomato* (*Pst*).

A ativação da HR pode requerer a presença de um gene de avirulência (*avr*) do patógeno que é reconhecido por um gene correspondente de resistência (*R*) na planta (Jones & Dangl, 2006). Alternativamente, a reação pode ser direcionada pela percepção do receptor da planta de um elicitor específico do patógeno não dependente de estirpe (Zipfel & Felix, 2005).

A bactéria *Pst* utilizada é uma bactéria fitopatogênica selvagem, sem gene *avr* específico. Nas folhas de soja, o surgimento da necrose nas regiões inoculadas ocorre cerca de 12 a 14 horas após a infiltração (Figura 6). Folhas de *Arabidopsis* infiltrada com *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (*avrPpt2*) apresentaram colapso do tecido foliar nas primeiras horas após a inoculação (De Vos *et al.*, 2005). Em soja desafiada com *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (*avrA*), os sintomas da HR são visualizados 12-15 horas da inoculação (Ludwig & Tenhaken, 2001). O curto período necessário ao surgimento das

necroses macroscópicas e a restrição das mesmas ao local de inoculação são características típicas do estabelecimento de uma interação incompatível (Morel & Dangl, 1997; Greenberg & Yao, 2004).

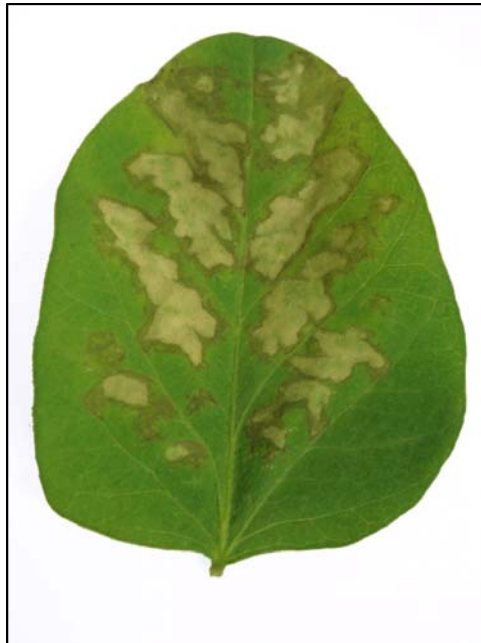


Figura 6. *Pseudomonas syringae* patovar *Tomato* (*Pst*) induz a resposta hipersensível em soja. A suspensão da bactéria *Pst* foi infiltrada na epiderme abaxial das folhas de soja. A fotografia corresponde a 24 horas após a inoculação bacteriana.

Assim como observado nas folhas locais tratadas com CDE (Figura 4B) houve uma forte indução na expressão dos genes *GmNAC3* e *GmNAC4*, observando-se um pico acentuado de acúmulo do transcrito após 6 horas do tratamento com variação na expressão de 60 e 100 vezes para *GmNAC3* e *GmNAC4*, respectivamente (Figura 7A). Em contrapartida, a indução da expressão dos genes *GmATAF*, *GmNAC2*, *GmNAC5* e *GmNAC6* não foi elevada (valores inferiores a 10 vezes de variação). Embora *GmATAF* não

tenha sido fortemente induzido durante a resposta hipersensível (variação em torno de 10 vezes nos períodos de 1 e 3 horas; Figura 7A), apresentou elevada indução de expressão nas folhas infiltradas localmente com enzimas hidrolíticas (variação de 50 e 100 vezes; Figura 4B).

Embora não tenha sido verificado uma acentuada indução de *GmNAC6* durante a resposta hipersensível, a atuação deste transfator na morte celular associada à HR pode estar relacionada a eventos de regulação pós-traducionais. A atuação de *OsNAC4*, regulador positivo da morte celular associada à HR é dependente de fosforilação (Kaneda *et al.*, 2009).

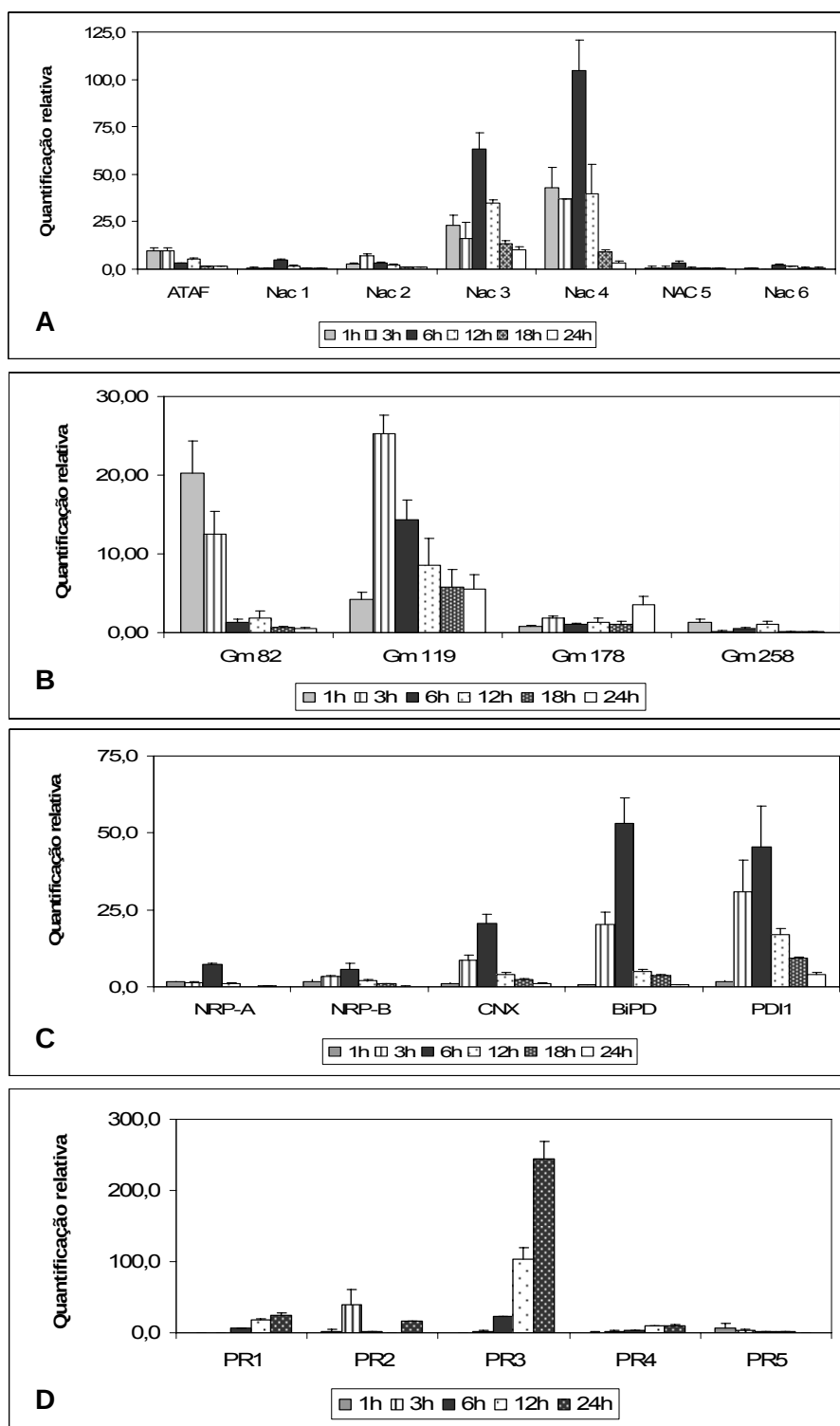


Figura 7. **Expressão gênica durante a resposta hipersensível.** (A e B) A expressão dos genes *NACs* nas folhas inoculadas com a bactéria *Pst* foi avaliada por PCR em tempo real. (C) A expressão dos genes responsáveis ao estresse no RE (*NRP-A*, *NRP-B*, *CNX*, *BiPD*, *PDI1*) foi também analisadas. (D) Avaliação da indução dos genes relacionados a patogênese (*PR1-PR5*). O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, tendo por controle a helicase, e normalizado com o tratamento controle (folhas não inoculadas). Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de um pool de 3 réplicas biológicas (n = 2 réplicas manuais).

A análise do perfil de expressão gênica durante o estabelecimento da resposta hipersensível foi estendida aos novos genes *NACs* identificados por Pinheiro *et al.*, 2009 (Figura 7B). Como citado previamente, *Gm82* é similar em sequência a *GmNAC6*. Em resposta ao tratamento, este gene apresenta uma indução inicial decaindo a valores basais após 6 horas da inoculação. *Gm119* (*Gm0119x00075.1*) é induzido durante HR, e apresenta um pico acentuado de expressão (25 vezes) com 3 horas de tratamento. *Gm119* pertence à subfamília SENU5, cujo gene representante é induzido em folhas senescentes (John *et al.*, 1997).

Os genes *Gm0178x0015* (*Gm178*) e *Gm0258x00014* (*Gm258*) não foram induzidos durante a interação incompatível (Figura 7B). *Gm178* é agrupado na subfamília NAM-B1 relacionada a eventos de senescência (Uauy *et al.*, 2006). *Gm258* é relacionado aos genes de *Arabidopsis* (*ANAC042*, *ANAC009* e *ANAC094*) agrupados na subfamília ONAC022 (Pinheiro *et al.*, 2009; Ooka *et al.*, 2003). Os membros desta subfamília estão envolvidos na resposta a estresse salino, frio e no controle do florescimento em *Arabidopsis* e arroz (Yokotani *et al.*, 2009; Yoo *et al.*, 2007).

Com relação aos genes *NRP-A* e *NRP-B*, previamente descritos como indutores de morte celular (Costa *et al.*, 2008), um pico acentuado na expressão de *NRP-A* ocorreu 6 horas após a inoculação do patógeno, apresentando uma variação de 8 vezes (Figura 7C). O gene *NRP-B* apresentou um perfil de expressão similar a *NRP-A*. Em culturas de células de soja, *NRP-A* é induzida após 8 horas da inoculação de *Psg(avrA)*, precedendo o evento de morte celular (Ludwig & Tenhaken, 2001). Uma forte indução de *NRP-A* durante HR também foi observada por Ludwig & Tenhaken, 2001.

A resposta inicial de defesa promove uma indução de genes relacionados à atividade da rota secretória (Wang *et al.*, 2005; Walter-Larsen *et al.*, 1993; Denecke *et al.*, 1995). A indução dos genes residentes no RE (Figura 7C) antecedeu os fortes picos de indução dos genes relacionados à patogênese (Figura 7D). A expressão dos genes *PR*, com a exceção de *PR3*, é mostrada na Figura A2, em anexos.

Os hormônios em planta atuam regulando diferentes processos de desenvolvimento e vias de sinalização de resposta a estresse biótico e abiótico. Ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e etileno (ET) são os fitohormônios principais na resposta de defesa a patógenos e ferimento (Glazebrook, 2001; De Vos *et al.*, 2005; Bari & Jones, 2009). As vias de sinalização hormonais são requeridas de modo distinto por invasores específicos. Em geral, patógenos com estilo de vida biotrófico são mais sensíveis à resposta mediada por SA. Em contrapartida, JA e ET estão frequentemente associados à defesa contra patógenos necrotófilos e herbívoros. Embora estas sinalizações sejam antagonistas, evidências de interações sinérgicas têm sido reportadas (Bari & Jones, 2009; Mur & Kenton, 2006).

A resposta de defesa ao ferimento e à infecção por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* promoveu uma indução na expressão do gene *GmPR3* (Figuras 3C e 7D). Este gene foi caracterizado como responsivo a JA e ET (Mazarei *et al.*, 2007). Em adição, verifica-se na interação incompatível, a indução do gene *GmPR2*, responsivo a etileno, e a indução tardia de *GmPR1*, responsivo a SA (Figura 7D e Figura A2, anexos; Mazarei *et al.*, 2007). Estes resultados são condizentes com a forte atuação de JA/ET na resposta de defesa ativada após ferimento (Reymond *et al.*, 2000). Adicionalmente, os três

fitohormônios estão envolvidos na resposta decorrente da interação incompatível. De fato, inoculação de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 em *Arabidopsis* induziu a expressão dos genes marcadores responsivos a SA, ET e JA, e promoveu um forte aumento na produção destes três sinalizadores (De Vos *et al.*, 2005). Além disso, verifica-se a sobreposição das vias de sinalização envolvendo estes três fitohormônios no evento de morte celular durante a HR (Devadas *et al.*, 2002).

6. GmNAC6 é induzido na interação compatível

As plantas possuem eficientes mecanismos que previnem a invasão de seus tecidos por patógenos. Na resposta compatível, a interação de microorganismos com as plantas leva ao estabelecimento de uma doença (Morel & Dangl, 1997). A bactéria *Ralstonia solanacearum* causa a murcha vascular letal em mais de 200 espécies de plantas. Presente no solo, infecta naturalmente as plantas através do sistema radicular, e em seguida, a colonização dos vasos do xilema possibilita a migração para a parte aérea. A disfunção vascular decorrente da obstrução dos vasos xilemáticos é a causa da murcha, e da subsequente morte da planta (Boucher & Genin, 2000).

A infiltração da suspensão de *Ralstonia solanacearum* em folhas de soja não provocou nenhum sintoma macroscópico, como verificada na Figura 8.

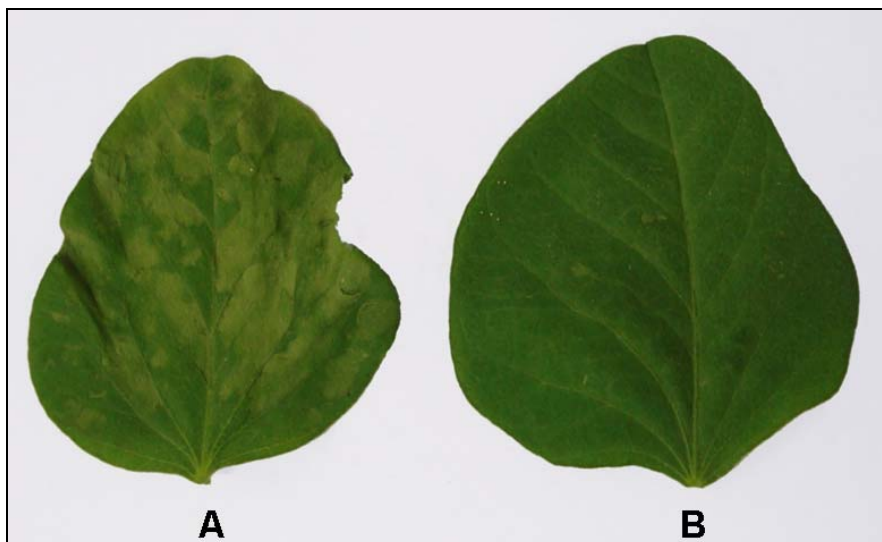


Figura 8. A bactéria *Ralstonia solanacearum* estabelece uma associação compatível com plantas de soja. Folhas de soja foram infiltradas com suspensões bacterianas de *Pseudomonas syringae* patovar Tomato (A) e *Ralstonia solanacearum* (B). A fotografia corresponde a 24 horas após as inoculações das bactérias.

A expressão dos genes *NACs* foi avaliada nas folhas desafiadas com *R. solanacearum*. Assim como na infecção com *Pst*, verifica-se uma alta indução dos genes *GmNAC3* e *GmNAC4* (Figura 9A). Há um aumento crescente na expressão de *GmNAC6* nas folhas inoculadas. Além disso, o perfil de expressão de *GmATAF* é similar ao observado na interação incompatível, e pode decorrer de uma resposta inespecífica a ferimento, resistência a penetração do patógeno e perturbações da homeostase.

Não houve indução na expressão dos novos genes *NACs* *Gm82*, *Gm178* e *Gm258* (Figura A3, anexos). Não obstante, ocorreu acúmulo do transcrito *Gm119* na interação compatível, assim como verificado na resposta hipersensível (Figura 7B). Vários estudos sugerem que a sinalização ativada na senescência foliar se sobrepõe à resposta de defesa. Neste contexto, vários genes codificando fatores de transcrição das famílias WRKY, MYB e ERF são

induzidos durante a senescência e em resposta a diferentes patógenos (Quirino *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002). Tais considerações sugerem o envolvimento do transfator codificado por *Gm119* na resposta de defesa e senescência. Experimentos futuros permitirão a caracterização destes novos genes NACs de soja.

Os genes que codificam para as proteínas NRPs foram fracamente induzidos nesta condição de interação compatível (Figura A4, anexos). A detecção na expressão destes genes pode advir da alta sensibilidade da técnica de Real Time PCR, uma vez que, a expressão de *NRP-A* não foi identificada por Northern blot na interação compatível (Ludwig & Tenhaken, 2001).

