

HUMBERTO HENRIQUE DE CARVALHO

**FUNÇÃO FISIOLÓGICA E MOLECULAR DA PROTEÍNA BIP EM EVENTOS DE
MORTE CELULAR PROGRAMADA EM PLANTAS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013

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

T

C331f
2013

Carvalho, Humberto Henrique de, 1979-

Função fisiológica e molecular da proteína BiP em eventos de morte celular programada em plantas / Humberto Henrique de Carvalho. – Viçosa, MG, 2013.

v, 108 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Plantas - Efeito do stress. 2. Soja. 3. Morte celular.
4. Proteínas. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 572.8

HUMBERTO HENRIQUE DE CARVALHO

FUNÇÃO FISIOLÓGICA E MOLECULAR DA PROTEÍNA BIP EM EVENTOS DE MORTE CELULAR PROGRAMADA EM PLANTAS

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

APROVADA: 20 de maio de 2013

Prof. Wagner Luiz Araújo

Prof. Adriano Nunes Nesi

Prof. Gilberto Sachetto Martins

Prof^ª. Juliana Rocha Lopes Soares Ramos

Prof^ª. Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

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

À minha família, razão de todo o meu esforço, aos meus pais José e Aparecida, pelo amor, dedicação, exemplo de honestidade, simplicidade, trabalho e não medirem esforços para realização dos meus sonhos. Minhas irmãs Kelly e Gisele pelo carinho, amor e apoio em tudo na minha vida. A vocês dedico todas as minhas vitórias e o desejo de podermos estar cada vez mais juntos.

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

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

À FAPEMIG pelo o suporte financeiro.

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

Ao Departamento de Fisiologia Vegetal, professores, funcionários e amigos pelo aprendizado e pelo conhecimento adquirido.

Aos amigos do LBMP, pela excelente convivência e companheirismo. Pela oportunidade de troca de conhecimento e aprendizado. Agradeço a cada um pela palavra amiga, pelo sorriso, pelo abraço e amizade que de certa forma substituiu a falta da família. Obrigado Cristiane, Giselle e Maiana, minhas parceiras de todos os momentos. Priscila, João Paulo, Pedro, Iara, Lucas, Wellison, Michihito, Bianca, Janaína, Anésia, Juliana e Humberto obrigado pelas horas de conversa e ajuda durante o desenvolvimento das pesquisas.

A Fábria, Marlene, Mônica e Adriano, pela ótima companhia e apoio técnico durante os anos de laboratório.

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

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

ÍNDICE

Resumo.....	iv
Abstract	v
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
CAPITULO I	6
Dual function of the endoplasmic reticulum binding protein BiP in modulating cell death events... 6	
Summary	8
Introduction	9
Results	12
Discussion.....	22
Acknowledgements.....	31
Experimental Procedures.....	32
References.....	39
Supporting Information.....	44
CAPITULO II	58
Variação global da expressão gênica induzida pela superexpressão de BiP (<i>Binding Protein</i>) em plantas de soja <i>Glycine max</i> submetidas a déficit hídrico.	58
Resumo.....	60
Introdução.....	61
Resultados	65
Discussão	77
MÉTODOS.....	85
Agradecimentos	89
Referências.....	89
Figuras	97

Resumo

CARVALHO, Humberto Henrique de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2013. **Função fisiológica e molecular da proteína BiP em eventos de morte celular programada em plantas.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-orientadores: Marcelo Ehlers Loureiro e Humberto Josué de Oliveira Ramos .

A proteína BiP demonstra participar da imunidade inata e atenuar eventos de morte celular induzido por estresse do retículo endoplasmático (RE) e osmótico. Plantas transgênicas com níveis elevados de BiP foram utilizadas para avaliar se BiP controla o desenvolvimento e morte celular programada (PCD) hipersensitiva. Sob condições normais, o transcriptoma induzido por BIP revelou uma robusta regulação negativa de genes envolvidos em PCD hipersensitiva e uma regulação positiva de genes relacionados a patógenos. A superexpressão de BIP atrasou a senescência foliar e acelerou a PCD hipersensitiva disparada por *Pseudomonas syringae* pv. tomato em plantas de soja e tabaco monitoradas por marcadores de PCD em plantas. O atraso da senescência foliar mediada por BiP correlacionou com a atenuação do sinal de morte celular mediada por proteínas ricas em asparagina (NRP) e inibição da ativação da resposta a proteínas mal dobradas (UPR). Além disso, sob ativação biológica da sinalização ácido salicílico (SA) e PCD hipersensitiva, a superexpressão de BiP inibiu antagonicamente a via UPR. Assim a indução de sinais de morte celular induzidas por NRP e mediadas por AS ocorre por uma via distinta da UPR. Os dados indicam que durante a PCD hipersensitiva, BiP regula positivamente a sinalização de morte celular mediada por NRP por meio de um mecanismo indefinido que é ativado por sinalização de AS e relacionado ao funcionamento do RE. Em contraste, a regulação negativa de BiP durante a senescência foliar pode ser ligada a capacidade de mediar a ativação de UPR e sinais de morte celular mediada por NRP. Assim, BiP pode funcionar como regulador positivo ou negativo de eventos de morte celular.

Abstract

CARVALHO, Humberto Henrique de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, may, 2013. **Physiological and molecular function of BiP protein in programmed cell death events in plants.** Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-advisers: Marcelo Ehlers Loureiro and Humberto Josué de Oliveira Ramos .

The binding protein (BiP) has been demonstrated to participate in innate immunity and attenuate ER- and osmotic-stress-induced cell death. Here, we employed transgenic plants with manipulated levels of BiP to assess whether BiP also controlled developmental and hypersensitive programmed cell death (PCD). Under normal conditions, the BiP-induced transcriptome revealed a robust down-regulation of the genes involved in developmental PCD and an up-regulation of the genes involved in hypersensitive PCD triggered by non-host-pathogen interactions. Accordingly, BiP overexpression delayed leaf senescence and accelerated the hypersensitive PCD triggered by *Pseudomonas syringae* pv. tomato in soybeans and tobacco, as monitored by measuring hallmarks of PCD in plants. The BiP-mediated delay of leaf senescence correlated with the attenuation of N-rich protein (NRP)-mediated cell death signaling and the inhibition of the senescence-associated activation of the unfolded protein response (UPR). In contrast, under biological activation of SA signaling and hypersensitive PCD, BiP overexpression further induced NRP-mediated cell death signaling and antagonistically inhibited the UPR. Thus, the SA-mediated induction of NRP cell-death signaling occurs via a pathway distinct from UPR. Our data indicate that during the hypersensitive PCD, BiP positively regulates the NRP cell-death signaling through a yet undefined mechanism that is activated by SA signaling and related to ER functioning. In contrast, BiP's negative regulation of leaf senescence may be linked to its capacity to mediate the UPR activation and NRP cell death signaling. Therefore, BiP can function either as a negative or positive regulator of PCD events.

INTRODUÇÃO GERAL

A soja é uma das principais culturas agronômicas, cuja área cultivada com plantas geneticamente modificadas cresce a cada ano. As plantas estão submetidas a condições adversas do meio ambiente, o que limita o crescimento e conseqüentemente a produtividade (Cutforth et al., 2007). Desta forma, para sobreviverem a agressões do meio ambiente, as células vegetais desenvolveram um complexo mecanismo de defesa que atua aumentando a tolerância contra estas condições restritivas que afetam o seu crescimento e desenvolvimento. No Brasil entre os estados produtores de soja, destacam-se Paraná, Goiás, São Paulo e Mato Grosso do Sul, cuja produtividade está diretamente relacionada às condições climáticas do local de produção como, por exemplo, temperatura e regime de chuvas.

O estresse hídrico é um dos principais fatores que limita a produção, causando uma série de mudanças fisiológicas, bioquímicas e moleculares. Várias ferramentas na área de biotecnologia têm ajudado no entendimento da percepção e transdução do sinal do estresse e esforços têm sido direcionados para obter novas cultivares com características que contribuam para minimizar perdas de produção (Talamè et al., 2007). Utilizando a tecnologia de microarranjos, centenas de genes induzidos por estresse, principalmente em *Arabidopsis thaliana*, foram identificados como candidatos para manipulação genética (Shinozaki et al., 2007). Entre as estratégias desenvolvidas, destacam-se manutenção da condutância estomática por um período maior de tempo, como por exemplo, na cultivar de soja BR16 (Stolf-Moreira et al., 2010), manutenção da turgidez da célula sob condições de desidratação, como por exemplo na cultivar PI 416937 (Sloane et al., 1990) e manutenção de maiores níveis de teor relativo de água das folhas pela superexpressão do gene *SoyBiPD* (Valente et al., 2009). Entretanto, as bases moleculares que conferem ao gene BiP uma função protetora contra desidratação das folhas, sob condições de déficit hídrico no solo, ainda não foram elucidadas.

Tais condições de estresse podem atuar diretamente sobre a homeostase do retículo endoplasmático (RE). Alterações das funções do RE que promovem inibição da glicosilação de proteínas ou da formação de ligações dissulfídicas podem resultar em acúmulo de proteínas incorretamente enoveladas, promovendo uma situação de estresse que altera o controle de qualidade da célula (Trombetta e Parodi, 2003). Esse estresse ativa a via de resposta a proteínas mal dobradas (*unfolded protein response*, UPR), desencadeando degradação das

proteínas anormais e indução de chaperones moleculares e enzimas que contribuem para o re-estabelecimento da homeostase. A proteína BiP é uma das principais chaperones do RE, da família Hsp70, envolvida na via de sinalização de estresse e no processo de degradação protéica para atenuar o estímulo apoptótico (Ni e Lee, 2007). BiP auxilia a translocação dessas cadeias para o lúmen do RE e funciona como um vedante do translocon durante os estágios iniciais de translocação. Dessa forma, a barreira de permeabilidade entre o retículo endoplasmático e o citosol é conservada e o nível de cálcio, conseqüentemente, mantido (Hamman et al., 1998; Vogel et al., 1990; Haigh e Johnson, 2002; Alder et al., 2005). Em eucariotos, BiP é induzida em resposta a condições de estresse abióticas adversas que perturbam a homeostase do RE (Liu e Howell, 2010; Wang et al., 2004; Sung et al., 2001; Sugino et al., 1999; Alvim et al., 2001) a fim de manter o processamento protéico e fidelidade na montagem e dobramento das proteínas (Pincus et al., 2010).

A identificação de vias de sinalização em células afetadas por diferentes estresses, bem como das interações entre estas vias, constitui um dos interesses majoritários de pesquisas na área de interações das células vegetais com o meio ambiente. Diversas evidências na literatura têm demonstrado o papel de BiP na manutenção da homeostase celular. Superexpressão de BiP em plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) e soja (*Glycine max*) aumenta a tolerância a estresse hídrico, provoca um atraso no processo de senescência e atenua o estado de estresse do RE causado por tunicamicina (Alvim et al., 2001; Costa et al., 2008; Valente et al., 2009). Além disso, tem sido demonstrado que BiP exerce um papel relevante na imunidade em plantas (Wang et al., 2005).

Por meio de análises de microarranjo em soja, foi identificada uma possível via de convergência que integra as respostas ao estresse osmótico e ao estresse causado pelo acúmulo de proteínas mal dobradas no RE para transduzir sinais de morte celular programada (PCD, Irsigler et al., 2007; Reis et al., 2011). Mais recentemente, foi demonstrado que BiP atua como regulador negativo dessa via integrativa de morte celular mediada por *N-rich proteins* (NRPs), modulando tanto a expressão quanto a atividade de morte celular de NRPs e NAC6 (Reis et al., 2011). Esta interação atenua morte celular induzida por desidratação e promove uma melhor adaptação de plantas superexpressando BiP à seca.

A função do RE também influencia a atividade imune de plantas, como organela que suporta a biossíntese de proteínas antimicrobianas e componentes do sistema imune. A perda do controle de qualidade do ER aumenta a suscetibilidade à patógenos, sendo que o sistema imune depende de uma elevada atividade secretória (Wang et al., 2005; Moreno et al., 2012). A resistência sistêmica adquirida (SAR) confere imunidade a um amplo espectro de patógenos e sua ativação envolve o aumento da concentração de moléculas de ácido salicílico (SA), levando a indução de genes relacionados a patógenos (PR, Cao et al., 1997). Tem sido demonstrado que o regulador NONEXPRESSOR OF PR GENES 1 (NPR1) controla tanto a indução de genes PRs quanto genes UPR, como chaperones do RE (BiP2, calnexinas e calreticulinas), durante SAR (Wang et al., 2005; Wang et al., 2006; Mukhtar et al., 2007). BiP tem sido diretamente envolvida no estabelecimento de SAR e indução de morte celular hipersensitiva induzida pelo patógeno (Ye et al., 2011; Xu et al., 2012). Evidências mostram que a regulação de genes da via secretória é essencial para imunidade de plantas e ocorre antes do acúmulo de PR-1 (Jelitto-Van Dooren et al., 1999). Inserções de T-DNA em BiP2 de *Arabidopsis* afetam negativamente a capacidade secretora de PR-1 após tratamento com análogos de ácido salicílico (SA) prejudicando a resistência contra bactérias patogênicas. Além disso, tem sido demonstrado que o sensor da via UPR, IRE1, pode ter uma função na imunidade em plantas, visto que mutantes *bip2* (Wang et al., 2005) e mutantes *ire1a* (Moreno et al., 2012) foram defectivos em SAR.

O chaperone molecular BiP parece atuar em vários mecanismos de estresse, respondendo tanto a injúrias a nível abiótico quanto biótico. Porém os mecanismos pelo qual BiP promove maior adaptação das plantas a condições adversas do meio ambiente permanece para ser elucidado. Sabe-se, entretanto, que a função protetora de BiP está associada a sua capacidade de modular eventos de morte celular induzidos por estresses (Reis et al., 2012). Entretanto, pouco se conhece sobre o controle de BiP no processo de senescência natural. Assim sendo, o objetivo primordial dessa investigação foi elucidar o papel de BiP e seu mecanismo de ação em diversos eventos de morte celular programada em plantas. No capítulo I, os experimentos foram direcionados para elucidar o papel regulador de BiP no processo de senescência natural e na resposta hipersensitiva imune de plantas. No capítulo II, análises de variação global de expressão gênica foram conduzidas em folhas de soja superexpressando BiP e com diferentes potenciais hídricos a fim de elucidar os mecanismos pelos quais BiP protege as células vegetais contra morte celular induzida por desidratação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alder, N.N., Shen, Y., Brodsky, J.L., Hedershot, L.M. and Johnson, A.E.** (2005) The molecular mechanisms underlying BiP-mediated gating of the Sec61 translocon of the endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology* **168**, 389-399.
- Alvim, F.C., Carolino, S.M.B., Cascardo, J.C.M., Nunes, C.C., Martinez, C.A., Otoni, W.C. and Fontes, E.P.B.** (2001) *Plant Physiol* **126**, 1042-1054.
- Cao, H., Glazebrook, J., Clark, J.D., Volko, S. and Dong, X.** (1997) The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* **88**, 57-63.
- Costa, M.D., Reis, P.A., Valente, M.A., Irsigler, A.S., Carvalho, C.M., Loureiro, M.E., Aragao, F.J., Boston, R.S., Fietto, L.G., and Fontes, E.P.** (2008) A new branch of endoplasmic reticulum stress signaling and the osmotic signal converge on plant-specific asparagine-rich proteins to promote cell death. *JBC* **283**, 20209-20219.
- Cutforth, H.W., McGinn, S.M., McPhee, K.E. and Miller, P.R.** (2007) Adaptation of pulse crops to the changing climate of the Northern Great Plains. *Agron. J.* **99**, 1684- 1699.
- Haigh, N.G. and Johnson, A.E.** (2002) A new role for BiP: closing the aqueous translocon pore during protein integration into the ER membrane. *Cell Bio*, **156**, 261-270.
- Hamman, B.D., Hedershot, L.M. and Johnson, A.E.** (1998) BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *The Cell*, **92**: 747-758.
- Irsigler, A.S., Costa, M.D., Zhang, P., Reis, P.A., Dewey, R.E., Boston, R.S. and Fontes, E.P.** (2007) Expression profiling on soybean leaves reveals integration of ER- and osmotic-stress pathways. *BMC genomics* **8**, 431.
- Jelitto-Van Dooren, E.P.W.M., Vidal, S. and Denecke, J.** (1999) Anticipating endoplasmic reticulum stress: a novel early response before pathogenesis-related gene induction. *Plant Cell* **11**, 1935-1943.
- Liu, J.X. and Howell, S.H.** (2010) Endoplasmic reticulum protein quality control and its relationship to environmental stress responses in plants. *Plant Cell* **22**, 2930-42
- Moreno, A.A., Mukhtar, M.S., Blanco, F., Boatwright, J.L., Moreno, I., Jordan, M.R., Chen, Y., Brandizzi, F., Dong, X., Orellana, A. and Pajeroska-Mukhtar, K.M.** (2012) IRE1/bZIP60-Mediated Unfolded Protein Response Plays Distinct Roles in Plant Immunity and Abiotic Stress Responses. *PLoS ONE* **7(2)**, e31944.
- Mukhtar, M.S., Nishimura, M.T, and Dangl, J.** (2009) NPR1 in Plant Defense: It's Not over 'til It's Turned over. *Cell* **137**, 804-806. 8.
- Ni, M. and Lee, A. S.** (2007) ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett.* **581**, 3641-3651
- Pincus, D., Chevalier, M.W., Aragon, T., van Anken, E., Vidal, S.E., et al.** (2010) BiP Binding to the ER-Stress Sensor Ire1 Tunes the Homeostatic Behavior of the Unfolded Protein Response. *PLoS Biol* **8(7)**, e1000415.
- Reis, P.A. and Fontes, E.P.** (2012) N-rich protein (NRP)-mediated cell death signaling: a new branch of the ER stress response with implications for plant biotechnology. *Plant signaling & behavior* **7**, 628-632.

- Reis, P.A., Rosado, G.L., Silva, L.A., Oliveira, L.C., Oliveira, L.B., Costa, M.D., Alvim, F.C. and Fontes, E.P.** (2011) The binding protein BiP attenuates stress-induced cell death in soybean via modulation of the N-rich protein-mediated signaling pathway. *Plant physiol* **157**, 1853-1865.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J Exp Bot* **58**, 221–227.
- Sloane, R.J., Patterson, R.P. and Carter, T.E.** (1990) Field drought tolerance of a soybean plant introduction. *Crop Science* **30**, 118–123.
- Stolf-Moreira, R., Lemos, E.G.M., Carareto-Alves, L., et al.** (2011) Transcriptional Profiles of Roots of Different Soybean Genotypes Subjected to Drought Stress *Plant Mol Biol Rep* **29**, 19–34.
- Sugino, M., Hibino, T., Tanaka, Y., Nii, N., Takabe, T., Takabe, T.** (1999) Overexpression of DnaK from a halotolerant cyanobacterium *Aphanotece halophytica* acquires resistance to salt stress in transgenic tobacco plants. *Plant Sci* **146**, 81-88.
- Sung, D.Y., Kaplan, F. and Guy, C.L.** (2001) Plant Hsp70 molecular chaperones: Protein structure, gene family, expression and function. *Physiol plantarum* **113**, 443-451.
- Talamè, V., Ozturk, N.Z., Bohnert, H.J. and Tuberosa, R.** (2007) Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis *J Exp Bot*, **58**: 2, 229-240.
- Trombetta, E.S. and Parodi, J.A.** (2003) Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 649-76.
- Valente, M.A., Faria, J.A., Soares-Ramos, J.R., Reis, P.A., Pinheiro, G.L., Piovesan, N.D., Moraes, A.T., Menezes, C.C., Cano, M.A., Fietto, L.G., Loureiro, M.E., Aragao, F.J. and Fontes, E.P.** (2009) The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco. *J Exp Bot* **60**, 533-546.
- Vogel, J.P., Misra, L.M. Rose, M.D.** (1990) Loss of BiP/GRP78 function blocks translocation of secretory proteins in yeast. *The J of Cell Biol*, **110**, 1885-1895.
- Wang, D., Amornsiripanitch, N. and Dong, X.** (2006) A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PLoS Pathog* **2**, e123.
- Wang, D., Weaver, N.D., Kesarwani, M. and Dong, X.** (2005) Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance. *Sci* **308**, 1036-1040.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O. and Altman, A.** (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci* **9**, 244-252.
- Xu, G., Li, S., Xie, K., Zhang, Q., Wang, Y., Tang, Y., Liu, D., Hong, Y., He, C. and Liu, Y.** (2012) Plant ERD2-like proteins function as endoplasmic reticulum luminal protein receptors and participate in programmed cell death during innate immunity. *Plant J* **72**, 57-69.
- Ye, C., Dickman, M.B., Whitham, S.A., Payton, M. and Verchot, J.** (2011) The unfolded protein response is triggered by a plant viral movement protein. *Plant Physiol.* **156**, 741-755.

CAPITULO I

Dual function of the endoplasmic reticulum binding protein BiP in modulating cell death events.

Humberto Henrique de Carvalho, Otávio José Bernardes Brustolini, Priscila Alves da Silva, Giselle Camargo Mendes, Humberto Josué de Oliveira Ramos, Juliana Rocha Lopes Soares Ramos, Elizabeth Batista Pacheco Fontes. Dual function of the endoplasmic reticulum binding protein BiP in modulating cell death events. Manuscript in preparation.

The endoplasmic reticulum binding protein BiP displays dual functions in modulating cell death events.

Humberto H. Carvalho^{1,3}, Priscila A. Silva^{1,2}, Giselle C. Mendes^{1,3}, Otávio J. B. Brustolini^{1,2}, Humberto J. O. Ramos^{1,2}, Juliana R. L. Soares-Ramos², Elizabeth B. P. Fontes^{1,2,*}

¹National Institute of Science and Technology in Plant-Pest Interactions, ²Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/Bioagro, and ³Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, 36570.000, Viçosa, MG, Brazil

Email addresses:

HHC: humberto_henriquec@hotmail.com

PAS: priasilva@yahoo.com.br

GCM: gisellebio_1@hotmail.com

OJBB: tavinbio@yahoo.com.br

HJOR: humramos@ufv.br

JRLSR: juliramos@ufv.br

EBPF: bbfontes@ufv.br

*For correspondence:

Elizabeth B. P. Fontes, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/Bioagro, INCT in Plant-Pest Interactions, Universidade Federal de Viçosa, 36570.000, Viçosa, MG, Brazil, phone +55 31 3899 2948 *email bbfontes@ufv.br

Summary

The binding protein (BiP) has been demonstrated to participate in innate immunity and attenuate ER- and osmotic-stress-induced cell death. Here, we employed transgenic plants with manipulated levels of BiP to assess whether BiP also controlled developmental and hypersensitive programmed cell death (PCD). Under normal conditions, the BiP-induced transcriptome revealed a robust down-regulation of the genes involved in developmental PCD and an up-regulation of the genes involved in hypersensitive PCD triggered by non-host-pathogen interactions. Accordingly, BiP overexpression delayed leaf senescence and accelerated the hypersensitive PCD triggered by *Pseudomonas syringae* pv. tomato in soybeans and tobacco, as monitored by measuring hallmarks of PCD in plants. The BiP-mediated delay of leaf senescence correlated with the attenuation of N-rich protein (NRP)-mediated cell death signaling and the inhibition of the senescence-associated activation of the unfolded protein response (UPR). In contrast, under biological activation of SA signaling and hypersensitive PCD, BiP overexpression further induced NRP-mediated cell death signaling and antagonistically inhibited the UPR. Thus, the SA-mediated induction of NRP cell-death signaling occurs via a pathway distinct from UPR. Our data indicate that during the hypersensitive PCD, BiP positively regulates the NRP cell-death signaling through a yet undefined mechanism that is activated by SA signaling and related to ER functioning. In contrast, BiP's negative regulation of leaf senescence may be linked to its capacity to mediate the UPR activation and NRP cell death signaling. Therefore, BiP can function either as a negative or positive regulator of PCD events.

Keywords: BiP, Binding Protein, PCD, Programmed cell death, NRP-mediated cell death signaling, UPR, unfolded protein response, soybean, Glycine max, Nicotiana tabacum.

Introduction

The binding protein (BiP) is an ER-resident molecular chaperone, which has been demonstrated to play a dynamic role in the regulation of various ER-supported processes in mammalian cells (for a review, see Hendershot, 2004). BiP mediates the gating of the translocon pore, folding and assembly of nascent proteins, targeting of incorrectly folded proteins for degradation, contribution to ER calcium stores, perception of ER stress and regulation of the unfolded protein response, UPR. Except for binding calcium, all of these BiP functions require the binding of the molecular chaperone to client proteins in an ATP-dependent manner.

Plant BiP has been demonstrated to display molecular chaperone activity and participate in protein folding and maturation. BiP associates detectably with normal storage proteins in an ATP-dependent manner (Gillikin *et al.*, 1995; Vitale *et al.*, 1995), interacts co-translationally with rice prolamin storage proteins (Li *et al.*, 1993) and binds to exposed sites on phaseolin monomers but not to the trimeric form of the bean protein (Foresti *et al.*, 2003). Several other client proteins interact with plant BiP in an ATP-dependent manner, and thus a molecular activity for plant BiP has been extensively demonstrated (Park *et al.*, 2010; Snowden *et al.*, 2007; Mainieri *et al.*, 2004; Brandizzi *et al.*, 2003). However, the role of plant BiP in regulating signaling events that radiate from stress in the ER, as implicated by the protective functions of plant BiP under distinct stress conditions, is far less understood. These functions include the ability of BiP to attenuate ER stress (Costa *et al.*, 2008; Alvim *et al.*, 2001; Leborgne-Castel *et al.*, 1999), to confer tolerance to drought in transgenic soybeans and tobacco plants (Valente *et al.*, 2009; Alvim *et al.*, 2001), to promote plant innate immunity (Wang *et al.*, 2005) and to attenuate ER stress and osmotic stress-induced cell death (Reis *et al.*, 2011).

The most-well characterized ER signaling pathway is the UPR, which is triggered by any condition that disrupts ER homeostasis and promotes an accumulation of unfolded proteins in the organelle lumen (Walter and Ron, 2011). In mammals, upon ER stress, the UPR is transduced by three distinct classes of ER transmembrane proteins: PERK, ATF6 and Ire1p. Upon activation, these receptors act together to transiently attenuate protein synthesis, up-regulate ER folding capacity and degrade misfolded proteins. BiP plays a pivotal role in regulating the activation status of PERK, ATF6 and Ire1p (Malhotra and Kaufman, 2007; Hendershot, 2004). In plants, the UPR is transduced by two classes of transmembrane receptors: the ATF6 orthologs, bZIP17 and bZIP28, and the Ire1 orthologs, Ire1a and Ire1b, in *Arabidopsis* (Eichamann and Schäfer, 2012; Fanata et al., 2013; Iwata and Koizumi, 2012; Reis and Fontes, 2013). BiP overexpression in tobacco and soybeans greatly inhibits the UPR, suggesting a role for BiP in regulating UPR activation (Costa et al., 2008; Alvim et al., 2001; Leborgne-Castel et al., 1999). Recently, plant BiP has been demonstrated to directly regulate the activation of the plant ER stress transducer bZIP28 (Srivastava R et al., 2013).

In addition to the ER stress-specific signaling UPR, the ER accommodates the integration of multiple stress signals. One plant-specific, ER stress-shared response is ER and osmotic stress-integrated signaling, which converges on N-rich proteins (NRPs) to transduce a cell death signal (Costa et al., 2008; Isrigler et al., 2007). As an integrated pathway, NRP-mediated cell death signaling is activated by either ER or osmotic stress but requires both signals for full activation (Reis *et al.*, 2012). Upon ER and osmotic stress, the expression of the transcriptional activator *GmERD15* is induced, which then activates the promoters and expression of the N-rich protein genes, NRP-A and NRP-B. An enhanced accumulation of N-rich proteins up-regulates the cell death effector *GmNAC81* (formerly designated *GmNAC6*; Faria et al., 2011) and *GmNAC30* to induce a programmed cell death (PCD) event, which can

be monitored by an induction of caspase activity, DNA fragmentation, chlorophyll loss, elevated peroxidation and senescence-associated marker gene expression (Faria *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2008). Recent studies have demonstrated that BiP negatively regulates NRP-mediated cell death signaling and manipulating BiP expression protects plants against drought (Reis *et al.*, 2011; Valente *et al.*, 2009). The underlying mechanism of BiP-mediated increase in water stress tolerance is associated with its capacity to modulate the osmotic stress-induced NRP-mediated cell death response. However, whether BiP would also control programmed cell death under developmental conditions remains unanswered.

As the gateway of antimicrobial protein and immune signaling component biosynthesis, the ER also functions as central regulator in the execution of immune responses in plants and animals. The ER participates in at least three different demands in plant innate immunity, and compelling evidence has linked BiP to all three ER-supported immunity functions (Eichmann and Schäfer, 2012). First, ER functions as a surveillance system of proper glycosylation and folding of immune signaling receptors (Li *et al.*, 2009; Liebrand *et al.*, 2009; Nekrasov *et al.*, 2009; Saijo *et al.*, 2009). Accordingly, overexpression of rice BiP3 regulates XA21-mediated innate immunity by specifically regulating the processing and stability of the immune receptor (Park *et al.*, 2010). Second, plant immunity depends on elevated secretory activity for the efficient production of immune proteins (Moreno *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2005). NONEXPRESSOR OF PR GENES1 (NPR1), the master regulator of SA-dependent systemic acquired resistance (SAR), coordinately controls the up-regulation of PR genes and UPR genes during SAR (Wang *et al.*, 2005). BiP also participates in the establishment of efficient SAR (Wang *et al.*, 2005). BiP2 silencing in *Arabidopsis* attenuates PR1 secretion, a marker of SAR, upon treatment with SA analogs and impairs resistance against bacterial pathogens. Finally, the ER has been demonstrated to participate in the

hypersensitive response (HR), a PCD-kind of host defense triggered in plant-pathogen incompatible interactions and in non-host resistance (Xu *et al.*, 2012; Ye *et al.*, 2011). Reverse genetics and overexpression studies have revealed that BiP also participates in the pathogen-induced HR PCD, although with contrasting results. BiP2 silencing is associated with a delay in the establishment of non-host HR PCD induced by *Xanthomonas oryzae* pv. *Orizae* (Xu *et al.*, 2012), whereas BiP overexpression alleviates cell death induced by ectopic expression of the *Potato virus X*, TGBp3al protein (Ye *et al.*, 2011).

Although BiP has been implicated in controlling cell death events in plant cells, whether BiP functions as a positive or negative regulator in HR PCD remains debatable. Additionally, an analysis of whether BiP-mediated regulation of cell death is linked to senescence under normal conditions is merited. Here, we employed soybean and tobacco transgenic lines with increased or suppressed BiP levels to elucidate the role of BiP as a mediator of development- and immunity-related cell death events.

Results

Expression profiles of BiP-overexpressing soybean leaves

We employed the soybean transgenic lines 35S::BIP-4 and 35S::BiP-2, which have been previously demonstrated to overexpress a functional *soyBiPD* (Valente *et al.*, 2009; Figure S1a), to elucidate the BiP-induced transcriptome in soybean leaves grown under normal conditions. Affymetrix GeneChipH Soybean Genome Arrays were used to determine the BiP-induced global variation of gene expression compared to wild type leaves. Soybean leaves at the V3/V4 stage of development were harvested and two biological replicates, consisting of a pool of leaves from three different soybean plants, were used for each treatment. The quality of the array was assessed by pairwise comparisons using MA plots (Figure S2a). Using criteria of a corrected p-value > 0.05 and log₂-fold-change > 1.5, we

identified 310 genes that were differentially expressed in BiP-overexpressing leaves compared to control, untransformed leaves (Figure S2b). A predominance of down-regulated genes (254) was observed over up-regulated genes (56). Functional annotation based on gene ontology and the David bioinformatics database (<http://david.abcc.ncifcrf.gov:8080/summary.jsp>) revealed some interesting terms (Figure S3a). Among the differentially expressed genes, we observed an over representation of abiotic stress-responsive genes (13%) that largely predominated the down-regulated list gene (Tables S1 and S2; Figure S2c). These down-regulated genes were represented by a large fraction of dehydration-induced genes and components of the antioxidant system. Therefore, under normal developmental conditions, BiP-overexpression massively down-regulates components of the antioxidant system. Likewise, protein degradation and cell death-associated genes were mostly down-regulated in BiP-overexpressing lines (Table S2, cell death and proteolysis), which may be consistent with the negative effects of BiP on stress-induced senescence or cell death programs (Valente *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2011).

Up-regulated defense and immune system-related genes clearly predominated in BiP-overexpressing lines. Most notable genes include the Bet vI gene family, pathogenesis-related protein (PR) genes, and lignin biosynthetic process genes, such as lignan, a chitinase class I and a syringolide-induced protein (Durner *et al.*, 1997; Broekaert *et al.*, 1988; Jacobs *et al.*, 1999; Lo *et al.*, 1999; Slaymaker and Keen, 2004). These results are consistent with previous data, which suggest that BiP participates in plant immunity and enhanced PR protein synthesis (Wang *et al.*, 2005; Jelitto-Van Dooren *et al.*, 1999).

A set of flavonoid-related genes, which fall into the Biological Process/Metabolic Process category, was up-regulated in the BiP-overexpressing line. The O-methyltransferases (OMTs), which participates in the biosynthesis of flavonoids and lignin, have been implicated

in disease resistance in plants (Lam et al.; 2007). Therefore, these flavonoid-related genes enhanced the list of biotic stress- responsive genes, which were up-regulated in the 35S::BiP-4 line.

A representative sub-set of down-regulated and up-regulated genes were selected to validate the microarray hybridization results by quantitative RT-PCR (Figure S3b). The qRT-PCR results perfectly matched the microarray hybridization results. Taken together, the global gene expression variation results indicated that BiP overexpression in soybean leaves down-regulates cell death-associated genes and simultaneously up-regulates immune system components.

BiP delays leaf senescence under normal developmental conditions

Recently, BiP has been implicated as a negative regulator of ER stress-, osmotic stress- and drought- induced cell death through the modulation of stress-induced NRP-mediated cell death signaling (Reis *et al.*, 2011, 2012; Valente *et al.*, 2009). Because the gene expression profile was assessed under normal conditions and because BiP overexpression down-regulated genes associated with PCD, we examined whether BiP would also regulate aging or leaf senescence under normal developmental conditions.

We observed that BiP-overexpressing plants flowered at similar rate as wild type controls (approximately 37 days after germination, DAG, on average) but displayed delayed senescence after flowering, because the plants retained green leaves for a longer time (Figures 1a, 1b and 1c for a comparison of leaf yellowing progression between 35S::BiP-4 and WT at 51, 72 and 93 DAG). Accordingly, a clear difference in the quantitation of senescence-associated physiological markers between wild type and 35S::BiP-4 leaves was observed during 21 days of growth, between 58 to 79 DAG, that did not persist through later stages of development. For example, significant differences in the leaf pigment content, such as

chlorophyll A (Figure 1d), chlorophyll B (Figure 1e), total chlorophyll (Figure 1f) and carotenoids (Figure 1g) between the wild type and BiP-overexpressing lines were pronounced during this time window. At 65 and 72 DAG, the photosynthesis rate (A) was significantly higher in BiP-overexpressing lines compared to wild type, untransformed controls (Figure 1g), whereas the malondialdehyde (MDA) content, a product of senescence-associated lipid peroxidation, was lower in BiP-overexpressing lines (Figure 1i). The expression of senescence-associated genes, such as *GmNAC1* (Pinheiro et al., 2009) and cysteine protease (*GmCystP*, Valente et al., 2009), was also monitored by qRT-PCR (Figures 2a and 2b), revealing the *GmNAC1* and *GmCystP* transcript levels in wild type and BiP-overexpressing lines displayed similar profiles; higher expression levels were observed at later developmental stages. However, at 72 DAG, the aging-associated induction of these genes was remarkably lower in BiP-overexpressing lines than in wild type leaves. Collectively, these results suggest that BiP modulates senescence under normal, greenhouse growth conditions.

Because high secretory activity may also cause ER stress, we measured the extent of the UPR activation during development to correlate the BiP-mediated modulation of ER stress x senescence. We used the UPR marker genes, i.e., *soyBiPD*, *CNX* and *PDI* that were known to be induced at the RNA and protein levels by ER stress. We also selected two soybean Ire1 homologs, Glyma01g36200 and Glyma11g09240, using a sequence comparison with Ire1a and Ire1b from *Arabidopsis* (Figure S4), as additional ER stress-associated genes. All tested UPR marker genes were up-regulated during senescence, indicating that developmental programmed leaf senescence activated the UPR in plants (Figures 2c, 2d, 2e, 2f and S5). Consistent with a previous observation, BIP overexpression initiated a feedback regulation of endogenous BiP gene expression, as the level of senescence-mediated BiP induction was significantly lower in the 35S::BiP-4 lines (Figure 2c; Leborgne-Castel *et al.*, 1999; Costa et

al., 2008). These results further confirm that BiP transcription is regulated via a feedback mechanism that involves monitoring BiP protein levels. BiP overexpression also inhibited the UPR activation during senescence, as the induction of the other UPR-associated marker genes (CNX, PDI and Ire homologs) was significantly lower in BiP-overexpressing than in wild type. At a later developmental stage (93 DAG), the BiP-mediated inhibition of the UPR was relieved, and the transcript levels of UPR marker genes reached wild type levels. These results are consistent with previous observations, which demonstrated that the BiP modulation of UPR activation depends on the duration and intensity of the ER stress, where BiP inhibition is relieved with persistent stress (Reis *et al.*, 2011).

The BiP-mediated delay of leaf senescence is associated with an attenuation of NRP-mediated cell death signaling

As BiP modulates the stress-induced NRP-mediated cell death response, we examined whether this pathway is also activated during developmental programmed leaf senescence. First we assessed whether the expression of the components of this pathway, *NRP-A*, *NRP-B* and *GmNAC-6*, are up-regulated during natural leaf senescence (Figure 3). The qRT-PCR assay was also performed with the homologs of vacuolar processing enzymes (VPE), as we recently demonstrated that VPE is a downstream target of the stress-induced NRP-mediated cell death (Mendes *et al.*, under review). In addition, VPE is an executioner of programmed cell death in plants and is induced during natural leaf senescence (Kinoshita *et al.*, 1999; Yamada *et al.*, 2004, Hatsugai *et al.*, 2004). Under normal developmental conditions, components of the stress-induced NRP-mediated cell death signaling, *NRP-A*, *NRP-B*, *GmNAC81* and *VPEs*, were up-regulated at the onset of leaf senescence and displayed increased transcript levels as leaf senescence progressed (Figure 3). BiP overexpression significantly inhibited the NRP-mediated signaling pathway at 72 DAG, which did not persist

through later stages of development. Because VPE displays caspase-like activity that is associated with the execution of programmed cell death (Hara-Nishimura et al., 2005), we monitored the induction of caspase 1 activity in wild-type and 35S::BiP-4 leaves undergoing senescence as additional evidence of NRP-mediated cell death signaling activation (Figure 4a). At 72 DAG, caspase-1 activity was significantly lower in 35S::BiP-4 leaves than in wild-type leaves, which is consistent with an inhibitory role of BiP in NRP-mediated cell death signaling. The inclusion of a caspase-1-specific inhibitor reduced enzyme activity to basal levels. Collectively, these results closely paralleled the BiP inhibition of the UPR and the BiP attenuation of leaf senescence. The BiP-mediated inhibition of NRP-mediated cell death signaling likely accounts, at least in part, for the attenuation of leaf senescence displayed by BiP-overexpressing lines.

BiP accelerates the onset of non-host hypersensitive programmed cell death

Although BiP overexpression down-regulated cell death genes, we observed a clear predominance of up-regulated defense and immune system-related genes in BiP-overexpressing lines. Those genes included PR genes, which are readouts of HR, a form of PCD elicited in non-host or incompatible interactions that is characterized by the rapid death of plant cells at the site of pathogen infection. Therefore, it was of interest to assess whether BiP overexpression would affect HR elicited by non-host-pathogen interactions. As expected, inoculating soybean seedlings with *Pseudomonas syringae* pv. tomato triggered a rapid cell death response, which was phenotypically visible at 24 h post-inoculation (Figure 5a). However, BiP-overexpressing lines displayed a cell death phenotype at 12 h post-inoculation, and more severe necrotic lesions persisted throughout the experiment compared to inoculated wild type leaves. Cell death was measured by H₂O₂ production in the inoculated leaves, and cell damage was monitored using electrolyte leakage from disk leaves and an exclusion of

Evans blue vital dye (Figure 5). H_2O_2 from oxidative bursts is known to drive programmed cell death at challenged sites (Lima *et al.*, 2002). A significantly enhanced oxidative burst was induced in wild type inoculated leaves; however, much more H_2O_2 accumulated in 35S::BiP-4 inoculated leaves at 36 h post-inoculation (Figure 5b). Electrolyte leakage was induced in wild type leaves at 12 h post-inoculation and the values continuously increased with the progression of the HR response (Figure 5c). The 35S::BiP-4 inoculated leaves exhibited an enhanced conductivity from electrolyte leakage throughout the experiment compared to wild type leaves. Likewise, the intensity of Evans blue dye stained cells, an indicator of cell death, was greater in 35S::BiP-4 inoculated leaves throughout the experiment (Figure 5d). We also monitored HR PCD induction by assaying the parallel induction of HR molecular markers, including *PR-1* and *PR-5*, which are frequently used to examine local activation of defense mechanisms during HR, and cysteine protease, a cell death-associated marker. The expression of these HR markers progressively increased with the HR response progression (Figures 7a, 7b and 7c). *PR-1* and *PR-5* induction has been associated with an activation of systemic acquired resistance (SAR), which frequently is triggered locally by HR (Van Loon *et al.*, 2006; Van Loon and van Strien, 1999) and with a rapid response to salicylic acid (SA), which is increased upon HR. Consistent with the profiles of the other analyzed HR markers, the induction of *PR-1*, *PR-5* and *GmCystP* by *Pseudomonas* was much greater in 35S::BiP-4 lines than in inoculated wild type leaves at all experimental time points (Figures 7a, 7b and 7c). Collectively, these results establish that BiP enhances or accelerates PCD induced by HR.

Under normal conditions, *PR-1* and *PR-5* were significantly induced in BiP-overexpressing lines compared to wild type lines (see time zero in Figures 7a and 7b). Because *PR-1* and *PR-5* are SA-responsive gene markers, we examined whether BiP stimulated SA synthesis under normal conditions (Figure S6a). The SA levels, which were

quantified in wild type and 35S::BiP-4 lines at the V3/V4 stage of development, were significantly higher in 35S::BiP-4 lines. These results may indicate that higher SA accumulation in 35S::BiP-4 lines represents a priming state that may be further amplified when SA signaling is biologically activated by biotrophic pathogens. Although we did not detect differences in JA accumulation between the wild type and 35S::BiP-4 lines under normal conditions (Figure S6b), a higher SA accumulation in 35S::BiP-4 may promote the antagonistic effect of SA on JA signaling, because several genes involved in JA synthesis were down-regulated by BiP overexpression (Table S2).

UPR and NRP-mediated cell death signaling are induced by non-host-pathogen interactions and antagonistically controlled by BiP during the hypersensitive response.