A infecção com *Ralstonia solanacearum* induziu a expressão dos genes *Calnexina* e *GST* (Figura A4, anexos). Coletivamente, condições de estresse como ferimento, aplicação de enzimas hidrolíticas e patógenos promoveram a indução dos genes que codificam chaperones moleculares e proteínas que assistem o enovelamento protéico (PDI) e detoxicação (GST). Tal resposta geral ao estresse difere das condições de desidratação por PEG e estresse hídrico, as quais promoveram a repressão transcricional destes genes (Irsigler *et al.*, 2007; Valente *et al.*, 2008).

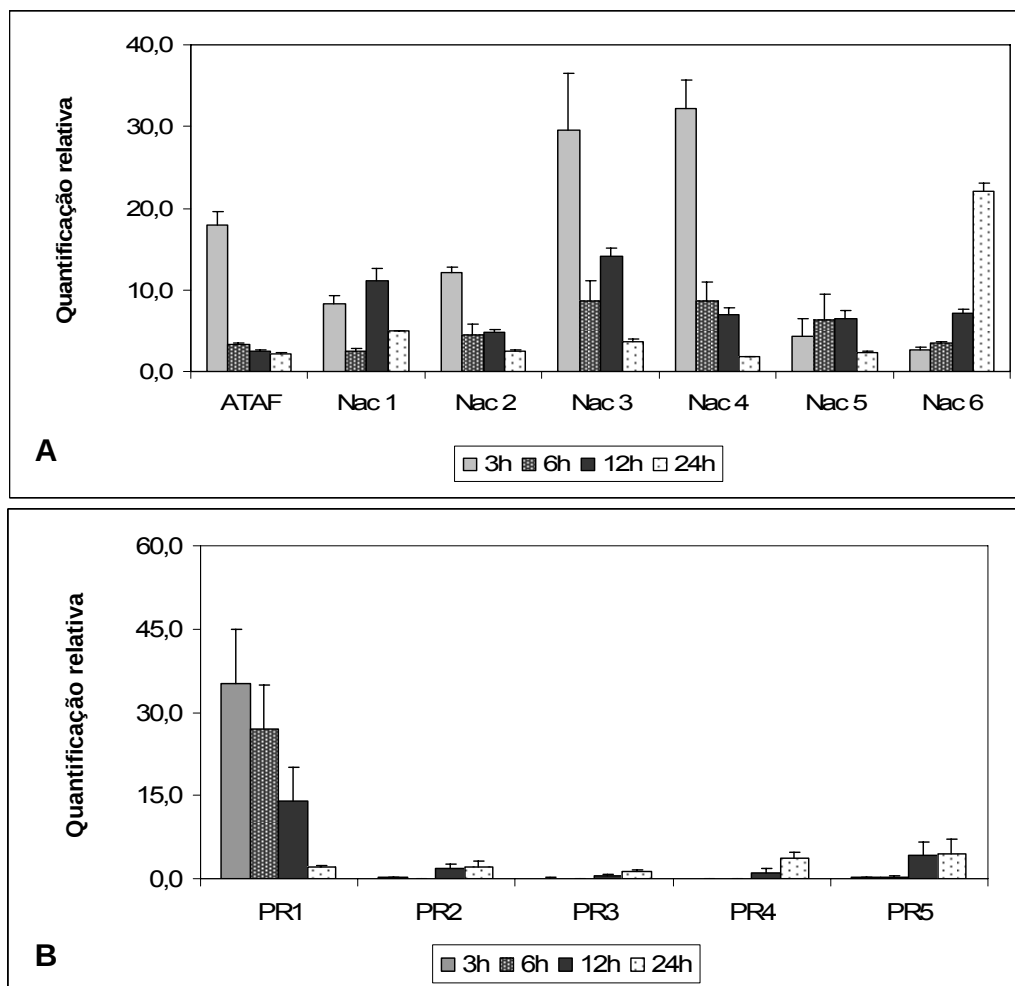


Figura 9. **Avaliação da expressão gênica durante a interação compatível.** (A) A expressão dos genes *NACs* (*GmNAC1-GmNAC6* e *GmATAF*) nas folhas inoculadas com a bactéria fitopatogênica *Ralstonia solanacearum* foi avaliada por PCR em tempo real. (B) Expressão dos genes relacionados à patogênese (*PR1-PR5*) durante interação compatível. Os valores de expressão foram calculados usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando como controle endógeno a helicase, e normalizado com o tratamento controle. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de um pool de 3 réplicas biológicas (n = 2 réplicas manuais).

As plantas são capazes de ativar diferentes respostas de defesa de uma maneira dependente de patógenos. A ativação de um mecanismo de resposta

a patógenos biotrófico e hemibiotrófico envolve a atuação do hormônio ácido salicílico. O nível de SA eleva nos tecidos desafiados com patógenos e sua aplicação exógena resulta na indução de genes *PRs* (Smith *et al.*, 2009; Bari & Jones, 2009). Em concordância, a inoculação de *R. solanacearum*, patógeno com estilo de vida biotrófico, induziu fortemente a expressão de *GmPR1* (Figura 9B), o qual é responsivo a SA (Mazarei *et al.*, 2007).

GmATAF, pertencente a subfamília StNAC apresenta similaridade com *ATAF2*, o qual é induzido por MeJA, SA e infecção por *Pseudomonas syringae* (Delessert *et al.*, 2004; Hauck *et al.*, 2003). Análise de microarranjo em *Arabidopsis* mostrou uma indução rápida e local de *ATAF2* após ferimento, (Delessert *et al.*, 2004). De fato, *GmATAF* apresenta uma expressão transiente similar nas diferentes condições analisadas (Figuras 3A, 7A e 9A). Esta resposta parece restringir ao local de aplicação do estresse, uma vez que não se observa forte indução em condição sistêmica (Figura 5A).

O transfator da família WRKY em *Capsicum annuum*, *CaWRKY1* apresenta uma indução forte nos períodos iniciais da infecção por patógenos compatíveis e incompatíveis. *CaWRKY1* e *ATAF2* atuam como reguladores negativos da resposta de defesa (Oh *et al.*, 2008; Delessert *et al.*, 2005). A expressão do gene de defensina *PDF1.2* e dos genes relacionados a patogênese foi reprimida nas plantas superexpressando *ATAF2* e induzida nas plantas *knock-out* (Delessert *et al.*, 2005). Superexpressão de *GmATAF*, por sua vez, está associada a repressão dos genes induzidos por tunicamicina e dos envolvidos na via que integra a resposta ao estresse osmótico e do RE (Pinheiro, 2007). Adicionalmente, *ATAF2* e *GmATAF* são induzidos em

condições que promovem a ativação da UPR como o tratamento com tunicamicina (Martínez & Chrispeels, 2003; Irsigler *et al.*, 2007; Pinheiro, 2007).

A região promotora do gene *ATAF2* apresenta um elemento regulatório putativo responsivo a ER (ERSE-I) identificado em mamíferos (Martinez & Chrispeels, 2003). Assim como *ATAF2*, a sequência ERSE-1 (CC-N₁₂-CCACG) está presente no promotor de *GmATAF* (posição -354 do ATG) (dado não mostrado). Em suma, *GmATAF* parece responder ao estresse causado pela perturbação na homeostase do RE, em decorrência da ativação da UPR ou de uma sinalização independente como é o caso da via integrativa.

A expressão transiente de *GmNAC1* promoveu o desenvolvimento de clorose foliar e não estava relacionado, com a exceção de quitinase, à indução dos genes *PRs* (Figura 2). *GmNAC1* é fortemente induzido por ABA, cicloheximida, em folhas de soja senescentes, e é reprimido pela citocinina BAP suportando a sua função no evento de morte celular associada à senescência (Pinheiro *et al.*, 2009; Valente *et al.*, 2008). O gene *CarNAC3* em grão de bico é agrupado na subfamília NAP, e considerando sua sequência aminoacídica apresenta identidade de 79% com *GmNAC1*. Assim como *GmNAC1*, *CarNAC3* é induzido por ABA, nas folhas senescentes e reprimido por 6-BA (Peng *et al.*, 2009).

A regulação transcricional de *GmNAC1* não foi associada às condições miméticas e de ataque de patógenos. Não obstante, verifica-se uma indução transiente de *GmNAC1* após ferimento (Figura 3A). Fatores ambientais também regulam positivamente o processo de senescência. Análise global da expressão gênica tem revelado grupo de genes comuns, principalmente codificando fatores de transcrição, que são expressos durante a senescência

induzida por desenvolvimento (envelhecimento) ou induzida (artificialmente). Um total de 20 genes codificando transfatores NACs apresentaram elevados níveis de expressão durante senescência natural e induzida por escuro (Lim, 2007; Lin & Wu, 2004; Guo *et al.*, 2004). *GmNAC1* pode atuar como regulador positivo do processo de senescência induzida ou natural. Esta sinalização pode requerer o hormônio ABA, o qual regula o evento de senescência (Weaver *et al.*, 1998; Van der Graaff *et al.*, 2006).

A sobreposição de vias de sinalização distintas pode ser resultante da indução de um mesmo fator de transcrição. Genes de diferentes famílias de fatores de transcrição como WRKY e ERF são induzidos em resposta a estresse abiótico e infecção por patógenos (Chen *et al.*, 2002). Transfatores NACs são responsivos a estresses biótico e abiótico (Nakashima *et al.*, 2007; Ohnishi *et al.*, 2005; Hegedus *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2007; Jensen *et al.*, 2008).

GmNAC3 e *GmNAC4* estão envolvidos na resposta geral a estresse abiótico, sendo induzidos por ABA, JA e sal (Pinheiro *et al.*, 2009). Estes dois genes estão relacionados à *ANAC019*, *ANAC055* e *ANAC072* (Pinheiro *et al.*, 2009), os quais integram a subfamília AtNAC3 (Ooka *et al.*, 2003). As proteínas NAC pertencentes a esta subfamília apresentam elevada conservação do subdomínio E. Além disso, a análise da região de ativação transcricional (C-terminal) sugere o envolvimento das proteínas da subfamília AtNAC3 em funções distintas (Ooka *et al.*, 2003). De fato, *ANAC019* e *ANAC055* são induzidos por ABA, seca, estresse salino, ferimento, patógeno e atuam regulando a expressão de genes de defesa em resposta a JA (Tran *et al.*, 2004; Bu *et al.*, 2008).

ANAC019 e *ANAC055* atuam downstream do regulador positivo (AtMYC2) da resposta induzida por ácido jasmônico. Esta sinalização culmina na expressão de genes responsivos a ferimento e repressão de genes de defesa como *PR-1* (Bu *et al.*, 2008). Em concordância com estas informações, observa-se uma forte indução dos genes homólogos *GmNAC3* e *GmNAC4* nas condições de alta expressão de *GmPR3*, responsivo a JA, quais sejam: ferimento, CDE local e infecção por *Pst*.

OsNAC6 apresenta forte indução nas mesmas condições de estresse que os transfatores *GmNAC3* e *GmNAC4* em soja (Ohnishi *et al.*, 2005; Nakashima *et al.*, 2007; Pinheiro *et al.*, 2009). A superexpressão de *OsNAC6* aumenta a tolerância das plantas de arroz à desidratação, estresse salino e infecção por fungo (Nakashima *et al.*, 2007). Se a expressão de *GmNAC3* e *GmNAC4* estiver associada à maior resistência a patógenos e às condições de estresses abióticos, estes genes corresponderão a alvos potenciais para a manipulação gênica em soja.

GmNAC2 é induzido por PEG e seca (Pinheiro *et al.*, 2009; Valente *et al.*, 2008), ao passo que, *GmNAC5* não responde a estresse abiótico, e é relacionado a um processo de morte celular (Pinheiro *et al.*, 2009). A regulação transcricional associada a ferimento e patógenos parece não envolver *GmNAC2* e *GmNAC5*. Estas informações sugerem a participação destes transfatores em eventos específicos nas plantas de soja. *GmNAC2* possivelmente relaciona-se a processos específicos de resposta à desidratação e *GmNAC5* à morte celular inerente ao desenvolvimento.

7. Superexpressão de proteínas ricas em asparagina (NRPs) em protoplastos induz a expressão de *GmNAC6*.

As proteínas NRP-A e NRP-B, de modo similar a *GmNAC6* estão relacionadas ao processo de morte celular, sendo reprimidas por inibidores de senescência e induzidas por cicloheximida (Pinheiro *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2008). Adicionalmente, *GmNAC6* e os genes *NRPs* apresentam uma forte indução em plântulas e células de soja tratadas com tunicamicina (Pinheiro, 2007; Pinheiro *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2008). Na presente investigação, foi demonstrado que, em plantas desafiadas com patógenos, os perfis de expressão de *GmNAC6* e dos genes que codificam proteínas *NRPs* são similares, porém a indução desses genes ocorre com cinética diferente. Conjuntamente, estes resultados sugerem a participação deste fator de transcrição na mesma via de sinalização de morte celular mediada pelas proteínas *NRPs*. A cinética de indução rápida de *NRPs* quando comparada com a indução tardia de *GmNAC6* pode ser um indicativo de que *NRPs* são componentes “upstream” na via de transdução de sinal resultando na indução de *GmNAC6*.

Para avaliar esta hipótese, a expressão de *GmNAC6*, assim como de outros genes *NACs* de soja, foi avaliada em protoplastos expressando transientemente *NRPs*. A confirmação da transformação transiente dos genes *NRP-A* e *NRP-B* é mostrada na Figura A5 em anexos.

Condição de superexpressão dos genes *NRPs* não altera de modo significativo a expressão dos genes *GmNAC1-GmNAC5*, bem como de

GmATAF (Figura 10). Este último, por sua vez, é alvo da via integrativa (Irsigler *et al.*, 2007).

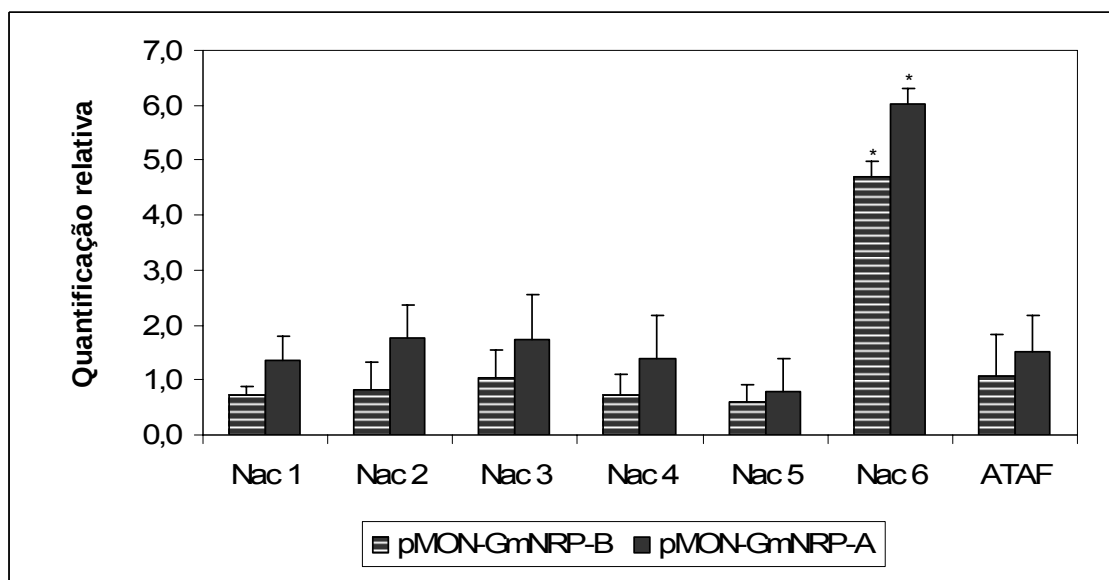


Figura 10. ***GmNAC6* é induzido em protoplastos superexpressando *NRPs*.** A expressão dos genes *NAC* (*GmNAC1-GmNAC6* e *GmATAF*) foi determinada por RT-PCR em tempo real em protoplastos transformados com o vetor vazio (pMON921) ou com os cassetes de expressão de *NRP-A* (pMON-*NRP-A*) e *NRP-B* (pMON-*NRP-B*). Os valores de expressão foram obtidos com o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, tendo por controle endógeno a helicase, e normalizado com o tratamento controle (protoplastos transformados com pMON921) (+DP, n= 3 réplicas biológicas). A análise de variância pelo teste Tukey ($p < 0,05$) revelou a distinção significativa de *GmNAC6* em protoplastos superexpressando *NRPs*. Em contrapartida, não houve variação na expressão dos demais *NAC*.