Next, we assessed whether the exogenous application of SA induced the UPR and the stress-induced NRP-mediated cell death signaling (Figure S7). As expected, the SA-responsive gene markers *PR-1* and *PR-5* and the cell death-associated gene markers *GmNAC1* and *GmCystP* were efficiently induced by SA treatment (Figures S7a, S7b, S7c and S7d). Except for the Ire homolog Glyma01g36200 (Figure S7), the other two Ire1 homologs and the other UPR gene markers, *soyBiP*, *CNX* and *PDI*, were induced by exogenous SA application. Likewise, all the stress-induced NRP-mediated cell death signaling components, *NRP-A*, *NRP-B*, *GmNAC81* and *VPEs*, were efficiently induced by SA. The up-regulation of the UPR and NRP-mediated cell death signaling by SA prompted us to investigate whether these stress-induced pathways were induced by a *Pseudomonas* invasion that triggers non-host resistance in soybean.

The UPR marker genes *soyBiP* and *PDI* were induced by a *Pseudomonas* invasion but displayed different induction kinetics than the PR genes (Figure 6). In contrast to the more delayed response kinetics of the PR genes, the accumulation of *soyBiP*, *PDI* and the IRE

homolog Glyma09g32970 peaked as early as 6 h after infection. This is not surprising because the UPR has been reported as an early response to pathogen invasion in anticipation of PR synthesis along the ER (Jelitto-Van Dooren *et al.*, 1999). Consistent with a role as a negative regulator of the UPR, BiP overexpression inhibited UPR activation triggered by *Pseudomonas* invasion because the *Pseudomonas*-mediated induction of UPR markers was attenuated in 35S::BiP-4 lines (Figures 6d, 6e, 6g and 6h). However, BiP overexpression stimulated calnexin induction in response to a *Pseudomonas syringae* pv. tomato invasion (Figure 6f). Because the chaperone and immune functions of calnexin are uncoupled (Wang, *et al.*, 2004, Saijo *et al.*, 2009), the immune function of calnexin may predominate over its chaperone function as an UPR marker in non-host resistance.

Additionally, the NRP-mediated cell death signaling was induced when the SA signaling was biologically activated by *Pseudomonas* invasion (Figure 7). In fact, all of the components of this cell death signaling, *NRP-A*, *NRP-B*, *GmNAC81* and the *VPE* homologs, were effectively induced by *Pseudomonas* infiltration and displayed similar induction kinetics to the SA-responsive PR genes. Moreover, BiP overexpression further stimulated the induction of NRP-mediated cell death signaling in the same manner as in the induction of the SA-responsive PR genes and calnexin. The amplification of the HR-mediated cell death signal in 35S::BiP-4 and 35S::BiP-2 lines was also confirmed by an enhanced caspase 1 activity displayed by 35S::BiP-4 and 35S::BiP-2 inoculated leaves compared to inoculated wild-type leaves (Figure 4b). These results indicate that the NRP-mediated signaling pathway was induced during the establishment of non-host resistance and thus may participate in the execution of HR PCD. Furthermore, they suggest that the SA-mediated induction of the NRP-mediated cell death signaling may occur via a similar signaling branch as the induction of the PR genes, because they share similar induction kinetics and similar control mechanisms in

response to pathogen invasion. In fact, BiP positively regulates both the PR genes and NRP-mediated cell death signaling pathway induction, which is antagonistic to its negative regulation of the UPR in response to HR PCD.

The relation between BiP mRNA abundance and the hypersensitive PCD response induced by non-host- pathogen interactions was also investigated in tobacco, using lines with suppressed BiP expression (antisense lines, AS1 and AS2) and lines with overexpressed BiP (sense lines; S1 and S2, Alvim *et al.*, 2001; Figure S1b). Tobacco leaves were also challenged with *Pseudomonas syringae* pv. tomato, and HR was examined 36 h post-inoculation (Figure S8). In transgenic sense lines with enhanced BiP accumulation, the leaf lesions were phenotypically more severe than in the wild type or antisense lines (Figure S8a). Likewise, H₂O₂ production was more pronounced in the sense lines, as judged by DAB staining (Figure S8b). Cell death and cell damage induced by non-host interactions were quantified by measuring the ion leakage and exclusion of Evans blue dye (Figures 10c and 10d). Similar to soybeans, the tobacco sense inoculated leaves exhibited an enhanced conductivity from electrolyte leakage and a greater intensity of stained cells with Evans blue dye throughout the experiment compared to wild type leaves. These results confirmed that enhanced BiP accumulation accelerates the onset of HR PCD triggered by non-host interactions. Importantly, the cell death phenotype was associated with BiP levels, because the antisense lines with decreased BiP levels, when challenged with *Pseudomonas*, displayed decreased electrolyte leakage and dead cells at later stages post-inoculation compared to wild type leaves (Figures S8c and S8d, see 24 h and 36 h post-inoculation).

We also monitored the induction of HR PCD by assaying the parallel induction of pathogenesis-related genes, such as *PR-1*, *PR-4*, chitinase and glucanase (Figure S9). The SA-responsive marker genes *PR-1* (Figure S9a) and chitinase (Figure S9d) displayed a higher

expression in sense leaves than in wild type and antisense leaves inoculated with *Pseudomonas*. Remarkably, the induction of SA-responsive genes was less pronounced in the antisense line than in wild-type leaves at 36 h post-inoculation, confirming that BiP suppression attenuated the hypersensitive response triggered by non-host-pathogen interactions. The BiP-mediated regulation of SA-responsive gene induction is consistent with our finding that BiP stimulates SA signaling activation. In contrast, the induction of the *PR-4* and glucanase genes, which are molecular markers of JA signaling, was compromised in the sense lines compared to wild-type inoculated leaves (Figures S9b and S9c). These results may be associated with the antagonistic effects of the SA signaling stimulation on JA signaling. Accordingly, *PR-4* was more induced in the antisense lines, in which BiP suppression inhibited the SA signaling activation.

Discussion

Recent studies on ER-stress induced cell death have uncovered a relevant role for the molecular chaperone BiP in controlling cell death events in plant cells (Reis *et al.*, 2011; Valente *et al.*, 2009; Schröder and Kaufman, 2005). BiP has been demonstrated to control drought-induced cell death through the modulation of osmotic stress and ER stress NRP-mediated cell death signaling (Reis *et al.*, 2012). BiP has also been implicated in regulating programmed cell death triggered by an immune response in plants and by ER stress specifically (Xu *et al.*, 2012; Reis *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2005). Here, we employed soybean transgenic lines that overexpress a functional BiP to elucidate the role of plant BiP in developmentally programmed and biotic stress-induced cell death events. The BiP-induced transcriptome under normal conditions revealed a robust down-regulation of genes involved in developmental PCD and an up-regulation of genes involved in hypersensitive PCD triggered by non-host plant-pathogen interactions. Consistent with the

BiP-induced expression profile, we demonstrated several lines of evidence indicating that BiP can either negatively or positively regulate PCD events. Under normal conditions, BiP overexpression delays leaf senescence and attenuates the appearance of senescence-associated markers, such as chlorophyll loss, photosynthesis rate decrease, lipid peroxidation and induction of senescence-associated genes. In contrast, we monitored hallmarks of HR PCD and demonstrated that enhanced BiP accumulation accelerated and amplified HR triggered by non-host-pathogen interactions and that silencing BiP delayed the HR PCD. The BiP-mediated amplification of the HR PCD may be linked to the activation of the SA signaling because, even under normal conditions, the 35S::BiP-4 line displayed an enhanced SA accumulation and an increased expression of SA-responsive marker genes, such as *PR-1*, *PR-5* and *PR-10*, compared to wild type, which may serve as a priming state for further induction of SA signaling upon biological activation. *Pseudomonas* infection induced a faster and stronger *PR-1* and *PR-5* gene expression in 35S::BiP-4 inoculated leaves, which were associated with a more rapid appearance and amplification of hypersensitive PCD hallmarks, such as leaf necrotic lesions, H₂O₂ production, electrolyte leakage and exclusion of Evans blue dye, as indicators of dead cells.

In the present study, we demonstrated that the UPR was strongly activated in senescing leaves. This robust UPR activation may be due to an increased secretory activity of leaf cells during senescence. BiP overexpression inhibited UPR activation at intermediate stages of leaf senescence (72 DAG), but this UPR inhibition was alleviated at later developmental stages when the induction of UPR gene markers (*CNX*, *PDI* and Ire homologs) in 35S::BiP-4 leaves approached the normal levels displayed by wild type leaves. BiP overexpression in tobacco and soybeans was previously demonstrated to attenuate UPR activation by ER stress, suggesting a role for BiP in regulating UPR in plants (Costa *et al.*,

2008; Alvim *et al.*, 2001; Leborgne-Castel *et al.*, 1999). A role of BiP as an UPR regulator in plants was further confirmed by recent data demonstrating that BiP regulates the activity to the UPR transducer bZIP28 (Srivastava *et al.*, 2013). However, the BiP-mediated inhibition of UPR activation appears to depend on the duration and intensity of the ER stress, such that BiP inhibition is relieved during persistent stress (Reis *et al.*, 2011). The results of the present investigation are consistent with the hypothesis that BiP modulation of UPR is dependent on the ER processing capacity and secretory activity and might explain the controversy surrounding a potential role for BiP as a regulator of UPR in plants.

BiP modulates the propagation of an ER stress and osmotic stress-induced cell death signal by negatively regulating the expression and activity of NRP-mediated cell death signaling components (Reis *et al.*, 2011). This interaction attenuates dehydration-induced cell death and promotes the adaptation of BiP-overexpressing lines to drought (Reis *et al.*, 2011, 2012; Valente *et al.*, 2009). Here we revealed that the stress-induced NRP-mediated cell death signaling also likely operates during developmentally programmed leaf senescence. We observed that all cell death pathway components, *NRP-A*, *NRP-B*, *GmNAC81* and *VPE* homologs, were induced during leaf senescence. Furthermore, the *GmNAC81*-mediated induction of *VPE* during leaf senescence was associated with a specific increase in caspase-1 activity, demonstrating that a *VPE*-mediated PCD may be functional during leaf senescence. *VPE* is a cysteine protease that exhibits caspase-1-like activity and has been associated with *Tobacco mosaic virus*-induced hypersensitive cell death (Hatsugai *et al.*, 2004) and more recently with developmental PCD (Hatsugai *et al.*, 2012; Hara-Nishimura *et al.*, 2011). As an executioner of vacuolar collapse-mediated PCD, *VPE* acts as a processing enzyme to activate various vacuolar proteins, which participate in the disintegration of vacuoles, to initiate the proteolytic cascade in plant PCD (Hatsugai *et al.*, 2004). We observed that BiP also

attenuated NRP-mediated cell death signaling during leaf senescence by inhibiting the induction of pathway components, such as NRPs, *GmNAC81* and *VPE* homologs, as well as caspase-1 activity. Therefore, BiP may delay leaf senescence by modulating NRP-mediated cell death signaling. The BiP-mediated negative regulation of NRP-mediated cell death signaling during leaf senescence may be linked to its function as an UPR regulator. In support of this hypothesis, we demonstrated that the BiP-mediated inhibition of the PCD signal was temporally coordinated with the BiP-mediated inhibition of the UPR, as it occurred at 72 DAG but not at later developmental stages. Furthermore, both *GmNAC81* and *NRP-B* promoters harbor the unfolded protein response element (UPRE) ccnnnnnnnnnnnnccacg (positions -200 in the *NRP-B* promoter and -383 in the *GmNAC81* promoter), which could be activated by the UPR and hence be modulated by BiP (Figure S10).

In addition to being induced during leaf senescence, which was demonstrated by this investigation, and by ER stress and osmotic stress (Faria *et al.*, 2011; Isrigler *et al.*, 2007), the NRP-mediated cell death signaling is also induced by SA signaling. This induction was confirmed by an exogenous application of SA (Figure S7) and by the inoculation of soybean and tobacco leaves with *Pseudomonas syringae* pv. tomato, which incites a non-host hypersensitive response in these plant species. Under biological activation of SA signaling, BiP overexpression did not inhibit the induction of NRP-mediated cell death signaling but rather enhanced the expression cell death pathway components and caspase 1 activity. The enhanced induction of NRP-mediated cell death signaling in 35S::BiP-4 leaves paralleled an increased expression of PRs and the enhanced development of morphological and physiological hallmarks of HR PCD elicited by non-host resistance. Therefore, in response to SA signaling, BiP positively regulated NRP-mediated cell death signaling. In contrast, BiP overexpression suppressed the induction of UPR marker genes in response to activated SA

signaling. These results are consistent with previous observation, which revealed an enhancement of the SA-mediated induction of UPR marker genes and a concomitant decrease in PR-1 gene expression in *Arabidopsis bip2* knockout lines (Wang *et al.*, 2005).

Salicylic acid (SA) plays a central role in plant defense signaling. It is required for the recognition of pathogen-derived components and subsequent establishment of local resistance in the infected region as well as for systemic resistance (Loake and Grant 2007; Gaffney *et al.*, 1993). During systemic acquired resistance (SAR), there is a massive buildup of PR proteins in vacuoles and in the apoplast. Coordinated up-regulation of the protein secretory machinery is required to ensure proper folding, modification, and transport of PR proteins. Accordingly, the ER-resident gene BiP is induced before PR-1 accumulation (Wang *et al.*, 2005; Jelitto-Van Dooren *et al.*, 1999; Figure 6). *NPR-1*, the master regulator of SA-dependent SAR, not only directly induces the PR genes but also prepares the cell to secrete PR proteins by controlling the expression of the secretory machinery components and UPR genes (Wang *et al.*, 2005). However, *NPR1* regulates the expression of *PR-1* and UPR genes via interactions with distinct transcriptional factors (Pajerowska-Mukhtar *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 1999). We observed that BiP antagonistically modulates the SA-mediated induction of UPR genes and PR genes, which is coordinated with the induction of the NRP-mediated cell death response. Therefore, the SA-mediated induction of NRP cell-death signaling likely occurs via a pathway distinct from the UPR, which contrasts with the coordinated induction of the NRP-mediated cell death response and the UPR by developmentally programmed leaf senescence.

In summary, we propose that the underlying mechanisms of BiP-mediated delay in leaf senescence or acceleration of HR PCD by the non-host response are likely associated, at least in part, with its capacity to modulate the NRP-mediated cell death response (Figure

S10). Although the BiP-mediated positive regulation of NRP cell-death signaling occurs through a yet undefined mechanism that is activated by SA signaling and related to ER functioning, the BiP-mediated negative regulation of this pathway is likely associated with the capacity of the ER-resident molecular chaperone to regulate the UPR activation that occurs during leaf senescence. Recent studies on ER-stress induced cell death have uncovered a relevant role for the molecular chaperone BiP in controlling cell death events in plant cells (Reis *et al.*, 2011; Valente *et al.*, 2009; Schröder and Kaufman, 2005). BiP has been demonstrated to control drought-induced cell death through the modulation of osmotic stress and ER stress NRP-mediated cell death signaling (Reis *et al.*, 2012). BiP has also been implicated in regulating programmed cell death triggered by an immune response in plants and by ER stress specifically (Xu *et al.*, 2012; Reis *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2005). Here, we employed soybean transgenic lines that overexpress a functional BiP to elucidate the role of plant BiP in developmentally programmed and biotic stress-induced cell death events. The BiP-induced transcriptome under normal conditions revealed a robust down-regulation of genes involved in developmental PCD and an up-regulation of genes involved in hypersensitive PCD triggered by non-host plant-pathogen interactions. Consistent with the BiP-induced expression profile, we demonstrated several lines of evidence indicating that BiP can either negatively or positively regulate PCD events. Under normal conditions, BiP overexpression delays leaf senescence and attenuates the appearance of senescence-associated markers, such as chlorophyll loss, photosynthesis rate decrease, lipid peroxidation and induction of senescence-associated genes. In contrast, we monitored hallmarks of HR PCD and demonstrated that enhanced BiP accumulation accelerated and amplified HR triggered by non-host-pathogen interactions and that silencing BiP delayed the HR PCD. The BiP-mediated amplification of the HR PCD may be linked to the activation of the SA

signaling because, even under normal conditions, the 35S::BiP-4 line displayed an enhanced SA accumulation and an increased expression of SA-responsive marker genes, such as *PR-1*, *PR-5* and *PR-10*, compared to wild type, which may serve as a priming state for further induction of SA signaling upon biological activation. *Pseudomonas* infection induced a faster and stronger *PR-1* and *PR-5* gene expression in 35S::BiP-4 inoculated leaves, which were associated with a more rapid appearance and amplification of hypersensitive PCD hallmarks, such as leaf necrotic lesions, H₂O₂ production, electrolyte leakage and exclusion of Evans blue dye, as indicators of dead cells.

In the present study, we demonstrated that the UPR was strongly activated in senescing leaves. This robust UPR activation may be due to an increased secretory activity of leaf cells during senescence. BiP overexpression inhibited UPR activation at intermediate stages of leaf senescence (72 DAG), but this UPR inhibition was alleviated at later developmental stages when the induction of UPR gene markers (*CNX*, *PDI* and Ire homologs) in 35S::BiP-4 leaves approached the normal levels displayed by wild type leaves. BiP overexpression in tobacco and soybeans was previously demonstrated to attenuate UPR activation by ER stress, suggesting a role for BiP in regulating UPR in plants (Costa *et al.*, 2008; Alvim *et al.*, 2001; Leborgne-Castel *et al.*, 1999). A role of BiP as an UPR regulator in plants was further confirmed by recent data demonstrating that BiP regulates the activity to the UPR transducer bZIP28 (Srivastava *et al.*, 2013). However, the BiP-mediated inhibition of UPR activation appears to depend on the duration and intensity of the ER stress, such that BiP inhibition is relieved during persistent stress (Reis *et al.*, 2011). The results of the present investigation are consistent with the hypothesis that BiP modulation of UPR is dependent on the ER processing capacity and secretory activity and might explain the controversy surrounding a potential role for BiP as a regulator of UPR in plants.

BiP modulates the propagation of an ER stress and osmotic stress-induced cell death signal by negatively regulating the expression and activity of NRP-mediated cell death signaling components (Reis *et al.*, 2011). This interaction attenuates dehydration-induced cell death and promotes the adaptation of BiP-overexpressing lines to drought (Reis *et al.*, 2011, 2012; Valente *et al.*, 2009). Here we revealed that the stress-induced NRP-mediated cell death signaling also likely operates during developmentally programmed leaf senescence. We observed that all cell death pathway components, *NRP-A*, *NRP-B*, *GmNAC81* and *VPE* homologs, were induced during leaf senescence. Furthermore, the *GmNAC81*-mediated induction of *VPE* during leaf senescence was associated with a specific increase in caspase-1 activity, demonstrating that a *VPE*-mediated PCD may be functional during leaf senescence. *VPE* is a cysteine protease that exhibits caspase-1-like activity and has been associated with *Tobacco mosaic virus*-induced hypersensitive cell death (Hatsugai *et al.*, 2004) and more recently with developmental PCD (Hatsugai *et al.*, 2012; Hara-Nishimura *et al.*, 2011). As an executioner of vacuolar collapse-mediated PCD, *VPE* acts as a processing enzyme to activate various vacuolar proteins, which participate in the disintegration of vacuoles, to initiate the proteolytic cascade in plant PCD (Hatsugai *et al.*, 2004). We observed that BiP also attenuated NRP-mediated cell death signaling during leaf senescence by inhibiting the induction of pathway components, such as NRPs, *GmNAC81* and *VPE* homologs, as well as caspase-1 activity. Therefore, BiP may delay leaf senescence by modulating NRP-mediated cell death signaling. The BiP-mediated negative regulation of NRP-mediated cell death signaling during leaf senescence may be linked to its function as an UPR regulator. In support of this hypothesis, we demonstrated that the BiP-mediated inhibition of the PCD signal was temporally coordinated with the BiP-mediated inhibition of the UPR, as it occurred at 72 DAG but not at later developmental stages. Furthermore, both *GmNAC81* and *NRP-B*

promoters harbor the unfolded protein response element (UPRE) ccnnnnnnnnnnnnccacg (positions -200 in the *NRP-B* promoter and -383 in the *GmNAC81* promoter), which could be activated by the UPR and hence be modulated by BiP (Figure S10).

In addition to being induced during leaf senescence, which was demonstrated by this investigation, and by ER stress and osmotic stress (Faria *et al.*, 2011; Isrigler *et al.*, 2007), the NRP-mediated cell death signaling is also induced by SA signaling. This induction was confirmed by an exogenous application of SA (Figure S7) and by the inoculation of soybean and tobacco leaves with *Pseudomonas syringae* pv. tomato, which incites a non-host hypersensitive response in these plant species. Under biological activation of SA signaling, BiP overexpression did not inhibit the induction of NRP-mediated cell death signaling but rather enhanced the expression cell death pathway components and caspase 1 activity. The enhanced induction of NRP-mediated cell death signaling in 35S::BiP-4 leaves paralleled an increased expression of PRs and the enhanced development of morphological and physiological hallmarks of HR PCD elicited by non-host resistance. Therefore, in response to SA signaling, BiP positively regulated NRP-mediated cell death signaling. In contrast, BiP overexpression suppressed the induction of UPR marker genes in response to activated SA signaling. These results are consistent with previous observation, which revealed an enhancement of the SA-mediated induction of UPR marker genes and a concomitant decrease in PR-1 gene expression in *Arabidopsis bip2* knockout lines (Wang *et al.*, 2005).