Em contraste, superexpressão dos genes *NRP-A* e *NRP-B* promoveu uma indução significativa na expressão de *GmNAC6*. A localização das *NRPs* no citosol ou na membrana celular, assim como, a indução precoce destes genes por indutores de morte celular suportam a atuação inicial destas proteínas no evento de morte celular (Costa *et al.*, 2008). A sinalização de

morte celular/senescência em soja parece envolver uma cascata de eventos com a atuação inicial de proteínas NRPs e a consequente indução do transfator *GmNAC6*.

8. Superexpressão de *GmNAC6* em protoplastos não altera expressão de *PRs*

O transfator *GmNAC6* parece estar envolvido na resposta de defesa das plantas de soja a patógenos. A sua expressão transiente em folhas de tabaco está associada à alta indução na expressão de genes relacionados à patogênese (Figura 2). Visando verificar a possível modulação por *GmNAC6* na expressão de genes relacionados com patogênese e senescência, foram realizados experimentos em protoplastos de soja superexpressando *GmNAC6* (Figura A6, anexos). A expressão dos genes de defesa e relacionados à senescência *GmPR1-GmPR5*, *GmCystP* e *GmDiD* não diferiu na condição controle (vetor vazio) e de superexpressão de *GmNAC6* (YFP-*GmNAC6*; Figura 11).

Embora GmDiD não tenha sido ainda caracterizado em soja, ele é homólogo a *didia9* em tabaco e *AtSEN1*, os quais são associados a senescência, e no caso de *AtSEN1* a resposta a patógenos (Simón-Mateo *et al.*, 2006; Schenk *et al.*, 2005). O gene *GmCystP*, por sua vez, é o homólogo em soja do gene de cisteína protease *NTCP-23* associado à senescência foliar em tabaco (Costa *et al.*, 2008).

A incapacidade de *GmNAC6* em induzir os genes relacionados à patogênese e senescência pode advir da metodologia aplicada para obtenção dos protoplastos. Neste procedimento, há a incubação das células de soja em solução contendo hidrolases (celulase, macerozima e pectoliase). Tal tratamento mimetiza a infiltração das folhas de soja com solução enzimática que degrada a parede celular, e esta condição, por sua vez, promove a indução dos genes *PRs* (Figura 4A). De modo similar, protoplastos de tabaco apresentam elevados níveis de expressão de β -1,3-glucanase (Denecke *et al.*, 1995).

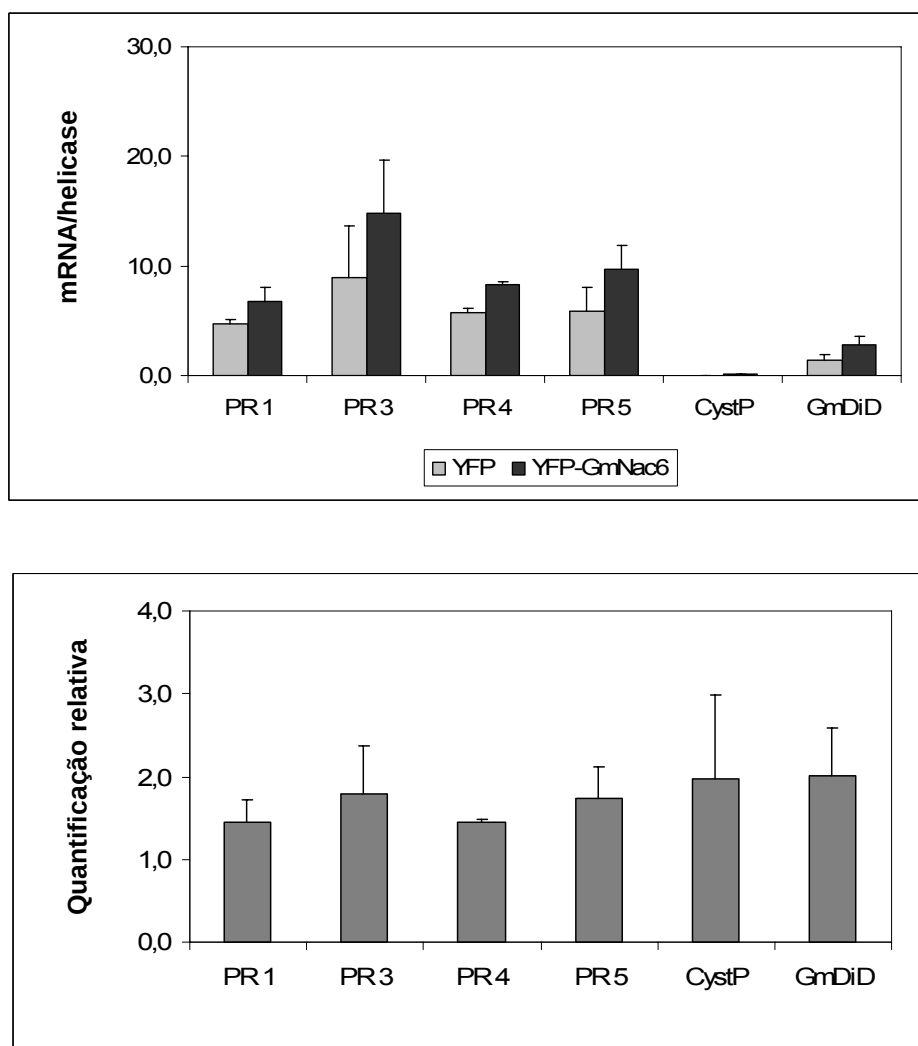


Figura 11. **Protoplastos superexpressando *GmNAC6* não apresentaram alteração na expressão dos genes *PRs* de soja.** A expressão dos genes relacionados à patogênese (*GmPR1-GmPR5*) e ao evento de senescência (*GmCystP* e *GmDiD*) foi monitorada por RT-PCR em tempo real nos protoplastos transformados com o vetor vazio (pYFP) e com o cassete de expressão de *NAC6* (pYFP-*GmNAC6*) (+DP, n= 3 réplicas biológicas). A análise de variância não indicou diferença significativa na expressão gênica entre os tratamentos analisados ($p < 0,05$).

Para comprovar se o tratamento enzimático na preparação dos protoplastos induz a expressão dos genes de defesa avaliados, a variação na expressão gênica dos dois tratamentos (controle e superexpressão de *GmNAC6*) foi normalizada para a condição não tratada (células de soja em

suspensão; Figura 12). Em ambos os tratamentos, há uma indução acentuada na expressão dos genes alvos, embora não se verifique diferença entre os protoplastos eletroporados com o vetor vazio (pYFP) e com pYFP-*GmNAC6*. Logo, a metodologia usada é responsável pela ativação da resposta de defesa e indução de genes *PRs*. Adicionalmente, o protocolo de obtenção de protoplastos também induz a expressão de *GmNAC6* (Figura A7, anexos). Estes dados são consistentes com a indução local de *GmNAC6* nas folhas infiltradas com CDE (Figura 4B). Além disso, indicam que a indução de genes *PRs* mediada por *GmNAC6*, conforme observado em folhas de tabaco, e a resposta mediada por enzimas hidrolíticas, que mimetizam o ataque de patógenos, não são aditivas e, portanto, estes dois mecanismos de indução podem ser lineares.

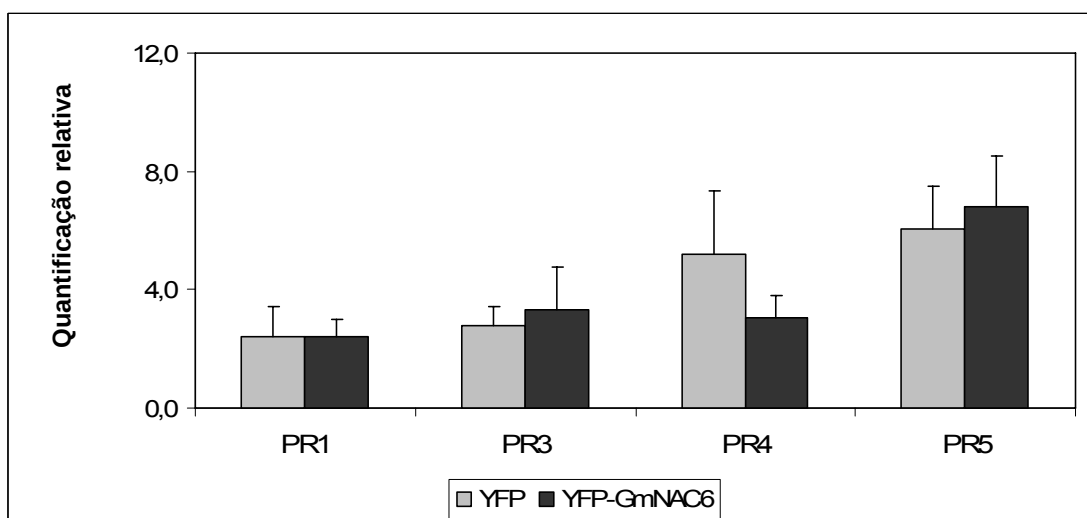


Figura 12. **Genes relacionados à patogênese são induzidos em protoplastos de células de soja.** A expressão dos genes *PR* (*PR1*, *PR3*, *PR4* e *PR5*) foi avaliada por PCR em tempo real em células e protoplastos de soja. Os valores de expressão foram calculados usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando como controle endógeno a helicase, e normalizado para o tratamento controle (células em suspensão) (DP+, 3 replicas biológicas). Não houve diferença significativa entre YFP vazio e YFP-*GmNAC6* pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A regulação de *GmNAC6* parece ser dependente da expressão dos genes *NRPs* e envolver uma sinalização de resposta a estresse no RE independente da UPR. Com o objetivo de elucidar a modulação transcricional decorrente da atuação de *GmNAC6*, a expressão dos genes residentes no RE e *NRPs* foi avaliada em protoplastos superexpressando este transfator (Figura 13). Expressão ectópica de *GmNAC6* não alterou a expressão dos genes *BiPD*, *Calnexina* e *PDI1*, consistente com a cinética tardia de indução de *GmNAC6* por patógenos em comparação com os genes alvos da UPR. Similarmente, a expressão transiente de *NRP-A* e *NRP-B* em protoplasto não induz a expressão dos genes alvos da UPR, *BiP* e *CNX* (Costa *et al.*, 2008).

A superexpressão de *GmNAC6* não alterou a expressão do gene *NRP-B*. Em contrapartida, há uma repressão significativa do gene que codifica *NRP-A* (Figura 13). Superexpressão de *GmATAF*, por sua vez, está associada a repressão de *GmNAC6* e dos genes *GmNRP-A* e *GmNRP-B* da via integrativa (Pinheiro, 2007).

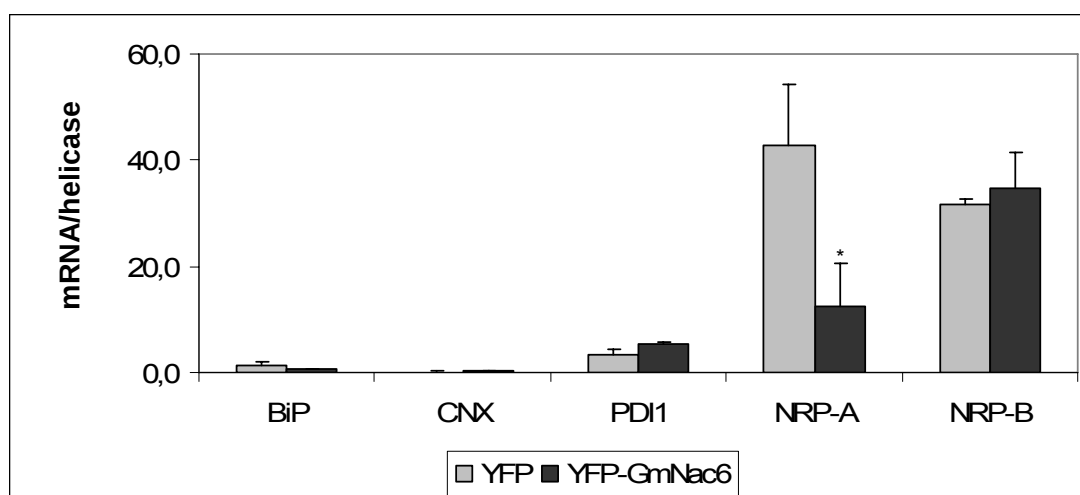


Figura 13. **Superexpressão de *GmNAC6* reprime *GmNRP-A* mas não altera a expressão dos chaperones moleculares do RE e de *GmNRP-B*.** A expressão dos genes residentes do RE (*BiPD*, *Calnexina* e *PDI1*) e das proteínas ricas em asparagina (*GmNRP-A* e *GmNRP-B*) foi avaliada por RT-PCR em tempo real nos protoplastos transformados com o vetor vazio (pYFP) e com o cassete de expressão de *NAC6* (pYFP-*GmNAC6*) (+DP, n= 3 réplicas biológicas). A análise de variância pelo teste de Tukey apontou a diferença significativa entre os tratamentos para a expressão do gene *NRP-A* ($p < 0,05$).

9. Identificação de cis-elementos regulatórios na região promotora de *GmNAC6*.

Uma vez determinado que *NRP-B* promove a indução de *GmNAC6*, tornou-se de interesse avaliar se este nível de controle residia na ativação do promotor. Para isso, a região promotora do gene *GmNAC6* de 1,3 kb foi isolada e submetida à análise computacional para a presença de elementos regulatórios putativos, utilizando os softwares PLACE (Higo *et al.*, 1999) e PlantPAN (Chang *et al.*, 2008). PLACE é um banco de dados de vários elementos *cis*- e *trans*-atuantes em plantas (Higo *et al.*, 1999). A plataforma PlantPAN (Plant promoter analysis navigator) amplia a avaliação da sequência,

uma vez que, integra diferentes bancos de dados externos como o TRANSFAC, AGRIS, JASPER e PLACE (Chang *et al.*, 2008).

A análise da sequência promotora de *GmNAC6* revelou a presença de uma série de motivos conservados em promotores eucarióticos. De modo consistente ao possível papel deste gene em vias responsivas a estresses e patógenos, vários elementos específicos putativos foram encontrados na região promotora (Figura 14).

Uma sequência putativa TATA box foi identificada no promotor na posição -156 considerando a sequência ATG de início da tradução. O elemento regulatório CAAT box putativo é encontrado tanto na posição -188 quanto na posição -297 em relação a sequência ATG de início da tradução.

-1300	ATTTGAACTCACACTAGAGAATCAAAATT TTGACA ACATTTTCAAATATT GAAGCTCCTTTTAATATTTGAGACTACTACACTAATAATCTTTTGCCAAG
-1200	GGCGTAATTAATTTGCCGGAAGTTGTTTTTAAATGA GTCAA ATTAATTAC TGT TGACG AATTGAGTCTAGTAAAGGAATTAACTTTAAAATAATAAATT
-1100	TCGATTTAAATTCTTACTATA GAAAAA ATACACTTGTGTTTAC GGTTAAA CTTTGAGAAATATTACATAAGATA CTTTTT TGGGGGGGGAATTGTATTTA
-1000	CTATGAAAG GTCA TTTGATTTAAGGCTTCATTAAATTAACGCTGCAGTACT GTTTGGTTTGAATTATGCCATTCAAGACCCAAATAAGAGTATG CACGTA
-900	TTTAGATGTGAGGAACCTTCAAAGGTTGGAGTTGAGTCTGCTAATTTGT AATTTTCTCGTTTGAAGCTGTTGGCATGTTGCT ACGT TATTTGGCATGT
-800	AAGTGAATAACAACG ACGT AGAAATACTTTTATTTTGTGCCCAAATCAT TTAGCAAATAATACAAACCTGTTTCTTTGCTACAACGCACTTAGTAAAGT
-700	CATAGACAAAAAAA TTAACC ATAATGTGCGAGATCAAATCTCATAACTC TTCTTCCCCCTTCTCCAGGGGATTGGGACCTTCATCTCTTGTGAACCTCC
-600	CTTAAATAAAACCCTTACATGCATTAAAAACAAGTTAATGGTAAGGTAA TTTTGTACCGTACATTTTTTTTCTTACATGCTGAAATGGAAGAAATTTAA
-500	GAACATAAAGTATAAAGTATG GTCA TGAAAATTGTAAGAGGAATTTCCGG GTAAAGTCCAAAACCGAAAG GAAAAA ATAG GGTCAA GCCATAACATGTATA
-400	TCTGTCCCACCACAGTTTAGTCTCTGCAGACTTTTT GTCAAGCCGCGTGG GTCCCACCTTCTGGCGGACCCACCACACTAATGTCGTAATAATGTGGAGAG
-300	TCG CAATT ACAAGTCCATTTTCTTTCAAGATTTCTTAGAGACTTTTGTGC CCCCTAGGCCTCC CACG ACCA GTCA TAACCCAAACTCAAATATTTAATAA
-200	AAATAAATCCAT CAATT AGCATAGTTATGAAACCAACCATTCTCT TATAAA TACCCT CACAACACATATTCATTTTATATC AACTAAC TTTGTGCTTCCTC
-100	CGCA GAAAAA TAAAAAAGAGTAGCTAGCACTAGCTAGCTAAACACAGTA CAGTAGTGATCATAGGCAAGCAAAGCATATTCATAATATGGCAACC ATG

Figura 14. Representação dos cis-elementos putativos na sequência nucleotídica do promotor de *GmNAC6*. A região promotora foi analisada nos *software* PLACE e PlantPAN. Os números indicam as posições relativas ao códon de iniciação da tradução ATG (cinza). Os elementos regulatórios putativos em destaque são: **TATA box**, **ABRELATERD1/ACGTAERD1**, **ASF1MOTIFCAMV**, **CAAT box**, **GT1GMSCAM4**, **ELRECOREPCR1 (WBOX)**, **WBOX**, **WYB1LEPR**, núcleo da ligação de NACs (**CACG**) e core GT1 (**GGTTAA**).