Salicylic acid (SA) plays a central role in plant defense signaling. It is required for the recognition of pathogen-derived components and subsequent establishment of local resistance in the infected region as well as for systemic resistance (Loake and Grant 2007; Gaffney *et al.*, 1993). During systemic acquired resistance (SAR), there is a massive buildup of PR proteins in vacuoles and in the apoplast. Coordinated up-regulation of the protein secretory

machinery is required to ensure proper folding, modification, and transport of PR proteins. Accordingly, the ER-resident gene BiP is induced before PR-1 accumulation (Wang *et al.*, 2005; Jelitto-Van Dooren *et al.*, 1999; Figure 6). *NPR-1*, the master regulator of SA-dependent SAR, not only directly induces the PR genes but also prepares the cell to secrete PR proteins by controlling the expression of the secretory machinery components and UPR genes (Wang *et al.*, 2005). However, *NPRI* regulates the expression of *PR-1* and UPR genes via interactions with distinct transcriptional factors (Pajerowska-Mukhtar *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 1999). We observed that BiP antagonistically modulates the SA-mediated induction of UPR genes and PR genes, which is coordinated with the induction of the NRP-mediated cell death response. Therefore, the SA-mediated induction of NRP cell-death signaling likely occurs via a pathway distinct from the UPR, which contrasts with the coordinated induction of the NRP-mediated cell death response and the UPR by developmentally programmed leaf senescence.

In summary, we propose that the underlying mechanisms of BiP-mediated delay in leaf senescence or acceleration of HR PCD by the non-host response are likely associated, at least in part, with its capacity to modulate the NRP-mediated cell death response (Figure S10). Although the BiP-mediated positive regulation of NRP cell-death signaling occurs through a yet undefined mechanism that is activated by SA signaling and related to ER functioning, the BiP-mediated negative regulation of this pathway is likely associated with the capacity of the ER-resident molecular chaperone to regulate the UPR activation that occurs during leaf senescence.

Acknowledgements

We thank professors Gilberto S. Martins, Adriano N. Nesi and Wagner L. Araújo for critically reading the manuscript and the Laboratorio Nacional de Luz Sincrontron, Campinas, SP, for

allowing the use of their microarray facility. This research was funded by the following grants from Brazilian Government Agencies: CNPq grants 559602/2009-0, 573600/2008-2 and 470287/2011-0 (to E.P.B.F.); FAPEMIG grant CBB-APQ-00070-09; and FINEP grant 01.09.0625.00 (to E.P.B.F.). G.C.M., P.A.S. and O.J.B.B. were supported by CNPq graduate fellowships, and H.H.C. was supported by a FAPEMIG graduate fellowship.

Experimental Procedures

Plant Growth and transgene expression

Soybean seeds (*Glycine max* cv. Conquista) transformed with *soyBiPD* under the control of the *Cauliflower mosaic virus* 35S promoter (Valente *et al.*, 2009) as well as untransformed, control seeds were germinated and grown in 3.0 L pots containing a mixture of soil and dung (3:1) in greenhouse conditions under natural conditions of light, a relative humidity of 65–85% and a temperature ranging from 35 °C during day to 15 °C at night. At different periods and developmental stages, as indicated in the figure legends, the plant tissues were harvested, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C.

Transgenic lines were confirmed by PCR, and transgene accumulation was monitored by immunoblotting as previously described (Valente *et al.*, 2009). Briefly, the total protein was extracted from untransformed or transformed soybean plant leaves and immunoblotted with an antibody prepared against an *E. coli*-produced BiP carboxyl domain (anti-carboxy BiP; Buzeli *et al.*, 2002) at a 1:1,000 dilution and a goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate (Sigma) at a 1:5,000 dilution. Alkaline phosphatase activity was assayed using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (Sigma) and p-nitro blue tetrazolium (Sigma).

RNA extraction, cDNA synthesis and mRNA purification

The total RNA was extracted from leaves at the V3/V4 or V4 developmental stage, in which the third trifoliate leaf had fully expanded, using TRIzol (Life Technologies Inc.) and treated with RNase-free DNase (Life Technologies Inc.). The RNA was quantified by spectrophotometry (Evolution 60 Thermo Scientific) and examined in a 1.3 % (p/v) denaturing agarose gel that was stained with 0.1 µg/mL ethidium bromide (EtBr). The total RNA was used for reverse transcription (RT)-PCR and microarray analyses.

RT-PCR assays were performed with 3 µg of total RNA, 5 µM of oligo-dT, 0.5 mM of dNTPs and 1 U of M-MLV reverse transcriptase (Life Technologies Inc.). For microarray analysis, mRNA was purified using the FastTrack 2.0 mRNA Isolation kit (Life Technologies Inc.) according to the manufacturer's instructions, quantified by spectrophotometry (Evolution 60 Thermo Scientific) and electrophoresed in 1.5% denaturing agarose gels in the presence of EtBr.

Microarray experiment and data analysis

For the microarray, RNA was extracted from untransformed, wild-type and BiP-overexpressing soybean leaves at the V3 developmental stage. Three biological replicates corresponding to transformed (35S::BiP) and untransformed (WT) leaves were used to obtain two independent mRNA pools to hybridize duplicated chips for each sample. Hybridizations were performed on Affymetrix GeneChip Soybean Genome Arrays (<http://affymetrix.com/index.affx>) according to the manufacturer's instructions and the following steps: (a) double-stranded cDNA synthesis using the SuperScript One-Cycle cDNA kit, (b) purification and cleaning of double-stranded cDNA with the cDNA Wash Buffer and Cleanup Spin Column, c) synthesis of biotinylated cRNA using the IVT Labeling kit, (d) amplification of cRNA using the IVT Master Mix, purification as in b and quantification at

260 nm by spectrophotometry (Evolution 60 Thermo Scientific) and (e) fragmentation (hydrolysis) of biotinylated cRNA to 35 to 200 nucleotides. Then, the cRNA (15 µg) was hybridized to an Affymetrix Soybean Genome Array for 16 h according to the Affymetrix GeneChip protocol with buffers provided by the manufacturers. The arrays were washed in a GeneChip Fluidic Station 450 GCOS/Microarray Suite (GeneChip Operating Software) and stained using a GeneChip IVT Labeling Kit. The chips were scanned with a Gene Array Scanner 3000 (Affymetrix) at 3 µm pixel resolution and a 570 nm wavelength, generating cell intensity files (CEL).

The CEL files were computationally analyzed using the R/Bioconductor package (Version 1.6/Version 2.6.0; Li and Wong, 2001). Normalization was performed using the Robust Multiarray Analysis (RMA) method (Irizarry et al., 2003), which is available through the R/Bioconductor package for Affymetrix arrays (Kerr et al., 2000). Microarray Quality Assessment was performed using functions from the Affy package along with functions from the R/Bioconductor package. To identify differentially expressed genes, we used R/MAANOVA (Microarray Analysis of Variance, <http://churchill.jax.org/software/rmaanovash.html>), and the significance of differential gene expression was detected using F and t tests. The estimated p-values were corrected by FDR (false discover rate, Benjamin and Hochberg, 1995), and the resulting respective gene lists were classified according to the corrected p-value and fold-change. The genes were considered differentially expressed if they yielded a corrected p-value > 0.05 and a fold-change > 1.5. The genes were annotated using the annotation Affymetrix file for the chip (<http://www.affymetrix.com/support/technical/annotationfilesmain.affx>), which were complemented with annotations from Soybase (<http://www.soybase.org/>) and Phytozome (<http://www.phytozome.net/>) data bases.

Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

All of the real-time PCR procedures, including tests, validations and experiments, were conducted according to the recommendations of Applied Biosystems. Real-time RT-PCR reactions were performed on an ABI7500 instrument (Applied Biosystems) using cDNAs from the treatments, gene-specific primers (Table 1) and the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). The amplification reactions were performed as follows: 10 min at 95 °C and 40 cycles of 94 °C for 15 sec and 60 °C for 1 min. The soybean RNA helicase (Irsigler *et al.*, 2007) and tobacco RNA actin (Costa *et al.*, 2008) were used as endogenous controls to normalize the real-time RT-PCR values. The gene expression was quantified using the $2^{-\Delta CT}$ or $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

Physiological measurements

The carotenoid, chlorophyll a, and chlorophyll b contents were determined as described by Wellburn (1994). Two 0.5-cm leaf discs were incubated with 5 mL of CaCO₃-saturated DMSO. After 12 hours at room temperature, the total pigment content was determined spectrophotometrically at 480, 649.1 and 665.1 nm and expressed as $\mu\text{g cm}^{-2}$.

Photosynthetic CO₂ assimilation (A) was measured in fully expanded leaves with a portable open-flow gas exchange system (LICOR 6400, Li-COR, USA) under ambient CO₂ concentrations, normal temperature conditions and an artificial, saturating irradiance (1,000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ at the leaf level) as described by Vu *et al.* (1986). All measurements were performed at 9 am.

The extent of leaf lipid peroxidation was estimated by measuring the malondialdehyde assay (MDA) content, as described by Cakmak and Horst (1991). Approximately 0.150 g of leaves were homogenized with 2 mL of 0.1% trichloroacetic acid (TCA). The mixture was

centrifuged at 12,000 *g* for 15 min. All steps were performed at 4 °C. Supernatant aliquots (0.5 mL) were added to 1.5 mL 0.5% thiobarbituric acid (TBA) in 20% TCA, and the samples were incubated at 90 °C for 20 min. The reaction was stopped by incubation on ice, followed by centrifugation at 13,000 *g* for 4 min. The absorbance of the supernatant was determined at 532 nm and subtracting from it the non-specific absorbance at 600 nm. The MDA concentration was calculated using the molar absorptivity coefficient of 155 mM⁻¹ cm⁻¹ (Heath & Packer, 1968).

Total protein extraction from leaves and quantification

Total protein extracts were obtained as described by Görg *et al.* (1988) with some modifications. Approximately 200 mg of leaves from sense, antisense and untransformed *N. tabacum* lines were crushed in liquid nitrogen, and the powder was homogenized with 10% (w/v) trichloroacetic acid in acetone containing 0.07% (v/v) 2-mercaptoethanol. The total protein was precipitated for 120 min and recovered by precipitation at 20,000 *g* for 20 min. The pellet was washed twice with acetone containing 0.07% (v/v) 2-mercaptoethanol, and the residual acetone was removed under vacuum. The pellet was resuspended by ultrasonication in 8 M urea, 4% (v/v) Triton X-100 (v/v) and 60 mM DTT. The total protein extract was stored at -20 °C. The protein concentration was determined according to Bradford (1976) using BSA as standard.

Bacterial strains and plant inoculation

For the plant inoculation experiments, a BiP-overexpressing soybean *Glycine max* cv. Conquista) transgenic line was used at the VC developmental stage (fully expanded unifoliate leaves) as well as an untransformed line and three-week-old leaves of *Nicotiana tabacum* cv. Havana (sense, anti-sense and wild type; Alvim *et al.*, 2001). *Pseudomonas*

syringae patovar tomato was cultured at 28 °C in KB (King's B; King *et al.*, 1954) medium for 18 hours. After centrifugation, the bacterial cultures were resuspended in 10 mM MgCl₂. The leaves of transgenic and wild-type plants were inoculated with bacterial suspensions at an OD 600 nm of 0.2 (which corresponds to approximately 1 x 10⁷ cells/mL; Bogdanove *et al.*, 1998) while applying a controlled pressure against the abaxial epidermis. Alternatively, the leaves were inoculated by aspersion of the bacterial suspension (1 x 10⁷ cells/mL), stored in a cloud chamber for 3 days and transferred to a growth chamber at 28 °C, 80% humidity with a 12 h photoperiod (Budde & ullrich, 2000). The plant material was frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C.

Determination of salicylic acid contents by UPLC-MSD

The plant extracts were prepared as described previously (Forcat *et al.*, 2008) with some modifications. Approximately 200 mg of fresh tissue were crushed in liquid nitrogen, transferred to a falcon tube and added to 400 µL of 10% (v/v) methanol and 1% (v/v) acetic acid. The plant extract was sonicated (Ultrasonic homogenizer 4610 series, Cole-Parmer instrument) twice at 30% power for 20 sec on ice. After incubation for 30 min on ice, the extract was purified by centrifugation for 10 min at 13,000 g and 4 °C. The supernatant was carefully removed and reserved, whereas the pellet was re-extracted as described. The supernatants were combined, centrifuged as before and filtered (Syringe filters 0.45 µm GHP Acrodisc).

Liquid chromatography was performed using a nanoAquity UPLC System (Waters, Milford, MA, USA) coupled to a binary pump and an autosampler. Ten microliters of the sample were separated by UPLC-MS using a Trap column (Waters) and a analytical ProteCol C₁₈ 5-Å 300 µm x 100 mm capillary column (SGE Analytical Science) operating at a flow

rate of 3.0 $\mu\text{L}/\text{min}$. The mobile phase buffers used for the gradient program were water with 0.1% (v/v) formic acid (A) and acetonitrile with 0.1% (v/v) formic acid (B). The gradient program consisted of 5% B for 5 min, linear ramping to 50% B over 35 min, linear ramping to 95% B over 10 min, holding at 95% B for 10 min, ramping back to 5% B over 5 min, and holding at 5% B for 5 min. The eluted compounds were injected on-line in an Ion Trap mass spectrometer (Bruker Daltonics, Ion Trap amaZon) using a microESI ionization needle. The mass spectrometer was operated in a multiple reaction mode (MRM) due to its high selectivity using precursor-to-product ion transitions. All of the UPLC-ESI MS and MS/MS parameters were optimized using individual standard solutions of SA at a concentration of 1 ng/ μL . Full scan data acquisition was performed by scanning from an m/z of 60 to 300 at the positive mode, and the data were acquired for 70 min for each LC-MS/MS run. The UPLC-ESI-MS/MS assays were performed for three biological replicates. The data acquisition of both LC-MS instruments was managed using the Hystar package (Bruker Daltonics Inc., Fremont, CA, USA). In the product ion scan experiments, MS/MS product ions were produced by collision-activated dissociation (CAD) of selected precursor ions. Thus, the combination of the parent mass and unique fragment ions were used to monitor SA selectively in crude plant extracts. MRM acquisition was performed by monitoring the 139/121. The mass spectrums were processed using a data analysis package (Bruker Daltonics Inc., Fremont, CA, USA), and the compound list was generated automatically using the optimized setting. The MS₂ spectrum fragments were verified to confirm the detection of SA in the samples. Total ion chromatograms (TIC) were used for quantitative analysis. The relative abundance of salicylic acid was normalized and expressed by integrating the total area of the chromatogram ion, which corresponds to salicylic acid, relative to the total area of all compounds observed in the MRM assays.

References

- Alves, M.S., Reis, P.A., Dadalto, S.P., Faria, J.A., Fontes, E.P. and Fietto, L.G.** (2011) A novel transcription factor, ERD15 (Early Responsive to Dehydration 15), connects endoplasmic reticulum stress with an osmotic stress-induced cell death signal. *J. Biol. Chem.* **286**, 20020-20030.
- Alvim, F.C., Carolino, S.M.B., Cascardo, J.C.M., Nunes, C.C., Martinez, C.A., Otoni, W.C. and Fontes, E.P.B.** (2001) *Plant Physiol.* **126**, 1042-1054.
- Baker, C.J. and Mock, N.M.** (1994) An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using Evans blue. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **39**, 7-12
- Brandizzi, F., Hanton, S.L., da Silva, L.L.P., Boevink, P., Evans, D., Oparka, K., Denecke, J. and Hawes, C.** (2003) ER quality control can lead to retrograde transport from the ER lumen to the cytosol and nucleoplasm in plants. *Plant J.* **34**, 269-281.
- Buzeli, R.A., Cascardo, J.C., Rodrigues, L.A., Andrade, M.O., Almeida, R.S., Loureiro, M.E., Otoni, W.C., Fontes, E.P.B.** (2002) Tissue-specific regulation of BiP genes: a cis-acting regulatory domain is required for BiP promoter activity in plant meristems. *Plant Mol Biol.* **50**, 757-771.
- Clive Lo, S.C., Hipskind, J.D. and Nicholson, R.L.** (1999) cDNA cloning of a sorghum pathogenesis-related protein (PR-10) and differential expression of defence-related genes following inoculation with *Cochilobolus heterostrophus* or *Collectotrichum sublineocum*. *Am Phytopathol. Soc.* **12**, 479-89.
- Costa, M.D., Reis, P.A., Valente, M.A., Irsigler, A.S., Carvalho, C.M., Loureiro, M.E., Aragao, F.J., Boston, R.S., Fietto, L.G., and Fontes, E.P.** (2008) A new branch of endoplasmic reticulum stress signaling and the osmotic signal converge on plant-specific asparagine-rich proteins to promote cell death. *J. Biol. Chem.* **283**, 20209-20219.
- de Bruxelles, G.L., Peacock, W.J., Dennis, E.S. and Dolferus R.** (1996) Abscisic acid induces the alcohol dehydrogenase gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **111**, 381-91.
- Dolferus, R., Jacobs, M., Peacock, W.J., and Dennis, E.S.** (1994) Differential interactions of promoter elements in stress response of the *Arabidopsis* Adh gene. *Plant Physiol.* **105**, 1075-1087.
- Dubods, C and Plomion, C.** (2001) Drought differentially affect expression of a PR10 protein, in needles of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) seedlings. *J. Exp. Bot.* **52**, 1143-4.
- Dunwell, J.M., Khuri, S. and Gane, P.J.** (2000) Microbial relatives of the seed storage proteins of higher plants: Conservation of structure and diversification of function during evolution of the cupin superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 153-179.
- Durner, J., Shah, J. and Klessig, D.F.** (1997) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci* **2**, 266-74.
- Ecker, J.R.** (1995) The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* **268**:667-75.
- Eichmann, R. and Schäfer P** (2012) The endoplasmic reticulum in plant immunity and cell death. *Front Plant Sci* **3**, 200.
- Faria, J.A., Reis, P.A., Reis, M.T., Rosado, G.L., Pinheiro, G.L., Mendes, G.C. and Fontes, E.P.** (2011) The NAC domain-containing protein, GmNAC6, is a downstream component of

- the ER stress- and osmotic stress-induced NRP-mediated cell-death signaling pathway. *BMC plant biology* **11**, 129.
- Foresti, O., Frigerio, L., Holkeri, H., de Virgilio, M., Vavassori, S. and Vitale, A.** (2003). A phaseolin domain involved directly in trimer assembly is a determinant for binding by the chaperone BiP. *Plant Cell* **15**, 2464-2475.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., et al.** (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* **261**, 754-56.
- Gething, M.J.** (1999) Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol* **10**, 465-472.
- Gillikin, J.W., Fontes, E.P. and Boston RS** (1995) Protein-protein interactions within the endoplasmic reticulum. *Methods Cell Biol.* **50**, 309-23.
- Hara-Nishimura, I., Hatsugai, N., Nakaune, S., Kuroyanagi, M. and Nishimura, M.** (2011) Vacuolar processing enzyme: an executor of plant cell death. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 404-408.
- Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Yamada, K., Meshi, T., Tsuda, S., Kondo, M., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I.** (2004) A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science New York, N.Y* **305**, 855-858.
- Hendershot, L.M.** (2004) The ER function BiP is a master regulator of ER function. *Mt Sinai J Med* **71**, 289-297.
- Holmgren, A.** (1989) Thioredoxin and Glutaredoxin Systems. *J. Biol. Chem.* 264:3963–13966
- Irsigler, A.S., Costa, M.D., Zhang, P., Reis, P.A., Dewey, R.E., Boston, R.S. and Fontes, E.P.** (2007) Expression profiling on soybean leaves reveals integration of ER- and osmotic-stress pathways. *BMC genomics* **8**, 431.
- Iwata, Y. and Koizumi, N.** (2012) Plant transducers of the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Trends Plant Sci.* **17**, 720-727.
- Jacobs, A.K., Dry, I.B. and Robinson, S.P.** (1999) Induction of different pathogenesis-related cDNA in grapevine infected with powdery mildew and treated with ethephon. *Plant Pathol* **48**, 325–36.
- Jelitto-Van Dooren, E.P.W.M., Vidal, S. and Denecke, J.** (1999) Anticipating endoplasmic reticulum stress: a novel early response before pathogenesis-related gene induction. *Plant Cell* **11**, 1935-1943.
- Jwa, N.S., Kumar, G., Rakwal, R., Park, C.H. and Prasad, V.** (2001) Molecular cloning and characterization of a novel jasmonate inducible pathogenesis-related class 10 protein gene, JIOsPR10, from rice (*Oryza sativa* L.) seedling leaves. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**, 973–83.
- Kinoshita, T., Yamada, K., Hiraiwa, N., Kondo, M., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I.** (1999) Vacuolar processing enzyme is up-regulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stressed conditions. *Plant J.* **19**, 43–53.
- Lam, K.C., Ibrahim, R.K., Behdad, B. and Dayanandan, S.** (2007) Structure, function and evolution of plant O-methyltransferases. *Genome*, **50**, 1001–1013.