Fatores ambientais como ferimento, ausência de luz e infecção por patógeno, bem como, a presença dos hormônios ABA e etileno promovem a senescência foliar (Weaver *et al.*, 1998). A sequência ABRE (ACGTG) é requerida juntamente com ACGT para a expressão responsiva a senescência

do gene *AtERD1* (Simpson *et al.*, 2003). Estes elementos putativos são encontrados no promotor de *GmNAC6* nas posições -906, -816 e -784 em relação ao ATG. ABRE é o principal cis-elemento atuante na expressão gênica responsiva a ABA (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2005). A presença destes elementos no promotor em análise é condizente com a indução transiente e inicial de *GmNAC6* decorrente da aplicação exógena de ABA (Pinheiro *et al.*, 2009). Além disso, correlação positiva entre elevados níveis de ABA e defesa a patógenos tem sido relatada (Adie *et al.*, 2007).

Fatores de transcrição da família WRKY atuam nos eventos de desenvolvimento, na resposta a patógeno, ferimento e estresse abiótico (Robatzek & Somssich, 2002; Chen & Chen, 2002; Oh *et al.*, 2008; Nishiuchi *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2008). Proteínas WRKY reconhecem o elemento W-box (sequência TGAC) presentes nos promotores de vários genes relacionados à defesa e senescência (Maleck *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002; Nishiuchi *et al.*, 2004; Oh *et al.*, 2008). Em salsa, proteínas induzidas por patógeno (WRKY1-3) reconhecem as sequências responsivas a elicitor (TTGACC) nos promotores dos genes *PR-1* (Rushton *et al.*, 1996).

Oito sequências putativas contendo o elemento consenso de ligação específica das proteínas WRKY estão presentes no promotor do gene *GmNAC6* (-1271, -1164, 1148, -992, -479, -421, -364, -229). A abundância de sequências W-BOX (uma média 4.3 elementos/promotor) foi também evidenciada nos promotores de 26 genes de defesa induzidos em *Arabidopsis* desafiada por diferentes patógenos (Maleck *et al.*, 2000). Sequências W-BOX podem atuar como elementos regulatórios negativos (Chen & Chen, 2002; Oh *et al.*, 2008). Assim, a presença destes cis-elementos negativos no promotor de

GmNAC6 poderia reprimir o acúmulo do transcrito e os efeitos prejudiciais de morte celular, a qual sua expressão está associada (Figura 1).

As sequências putativas Myb1/MYB1LEPR (posição -120 do ATG) e GT-1 (-1057 e -685) também estão presentes nas regiões promotoras de genes de defesa (Chakravarthy *et al.*, 2003). O elemento responsivo a patógeno Myb1 regula a expressão de *HSR203J* em tabaco. Este gene apresenta uma indução forte, local e específica da resposta hipersensível (Pontier *et al.*, 1998; Pontier *et al.*, 2001a). A ligação dos fatores GT-1 em posições distantes (-902 a -656) no promotor do gene *PR1-a*, por sua vez, influenciam a expressão deste gene na HR e na aplicação de SA (Buchel *et al.*, 1999).

A regulação por fitohormônios relacionados à resposta de defesa é também observada para o elemento ASF1MOTIFCAMV (posição -1147 referente ao códon ATG). Esta é a denominação do elemento *as-1* inicialmente identificado no promotor 35S do vírus do mosaico da couve flor (CaMV; Lam *et al.*, 1989). Genes caracterizados previamente e regulados por *as-1* são relacionados a mecanismo de detoxicação e resposta a patógenos. Adicionalmente, este *cis*-elemento é regulado por JA, SA e auxina, e direciona a expressão na raiz (Ulmasov *et al.*, 1994; Xiang *et al.*, 1996; Xiang *et al.*, 1997). De fato, genes induzidos após ataque de patógenos pertencentes a diferentes famílias de transfatores como Myb, bZIP e AP2/EREBP apresentam elevada expressão na raiz (Chen *et al.*, 2002). Estas informações reforçam os resultados prévios de indução na expressão de *GmNAC6* neste órgão (Pinheiro, 2007; Tran *et al.*, 2009).

O reconhecimento da sequência *as-1* (TGACG) deve-se à ligação de fatores de transcrição TGA (bZIP), os quais interagem com NPR1 após a

indução da SAR. NPR1 é o regulador positivo da resistência induzida (Durrant & Dong, 2004). Sequências W-box no promotor de *AtNPR1* são reconhecidas especificamente por proteínas WRKY induzidas por ácido salicílico e patógeno (Yu *et al.*, 2001). Tais sequências putativas denominadas WBOXATNPR1 (TTGAC) também ocorrem na região promotora em estudo (correspondem a 5 das 8 sequências W-box). Desta forma, a presença dos elementos ASF1MOTIFCAMV (*as-1*) e WBOXATNPR1 juntamente com a indução de *GmNAC6* nas folhas opostas às infiltradas com solução enzimática (Figura 5A) sugerem a atuação deste transfator na resposta sistêmica.

Algumas proteínas NAC ligam-se ao promotor 35S de CaMV, na região que se sobrepõe ao cis-elemento *ocs/as-1*. Tal sítio de ligação ao promotor 35S é por sua vez, similar a NACRS (sequência de reconhecimento de NAC; Xie *et al.*, 1999; Duval *et al.*, 2002; Hegedus *et al.*, 2003; Olsen *et al.*, 2005b). Além disso, o núcleo de ligação ao DNA de algumas proteínas NAC (CACG) e a sequência complementar reversa (CGTG) estão presentes no promotor de *GmNAC6* (-238, -355 e -906; Olsen *et al.*, 2005b). Coletivamente, estas observações indicam a possibilidade de regulação de *GmNAC6* por proteínas da família NAC.

GT1GMSCAM4 (-1079, -1026, -430 e -96) é a referência para o cis-elemento putativo GT-1 (GAAAAA) identificado no promotor do gene *CaM-4* de soja. A interação do fator de transcrição GT-1 e o cis-elemento GT-1 é requerida para a expressão da calmodulina (SCAM-4) induzida por patógeno e NaCl (Park *et al.*, 2004).

Ca⁺⁺ e proteínas de ligação específica como a calmodulina (CaM) são importantes na resposta de defesa em plantas. Estresse biótico e abiótico

direcionam mudanças no cálcio livre e na expressão dos genes que codificam CaM. A calmodulina é um mediador intracelular ubíquo na sinalização de Ca^{++} . Em sua função efetora, CaM pode regular a atividade transcricional de transfatores. As isoformas de CaM em soja se ligam de forma distinta ao transfator AtMYB2 e regulam sua capacidade de ligação ao DNA (Yang & Poovaiah, 2003; Yoo *et al.*, 2005). Em *Arabidopsis*, o transfator NAC (CBNAC) liga-se a CaM e parece atuar como repressor transcricional (Kim *et al.*, 2007a).

AtSR1-6, assim como, *NtER1* codificam fatores de transcrição responsivos a estresse que se ligam a CaM de modo dependente de Ca^{++} . O domínio de ligação ao DNA destes transfatores reconhece cis-elemento de 6pb com o consenso CGCG. Um dos elementos característicos CCGCGT (-358) é encontrado no promotor de *GmNAC6*. Genes em *Arabidopsis* apresentando esta sequência consenso estão envolvidos na resposta a estresse, reparo do DNA, sinalização por etileno e ABA (Yang & Poovaiah, 2002).

A comunicação entre Ca^{++} /CaM e vias de sinalização envolvendo estresse ambiental, auxina, ABA, etileno tem sido reportadas (Larkindale & Knight, 2002; Yang & Poovaiah, 2003). A sinalização de defesa que antecede a indução de *GmNAC6* pode envolver diretamente a complexidade da sinalização mediada por cálcio e seus mediadores como a CaM.

Análise de seqüências promotoras na plataforma *PlantPAN* possibilita, em adição a busca de cis-elementos regulatórios putativos, avaliar a presença de elementos repetidos em tandem e ilhas CpG/CpNpG (Chang *et al.*, 2008). As repetições em tandem são cruciais para a regulação gênica em plantas (Rasmussen & Donaldson, 2006). Regiões no DNA com alto conteúdo das seqüências CpG/CpNpG são sítios importantes de metilação que podem

resultar no silenciamento gênico (Lewin, 2004; Cao & Jacobsen, 2002). A região promotora de *GmNAC6* não apresentou ilhas CpG/CpNpG nem elementos repetidos em tandem. Em resumo, a indução de *GmNAC6* na condição de ataque de patógeno e ferimento está condizente com a presença de cis-elementos putativos de resposta a estresse no promotor deste gene.

10. O promotor do gene *GmNAC6* não é induzido por expressão transiente de *NRP-B* em folhas de tabaco.

Uma vez demonstrado que superexpressão das proteínas NRPs (NRP-A e NRP-B) em protoplastos promove elevação na expressão do transfator *GmNAC6*, foi de interesse avaliar se o referido controle ocorria no nível de ativação de promotor. Desta forma, para avaliar se a indução dos genes *NRPs* ocorre como um evento inicial na sinalização que promove a indução transcricional de *GmNAC6*, os experimentos de expressão ectópica de NRPs foram estendidos para ensaios *in planta* com a região promotora deste transfator NAC. A construção contendo a sequência do promotor de *GmNAC6* fusionada ao gene repórter *GUS* (β -glucuronidase) foi utilizada para a transformação estável de tabaco. Paralelamente, folhas de tabaco foram transientemente transformadas com a construção contendo o promotor e mensuradas as atividades enzimáticas (confirmações das expressões nas Figuras A9 -12, anexos).

Co-expressão transiente em folhas de tabaco da construção pNAC6-GUS e *NRP-B* não alterou significativamente a atividade de GUS (Figura 15; Figuras A8, anexos). Similarmente, co-expressão do gene *rpL18*, utilizado como controle, não alterou a atividade enzimática de GUS, sob o controle do promotor de *GmNAC6* (Figura 15).

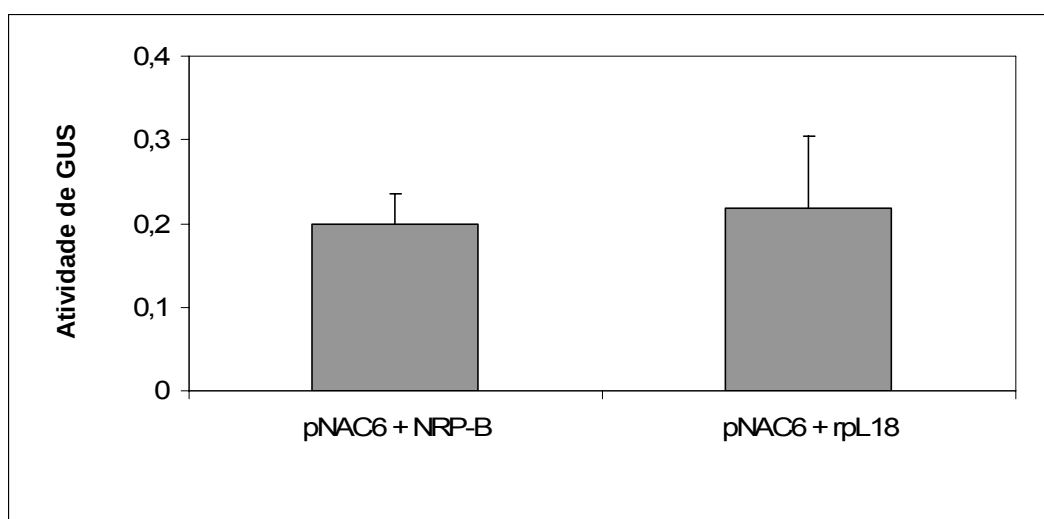


Figura 15. ***NRP-B* sozinho não ativa o promotor de *GmNAC6*.** Folhas de tabaco foram co-infiltradas com as construções de interesse: pNAC6:GUS + YFP- *AtrpL18*; pNAC6:GUS + YFP- *GmNRP-B*. A atividade específica de GUS foi determinada pelo ensaio fluorimétrico com extrato protéico das folhas infiltradas e expressa em nmol de 4-methylumbelliferone μg^{-1} proteína. min^{-1} (+DP, n= 3 repetições biológicas). O teste de Tukey não apontou diferença significativa entre os dois tratamentos ($p < 0,05$). A análise estatística foi realizada no programa SAEG.

A técnica de expressão transiente envolvendo um sistema de co-expressão pode não ser eficiente para averiguar induções pequenas, embora significativas que ocorre na região promotora do transfator. Particularmente, isto se deve à alta meia vida da enzima GUS que permite acúmulo da proteína

em grandes intervalos de tempo, podendo conseqüentemente mascarar pequenas variações na atividade de promotores. Adicionalmente, os eventos que antecedem à expressão de *GmNAC6* podem ser influenciados por uma cascata de sinalização específica na soja e ausente no sistema utilizado. Além disso, a modulação de *GmNAC6* mediada por NRPs pode decorrer de mecanismos regulatórios pós-transcricionais. Assim, o acúmulo do mRNA de *GmNAC6* em protoplastos superexpressando NRPs pode advir do aumento na estabilidade deste transcrito. A regulação do gene *AtNAC2/ORE1*, regulador positivo da morte celular associada à senescência, é dependente da estabilidade do mRNA. O RNA de interferência (*miR164*) regula negativamente o acúmulo do transcrito *ORE1* em folhas jovens e no início da senescência. A expressão de *miR164* é reduzida gradualmente, de modo dependente do envelhecimento (Kim *et al.*, 2009). Similarmente a *GmNAC6*, a superexpressão de *UBA2a* e *UBA2b* promove morte celular e indução de genes relacionados à defesa e senescência. Estes transcritos foram induzidos por ferimento, mas não na senescência natural. Os genes *UBA* codificam proteínas de ligação a RNA atuando na regulação pós-transcricional, e podem estabilizar ou desestabilizar (reprimir) transcritos especialmente envolvidos na progressão da senescência induzida por estresses (Kim *et al.*, 2008). Experimentos de expressão transiente dos genes NRPs em plantas de tabaco transformadas estavelmente com construção pNAC6: GUS possibilitará esclarecer estas perguntas.

V - CONCLUSÕES

Fatores de transcrição da família NAC em soja apresentam perfis de expressão distintos em resposta ao estresse biótico e abiótico. *GmATAF*, *GmNAC3* e *GmnNAC4* atuam na resposta geral a diferentes fatores bióticos. De modo interessante, o gene *GmNAC4* embora não tenha sido induzido por injúria mecânica foi fortemente expresso na condição de ataque de patógenos. *GmNAC1* respondeu apenas transientemente a ferimento. Em contrapartida, *GmNAC2* e *GmNAC5* não foram regulados transcricionalmente por condições bióticas. Dentre os novos genes NACs de soja avaliados, *Gm82* foi induzido durante a resposta hipersensível e sistêmica, ao passo que, *Gm119* foi induzido na interação compatível e incompatível.

GmNAC6 está relacionado ao evento de morte celular e à resposta elicitada por patógenos e ferimento. Características similares envolvendo a expressão dos genes *NRPs* e *GmNAC6* sugere a integração destes sinalizadores em uma mesma sinalização (Figura 16). Neste contexto, *GmNAC6* atuaria como um gene de expressão tardia dependente da sinalização upstream mediada pelas *NRPs*. Como modulador transcricional, *GmNAC6* poderia participar do mecanismo de feedback reprimindo o gene *NRP-A*, assim como, promover a expressão dos efetores de morte celular. O estudo funcional do promotor do gene *GmNAC6* e do envolvimento das *NRPs* na indução deste transfator poderão elucidar a via de sinalização envolvendo morte celular dependente de estresses no RE, em soja.