- Leborgne-Castel, N., Jelitto-Van Dooren, E.P., Crofts, A.J. and Denecke, J.** (1999) Overexpression of BiP in tobacco alleviates endoplasmic reticulum stress. *Plant Cell* **11**, 459-470.
- Lee, S., Lee, E.J., Yang, E.J., Lee, J.E., Park, A.R., Song, W.H. and Park, O.K.** (2004) Proteomic identification of annexins, calcium-dependent membrane binding proteins that mediate osmotic stress and abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *Plant Cell*, **16**, 1378-1391.
- Li, J., Zhao-Hui, C., Batoux, M., Nekrasov, V., Roux, M., Chinchilla, D., Zipfel, C. and Jones, J.D.** (2009) Specific ER quality control components required for biogenesis of the plant innate immune receptor EFR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**, 15973-15978.
- Li, X., Wu, Y., Zhang, D.Z., Gillikin, J.W., Boston, R.S., Franceschi, V.R. and Okita, T.W.** (1993) Rice prolamine protein body biogenesis: a BiP-mediated process. *Science*, **262**, 1054-1056.
- Liebrand, T.W., Smit, P., Abd-El-Haliem, A., de Jonge, R., Cordewener, J.H., America, A.H., Sklenar, J., Jones, A.M., Robatzek, S., Thomma, B.P., Tameling, W.I. and Joosten, M.H.** (2012) Endoplasmic reticulum-quality control chaperones facilitate the biogenesis of Cf receptor-like proteins involved in pathogen resistance of tomato. *Plant Physiol*. **159**, 1819-1833.
- Lima, A.L.S., DaMatta F.M., Pinheiro H.A., Totola M.R. and Loureiro M.E.** (2002) Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea Canephora* under water deficit conditions. *Environ. Exp. Bot.* **47**, 239-247.
- Loake, G. and Grant, M.** (2007) Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**, 466-472.
- Maattanen, P., Gehring, K., Bergeron, J.J. and Thomas, D.Y.** (2010) Protein quality control in the ER: the recognition of misfolded proteins. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **21**, 500-511.
- Mainieri, D., Rossi, M., Archinti, M., Bellucci, M., De Marchis, F., Vavassori, S., Pompa, A., Arcioni, S. and Vitale, A.** (2004) Zeolin. A new recombinant storage protein constructed using maize gamma-zein and bean phaseolin. *P. Physiol* **136**, 3447–3456.
- Malhotra, J.D. and Kaufman, R.J.** (2007) The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Sem. Cell Dev. Bio.* **18**, 716-731.
- Markovic-Housley, Z., Degano, M., Lamba, D., von Roepenack-Lahaye, E., Clemens, S., Susani, M., Ferreira, F., Scheiner, O. and Breiteneder, H.** (2003) Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the major birch pollen allergen Bet v 1 and its likely biological function as a plant steroid carrier. *J. Mol. Bio.* **325**, 123-133.
- Mendes, G.C., Reis, P.A.B., Carvalho, H.H. Aragão, J.F. and Fontes, E.B.P.** (2013) Interaction between GmNAC6 and GmNAC30 integrates ER stress- and osmotic stress-induced cell death responses through vacuolar processing enzyme. *The Plant Cell in preparation*.
- Moreno, A.A., Mukhtar, M.S., Blanco, F., Boatwright, J.L., Moreno, I., Jordan, M.R., Chen, Y., Brandizzi, F., Dong, X., Orellana, A. and Pajerowska-Mukhtar, K.M.** (2012) IRE1/bZIP60-Mediated Unfolded Protein Response Plays Distinct Roles in Plant Immunity and Abiotic Stress Responses. *PLoS ONE*, **7(2)**, e31944.

- Pajerowska-Mukhtar, K.M., Wang, W., Tada, Y., Oka, N., Tucker, C.L., et al.** (2012) The HSF-like Transcription Factor TBF1 Is a Major Molecular Switch for Plant Growth-to-Defense Transition. *Curr Biol* 22: 103–112.
- Park, C.J., Han, S.W., Chen, X. and Ronald, P.C.** (2010) Elucidation of XA21-mediated innate immunity. *Cell Microbiol* 12, 1017-1025.
- Poupard, P., Parisi, L., Campion, C., Ziadi, S. and Simoneau, P.** (2003) A wound- and ethephon-inducible PR-10 gene subclass from apple is differentially expressed during infection with a compatible and an incompatible race of *Venturia inaequalis*. *Physiol Mol Plant Pathol* 62, 3-12.
- Rausser, W.E. (1995) Phytochelatins and related peptides.** Structure, biosynthesis and function. *Plant Physiol.*, 109, 1141-1149.
- Reis, P.A. and Fontes, E.P.** (2012) N-rich protein (NRP)-mediated cell death signaling: a new branch of the ER stress response with implications for plant biotechnology. *Plant Signal. Behav.* 7, 628-632.
- Reis, P.A., Rosado, G.L., Silva, L.A., Oliveira, L.C., Oliveira, L.B., Costa, M.D., Alvim, F.C. and Fontes, E.P.** (2011) The binding protein BiP attenuates stress-induced cell death in soybean via modulation of the N-rich protein-mediated signaling pathway. *P. Physiol.* 157, 1853-1865.
- Reis, P.A.B. and Fontes, E. P. B** (2013) Cell Death Signaling From the Endoplasmic Reticulum in Soybean, A Comprehensive Survey of International Soybean Research., ISBN: 978-953-51-0876-4, 261-271.
- Saijo, Y., Tintor, N., Lu, X., Rauf, P., Pajerowska-Mukhtar, K., Häweker, H., Dong, X., Robatzek, S. and Schulze-Lefert, P.** (2009) Receptor quality control in the endoplasmic reticulum for plant innate immunity. *EMBO J* 28, 3439-3449.
- Salcedo, G., Sanchez-Monge, R., Diaz-Perales, A., Garcia-Casado, G. and Barber, D.,** (2004) Plant non-specific lipid transfer proteins as food and pollen allergens. *Clin. and E. Allergy* 34, 1336-1341.
- Schroder, M. and Kaufman, R.J.** (2005) ER stress and the unfolded protein response. *Mut. Res.* 569, 29-63.
- Siegel, B.Z.** (1993) Plant peroxidases – an organic perspective. *Plant Growth Reg.* 12, 303-312.
- Slaymaker, D.H. and Keen, N.T.,** (2004) Syringolide elicitor-induced oxidative burst and protein phosphorylation in soybean cells, and tentative identification of two affected phosphoproteins *Plant Sci.* 166, 387-396.
- Snowden, C.J., Leborgne-Castel, N., Wootton, L.J., Hadlington, J.L. and Denecke, J.** (2007) In vivo analysis of the luminal binding protein (BiP) reveals multiple functions of its ATPase domain. *Plant J* 52, 987-1000.
- Solomon, M., Belenghi, B., Delledonne, M., Menachem, E. and Levine, A.** (1999) The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell* 11, 431-443.

- Srivastava R., Deng Y., Shah S., Rao A.G., Howell S.H.** (2013) BINDING PROTEIN is a master regulator of the endoplasmic reticulum stress sensor/transducer bZIP28 in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **25**, 1416-1429.
- Valente, M.A., Faria, J.A., Soares-Ramos, J.R., Reis, P.A., Pinheiro, G.L., Piovesan, N.D., Morais, A.T., Menezes, C.C., Cano, M.A., Fietto, L.G., Loureiro, M.E., Aragao, F.J. and Fontes, E.P.** (2009) The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco. *Journal of E Bot.* **60**, 533-546.
- Van der Hoorn, R.A.L.** (2008) Plant proteases: From phenotypes to molecular mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**, 191-223.
- Van Loon, L. and van Strien, E.** (1999) The families of pathogenesis related proteins, their activities, and comparative analysis of PR- 1 type proteins. *Physiol and Mol P Pathol.* **55**, 85-97.
- Van Loon, L.C., Rep, M. and Pieterse, C.M.J.** (2006) Significance of inducible defenselated proteins in infected plants. *Ann Rev Phytopathol.* **44**, 135-162.
- Vitale, A., Bielli, A. and Ceriotti, A.** (1995) The Binding Protein Associates with Monomeric Phaseolin. *Plant Physiol.* **107**, 1411-1418.
- Walter, P. and Ron, D.** (2011) The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, **334**, 1081-1086.
- Wang, D., Weaver, N.D., Kesarwani, M. and Dong, X.** (2005) Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance. *Science* **308**, 1036-1040.
- Wang, S., Narendra, S., and Fedoroff, N.** (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 3817–3822
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O. and Altman, A.** (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* **9**, 244-252.
- Weigel, D., and Glazebrook, J.** (2002) *Arabidopsis: A laboratory Manual.* Cold Springs Harbor Lab. Press, 85-87.
- Xinzhang, G., Yang, J.Y. and Qinglong, S.** (2012) Physiological mechanism of resistance to anthracnose of different *Camellia* varieties, *African J. Biotechnol.* **11(8)**, 2026-2031.
- Xu, G., Li, S., Xie, K., Zhang, Q., Wang, Y., Tang, Y., Liu, D., Hong, Y., He, C. and Liu, Y.** (2012) Plant ERD2-like proteins function as endoplasmic reticulum luminal protein receptors and participate in programmed cell death during innate immunity. *Plant J* **72**, 57-69.
- Yamada, K., Shimada, T., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I.** (2004) A VPE family supporting various vacuolar functions in plants. *Physiol. Plantarum*, **123**, 369-375.
- Ye, C., Dickman, M.B., Whitham, S.A., Payton, M. and Verchot, J.** (2011) The unfolded protein response is triggered by a plant viral movement protein. *Plant Physiol.* **156**, 741-755.
- Zhang, Y., Fan, W., Kinkema, M., Li, X. and Dong, X.** (1999) Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 6523–6528.

Supporting Information

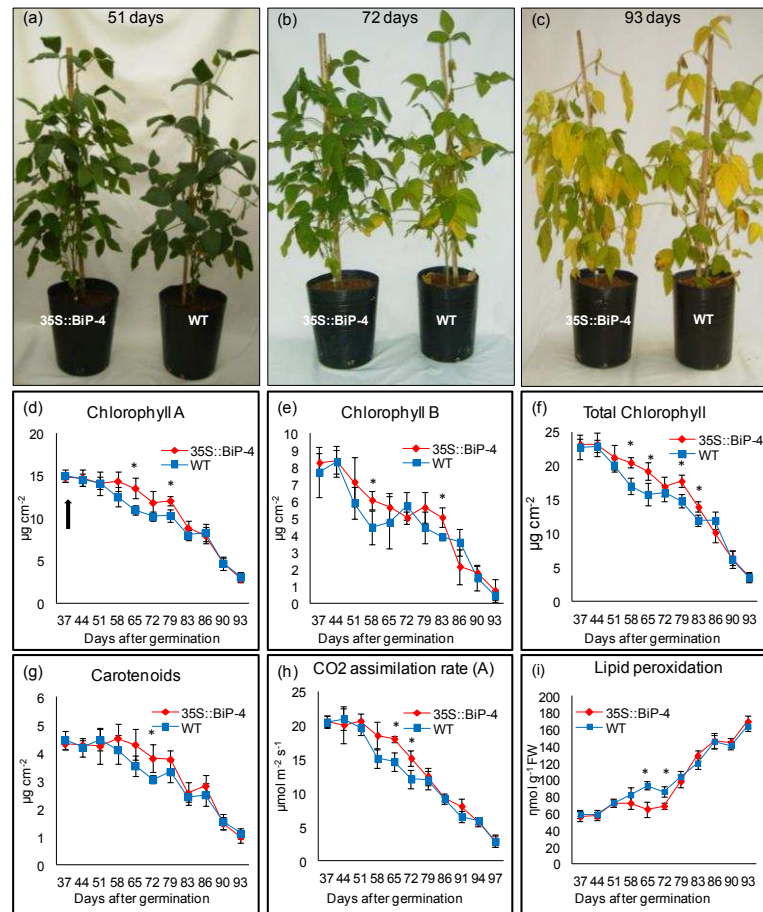


Figure 1. BiP Overexpression slightly delays leaf senescence in soybeans. (a, b, c) Developmental performance of soybean plants after flowering. WT and 35S::BiP-4 soybean lines were grown under greenhouse conditions and were photographed at 51 days after germination (a), at 72 days after germination (b) and at 93 days after germination (c). (d, e, f) Chlorophyll loss during the progression of leaf senescence. The content of chlorophyll A (d), chlorophyll B (e) and total chlorophyll (f) was determined over time in the leaves of wild type and 35S::BiP-4 lines during leaf senescence. The arrow indicates the start of flowering. (g) The carotenoids content during leaf senescence in wild-type and 35S::BiP-4 leaves. (h) CO_2 assimilation during leaf senescence in wild-type and 35S::BiP-4 leaves. (i) Lipid peroxidation induced by leaf senescence in wild-type and 35S::BiP-4 leaves. The leaf lipid peroxidation was monitored by determining the level of TBA-reactive compounds and expressed as the malondialdehyde (MDA) content. The bars indicate the confidence intervals, and the asterisks indicate significant differences of $p \leq 0.05$ when comparing the transgenic and non-transgenic lines on the same observation day.

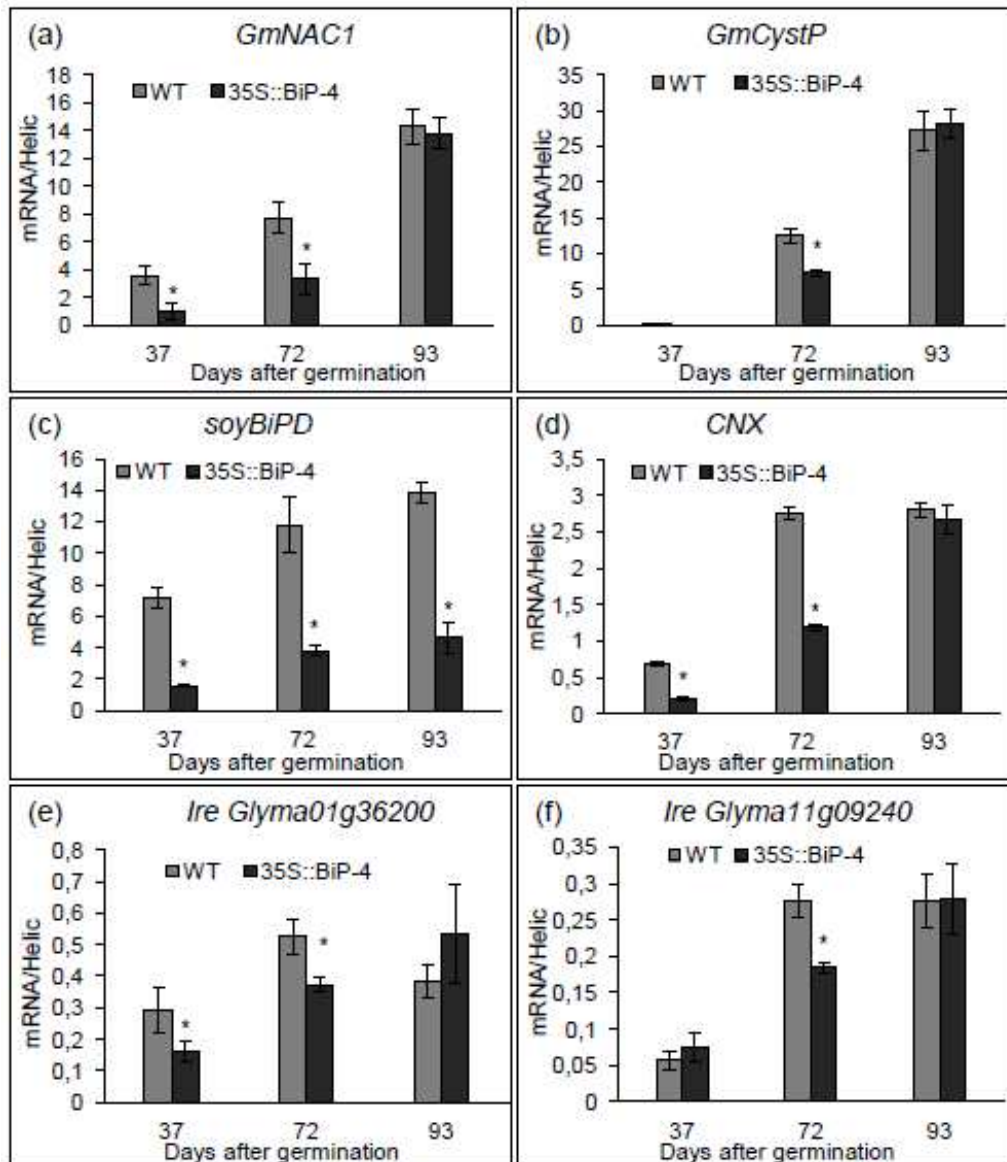


Figure 2. Gene expression analysis of senescence and cell death-associated genes in 35S::BiP-4 transgenic plants under normal developmental conditions. Total RNA was isolated from WT and 35S::BiP-4 leaves at 37, 72 and 93 days after germination (DAG) and the induction of *GmNAC1*(a), Cysteine protease, *GmCystP* (b), *soyBiPD*. (c) Calnexin (*CNX*) (d) the *IRE1* homologs *Glyma01g36200* (e) and *Glyma11g09240* (f) was monitored by quantitative RT-PCR. Expression values were obtained using the $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ method and the endogenous control helicase. The bars indicate the confidence interval ($p < 0.05$, $n = 3$), and the asterisks indicate significant differences between WT and transgenic plants.

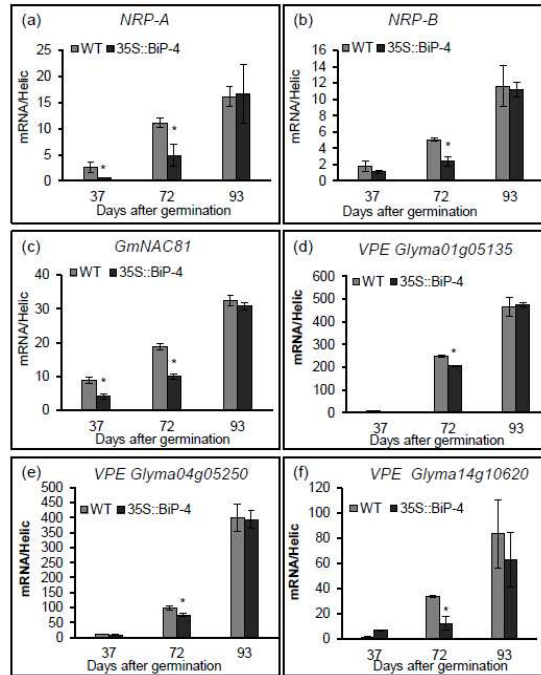


Figure 3. BiP Overexpression attenuates the ER and osmotic stress-induced cell death response during development. Total RNA was isolated from WT and 35S::BiP-4 leaves at 37, 72 and 93 days after germination (DAG) and the induction of (a) N-rich protein A (*NRP-A*), (b) N-rich protein B (*NRP-B*), (c) *GmNAC81*, (d) Vacuolar processing enzyme (Glyma01g05135), (e) Vacuolar processing enzyme (Glyma04g05250) and (f) Vacuolar processing enzyme (Glyma14g10620) was monitored by qRT-PCR. Expression values were obtained as in Figure 2.

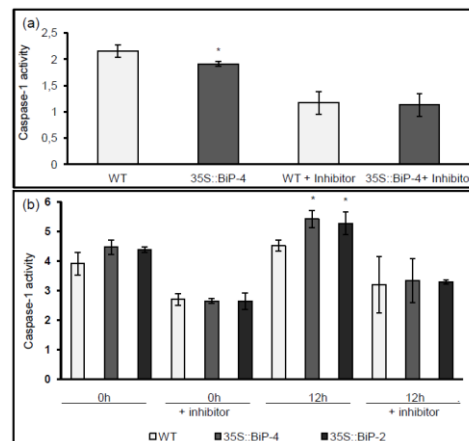


Figure 4. Caspase-1 activity in soybean leaves. (a) BiP overexpression attenuates caspase-1 activity in 35S::BiP-4 leaves 72 days after germination. (b) Enhanced caspase-1 activity displayed by 35S::BiP-4 inoculated leaves compared to WT leaves in the presence and absence of caspase-1-specific inhibitor.