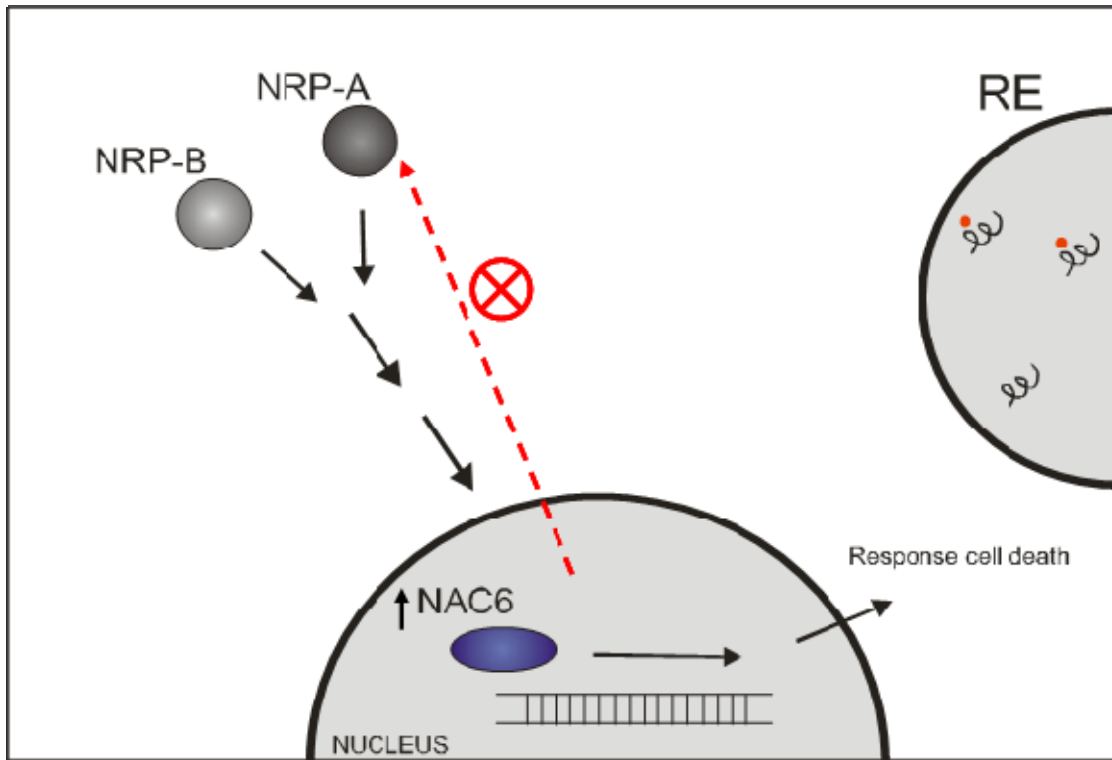


Figura 16. **Modelo proposto para a sinalização envolvendo *GmNAC6* e proteínas NRPs.** A sinalização de morte celular associada as proteínas NRPs decorre do sinal de estresse gerado no reticulo endoplasmático. A via de sinalização ativada pela atuação das NRPs parece promover um aumento na transcrição ou elevar a estabilidade do transcrito *GmNAC6*. Este gene NAC pode participar na indução dos efetores e reguladores da morte celular programada em soja. Em adição, como modulador transcricional *GmNAC6* pode ativar uma resposta de feedback, a qual reprime a expressão do gene que codifica a proteína NRP-A.

VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adie BA, Perez-Perez J, Perez-Perez MM, Godoy M, Sanchez-Serrano JJ, Schmelz EA, Solano R** (2007) ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 1665-1681.
- Aida M, Ishida T, Fukaki H, Fujisawa H, Tasaka M** (1997) Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*, an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell* 9: 841-857.
- Aida M, Vernoux T, Furutani M, Traas J, Tasaka M** (2002) Roles of PIN-FORMED1 and MONOPTEROS in pattern formation of the apical region of the *Arabidopsis* embryo. *Development* 129: 3965-3974.
- Alvim FC, Carolino SMB, Cascardo JCM, Nunes CC, Martinez CA, Otoni WC, Fontes EPB** (2001) Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. *Plant Physiology* 126: 1042-1054.
- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review Plant Biology* 55: 373-399.
- Bari R, Jones JDG** (2009) Role of plant hormones in plant defense response. *Plant Molecular Biology* 69: 473-488.
- Benhamou N** (1996) Elicitor-induced plant defense pathways. *Trends Plant Sciences* 1: 233-240.
- Bernales S, Papa FR, Walter P** (2006) Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annual Review Cell Development Biology* 22: 487-508.
- Bertolotti A, Zhang YH, Hendershot LM, Harding HP, Ron D** (2000) Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature Cell Biology* 2: 326-332.
- Bilgin DD, Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar SP** (2003) P58^{IPK}, a plant ortholog of double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR inhibitor, functions in viral pathogenesis. *Developmental Cell* 4: 651-661.
- Bogdanove AJ, Kim JF, Wei Z, Kolchinsky P, Charkowski AO, Conlin AK, Collmer A, Beer SV** (1998) Homology and functional similarity of an hrp-linked pathogenicity locus, dspEF, of *Erwinia amylovora* and the avirulence locus *avrE* of

Pseudomonas syringae pathovar tomato. Proceeding of the National Academy of Sciences USA 95:1325-1330.

Bostock RM (2005) Signal crosstalk and induced resistance: Straddling the line between cost and benefit. Annual Review Phytopathology 43: 545-580.

Boucher C, Genin S (2000) The *Ralstonia solanacearum*–plant interaction. In Plant-pathogen interactions, Talbot NJ CRC press 248p.

Bu Q, Jiang H, Li C-B, Zhai Q, Zhang J, Wu X, Sun J, Xie Q, Li C (2008) Role of the *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factors ANAC019 and ANAC055 in regulating jasmonic acid-signaled defense response. Cell research 18: 756-767.

Buchanan-Wollaston V, Earl S, Harrison E, Mathas E, Navabpour S (2003) The molecular analysis of leaf senescence - a genomics approach. Plant Biotechnology Journal 1: 3-22.

Buchel AS, Brederode FT, Bol JF, Linthorst HJM (1999) Mutation of GT-1 binding sites in the *Pr-1A* promoter influences the level of inducible gene expression *in vivo*. Plant Molecular Biology 40: 387-396.

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

Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR (2002) IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. Nature 415: 92-96.

Cao X, Jacobsen SE (2002) Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the DRM and CMT3 methyltransferase genes. Proceeding of the National Academy of Sciences USA 99(4): 16491-16498.

Carvalho CM, Fontenelle MR, Florentino LH, Santos AA, Zerbini FM, Fontes EPB (2008) A novel nucleocytoplasmic traffic GTPase identified as a functional target of the bipartite geminivirus nuclear shuttle protein. The Plant Journal 55: 869-880.

Chakravarthy S, Tuori RP, D'ascenzo MD, Fobert PR, Despres C, Martin GB (2003) The tomato transcription factor Pti4 regulates defense-related gene expression via GCC Box and Non-GCC Box *cis* elements. The Plant Cell 15: 3033-3050.

- Chang W-C, Lee T-Y, Huang H-D, Huang H-Y, Pan R-L** (2008) PlantPAN: Plant promoter analysis navigator, for identifying combinatorial cis-regulatory elements with distance constraint in plant gene groups. *BMC genomics* 9 (561).
- Chen C, Chen Z** (2002) Potentiation of developmentally regulated plant defense by AtWRKY18, a pathogen-induced *Arabidopsis* transcription factor. *Plant Physiology* 129: 706-716.
- Chen W, Provart NJ, Glazebrook J, Katagiri F, Chang H-S, Eulgem T, Mauch F, Luan S, Guangzhou Z, Whitham SA, Budworth PR, Tao Y, Xie A, Chen X, Lam S, Kreps JA, Harper JF, Si-Ammour A, Mauch-Mani B, Heinlein M, Kobayashi K, Hohn T, Dangl JL, Wang X, Zhu T** (2002) Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their functions in response to environmental stresses. *The Plant Cell* 14: 559-574.
- Christianson JA, Wilson IW, Liewellyn DJ, Dennis, ES** (2009) The low-oxygen-induced nac domain transcription factor ANAC102 affects viability of *Arabidopsis* seeds following low-oxygen treatment. *Plant Physiology* 149: 1724-1738.
- Collinge M, Boller** (2001) Differential induction of two potato genes, *Stprx2* and *StNAC*, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding. *Plant Molecular Biology* 46: 521-529.
- Conab** (2009) Boletim agrometeorológico. Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília (DF) Março, 37p.
- Costa, MDBL** (2007) Estresse osmótico e do retículo endoplasmático induzem morte celular programada de maneira dependente das proteínas NRPs. Viçosa: UFV. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- Costa MDL, Reis PAB, Valente MAS, Irsigler AST, Carvalho CM, Loureiro ME, Aragão FJL, Boston RS, Fietto LG, Fontes EPB** (2008) A new branch of endoplasmic reticulum stress signalling and the osmotic signal converge on plant-specific asparagine-rich proteins to promote cell death. *Journal of Biological Chemistry* 283: 20209-20219.
- Dangl JL, Dietrich RA, Richberg MH** (1996) Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* 8:1793-1807.
- De Vos M, Van Oosten V, Poeche RMPV, Pelt JAV, Pozo MJ, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux JP, Van Loon LC, Dicke M, Pieterse MJ** (2005) Signal signature and transcriptoma changes of *Arabiopsis* during pathogen and insect attack. *The American Phytopathology Society* 18: 923-937.

- Delessert C, Kazan K, Wilison IW, Van Der Straeten D, Manners J, Dennis ES, Dolferus R** (2005) The transcription factor ATAF2 represses the expression of pathogenesis-related genes in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 43: 745-757.
- Delessert C, Wilson IW, Van der Straeten D, Dennis ES, DolferuS R** (2004) Spatial and temporal analysis of the local response to wounding in *Arabidopsis* leaves. *Plant Molecular Biology* 55: 165-181.
- Denecke J, Carlsson LE, Vidal S, Hoglund A-S, Ek B, Van Zeijl MJ, Sinjorgo KMC, Palva ET** (1995) The tobacco homolog of mammalian calreticulin is present in protein complexes in vivo. *Plant Cell* 7: 391-406.
- Devadas SK, Enyedi A, Raina R** (2002) The *Arabidopsis* hrl1 mutation reveals novel overlapping roles for salicylic acid, jasmonic acid and ethylene signalling in cell death and defense against pathogens. *The Plant Journal* 30(4): 467-480.
- 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. *Journal of Experimental Botany* 32: 93-101.
- Durrant WE, Dong X** (2004) Systemic acquired resistance. *Annual Review Phytopathology* 42: 185-209.
- Duval M, Hsieh T, Kim S, Thomas T** (2002) Molecular characterization of AtNAM: a member of the *Arabidopsis* NAC domain superfamily. *Plant Molecular Biology* 50: 237-248.
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE** (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science* 5: 199-206.
- Fang Y, You J, Xie K, Xie W, Xiong L** (2008) Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice. *Molecular Genetics Genomics* 280: 535-546.
- Fehr WR, Caviness CE** (1977) Stages of soybean development. Ames: Iowa State University of Science and Technology 11p.
- Fontes EPB, Eagle P, Sipes P, Hanley-Bowdoin** (1994) Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for replication. *Journal of Biological Chemistry* 269: 8459-8465.
- Fujita M, Fujita Y, Maruyama K, Seki M, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Tran LP, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozak K** (2004) A dehydration-induced NAC protein,

RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *Plant Journal* 39: 863-876.

Ganesan G, Sankararamasubramanian HM, Narayanan JM, Sivaprakash KR, Parida A (2008) Transcript level characterization of a cDNA encoding stress regulates NAC transcription factor in the mangrove plant *Avicennia marina*. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 928-934.

Gechev TS, Gadjev IZ, Hille J (2004) An extensive microarray analysis of AAL-toxin-induced cell death in *Arabidopsis thaliana* brings new insights into the complexity of programmed cell death in plants. *Cell Molecular Life Science* 61: 1185-1197.

Glazebrook J (2001) Genes controlling expression of defense response in *Arabidopsis*-2001 status. *Current Opinion Plant Biology* 4: 301-308.

Greenberg JT, Yao N (2004) The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cellular Microbiology* 6(3): 201-211.

Greve K, La Cour T, Jensen MK, Poulsen, FM, Skriver K (2003) Interactions between plant RING-H2 and plant-specific NAC (NAM/ATAF1/2/CUC2) proteins: RING-H2 molecular specificity and cellular localization. *Biochemical Journal* 371: 97-108.

Griffith M, Yaish MWF (2004) Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. *Trends Plant Science* 9: 399-405.

Guo Y, Cai Z, Gan S (2004) Transcriptome of *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant, Cell and Environment* 27: 521-549.

Guo Y, Gan S (2006) AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *Plant Journal* 46: 601-612.

Harding HP, Zhang Y, Ron D (1999) Protein translation folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397: 271-274.

Hauck P, Thilmony R, He SY (2003) A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 100: 8577-8582.

He XJ, Mu RL, Cao WH, Zhang ZG, Zhang JS, Chen SY (2005) AtNAC2, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. *Plant Journal* 44: 903-916.

- Heath MC** (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44: 321-334.
- Hegedus D, Yu M, Baldwin D, Gruber M, Sharpe A, Parkin I, Whitwill S, Lydiate D** (2003) Molecular characterization of *Brassica napus* NAC domain transcriptional activators induced in response to biotic and abiotic stress. *Plant Molecular Biology* 53: 383-397.
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga TN** (1999) Plant cis acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Research* 27: 297-300.
- Hodges DM, Delong JM, Forney CF, Prange RK** (1993) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207: 604-611.
- Hofius D, Tsitsigiannis DI, Jones JDG, Mundy J** (2007) Inducible cell death in plant immunity. *Seminars in Cancer Biology* 17: 166-187.
- Hortensteiner S** (2006) Chlorophyll degradation during senescence. *Annual Review Plant Biology* 57: 55-77.
- Hu H, Dai M, Yao J, Xiao B, Li X, Zhang Q, Xiong LN** (2006) Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 103: 12987-12992.
- Hu H, You J, Fang Y, Zhu X, Qi Z, Xiong L** (2008) Characterization of transcription factor gene SNAC2 conferring cold and salt tolerance in rice. *Plant Molecular Biology* 67:169-181.
- Huckelhoven, R** (2007) Cell Wall - associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual Review Phytopathology*, 45: 101-127.
- Irisigler AST, Costa MDL, Zhang P, Braga PA, Dewey R, Boston RS, Fontes EPB** (2007) Expression profiling on soybean leaves reveals integration of ER- and osmotic-stress pathways. *BMC Genomics*, 8(431).
- Iwata Y, Fedoroff NV, Koizumi N** (2008) *Arabidopsis* bZIP60 is a proteolysis-activated transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response. *The Plant Cell* 20: 3107-3121.
- Iwata Y, Koizumi N** (2005) Unfolded protein response followed by induction of cell death in cultured tobacco cells treated with tunicamycin. *Planta* 220: 804-807.

- Iwata Y, Yoneda M, Yanagawa Y, Koizumi N** (2009) Characteristics of the nuclear form of the *Arabidopsis* transcription factor AtbZIP60 during the endoplasmic reticulum stress response. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 73(4): 865-869.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW** (1987) Gus fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6: 3901-3907.
- Jelitto-Van Dooren EPWM, Vidal S, Denecke J** (1999) Anticipating endoplasmic reticulum stress: a novel early response before pathogenesis-related gene induction. *Plant Cell* 11: 1935-1943.
- Jensen MK, Hagedorn PH, Torres-Zabala M, Grant MR, Rung JH, Collinge DB, Lyngkjær MF** (2008) Transcriptional regulation by an NAC (NAM-ATAF1,2-CUC2) transcription factor attenuates ABA signalling for efficient basal defence towards *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 56: 867-880.
- John I, Hackett R, Cooper W, Drake R, Farrell A, Grierson D** (1997) Cloning and characterization of tomato leaf senescence-related cDNAs. *Plant Molecular Biology* 33: 641-651.
- Jones JD, Dangl JL** (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
- Kado CJ, Heskett MG** (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60: 969-976.
- Kalinski A, Kowley DL, Loer DS, Foley C, Buta G, Herman EM** (1995) Binding-protein expression is subject to temporal, developmental and stress-induced regulation in terminally differentiated soybean organs. *Planta* 195: 611-621.
- Kamauchi S, Nakatani H, Nakano C, Urade R** (2005) Gene expression in response to endoplasmic reticulum stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Journal* 272: 3461-3476.
- Kaneda T, Taga Y, Takai R, Iwano M, Matsui H, Takayama S, Isogai A, Che FS** (2009) The transcription factor OsNAC4 is a key positive regulator of plant hypersensitive cell death. *The EMBO Journal* 28: 926-936.
- Kawasaki T, Henmi K, Ono E, Hatakeyama S, Iwano M, Satoh H, Shimamoto K** (1999) The small GTP-binding protein Rac is a regulator of cell death in plants. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 96: 10922-10926.