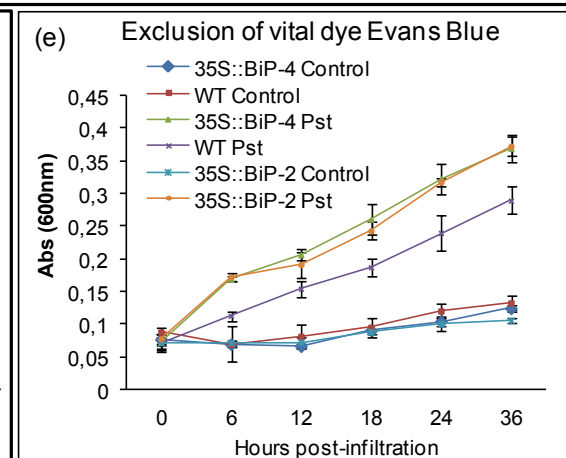
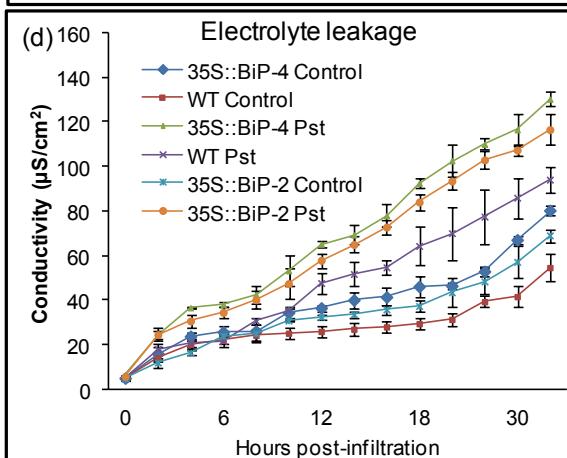
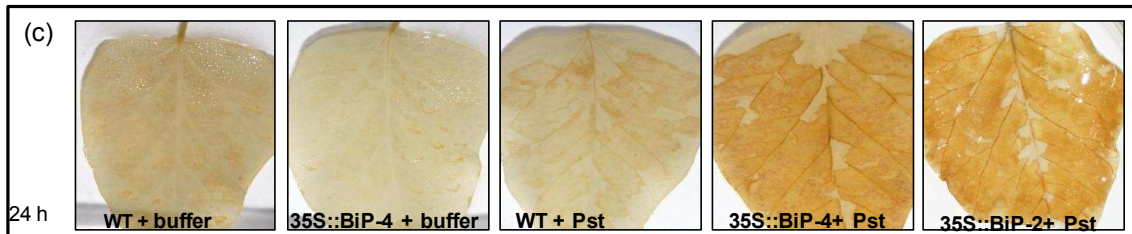
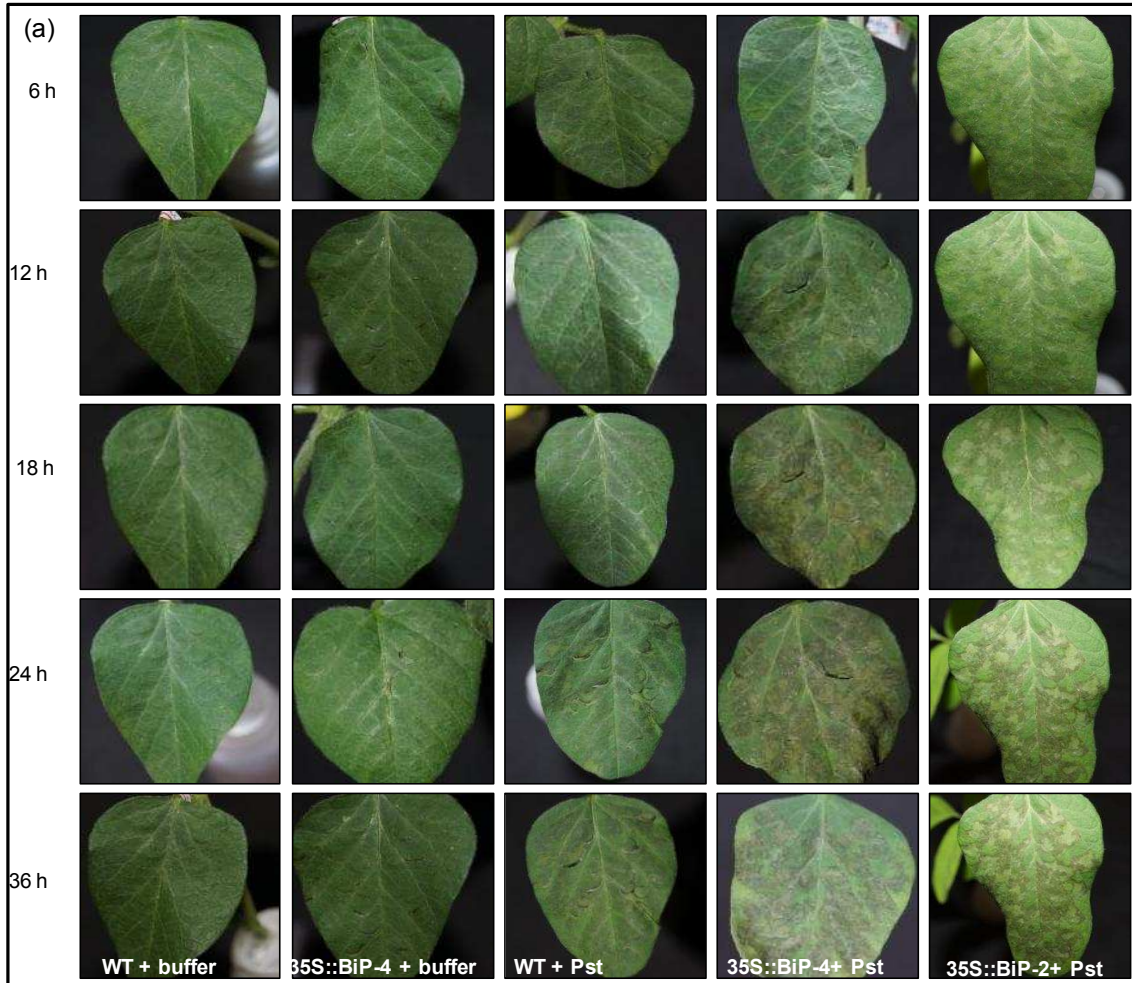


Figure 5. Hypersensitive response (HR) in soybean leaves induced by a non-host-pathogen interaction. (a) Leaf necrotic lesions induced by HR. Soybean WT and 35S::BiP-4 leaves were mock-inoculated and inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Pst) and observed at intervals of 6, 12, 18, 24 and 36 hours post-inoculation. (b) H₂O₂ production induced by HR. WT and 35S::BiP-4 leaves were stained with diaminobenzidine (DAB) 24 hours after inoculation. (c) Electrolyte leakage during HR. The conductivity from electrolyte leakage of mock- or Pst-inoculated WT and 35S::BiP-4 leaves was measured at the indicated periods post-inoculation. (d) Exclusion of Evans blue dye. The frequency of dead cells was quantified by the intensity of Evans blue staining of inoculated leaves as HR progresses. The bars represent a confidence interval based on t test ($p < 0,05$, $n = 5$).

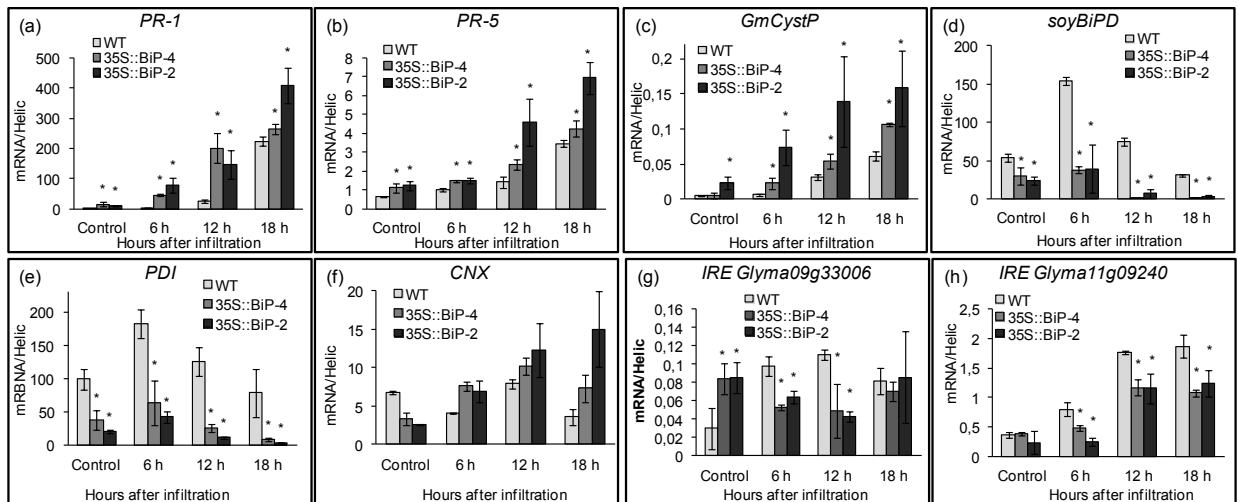


Figure 6. Induction of pathogenesis-related (PR) genes and UPR marker genes during HR elicited by *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Pst). Total RNA was isolated from Pst- or mock-inoculated WT and 35S::BiP-4 leaves and the expression of PR and UPR genes was monitored by qRT-PCR. Expression values were obtained as in Figure 2. PR genes: (a) *PR-1*. (b) *PR-5* and (c) Cysteine protease (*GmCystP*). UPR marker genes: (d) *soyBiPD*, (e) protein disulphide isomerase (*PDI*), (f) Calnexin (*CNX*), the IRE1 homologs (g) *Glyma09g32970* and (e) *Glyma11g09240*.

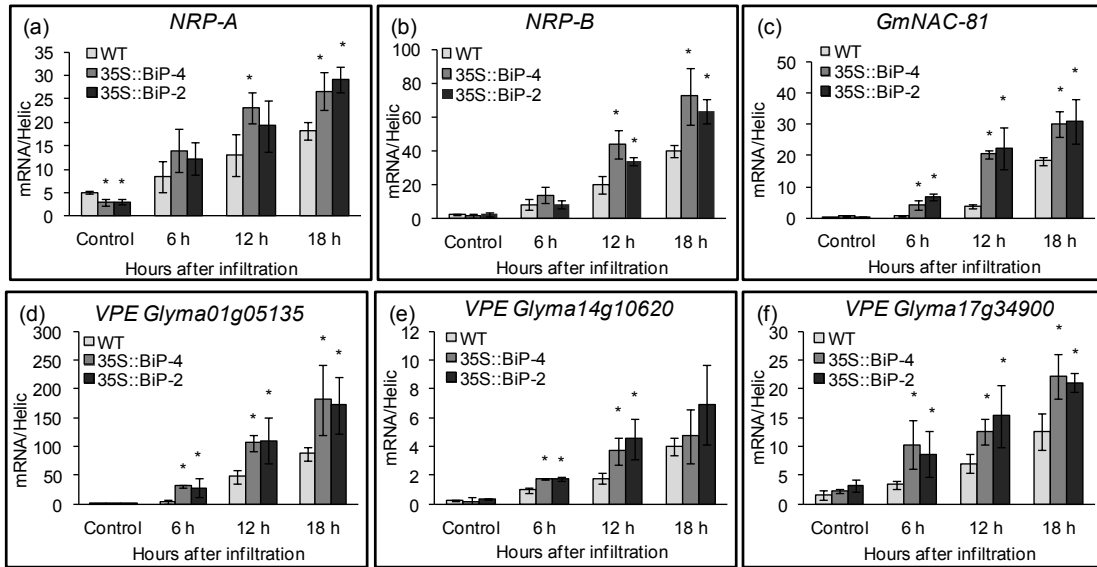


Figure 7. Inoculation of soybean leaves with *Pseudomonas syringae* pv. tomato triggers NRP-mediated cell death signaling during the establishment of non-host resistance. The total RNA was isolated from Pst- or mock-inoculated WT and 35S::BiP-4 leaves and induction of (a) *NRP-A*, (b) *NRP-B*, (c) *GmNAC81*, (d) Vacuolar processing enzyme (*VPE*, Glyma01g05135), (e) *VPE* (Glyma14g10620) and (f) *VPE* (Glyma17g34900) was monitored by qRT-PCR. Expression values were obtained as in Figure 2.

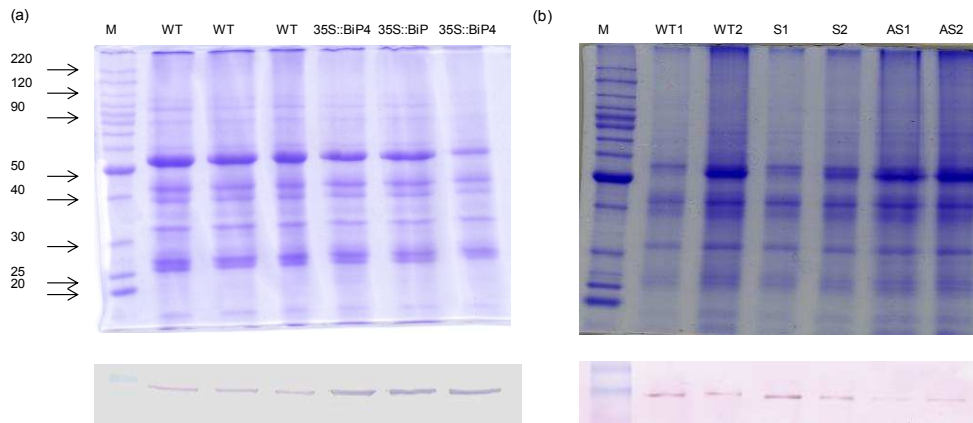


Figure S1. Ectopic expression of soyBiPD in transgenic plants. (a) Enhanced accumulation of BiP in leaves from the soybean transgenic line 35S::BiP-4. An equal amount of total protein (30 µg) extracted from the leaves of wild-type plants and soybean transgenic lines was separated on an SDS-PAGE (top) and immunoblotted with anti-BiP serum (bottom). (b) Enhanced BiP levels in tobacco leaves from WT, sense (35S:BiPS) and antisense (35S:BiPAS) lines. Proteins were processed as described in (a).

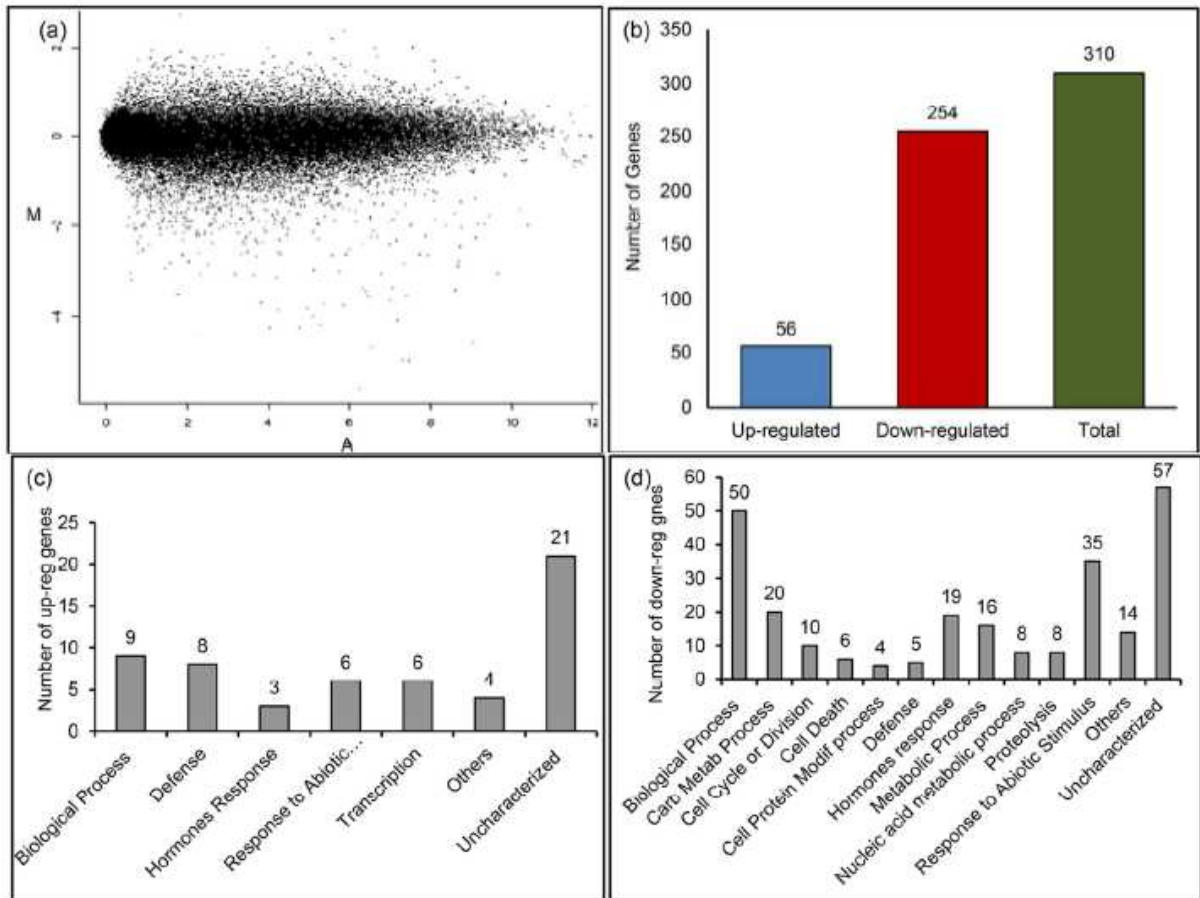


Figure S2. Number of differentially expressed genes in transformed plants (35S::BiP-4) under normal developmental conditions. (a) MA plots of arrays as a function of Log₂ changes. M=log₂fold change and A=average of intensity log. (b) The number of differentially expressed genes (total, up-regulated and downregulated genes) in 35S::BiP-4 under normal developmental conditions. (c) The groups are based on biological processes generated by Gene ontology showing positively and negatively regulated genes.

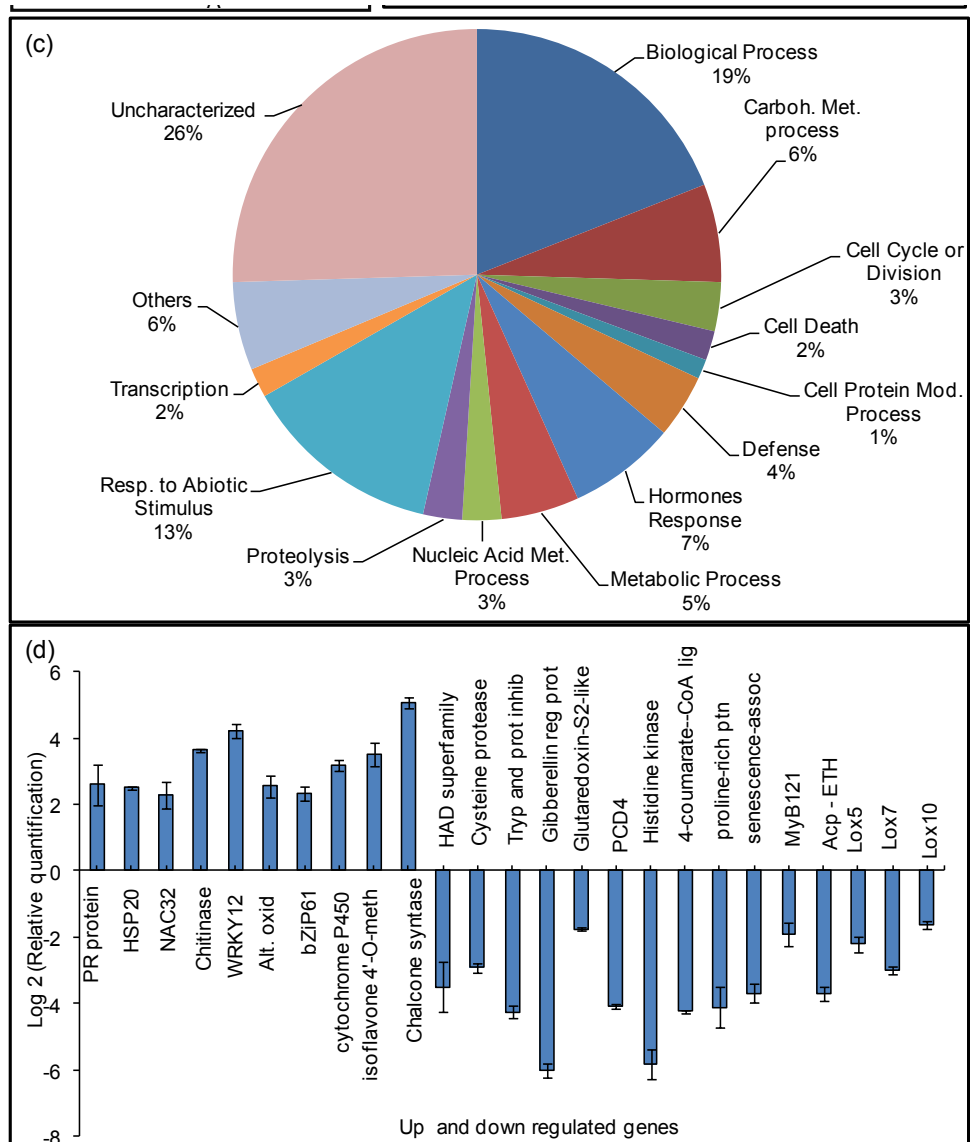


Figure S3. Global variation of gene expression induced by soyBiPD overexpression. (a) The pie chart illustrates the distribution of the differentially expressed genes across functional categories defined by the Gene Ontology Biological process. The numbers represent the frequency of genes in each category. (b) The relative quantification of gene expression in transgenic plants compared to WT in a log₂ scale (\pm SD, n = 3 biological replicates) determined by real-time PCR. The identities of each gene are presented in Supplementary Table S3.