- Kessler A, Baldwin IT** (2002) Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annual Review Plant Biology* 53: 299-328.
- Kikuchi K, Ueguchi-Tanaka M, Yoshida KT, Nagato Y, Matsusoka M, Hirano HY** (1999) Molecular analysis of the NAC gene family in rice. *Molecular and General Genetics* 262: 1047-1051.
- Kim CY, Bove J, Assmann, SM** (2008) Overexpression of wound-responsive RNA-binding proteins induces leaf senescence and hypersensitive-like cell death. *New Phytologist* 180: 57-70.
- Kim HS, Park BO, Yoo JH, Jung MS, Lee SM, Han HJ, Kim KE, Kim SH, Lim CO, Yun D-J, Lee SY, Chung WS** (2007a) Identification of a calmodulin-binding NAC protein as a transcriptional repressor in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 282(50): 36292-36302.
- Kim JH, Woo HR, Kim J, Lim PO, Lee CI, Choi SH, Hwang D, Nam HG** (2009) Trifurcate Feed-Forward Regulation of Age-Dependent Cell Death Involving *miR164* in *Arabidopsis*. *Science* 323: 1053-1057.
- Kim SY, Kim SG, Kim YS, Seo PJ, Bae M, Yoon HK, Park CM** (2007b) Exploring membrane-associated NAC transcription factors in *Arabidopsis*: implications for membrane biology in genome regulation. *Nucleic Acids Research* 35 203-213.
- Kotzer AM, Brandizzi F, Neumann U, Paris N, Moore I, Hawes C** (2004) AtRabF2b (Ara7) acts on the vacuolar trafficking pathway in tobacco leaf epidermal cells. *Journal of Cell Science* 117: 6377-6389.
- Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, Gething MJ, Sambrook J** (1988) The presence of malformed proteins in the endoplasmic-reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* 332: 462-464.
- Kragh KM, Hendriks T, De Jong AJ, Lo Schiavo F, Bucherna N** (1996) Characterization of chitinases able to rescue somatic embryos of the temperature-sensitive carrot variant *ts11*. *Plant Molecular Biology* 31: 631-645.
- Kunieda T, Mitsuda N, Ohme-Takagi M, Takeda S, Aida M, Tasaka M, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2008) Nac family proteins NARS1/NAC2 and NARS2/NAM in the outer integument regulate embryogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 20: 2631-2642.
- Lam E, Benfey PN, Gilmartin PM, Fang RX, Chua NH** (1989) Site specific mutations alter *in vitro* factor binding and change promoter expression pattern in transgenic plants. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 86: 7890-7894.

- Larkindale J, Knight MR** (2002) Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiology* 128: 682-695.
- Leborgne-Castel N, Jelitto-Van Dooren E, Crofts AJ, Denecke J** (1999) Overexpression of BiP in tobacco alleviates endoplasmic reticulum stress. *Plant Cell* 11: 459-469.
- Lewin B** (2004) Chapter 22 Activating Transcription. In *GENES VIII*. Pearson Prentice Hall 1003p.
- Lichthenthaler HK** (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In *Methods in Enzymology*. Academic Press, San Diego 350-382.
- Lim PO, Kim HJ, Nam HG** (2007) Leaf senescence. *Annual Review Plant Biology* 58:115-136.
- Lin JF, Wu SH** (2004) Molecular events in senescing *Arabidopsis* leaves. *The Plant Journal* 39: 612-628.
- Lin JH, Walter P, Yen TSB** (2008) Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis. *Annual Review Pathology Mechanism Disease* 3: 399-425.
- Lin R, Zhao W, Meng X, Wang M, Peng Y** (2007) Rice gene *OsNAC19* encodes a novel NAC-domain transcription factor and responds to infection by *Magnaporthe grisea*. *Plant Science* 172: 120-130.
- Liu LX, Srivastava R, Che P, Howell SH** (2007) An endoplasmic reticulum stress response in *Arabidopsis* is mediated by proteolytic processing and nuclear relocation of a membrane-associated transcription factor, bZIP28. *Plant Cell* 19: 4111-4119.
- Lu D-P, Christopher DA** (2008) Endoplasmic reticulum stress activates the expression of a sub-group of protein disulfide isomerase genes and AtbZIP60 modulates the response in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetics Genomics* 280:199-210.
- Lu PL, Chen NZ, An R, Su Z, Qi BS, Ren F, Chen J, Wang XC** (2007) A novel drought-inducible gene, *ATAF1*, encodes a NAC family protein that negatively regulates the expression of stress-responsive genes in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 63: 289-305.
- Ludwig AA, Tenhaken R** (2001) A new cell wall located N-rich protein is strongly induced during the hypersensitive response in *Glycine max* L. *European Journal of Plant Pathology* 107: 323-336.

- Maleck K, Levine A, Eulgem T, Morgan A, Schmid J, Lawton KA, Dangi JL, Dietrich RA** (2000) The transcriptoma of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nature Genetics* 26: 403-410.
- 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. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 18: 716-731.
- Mao C, Ding W, Wu Y, Yu J, He X, Shou H, Wu P** (2007) Overexpression of a NAC-domain protein promotes shoot branching in rice. *New Phytologist* 176: 288-298.
- Martínez IM, Chrispeels MJ** (2003) Genomic analysis of the unfolded protein response in *Arabidopsis* shows its connection to important cellular processes. *The Plant Cell* 15: 561-576.
- Mazarei M, Elling AA, Maier TR, Puthoff DP, Baum T** (2007) GmEREBP1 is a transcription factor activating defense genes in soybean and *Arabidopsis*. *The American Phytopathological Society* 20: 107-119.
- McDowell JM, Dangi JL** (2000) Signal transduction in the plant immune response. *Trends Biochemistry Science* 25(2): 79-82.
- Meng CM, Cai CP, Zhang TZ, Guo WZ** (2009) Characterization of six novel NAC genes and their responses to abiotic stresses in *Gossypium hirsutum* L. *Plant Science* 176: 352-359.
- Meng Q, Zhang C, Gal J, Yu D** (2007) Molecular cloning, sequence characterization and tissue-specific expression of six NAC-like genes in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) *Journal of Plant Physiology* 164: 1002-1012.
- Mitsuba N, Iwase A, Yamamoto H, Yoshida M, Seki M, Shinozaki K, Ohme-Takagi M** (2007) NAC transcription factors, NST1 e NST3, are key regulators of the formation of secondary walls in woody tissues of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 19: 270-280.
- Mittler R, Herr EH, Orvar BL, Van Camp W, Willekens H, Inzé D, Ellis BE** (1999) Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 23: 14165-14170.

- Morel JB, Dangl JL** (1997) The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death and differentiation* 4: 671-683.
- Mur LA, Kenton P** (2006) The outcomes of concentration specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiology* 140:249-262.
- Murashige T, Skoog F** (1967) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 5: 473-498.
- Nakashima K, Tran LP, Nguyen DV, Fujita M, Maruyama K, Todaka D, Ito Y, Hayashi N, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2007) Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *The Plant Journal* 51: 617-630.
- Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2006) Molecular studies on stress-responsive gene expression in *Arabidopsis* and improvement of stress tolerance in crop plants by regulon biotechnology. *Japan Agriculture Research Quarterly* 39: 221-222.
- Nishiuchi T, Shinshi H, Suzuki K** (2004) Rapid and transient activation of transcription of the *erf3* gene by wounding in tobacco leaves. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 55355-55361.
- Nogueira FTS, Schlögl PS, Camargo SR, Fernandez JH, De Rosa JRVE, Pompermayer P, Arruda P** (2005) SsNAC23, a member of the NAC domain protein family, is associated with cold, herbivory and water stress in sugarcane. *Plant Science* 169: 93-106.
- Noh S-J, Kwon CS, Chung W-I** (2002) Characterization of two homologs of Ire1p, a Kinase/endoribonuclease in yeast, in *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1575: 130-134.
- Nurnberger T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L** (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews* 66: 198-249.
- Oh SK, Baek K-H, Park JM, Yi SY, Yu SH, Kamoun S, Choi D** (2008) *Capsicum annuum* WRKY protein CaWRKY1 is a negative regulator of pathogen defense. *New Phytologist* 177: 977-989.
- Oh SK, Lee S, Yu SH, Choi D** (2005) Expression of a novel NAC domain-containing transcription factor (*CaNAC1*) is preferentially associated with incompatible interactions between chili pepper and pathogens. *Planta* 222: 876-887.

- Ohnishi T, Sugahara S, Yamada T, Kikuchi K, Yoshida Y, Hirano HY, Tsutsumi N** (2005) *OsNAC6*, a member of the NAC gene family, is induced by various stresses in rice. *Genes and Genetic Systems* 80: 135-139.
- Olsen AN, Ernst HA, Lo Leggio L, Skriver K** (2005a) NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends in Plant Science*, 10: 79-87.
- Olsen AN, Ernst HA, Lo Leggio L, Skriver K** (2005b) DNA-binding specificity and molecular functions of NAC transcription factors. *Plant Science* 169: 785-797.
- Ooka H, Satoh K, Doi K, Nagata T, Otomo Y, Murakami K, Matsubara K, Osato N, Kawai J, Carninci P, Hayashizaki Y, Suzuki K, Kojima K, Takahara Y, Yamamoto K, Kikuchi S** (2003) Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA Research* 10: 239-247.
- Park HC, Kim ML, Kang YH, Jeon JM, Yoo JH, Kim MC, Park CY, Jeong JC, Moon BC, Lee JH, Yoon HW, Lee S-H, Chung WS, Lim CO, Lee SY, Hong JC, Cho MJ** (2004) Pathogen- and NaCl- induced expression of the SCaM-4 promoter is mediated in part by a GT-1 box that interacts with a GT-1 like transcription factor. *Plant Physiology* 135: 2150-2161.
- Park JM, Park CJ, Lee SB, Ham BK, Shin R, Paek KH** (2001) Overexpression of the tobacco *Tsi1* gene encoding an EREBP/ AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. *Plant Cell* 13:1035-1046.
- Passarinho PA, Van Hengel AJ, Fransz PF, De Vries SC** (2001) Expression pattern of the *Arabidopsis thaliana AtEP3/AtchitIV* endochitinase gene. *Planta* 212: 556-567.
- Peng H, Cheng HI, Chen C, Yu XW, Yang JN, Gao WR, Shi QH, Zhang H, Li JG, Ma M** (2009) A NAC transcription factor gene of Chickpea (*Cicer arietinum*), *CarNAC3*, is involved in drought stress response and various developmental processes. *The Journal of Plant Physiology*.
- Pieterse CMJ, Van Loon LC** (2004) NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 456-464.
- Pieterse CMJ, Van Wees SCM, Ton J, Van Pelt JA, Van Loon LC** (2002) Signalling in rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology* 4: 535-544.
- Pinheiro GL** (2007) Caracterização molecular e funcional de transfatores da família NAC de soja (*Glycine max*). Viçosa: UFV. Dissertação (Mestrado Bioquímica Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

- Pinheiro GL, Carolino SM, Costa MDL, Reis PAB, Alves MS, Carvalho CM, Fietto LG, Fontes EBP** (2009) Complete inventory of soybean NAC transcription factors: sequence conservation and expression analysis uncover their distinct roles in stress response. *Gene* 444: 10-23.
- Pontier D, Balague C, Bezombes-Marion I, Tronchet M, Deslandes L, Roby D** (2001a) Identification of a novel pathogen-responsive element in the promoter of the tobacco gene *HSR203J*, a molecular marker of the hypersensitive response. *Plant Journal* 26: 495-507.
- Pontier D, Miao ZH, Lam E** (2001b) Trans-dominant suppression of plant TGA factors reveals their negative and positive roles in plant defense responses. *Plant Journal* 27: 529-538.
- Pontier D, Tronchet M, Rogowsky P, Lam E, Roby D** (1998) Activation of *hsr203*, a plant gene expressed during incompatible plant-pathogen interactions, is correlated with programmed cell death. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11(6): 544-554.
- Quirino BF, Noh YS, Himelblau E, Amasino RM** (2000) Molecular aspects of leaf senescence. *Trends Plant Science* 5: 278-282.
- Rasheva VI, Domingos PM** (2009) Cellular response to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis* 14: 996-1007.
- Rasmussen TB, Donaldson IA** (2006) Investigation of the endosperm specific sucrose synthase promoter from rice using transient expression of reporter genes in guar seed tissue. *Plant Cell Reports* 25(10):1035-1042.
- Ren T, Qu F, Morris TJ** (2000) HRT gene function requires interaction between a NAC protein and viral capsid protein to confer resistance to turnip crinkle virus. *Plant Cell* 12: 1917-1926.
- Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE** (2000) Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 707-720.
- Riaño-Pachón DM, Ruzicic S, Dreyer I, Mueller-Roeber B** (2007) PlnTFDB: an integrative plant transcription factor database. *BMC Bioinformatics* 8: 42.
- Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha RR, Creelman R, Pilgrim M, Broun P, Zhang JZ, Ghandehari D, Sherman BK, Yu G** (2000) *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 15: 2105-2110.

- Robatzek S, Somssich IE** (2002) Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes Development* 16: 1139-1149.
- Romero-Puertas MC, Perazzolli M, Zago ED, Delledonne M** (2004) Nitric oxide signalling functions in plant–pathogen interactions. *Cellular Microbiology* 6(9): 795-803.
- Ron D, Walter P** (2007) Signal integration in the endoplasmatic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews (Molecular cell biology)*.
- Rushton PJ, Torres JT, Parniske M, Wernert P, Hahlbrock K, Somssich IE** (1996) Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley *PR1* genes. *EMBO Journal* 15: 5690-5700.
- Ryals JA, Jeuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD** (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8: 1809-1819.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniats T** (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Ed.2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schenk PM, Kazan K, Manners JM, Anderson JP, Simpson RS, Wilson IW, Somerville SC, Maclean DJ** (2003) Systemic gene expression in *Arabidopsis* during an incompatible interaction with *Alternaria brassicicola*. *Plant Physiology* 132: 999-1010.
- Schenk PM, Kazan K, Rusu AG, Manners JM, Maclean DJ** (2005) The *SEN1* gene of *Arabidopsis* is regulated by signals that link plant defence responses and senescence. *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 997-1005.
- Schroder M, Kaufman RJ** (2005) The mammalian unfolded protein response. *Annual Review Biochemistry* 74: 739-789.
- Selth LA, Dogra SC, Rasheed MS, Healy H, Randles JW, Rezaiana MA** (2005) A NAC domain protein interacts with tomato leaf curl virus replication accessory protein and enhances viral replication. *The Plant Cell* 17: 311-325.
- Simón-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 BiP overexpression delays drought-induced leaf senescence axillary meristems by inducing plant genes involved in hormone metabolism. *Molecular Plant Pathology* 7: 103-112.
- Simpson SD, Nakashima K, Narusaka Y, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2003) Two different novel cis-acting elements of *erd1*, a clpA

homologous *Arabidopsis* gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. *The Plant Journal* 33: 259-270.

Smith JL, De Morais CM, Mescher M (2009) Jasmonate- and salicylate-mediated plant defense responses to insect herbivores, pathogens and parasitic plants. *Pest Management Science* 65: 497-503.

Souer E, Von Houwelingen A, Kloos D, Mol J, Koes R (1996) The *No Apical Meristem* gene of *Petunia* is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell* 85:159-170.

Sticher L, Mauch-Mani B, Métraux J-P (1997) Systemic acquired resistance. *Annual Review Phytopathology* 35: 235-270.

Stintzi A, Heitz T, Prasad V, Wiedemann-Merdinoglu S, Kauffmann S, Geoffroy P, Legrand M, Fritig B (1993) Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* 75: 687-706.

Tajima H, Iwata Y, Iwano M, Takayama S, Koizumi N (2008) Identification of an *Arabidopsis* transmembrane bZIP transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 374: 242-247.

Takahashi Y, Berberich T, Yamashita K, Uehara Y, Miyazaki A, Kusano T (2004) Identification of tobacco *HIN1* and two closely related genes as spermine-responsive genes and their differential expression during the Tobacco mosaic virus-induced hypersensitive response and during leaf- and flower-senescence. *Plant Molecular Biology* 54: 613-22.

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

Thompson JE, Froese CD, Madey E, Smith MD, Hong Y (1998) Lipid metabolism during plant senescence. *Progress Lipid Research* 37:119-141.

Thompson J, Taylor C, Wang TW (2000) Altered membrane lipase expression delays leaf senescence. *Biochemistry Society Transaction* 28:775-777.

Tran LS, Nakashima K, Sakuma Y, Simpson SD, Fujita Y, Maruyama K, Fujita M, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2004) Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive *cis*-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell* 16: 2481-2498.

- Tran L-SP, Quach TN, Guttikonda SK, Aldrich DL, Kumar R, Neelakandan A, Valliyodan B, Nguyen H** (2009) Molecular characterization of stress-inducible *GmNAC* genes in soybean. *Molecular Genetics and Genomics* 281: 647-664.
- Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P** (2000) Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* 101: 249-258.
- Tsai B, Ye Y, Rapoport TA** (2002) Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nature Review Molecular Cell Biology* 3: 246-255.
- Uauy C, Distelfeld A, Fahima T, Blechl A, Dubcovsky J** (2006) A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. *Science* 314: 1298-1301.
- Ulker B, Mukhtar MS, Somssich IE** (2007) The WRKY70 transcription factor of *Arabidopsis* influences both the plant senescence and defense signaling pathways. *Planta* 226: 125-137.
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle T** (1994) The ocs element in the soybean *GH2/4* promoter is activated by both active and inactive auxin and salicylic acid analogues. *Plant Molecular Biology* 26: 1055-1064.
- Vailleau F, Daniel X, Tronchet M, Montillet JL, Triantaphylides C, Roby DA** (2002) R2R3-MYB gene, *AtMYB30*, acts as a positive regulator of the hypersensitive cell death program in plants in response to pathogen attack. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 99: 10179-10184.
- Valente MAS, Faria JAQA, Soares-Ramos JRL, Reis PAB, Pinheiro GL, Piovesan ND, Morais AT, Menezes CC, Cano MAO, Fietto LG, Loureiro ME, Aragão FJL, Fontes EPB** (2009) The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increases in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco. *Journal of Experimental Botanic* 60(2): 533-546.
- Van der Graaff E, Schwacke R, Schneider A, Desimone M, Flugge UI, Kunze R** (2006) Transcription analysis of *Arabidopsis* membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiology* 141:776–92.
- Van Hengel AJ, Tadesse Z, Immerzeel P, Schols H, Van Kammen A, De Vries SC** (2001) N-acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. *Plant Physiology* 125: 1880-1890.

- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ** (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review Phytopathology* 44:135-162.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F** (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7).
- Vidal S, Eriksson ARB, Montesano M, Denecke J, Palva ET** (1998) Cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora* cooperate in the salicylic acid-independent induction of a plant defense response. *Molecular Plant-Microbe Interact* 11: 23-32.
- Walther-Larsen H, Brandt J, Collinge DB, Thordal-Christensen H** (1993) A pathogen-induced gene of barley encodes a HSP90 homologue showing striking similarity to vertebrate forms resident in the endoplasmic reticulum. *Plant Molecular Biology* 21: 1097-1108.
- Wang D, Weaver, ND, Kesarwani M, Dong X** (2005) Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance. *Science* 308: 1036-1040.
- Wang S, Narendra S, Fedoroff N** (2007) Heterotrimeric G protein signaling in the *Arabidopsis* unfolded protein response. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 104: 3817-3822.
- Watanabe N, Lam E** (2008) BAX Inhibitor-1 modulates endoplasmic reticulum stress-mediated programmed cell death in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 283: 3200-3210.
- Weaver LM, Gan S, Quirino B, Amasino RM** (1998) A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Molecular Biology* 37: 455-469.
- Weir I, Lu J, Cook H, Causier B, Schwarz-Sommer Z, Davies B** (2004) CUPULIFORMIS establishes lateral organ boundaries in *Antirrhinum*. *Development* 131: 915-922.
- Wiweger M, Farbos I, Ingouff M, Lagercrantz U, Von Arnold S** (2003) Expression of *Chia4-Pa* chitinase genes during somatic and zygotic embryo development in Norway spruce (*Picea abies*): similarities and differences between gymnosperm and angiosperm class IV chitinases. *Journal of Experimental Botany* 54: 2691-2699.
- Xiang C, Miao Z, Lam E** (1996) Coordinated activation of *as-1* type elements and a tobacco glutathione S-transferase gene by auxins, salicylic acid, methyl- jasmonate and hydrogen peroxide. *Plant Molecular Biology* 32: 415-426.

- Xiang C, Zhonghe M, Lam E** (1997) DNA-binding properties, genomic organization and expression pattern of *TGA6*, a new member of the *TGA* family of bZIP transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 34: 403-415.
- Xie Q, Frugis G, Colgan D, Chua NH** (2000) *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal posterior of TIR1 to promote lateral root development. *Genes and Development* 14: 3024-3036.
- Xie Q, Sanz-Burgos AP, Guo H, Garcia JA, Gutierrez C** (1999) GRAB proteins, novel members of the NAC domain family, isolated by their interaction with a geminivirus protein. *Plant Molecular Biology* 39: 647-656.
- Xiong Y, Liu T, Tian C, Sun S, Li J, Chen M** (2005) Transcription factors in rice: a genome-wide comparative analysis between monocots and eudicots. *Plant Molecular Biology* 59: 191-203.
- Xue GP, Neil I, Bower C, McIntyre L, George, A, Riding, KK, Shorter, R** (2006) *Ta*NAC69 from the NAC superfamily of transcription factors is up-regulated by abiotic stresses in wheat and recognize two consensus DNA-binding sequences. *Functional Plant Biology* 33: 43-57.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2005) Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends in Plant Science* 10(2): 88-94.
- Yang T, Poovaiah BW** (2002) A calmodulin-binding/CGCG box DNA-binding protein family involved in multiple signaling pathways in plants. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 45049-45058.
- Yang T, Poovaiah BW** (2003) Calcium/calmodulin mediated signal network in plants. *Trends Plant Science* 8: 505- 512.
- Yang Y, Shah J, Klessig DF** (1997) Signal perception and transduction in plant defense response. *Genes & Development* 11: 1621-1639.
- Yokotani N, Ichikawa T, Kondou Y, Matsui M, Hirochika H, Iwabuchi M, Oda K** (2009) Tolerance to various environmental stresses conferred by the salt-responsive rice gene *ONAC063* in transgenic *Arabidopsis*. *Planta* 229: 1065-1075.
- Yoo JH, Park CY, Kim JC, Heo WD, Cheong MS, Park HC, Kim MC, Moon BC, Choi MS, Kang YH, Lee JH, Kim HS, Lee SM, Yoon HW, Lim CO, Yun DJ, Lee SY, Chung WS, Cho MJ** (2005) Direct interaction of a divergent CAM isoform and the transcription factor, MYB2, enhances salt tolerance in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 280: 3697-3706.

- Yoo SY, Kim Y, Kim SY, Lee JS, Ahn JH** (2007) Control of flowering time and cold response by a NAC-domain protein in ***Arabidopsis***. PLoS ONE 2, e642.
- Yu D, Chen C, Chen Z** (2001) Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of *NPR1* gene expression. Plant Cell 13: 1527-1540.
- Zhong R, Demura T, Ye Z** (2006) SND1, a NAC domain transcription factor, is a key regulator of secondary wall synthesis in fibers of *Arabidopsis*. The Plant Cell 18: 3158-3170.
- Zhou QY, Tian AG, Zou HF, Xie ZM, Lei G, Huang J, Wang CM, Wang HW, Zhang JS, Chen SY** (2008) Soybean WRKY-type transcription factor genes, *GmWRKY13*, *GmWRKY21*, and *GmWRKY54*, confer differential tolerance to abiotic stress in transgenic *Arabidopsis* plants. Plant Biotechnology Journal 6: 486-503.
- Zipfel C, Felix G** (2005) Plants and animals: a different taste for microbes. Current Opinion Plant Biology 8: 353-360.
- Zuppin A, Navazio L, Mariani P** (2004) Endoplasmic reticulum stress-induced programmed cell death in soybean cells. Journal of Cell Science 117:

VII – ANEXOS

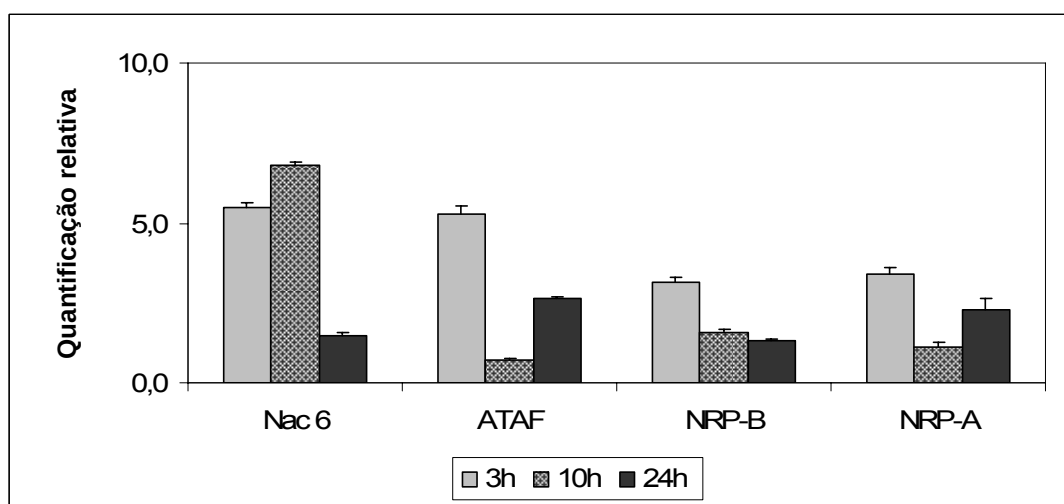


Figura A1. **Indução dos genes *GmNAC6*, *GmATAF* e *GmNRPs* nas folhas sistêmicas tratadas com CDE.** A análise da expressão dos genes de soja foi realizada por RT-PCR em tempo real nas folhas opostas às infiltradas com a solução CDE nos períodos indicados na figura. O valor de expressão foi determinado com base no método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, usando a helicase como controle endógeno. A normalização foi realizada utilizando os tratamentos controles respectivos (folhas opostas às infiltradas com solução tampão sem adição das enzimas hidrolíticas). Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de um pool de 2 réplicas biológicas (n = 2 réplicas manuais).

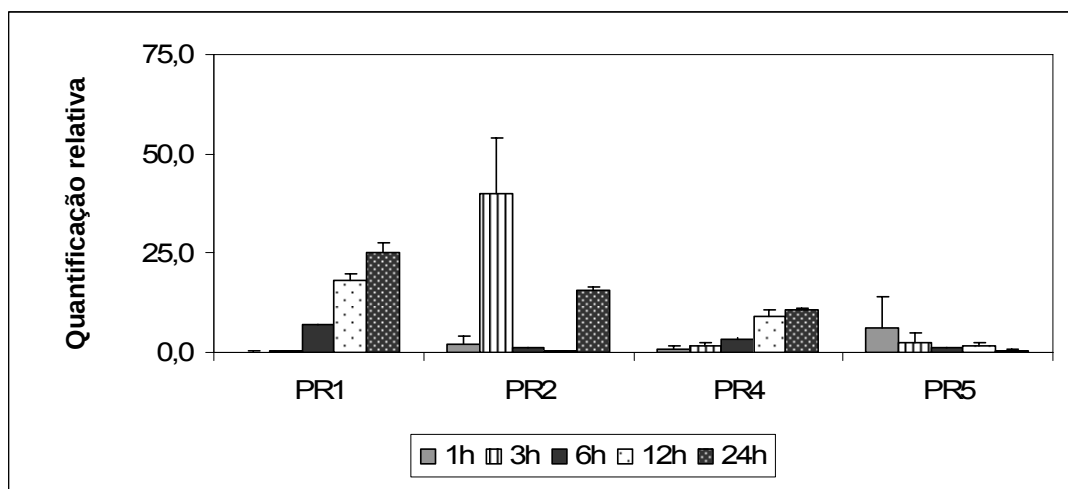


Figura A2. **Padrão de expressão dos genes relacionados à patogênese na resposta hipersensível.** A expressão dos genes *PRs* (*GmPR1*, *GmPR2*, *GmPR4* e *GmPR5*) foi determinada por RT-PCR em tempo real nas folhas infiltradas com a bactéria fitopatogênica *Pst* nos tempos indicados. O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando como controle endógeno a helicase, e normalizado com o tratamento controle. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de um pool de 3 réplicas biológicas (n = 2 réplicas manuais).

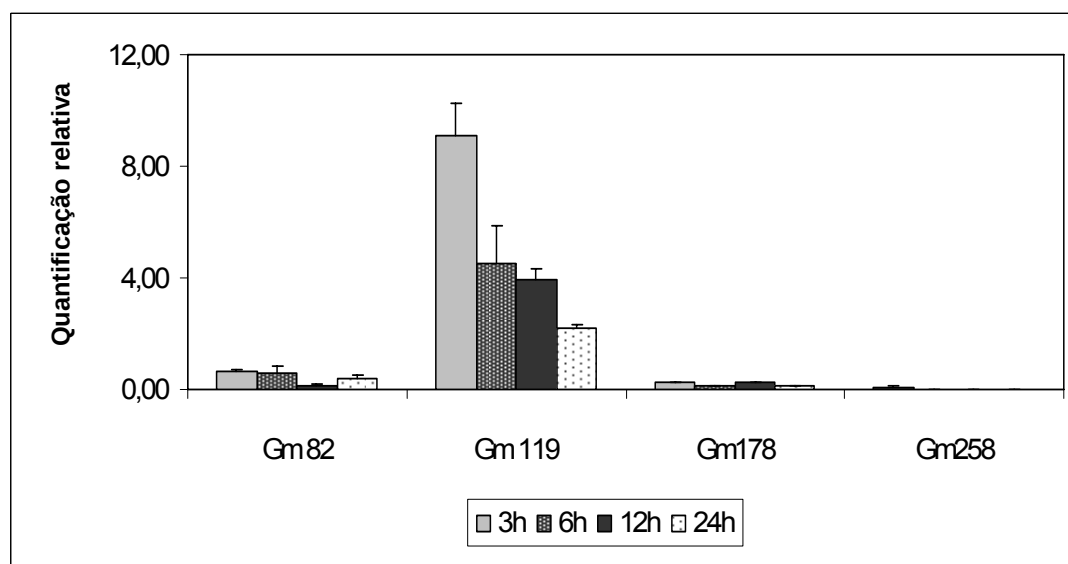


Figura A3. **Indução dos novos genes *NACs* de soja na interação compatível.** A expressão dos genes *NACs* em folhas inoculadas com a bactéria fitopatogênica *Ralstonia solanacearum* foi avaliada por PCR em tempo real. O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, tendo por controle endógeno a helicase. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de um pool de 3 réplicas biológicas (n = 2 réplicas manuais).

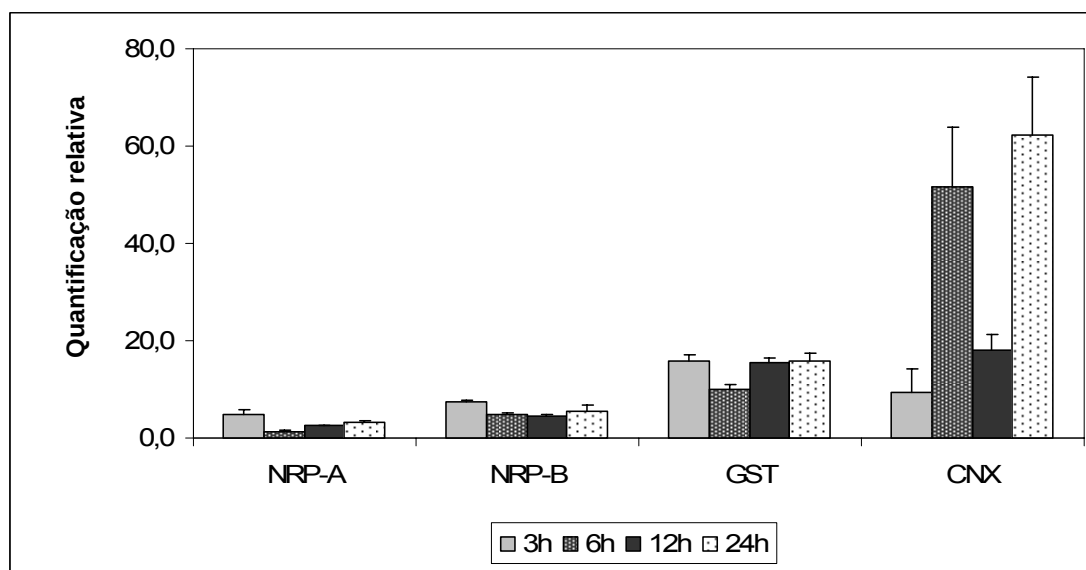


Figura A4. **Expressão dos genes relacionados ao estresse no retículo endoplasmático durante a infecção com *Ralstonia solanacearum*.** A expressão dos genes responsáveis ao estresse no RE (NRPs, GST, Calnexina) foi avaliada por PCR em tempo real. O valor de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando como controle endógeno a helicase. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de um pool de 3 réplicas biológicas (n = 2 réplicas manuais).