Glyma01g36200	... MKCRVSI FLLSI L L F F F F F F F F F S L . . . S A S C S C C L S L F S L P A R S L K P A T	48
Glyma09g32970 M K L F P F L I S F L F A S I A T S G T P H P N E E R L N I H S A L H R F A S R S L L S L P F P K A A T T	54
Glyma11g09240 M K C C R V S I F L L S I L R L F F F A S E C C L S L F S L P F S S V K P A T	40
IRE1 M R C S A L L D L I L F L L S P L A H S F K G S E I S K F Y D K S I S N C I S C D S R E S Y	48
IRE2	M P R C F L R L H L F F L L L L S P W I M S P C G G A A D D V T Y F I V P S S F C R R S I L C I R R E P T E P N	60
Glyma01g36200	A L I A A L D C T M Y L V D S V S G R V F V S F T E S F I Y H S Y R A P I N D P E D N N V T G L I E	100
Glyma09g32970	A L I V T L D C T M Y L V D C L E S G S T R V I M S F F T G L P I Y C S Y G A P T K K D N G K E N A S A A L M S G F M E	114
Glyma11g09240	A L I A A L D C T M Y L V D S V S A R V I M S F F T E S F I Y H S Y R V S I N D P N V T G L I E	89
IRE1	V L V S T V D C S I S L V D N S S C K L D V T F F T I N E F I Y S S Y G A P H Y H Y T T D E E R S S . V L G D D F Y	104
IRE2	K L V D R D C K V F L K G C F K E T P Y M S F F T E S F I H S L Y G A P A N N T E N A T E I T R	110
Glyma01g36200	C G D D V E L I V H D A R F G I T R L S E S I A N Y V A L T F T E T K E G A S I F C S M K D T M F E V D A K T G A L	158
Glyma09g32970	C G E G N D V S L Y M H D K H F G M R I S E S I A E Y V A R T P T F S D D G A V T L C S M R S T L F E V D A K T S G I	174
Glyma11g09240	C G D D V E L I L H D A H F G I T R L S E S I A N Y V A L T F T E T K E G A S I F C S M K N T M F E V D A K T G V L	147
IRE1	M D C D K D V R L Y N S S V R K G R V N E I V D A S E F I G T L F Y T S T O R I V L G K I D T S V L L D V M T G K L	164
IRE2	P H I I V E Y L N N S K A A T T V D G Y H N V T C E F F R C K L V T D D C . V T L C S E T T S A L L V C G S C F L	169
Glyma01g36200	V R T H Y D L N A S N V V L S G D D R L C R V T T T K N N E L V D P A C L D S F E F L L K I T R S E Y V V K	213
Glyma09g32970	I K I H A M S D P N A S A P C S D G K G C V T N I L N V K N K D L A D P K L N S F C F L L K I F R T Y V V K	231
Glyma11g09240	V R T H Y D L H A S N V V L S D D R R C R A T A T K N N E L V D P A C L D P E F L L K I T R T Y V V K	202
IRE1	V K R Y R M E L Y S N T V V E N D K E K A I V L S K E A P L L F G S G F K K S E D F P E L V I E K K F K I Q	221
IRE2	I H V Y K S T G D T K I T N A L V K P A S T E D F V N E L L I R R T E S K I E	209
Glyma01g36200	S L G . K A G I V L V T N N V A E K A R L I C H N E N P S G . R D S F D A E D G Y V V D R G L D F A N Y A G W D M	271
Glyma09g32970	S V E F S S G W L V T N A V A E A V L C C H T S F L D E D E Y A S D S S L F R N F Y P G C	281
Glyma11g09240	S L G . K A G I V L V T N N V A E K A R L I C H N E Y P S G . R D S E Y F E D G Y V V D R G L D F A N Y A G W D M	260
IRE1	C I S . K F G D V L V S V Y A K N A W L C N H E S V G F I S G L S S V G K N C F F L G Y T T S V P N V C L R N . .	278
IRE2	H F S K T T G L V N L T S H E R A A L E D F V N S G Y D L C P K L C T G I Y L L L G	258
Glyma01g36200	K L N E V Y R C R K N F L L H P A D P G R L S G I Y C E N I I L P F H T S E L I L F S C F D M D G F I L G C G G N M L	331
Glyma09g32970	E I N C V F R L K K N F R F E S L T E R L L V D Y H E N D L S M P N S K L I L F S C F N I D R L F N G H D N M L	345
Glyma11g09240	K L N E V Y R C R K N F L L H P A A G I Y C E N G L P F H T S E L I L F S C F E I D G F I L G C G G N M L	315
IRE1	V K Y E T L F R L G L D E A L Y L P F C D R K F N Q A I G D G N C L I L F N K E A E E V L S L P F E T V I	336
IRE2 S G I D V R G P E V I R V L H D C P N V K L L P S S L N H F E S E N S I M	298
Glyma01g36200	P L F I S N S L F S L C C K L D F C E S N D N V A L P W P L M E I S T C E E V D P K V I E W S T T L P L I L F T I F	391
Glyma09g32970	P C P F V E I T T P G E V Y L N R T S E W P T L P L I L F T V F	374
Glyma11g09240	P L F V S N S L F S L C C K I D F Y E S N D N V A L P R P L M E I T T C E E V D P K V I E W S T T L P L I L F T I F	375
IRE1	S C I T D I I C S I K C A G F A S H F S G L I V L I F C F V T M L	371
IRE2	P F C K A R S R R K L C E C H K K Q Y T Y L F G W S F V K L L A P	332
Glyma01g36200	L G F F V F Y H Y V V T N K D C N R E L N S R L F F K K K K A R K S V K N N I T I D N R G D K F M S S A E E	447
Glyma09g32970	L L A F S L I Y P L V I E N C D I L K D C D S E S E L K G S F A K K K K T R K S C K N K T I D T R E K H L S P E N E	433
Glyma11g09240	L G F F I F Y H Y V V T N K D C N R E L N S R F F K K K K A R K S V K N N I T V D N R G D K F M S S A E E	431
IRE1	S V C G L F F Y R L R C S I R I K E P Y V S E V P I A T P K K K K S K N N T T K A V H K K E N G F I S G N K O P	429
IRE2	L V L L G V V V S F I K K F S S R G S D V S L K A G S E K K K K N R K S A K D T N R G S V R R G C D C F	385
Glyma01g36200	D K L A R K E T N D T Y T C M G V D G R R I G K L F S K E I A K G S N G T V F E G T Y E E R F V A V K	502
Glyma09g32970	D V L T C K D N E R E V W K H F N C G D S E V D G R R I G K L F S K E I A K G S N G T V L E G I Y E E R F V A V K	493
Glyma11g09240	D I L H M E T N D T Y T C M G V D G R R I G K L F S K E I A K G S N G T V F E G T Y E E R F V A V K	486
IRE1	S H E E N K R L L T A F F G L N N S S A E G Y R I G K L F S K E I A K G S N G T V L E G S Y E E R F V A V K	487
IRE2	E L I E G C C L L C . F N N F C S G . A T L G R K I G K L F S S K E I A K G S N G T V F E G I Y E E R F V A V K	442
Glyma01g36200	R L V K A H H V A K E I G N L I S D C L T N I R W G V E C D E F Y I Y A L E R C I O N L E D L I H M Y S D I	562
Glyma09g32970	R L V K S H H V A K E I G N L V S D C L T N I R W G V E Y C D E F Y I A L E R C I O N L E D L I C I Y S D M	553
Glyma11g09240	R L V C A H H V A K E I G N L I S D R C L T N I R W G V E C D E F Y I Y A L E R C I O N L E D L I H M Y S D T	546
IRE1	R L V C S H H V A K E I G N L V S D C L T N I R W G V E C D E F Y I Y S L E L C A C S L I D L I Y A S S A L	547
IRE2	R L V R S H H V A K E I G N L I S D C L T N I R W G V E Y C D E F Y I Y S L E R C I O N L E D L I K S W L E F	502
Glyma01g36200	S E N F T I C E D C Y S N F F K N A R I D T R N D N R Y L W K A I G F S P L L L K L N R D V S G L V H L H	617
Glyma09g32970	S E N F A F R K D C G F R C L I K S C N E M E K Y N T C C L W K E G Y P S L L L K L N R D V S G L V H L H	609
Glyma11g09240	S E N F T I S E D C Y S N F L K N A R N E L R N D N C Y L W K A I G F S P L L L K L N R D V S G L V H L H	601
IRE1	L E S P I A S S . S I H S I C I N P I F E N G K C V E L W K E G Y P S V L L K L N R D V A G L V H L H	600
IRE2	S M T K V L E N N D S T E G V A A Y K I C L D S L E G V I K C N N F V K V G F P S P L L L K L N R D V G C L V H L H	562
Glyma01g36200	E L G I I H R D L K P C N V L I I K E K S L G A K L S D M G I S K R L L E D N S L G H T V T G G S S G W C A P E	675
Glyma09g32970	E L G I I H R D L K P C N V L I I K E R S L G A K L S D M G I S K R L L E N N S L E N N A T G G S S G W C A P E	667
Glyma11g09240	E L G I I H R D L K P C N V L I I K E K S L G A K L S D M G I S K R L L E D N S L G H T V T G G S S G W C A P E	659
IRE1	D I G I H R D L K P C N V L I V K N S L G A K L S D M G I S K R L P A D T S A L T R N S I G L G S S G W C A P E	660
IRE2	E L G I I H R D L K P C N V L I S K D M T L G A K L S D M G I S K R I S P D N S L E H L A T G G S S G W C A P E	620
Glyma01g36200	C L V C G R C T R A V D I F S L G C V L F F C N T C G R H P F G E R L E R D N I V K N G D L F L E F I P E A D E L	735
Glyma09g32970	C L V R G R C T R A V D I F S L G C V L F F C I C G R H P F G E R I E R D N I L K N G D L F L E F I P E A K E L	727
Glyma11g09240	C L V C G R C T R A V D I F S L G C V L F F C N T A G R H P F G E R L E R D N I V K N G D L F L E F I P E A D E L	719
IRE1	C L R N G R C T R A V D I F S L G C V L F F C N T S E M H P G D N Y E R D N I L K G D L F L E S U P E A V H L	720
IRE2	C L L C G R C T R A V D I F S L G C V I F I T I T G C H P F G D D L E R D N I V K N K V D L F L E H V P E A S E L	680
Glyma01g36200	I S C L L N P F L R L T A I E V L H F P F V S S E M R L S F L R D S D R V E L E N R E I D S O L L K A E S I A	795
Glyma09g32970	I S C L L N P F L R R K A T E V L H F P F V S S E M R L S F L R D S D R V E L E N R E T N S O L L V T E S V A	787
Glyma11g09240	I S C L L N P F L R L T A I E V L H F P F V S S E M R L S F L R D S D R V E L E N R E I D S O L L K A E S I A	779
IRE1	L T G L L N P P F L R P R A C D V H R F L V N S E M R L S F L R D S D R V E L E N R E E G S C L L A A E S T A	780
IRE2	I F L L N P F L R P S A T E V L H F P F V N S E M R L S F L R D S D R V E L E N R E A D S E I L K A E S T A	740
Glyma01g36200	F L A L G A W D E R L D F D F I T N I G Y R R Y K Y D S V R L L R V I R N K L N H R E L F C E I C E L I G R V P	855
Glyma09g32970	T V A L G G W D E R N E F T F A N I G Y R R Y N F S V R L L R V I R N K L N H R E L F R E I C E L I G R V P	847
Glyma11g09240	F L A L G A W D E R L D F D F I T N I G Y R R Y K Y D S V R L L R V I R N K L N H R E L F C E I C E L I G R V P	839
IRE1	A V T L N G W D E R L D S I F L D N I G Y R R Y K F D S I R L L R V I R N K L N H R E L F K E I C E L I G R V P	840
IRE2	F V A I E G W D E R L E E V F I T N I G Y R R Y K Y D S I R L L R V I R N K L N H R E L F F E I C E L I G T V P	800
Glyma01g36200	E G F N D Y F A S R F R L L I E V Y V M Y K S C K D D E C F C R Y F R Y I N	895
Glyma09g32970	E G F N Y F A S R F R L L I E V Y V M L C Y C K E E C F C R Y F K N D	887
Glyma11g09240	E G F N D Y F A S R F R L L I E V Y V M Y K S C K D D E C F C R Y E R N I N	879
IRE1	E G R E R V F S R F R L L I E V Y T V L F D Y C N N E F F F K Y S K T T V	880
IRE2	E G R D E V F A R F R L L I E V Y V M S L C R E E E F F R K Y K C C I	840

Figure S4. Multiple alignment of Glyma01g36200, Glyma09g32970, Glyma11g09240, IRE1 (BAB63366) and IRE2 (BAB63367). Homologous proteins were identified using NCBI and Phytozome and used to perform a multiple alignment with the DNAMAN software. Identical amino acid residues in all sequences are marked in black, with a frequency $\geq 75\%$ in dark gray and $\geq 50\%$ in gray.

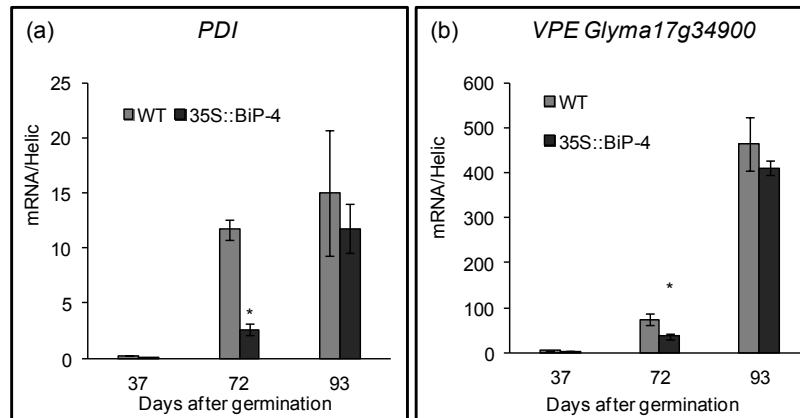


Figure S5. Analysis of protein disulphide isomerase (*PDI*) and vacuolar processing enzyme (*VPE*; Glyma17g34900) transcript accumulation during the development of transgenic and wild plants by qRT-PCR. The expression values were obtained using the $2^{-(DCt)}$ method and helicase as the endogenous control. The bars indicate the confidence interval ($p < 0.05$, $n = 3$), and the asterisks indicate significant differences between WT and transgenic plants.

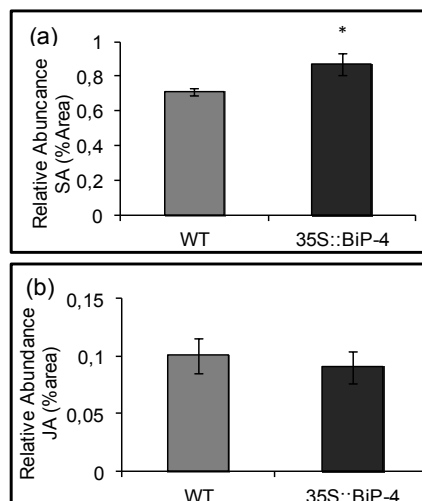


Figure S6. (a) Relative abundance of salicylic acid and (b) jasmonic acid in WT and 35S::BiP-4 lines at the V3/V4 developmental stage, as determined using the Ion Trap mass spectrometer.

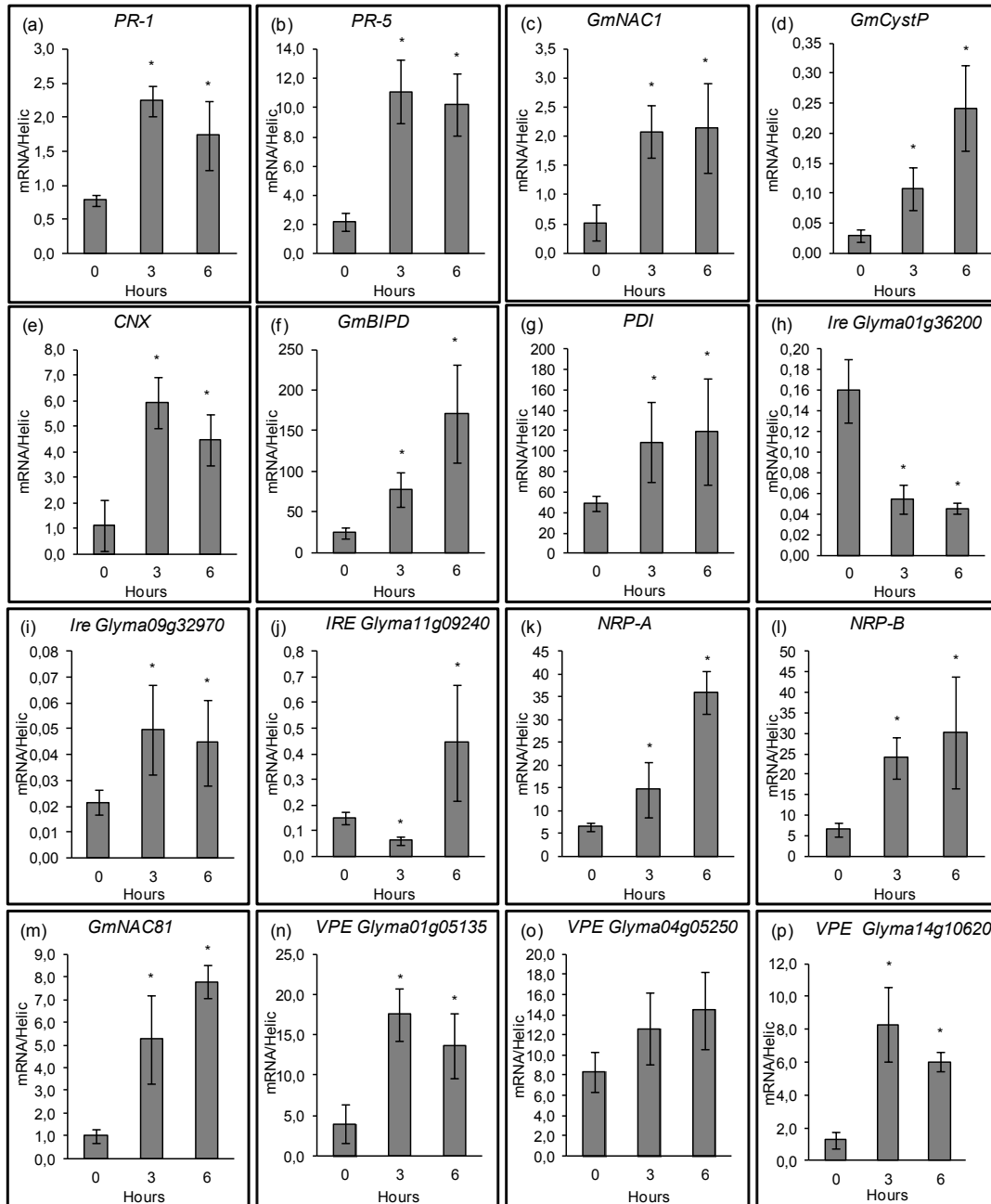


Figure S7. Induction of gene expression by the exogenous application of salicylic acid in wild type soybeans leaves. The induction of selected genes (as indicated in the figure) by treatment with SA was monitored by qRT-PCR. The following genes were analyzed: (a) PR-1, (b) PR-5, (c) *GmNAC1*, (d) *GmCystP*, (e) calnexin, *CNX*, (f) *soyBiPD*, (g) *PDI*, (h) *NRPA*, (i) *NRPB*, (j) *GmNAC6*, (k) vacuolar processing enzyme (Glyma01g05135), (l) vacuolar processing enzyme (Glyma04g05250), (m) vacuolar processing enzyme (Glyma14g10620), (n) vacuolar processing enzyme (Glyma17g34900), (o) Ire1 homolog Glyma01g36200, (p) Ire1 homolog Glyma09g32970, and (q) Ire1 homolog Glyma11g09240.

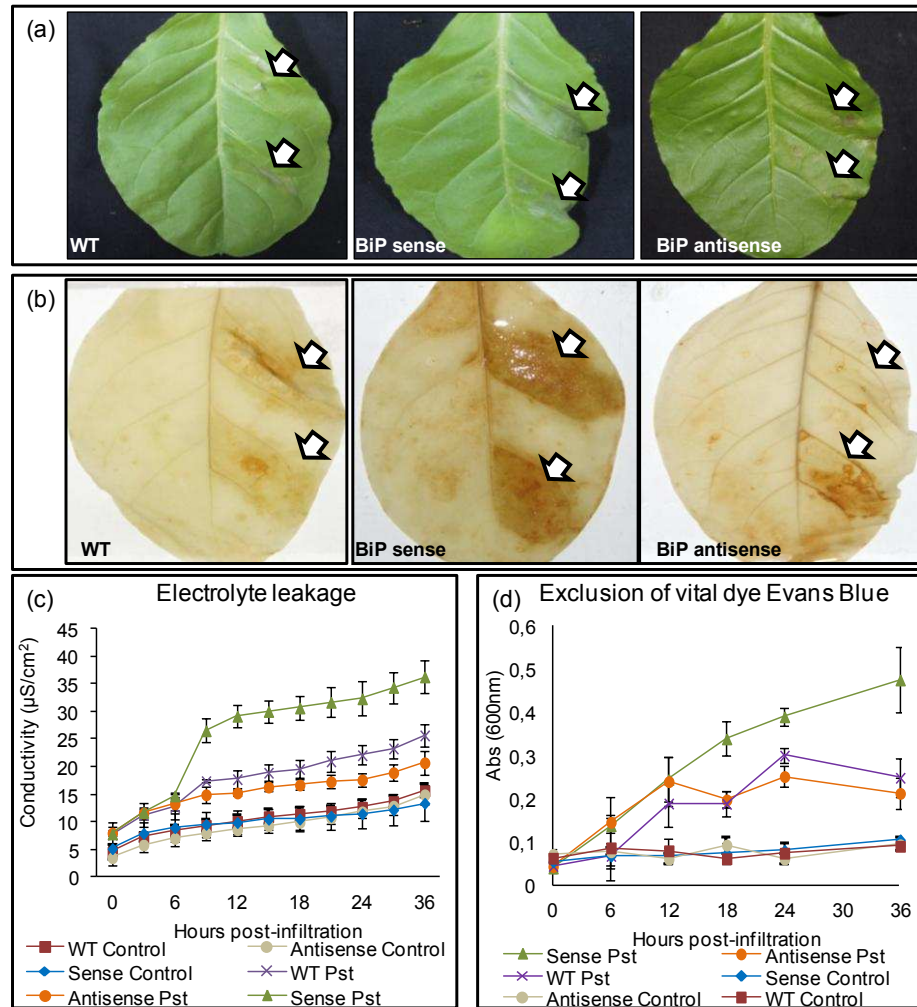


Figure S8. Hypersensitive response elicited by non-host-pathogen interactions in tobacco leaves with enhanced (sense) and suppressed (antisense) levels of BiP.

(a) The lesions on the tobacco leaves of WT, sense and antisense lines after 24 hours of inoculation with a control MgCl₂ buffer or with *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Pst). (b) Diaminobenzidine (DAB) staining in WT, sense and antisense leaves 24 hours after inoculation with Pst or a MgCl₂ solution. (c) The membrane integrity of leaf cells during the hypersensitive response. The conductivity from electrolyte leakage of Pst- and mock-inoculated WT, sense and antisense leaves was measured at the indicated periods after inoculation. (d) The exclusion of vital Evans blue dye from tobacco WT, sense and antisense leaves during the hypersensitive response. The bars represent the confidence interval ($p < 0.05$ and $n = 5$).