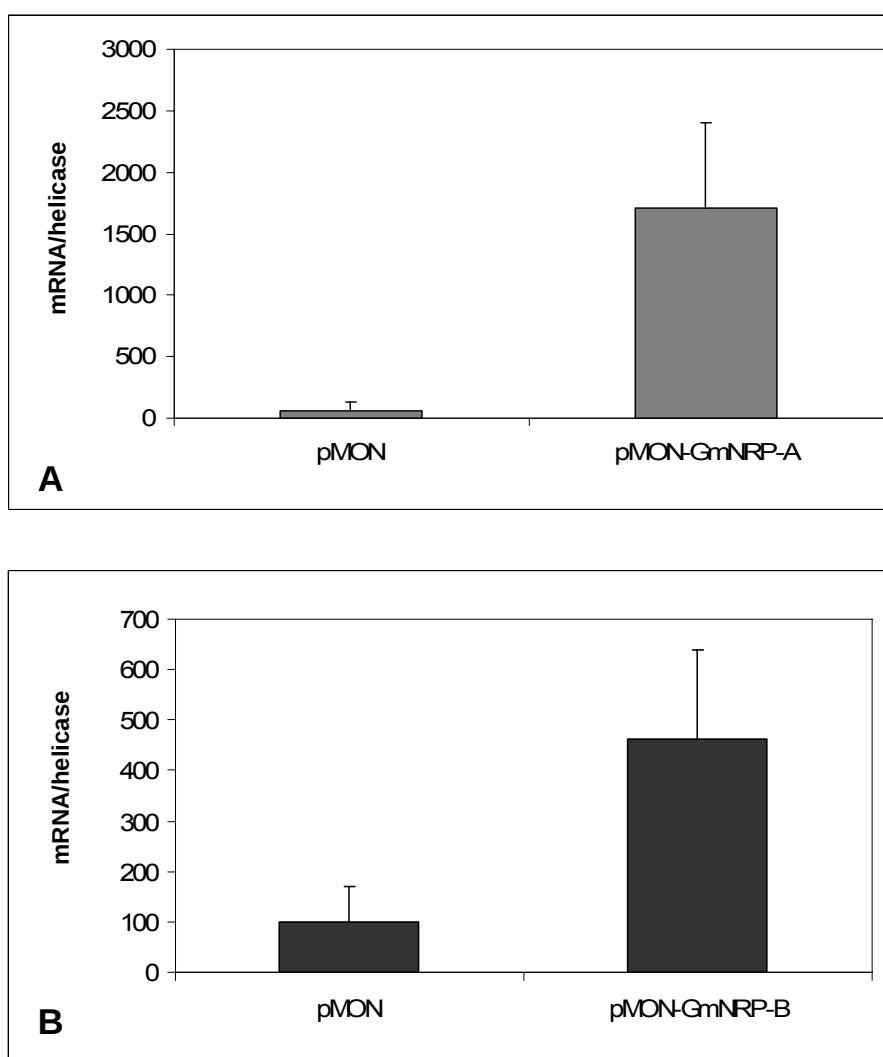


Figura A5. **Expressão transiente de *GmNRP-A* (A) e *GmNRP-B* (B) em protoplastos.** Plasmídios contendo cassete de expressão de *NRP-A* (pMON921-*NRP-A*) e *NRP-B* (pMON921-*NRP-B*) foram eletroporados em protoplastos de soja. Decorridas 30 horas de incubação, a expressão gênica foi avaliada por RT-PCR quantitativo. pMON indica a eletroporação com o vetor vazio pMON921. Os valores de expressão foram calculados usando o método $2^{-\Delta Ct}$, utilizando como controle endógeno a helicase. Os valores representam uma média de 2 réplicas biológicas (+DP, n = 2 réplicas manuais).

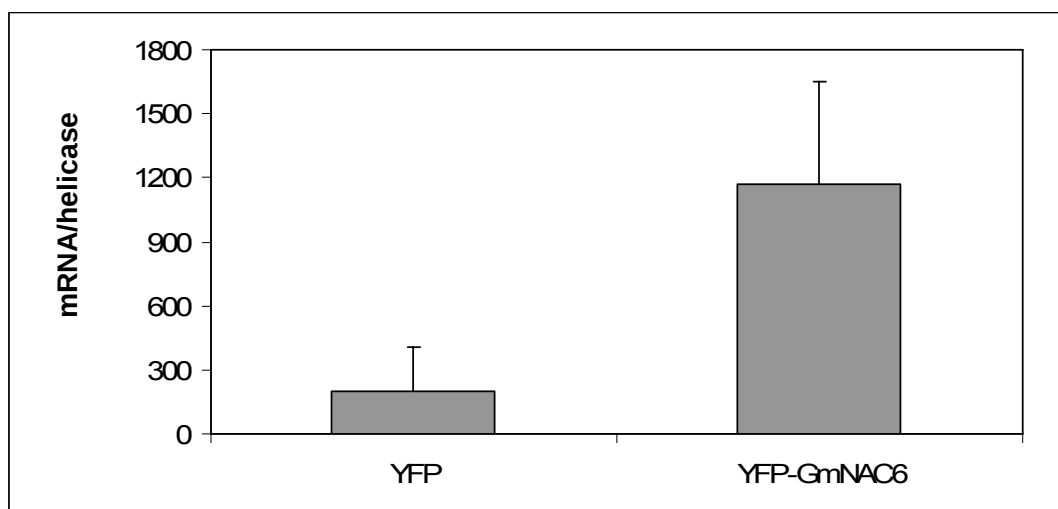


Figura A6. **Expressão transiente de *GmNAC6* em protoplastos.** Protoplastos de soja foram eletroporados com cassete de expressão de *NAC6* (pYFP-*NAC6*) e o vetor vazio. A expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real. YFP indica a eletroporação com o vetor vazio. Os valores de expressão foram calculados usando o método $2^{-\Delta Ct}$, utilizando como controle endógeno a helicase (+DP, n = 3 réplicas biológicas).

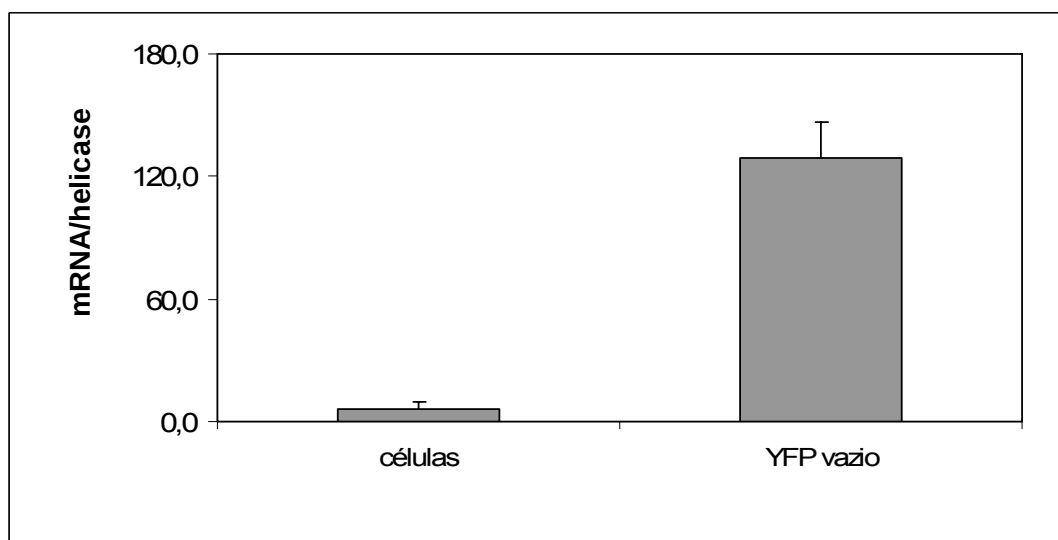


Figura A7. **Expressão de *GmNAC6* em células e protoplastos eletroporados com YFP vazio.** Plasmídeo contendo cassete pYFP vazio foi eletroporado em protoplastos de soja. A expressão do gene *GmNAC6* foi avaliada por PCR em tempo real. Os valores de expressão foram calculados usando o método $2^{-\Delta Ct}$, utilizando como controle endógeno a helicase. O resultado corresponde à média de 2 experimentos independentes (DP+, 6 repetições biológicas).

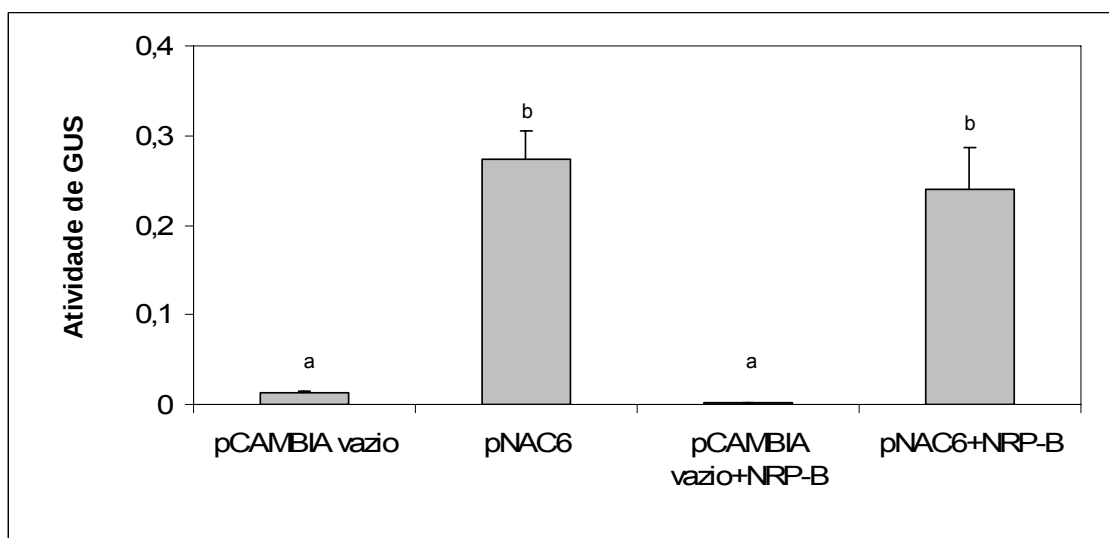


Figura A8. **Atividade do promotor *GmNAC6* em folhas de tabaco transformadas transientemente com *NRP-B*.** As folhas de tabaco foram infiltradas com suspensões de agrobactérias transformadas com as construções de interesse: vetor vazio (pCAMBIA vazio), pNAC6:GUS (GUS, sob o controle do promotor de *GmNAC6*), e co-transformações: pCAMBIA vazio + YFP-*GmNRP-B*; pNAC6:GUS + YFP-*GmNRP-B*. A atividade específica de GUS foi determinada pelo ensaio fluorimétrico com extrato protéico das folhas infiltradas e expressa em nmol de 4-methylumbelliferone. μg^{-1} proteína. min^{-1} (+DP, n= 3 repetições biológicas). Não houve diferença significativa na atividade enzimática com a superexpressão de *NRP-B* ($p < 0,05$).

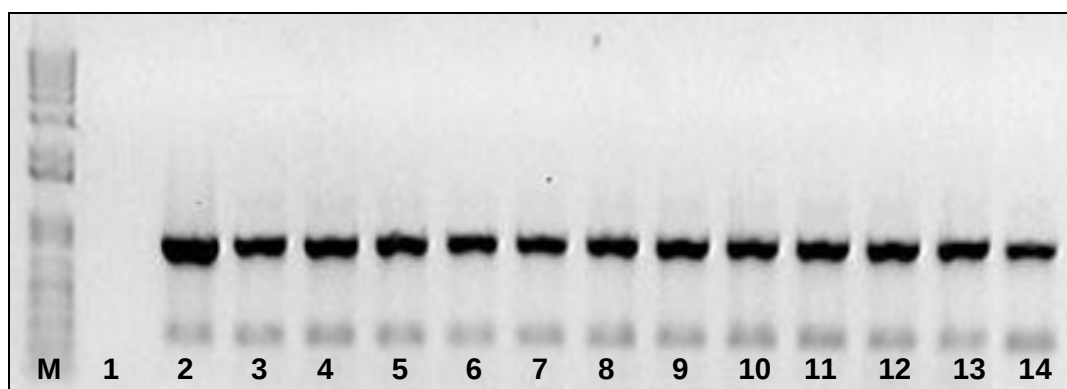


Figura A9. **Confirmação da transformação transiente de tabaco com construções do vetor pCAMBIA1381Z.** A presença do vetor pCAMBIA1381Z foi verificada nas folhas de tabaco infiltradas, utilizando o primer para o gene de resistência a higromicina (*hptII*). M, marcador molecular, 2, controle positivo, 3 e 14 amostras correspondentes ao ensaio da figura A8.

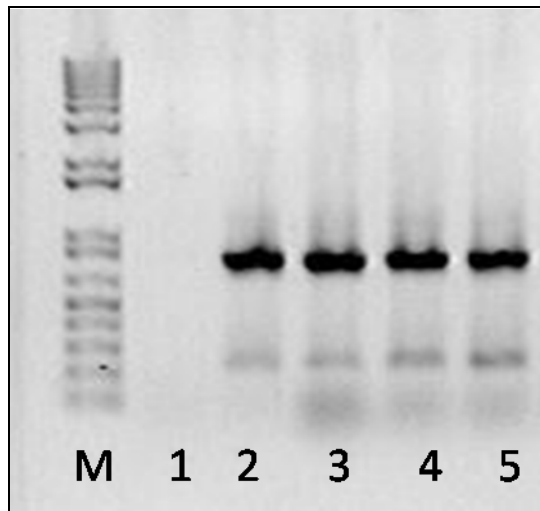


Figura A10. **Confirmação da transformação transiente de *rpL18* de *Arabidopsis*.** A superexpressão de *rpL18* foi analisado por RT-PCR utilizando oligonucleotídeos específicos. M corresponde ao marcador. A canaleta 1 refere-se ao controle negativo enquanto a canaleta 2 ao controle positivo. 3 a 5 correspondem as amostras demonstradas na Figura 23.

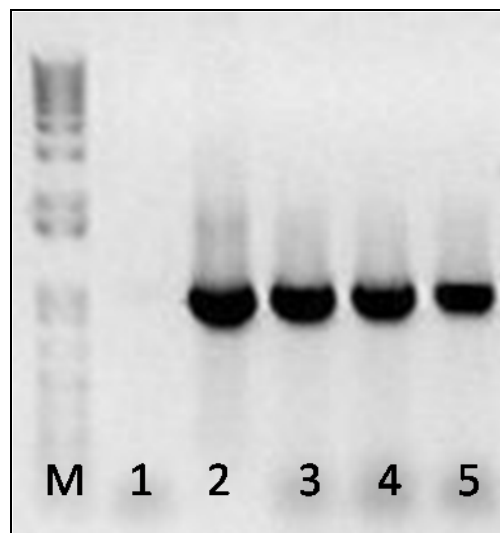


Figura A11. **Confirmação da expressão transiente de *NRP-B* em folhas de tabaco.** O acúmulo de mRNA de *NRP-B* foi analisado por RT-PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene de soja. M corresponde ao marcador. A canaleta 1 refere-se ao controle negativo enquanto a canaleta 2 ao controle positivo. 3 a 5 correspondem as amostras demonstradas na Figura 23.

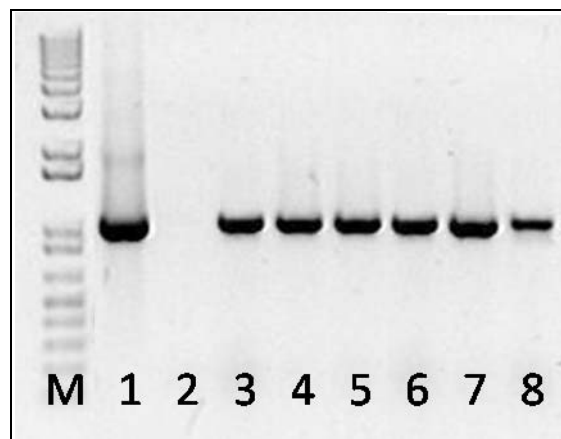


Figura A12. **Confirmação da expressão transiente de *NRP-B* em folhas de tabaco.** O acúmulo de mRNA de NRP-B foi analisado por RT-PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene de soja. M corresponde ao marcador. A canaleta 1 refere-se ao controle positivo enquanto a canaleta 2 ao controle negativo. 3 a 8 correspondem as amostras demonstradas na figura A8.