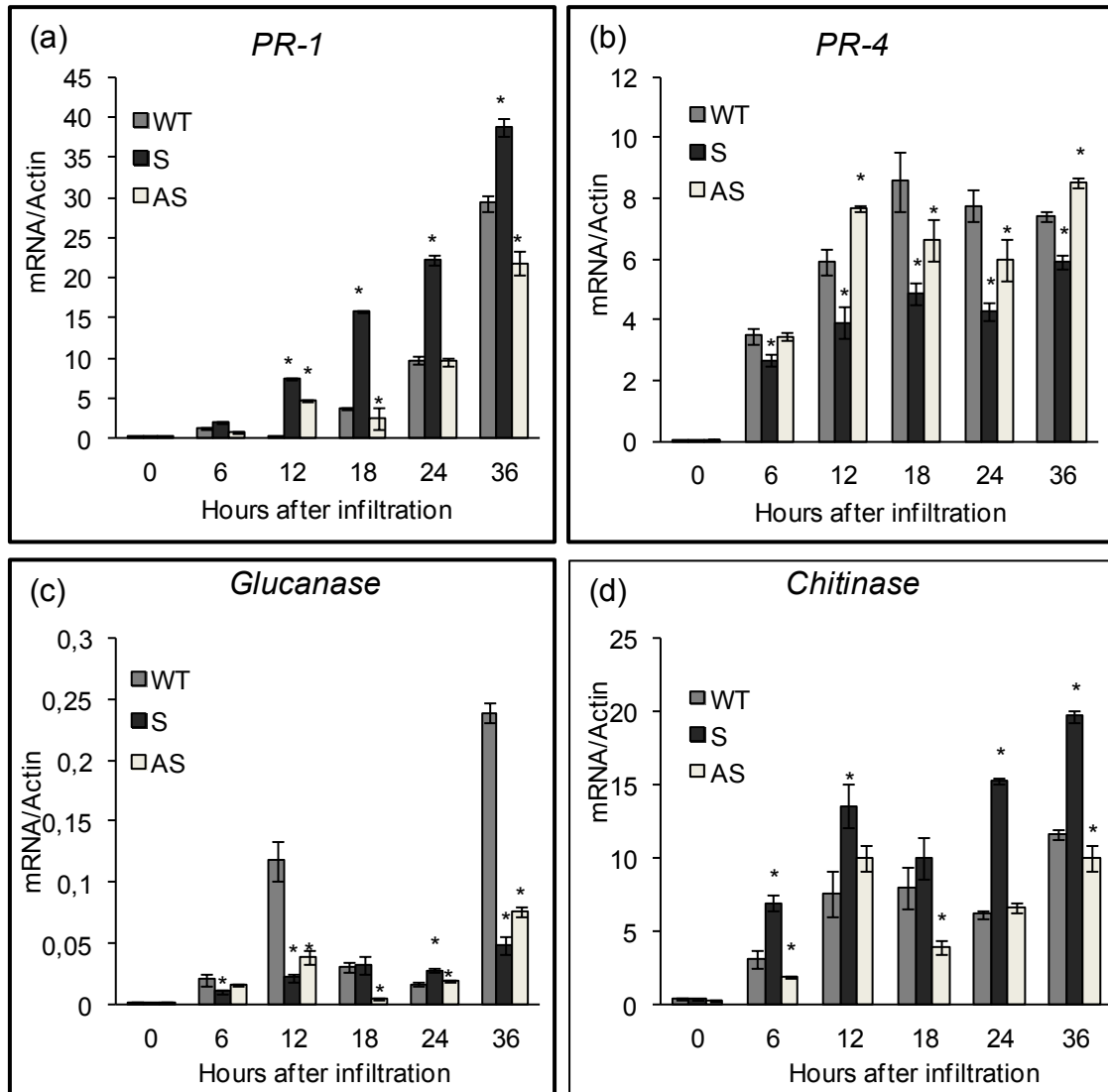


Figure S9. Time-course of induction of pathogenesis-related (PR) genes by the non-host interaction in tobacco leaves. WT, sense and antisense tobacco leaves were inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Pst), and the induction of the PR genes, including (a) pathogenesis-related protein 1 (*PR-1*), (b) pathogenesis-related protein 4 (*PR-4*), (c) chitinase and (d) glucanase, was examined by qRT-PCR. The expression values were obtained using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method and actin as the endogenous control. The bars indicate the confidence interval ($p < 0.05$, $n = 3$), and the asterisks indicate significant differences between WT and transgenic plants.

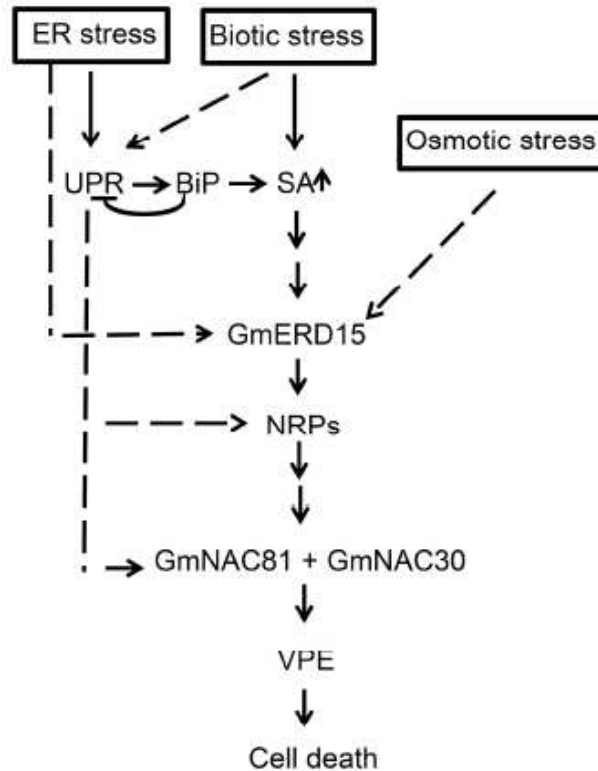


Figure S10. BiP modulates the NRP-mediated cell death signaling pathway by inhibiting UPR and stimulating SA signaling. The scheme illustrates the propagation of a cell death signal derived from prolonged ER stress, osmotic stress and biotic stress through the NRP-mediated PCD signaling pathway. A broken arrow indicates an effect on gene expression, while a solid arrow indicates that the gene is an immediate downstream target. This investigation revealed that overexpression of BiP inhibits the UPR, the expression of NRPs and GmNAC81 and as consequence attenuates cell death mediated by the NRP signaling as in leaf senescence. In response to a biotic stimulus, BiP positively regulates the SA signaling and activates the NRP-mediated cell death signaling. Abbreviations: GmERD15, Glycine max early responsive to dehydration stress 15; NRP, N-rich protein; VPE, vacuolar processing enzyme; UPR, unfolded protein response, SA,

CAPITULO II

Varição global da expressão gênica induzida pela superexpressão de BiP (*Binding Protein*) em plantas de soja *Glycine max* submetidas a déficit hídrico.

Humberto Henrique de Carvalho, Otávio José Bernardes Brustolini, José Cleydson Ferreira da Silva, Maiana Reis Pimenta, Clenilso Sehnen Mota, Juliana Rocha Lopes Soares Ramos, Elizabeth Batista Pacheco Fontes. Varição global da expressão gênica induzida pela superexpressão de BiP (*Binding Protein*) em plantas de soja *Glycine max* submetidas a déficit hídrico. Manuscrito em preparação.

Variação global da expressão gênica induzida pela superexpressão de BiP (*Binding Protein*) em plantas de soja *Glycine max* submetidas a déficit hídrico.

Humberto Henrique de Carvalho^{1,2}, Otávio José Bernardes Brustolini², Maiana Reis Pimenta^{1,2}, Giselle Camargo Mendes^{1,2}, José Cleydson Ferreira da Silva², Clenilso Sehnen Mota¹, Juliana Rocha Lopes Soares Ramos², Elizabeth Batista Pacheco Fontes^{2§}

¹Departamento de Biologia Vegetal Universidade Federal de Viçosa, 36570.000, Viçosa, MG, Brazil

²Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/Bioagro, INCT in Plant-Pest Interactions, Universidade Federal de Viçosa, 36570.000, Viçosa, MG, Brazil

§Corresponding author

Email addresses:

HHC: humberto.henrique@ufv.br

OJBB: otavio.brustolini@ufv.br

MRP: maianarp@yahoo.com.br

JCFS: cleydson@ufv.br

CSM: clenilso@vicosa.ufv.br

JRLSR: juliramos@ufv.br

EBPF: bbfontes@ufv.br

Resumo

A superexpressão de *soyBiPD* promove uma melhor manutenção das relações hídricas foliares e maior tolerância a estresse osmótico por meio da modulação da via de morte celular mediada por proteínas NRPs e induzida por seca. Os transcriptomas induzidos por desidratação foliar de plantas superexpressando BiP (linhagem 35S::BiP-4) e selvagens em um mesmo nível de potencial hídrico foram determinados com a finalidade de se obterem informações sobre o mecanismo pelo qual BiP confere proteção contra desidratação em células vegetais. A superexpressão de BiP parece aliviar o estado de estresse imposto pela desidratação, diminuindo o número de genes diferencialmente expressos em $\psi_w=-1,0$. De uma maneira geral, o número de genes reprimidos predominaram consideradamente sobre as variações positivas. Entre os genes diferencialmente expressos, destacaram-se a indução de caspases, *GmNAC2* e *GmNAC3* em plantas selvagens e a repressão de *VPE* em plantas transgênicas. Quando analisado um período mais severo de seca, ocorreu uma diminuição de genes diferencialmente expressos exclusivos em plantas selvagens e um aumento de genes exclusivos em plantas transformadas, predominando maior proporção de genes induzidos, com destaque para a regulação negativa de *GmNAC6* em plantas transformadas. A regulação negativa de *GmNAC6* e *VPE* na linhagem 35S::BiP-4 está consistente com o papel de BiP como inibidor da via de morte celular mediada por NRPs. Os *heat maps* de genes UPR (unfolded protein response), ERAD (ER-associated degradation protein system), responsivos a estresse hídrico e a morte celular revelaram que o transcriptoma de plantas transgênicas com $\psi_w=-1,0$ se agruparam sempre próximo ao transcriptoma de plantas irrigadas e divergiram consideravelmente dos transcriptomas induzido por seca de WTs e transgênicas com $\psi_w=-1,6$. Resultado semelhante foi obtido por qRT-PCR, corroborando dados dos microarranjos, cujo perfil de variação gênica demonstrou que as plantas transgênicas apresentaram uma menor indução do estresse por desidratação com a repressão de genes da via de morte celular mediada por proteínas NRPs e genes da via UPR. A superexpressão de BiP não somente atrasa mas também atenua o estado de estresse imposto pelo mesmo nível de desidratação foliar, mantendo a homeostase celular sob condições de déficit hídrico. Além disso, atenua a expressão dos executores de morte celular programada induzida por seca, modulando a atividade de NRPs e VPE e exerce um papel de regulador negativo das vias UPR e ERAD induzidos por seca.

Introdução

Um dos principais fatores de estresse abiótico, a seca, se estabelece e é percebida pelas plantas quando a taxa de transpiração foliar e evaporação excedem a quantidade de água disponível no solo. Assim as plantas usam diversos mecanismos para lidar com a falta de água, como escapar, evitar ou tolerar à seca (Blum, 2005; Sherrard & Maherali, 2006; Price et al., 2002). Várias ferramentas biotecnológicas e melhoramento genético têm auxiliado no entendimento da percepção e transdução do sinal do estresse, obtendo novos cultivares tolerantes à seca (Talamè et al., 2007). Entre as estratégias desenvolvidas destacam-se as tentativas de manutenção da condutância estomática por um período maior de tempo, como por exemplo, na cultivar de soja BR16 (Stolf-Moreira et al., 2010), manutenção da turgidez da célula sob condições de desidratação, como por exemplo na cultivar PI 416937 (Sloane et al., 1990) e manutenção de maior teor relativo de água das folhas pela superexpressão do gene *SoyBiPD* (Valente et al., 2009).

Baseado na tecnologia de microarranjos, centenas de genes induzidos por estresse têm sido identificados como candidatos para manipulação genética (Shinozaki et al., 2007). Em resposta à seca, as plantas iniciam uma cascata de sinalização, estimuladas por espécies reativas de oxigênio, NO, Ca²⁺, que é propagada através de interações proteína-proteína envolvendo MAPKinases (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), CDPKs (*Calcium-dependent protein kinases*), e fosfolipases como fosfolipase C, fosfolipases D1e PiP5 (*Phosphatidyl-4, 5-phosphate 5-kinase*) que regulam a expressão de fatores de transcrição específicos culminando na reprogramação da expressão gênica (Bartels e Sunkar, 2005; Xiong et al., 2002, Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2000). Mudanças no nível de cálcio citosólico e IP3 (Inositol 1,4,5-trifosfato) também levam à ativação de genes de resposta à seca via ácido abscísico (ABA; Xiong et al., 2002). Em resposta ao estresse hídrico ABA (ácido abscísico) acumula garantindo a manutenção do balanço hídrico através do fechamento estomático e indução de genes que codificam proteínas responsivas à desidratação (Zhu, 2002). Existe pelo menos quatro sistemas de transdução de sinais para a expressão de genes responsivos ao estresse hídrico que também estão relacionados ao frio e salinidade (Shinozaki et al., 2007). Dois destes sistemas são dependentes de ABA (tipo I e II) e dois são independentes de ABA (tipo III e IV) (Shinozaki et al., 2007; Seki et al., 2003; Shinozaki et al., 1997). A maioria dos fatores de transcrição responsiva à seca pertence a famílias gênicas tais como *AP2/ERF-Type*, *bZIP* (*basic region leucine zipper*), *HD-ZIP* (*Homeodomain-leucine zipper*), *HB-Zip*

(*homeobox TF*), *b-HLH* (*basic helix-loop-helix*), *MYB* (*Myoblastoma*), *NAC* (*NAM*, *ATAF1* e *2*, *CUC2*), *WRKY* e *Zinc-finger proteins*.

Em plantas, assim como em outros eucariotos, BiP é induzido em resposta a condições de estresse abióticas adversas que perturbam a homeostase do RE (Liu e Howell, 2010; Alvim et al., 2001; Sung et al., 2001). Quando proteínas mal dobradas e possivelmente nocivas se acumulam na organela (Ron e Walter, 2007), elas são reconhecidas pelo controle de qualidade do RE (ERQC; Vitale e Boston, 2008) e disparam uma via de sinalização de resposta a proteínas mal dobradas (UPR – Unfolded protein; Bernales et al., 2006). Assim, na tentativa de minimizar efeitos do estresse, ocorre indução na expressão de genes que codificam chaperones moleculares do RE, componentes da maquinaria de degradação associada ao RE (ERAD) e de rotas secretórias (Travers et al., 2000), a fim de manter o processamento protéico e fidelidade na montagem e dobramento das proteínas (Pincus et al., 2010). Entretanto, quando a capacidade de dobramento não é suficiente, as proteínas são retranslocadas para o citosol para degradação via proteassomo, por meio da ativação do sistema de degradação associado ao ER (Trombetta e Parodi, 2003; Kamauchi et al., 2005; Martinez e Chrispeels, 2003; Hampton, 2002), BiP está diretamente envolvida nessa degradação auxiliando, identificando e endereçando esses substratos para degradação (Molinari et al., 2002).

A via UPR (unfolded protein response) pode ser induzida por uma variedade de estresses abióticos e bióticos que causam o acúmulo de proteínas mal dobradas no lúmen do RE (Moreno et al., 2012; Ye et al., 2011; Liu e Howell, 2010). Além disso, agentes químicos também interferem no dobramento protéico no RE e induzem a via UPR (Patil e Walter, 2001), como por exemplo, tunicamicina que interfere na glicosilação de glicoproteínas e agentes redutores, como dithiothreitol (DTT), capaz de interferir nas ligações dissulfídicas. Em mamíferos, a sinalização da via UPR envolve três classes de transdutores ou sensores de estresse no RE (Walter e Don, 2011), IRE1, PERK e ATF6. Esses sensores quando dissociados de BiP levam a uma mudança conformacional ativando as cascatas de sinalização iniciadas por estes receptores (Oikawa et al., 2009; Shen et al., 2002). IRE1 é uma proteína transmembrana, denominada *inositol-requerin protein 1* (IRE1) com dupla função *cinase/ribonuclease* (Cox et al., 1993), o qual promove *splicing* para codificar fatores de transcrição que também disparam genes de resposta a estresse. O estresse no RE desencadeia o desligamento entre BiP e IRE1, resultando numa autofosforilação que ativa o domínio

ribonuclease (Oikawa et al. 2007; Bertolotti et al. 2000). A atividade de ribonuclease de IRE1 cliva regiões específicas do mRNA de XBP1 (*X-box-binding protein 1*) em mamíferos (Calfon et al, 2002) e Hac1p em leveduras (Kawahara et al, 1998) induzindo genes que aumentam a capacidade de processamento do RE (Lee et al., 2003; Calfon et al., 2002; Lee et al., 2002; Yoshida et al., 2001) e ao mesmo tempo diminui a tradução de proteínas (Pirot et al., 2007). Outra via de sinalização envolve *protein kinase-like ER kinase* (PERK); sob condições de estresse, BiP se dissocia de PERK, que sofre uma mudança conformacional se autofosforilando e fosforilando o fator de iniciação da tradução eIF2 α (Rutkowski e Kaufman, 2004) que, por sua vez, inibe de modo seletivo o processo de tradução de proteínas, (Harding et al., 1999), permitindo a tradução de genes responsivos ao estresse como ATF4 *Activating Transcription Factor* (Ron, 2002). ATF6 também está associada a BiP no RE; porém, em resposta ao sinal de estresse na organela, BiP se dissocia de ATF6, permitindo a translocação do receptor para o Golgi (Haze et al., 1999) onde é clivado proteoliticamente, dando origem a ATF6 α e ATF6 β . Assim, as versões truncadas de ATF6 são proteoliticamente liberadas da membrana e translocados para o núcleo, onde se ligam a elementos responsivos ao estresse no RE (ERSE-1; Yoshida et al., 2001).

Em plantas, os sensores da via UPR são análogos aqueles descritos em mamíferos e leveduras (Urade, 2007) e a caracterização molecular dessa via de sinalização citoprotetora iniciou-se com a descoberta em *Arabidopsis* de dois genes com sequências relacionadas à *IRE1*, *IRE1a* e *IRE1b* (Noh et al. 2002; Koizumi et al., 2001). bZIP60 também tem sido descrito como fator de transcrição da via UPR de plantas, cuja inativação gênica diminuiu a resposta de diversos genes alvo da via UPR (Iwata et al., 2008). Mais recentemente, foi demonstrado que o transcrito de *bZIP60* constitui o substrato para atividade de endonuclease de *Irela* e *Irelb* de *Arabidopsis* (Nagashima et al., 2011). O splicing de bZIP60 mRNA mediado por *Irelb* remove o domínio transmembrana de bZIP60 resultando na translocação de bZIP60 para o núcleo para ativar promotores alvos da via UPR. Em arroz (*Oryza sativa*) homólogos de *bZIP60*, *OsZIP74* e *OsZIP50* são ativados em resposta ao estresse do RE (Lu et al., 2012; Hayashi et al., 2011; Okushima et al., 2002), em milho foi demonstrado que o splicing de *ZmZIP60* leva à ativação de fatores de transcrição responsivos a estresse do RE (Wang et al., 2012). O genoma de *Arabidopsis* apresenta outros genes com domínio zíper de leucina (bZip) e com domínio transmembrana capazes de responder a Via UPR, como AtbZIP17, AtbZIP28 and AtbZIP49. AtbZIP28 e AtbZIP17 são similares à ATF6 de

mamíferos (Tajima et al., 2008; Liu et al., 2007; Jakoby et al., 2002) e também são translocados para o Golgi e proteoliticamente liberados da membrana em resposta a estresse no RE, em um mecanismo similar à ativação de seus homólogos de mamíferos.

Os genes responsivos à UPR em plantas apresentam em sua região promotora sequências *cis*-regulatórias conservadas, P-UPRE (*plant UPR element*) e ERSE (*ER stress response element*). Tais *cis*-elementos são reconhecidos pelos domínios zíper de leucina de bZIP60 e bZIP28, sendo, portanto, importantes na indução de genes responsivos à UPR (Tajima et al., 2008). Embora uma grande parte dos componentes da UPR em plantas não tenha sido elucidada, sabe-se que as proteínas IRE1, bZIP60, bZIP28 e BiP desempenham funções de destaque nesta cascata de sinalização (Urade, 2009; Leborgne-Castel et al., 1999).

Tem sido demonstrado que a superexpressão de BiP nas linhagens transgênicas de soja e tabaco mantém o turgor da folha em condições de seca e reprime a expressão de genes da via UPR, tais como *BiP* e *CNX* (Alvim et al., 2001; Valente et al., 2009). Uma nova via de sinalização em resposta a estresse osmótico e do RE, independente da via UPR, tem sido proposta e traduz sinais de morte celular programada (PCD; Reis et al., 2012). O modelo para esta via de sinalização preconiza que os estresses osmótico e do RE induzem de modo sinérgico a expressão do fator transcricional *GmERD15* (*Glycine max Early Responsive to Dehydration*) que, por sua vez, se liga ao promotor de *NRP-B* (Alves et al., 2011) e ativa a expressão de *N-rich proteins* (*NRP-A* e *NRP-B*) para induzir a expressão de *GmNAC6* como o efetor de morte celular (Irsigler et al., 2007; Costa et al., 2008; Pinheiro et al., 2009). Mais recentemente, foi demonstrado que *GmNAC6* interage com um novo fator de transcrição com domínio NAC, *GmNAC30*, para ativar a expressão de *VPE* (vacuolar processing enzyme) que exibe atividade de caspase 1 envolvida no processo de PCD mediado por colapso do vacúolo (Mendes, 2013, Hara-Nishimura et al., 2005). BiP atua como regulador negativo dessa via integrativa de morte celular mediada por NRPs, modulando tanto a expressão quanto a atividade de morte celular de NRPs e *GmNAC6* (Reis et al., 2011). No entanto, o mecanismo pelo qual BiP modula a via integrativa de morte celular induzida por estresses abióticos permanece para ser elucidado. Nesta investigação, o transcriptoma induzido por seca em folhas de soja superexpressando BiP foi determinado com a finalidade de se obterem informações sobre as bases moleculares pela qual BiP confere proteção contra desidratação em células vegetais.

Resultados

Potencial hídrico foliar de plantas superexpressando BiP e plantas controle expostas a um regime gradual de indução de déficit hídrico.

Plantas de soja superexpressando o gene *soyBiPD* linhagem 4 sob o controle do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (35S::BiP-4), em estágio em transição V3/V4 de desenvolvimento, foram submetidas a um regime de déficit hídrico lento, no qual a quantidade de água fornecida foi reduzida para 40% da irrigação normal, durante um período de 25 dias. O progresso do estresse hídrico imposto nas plantas transgênicas e WT foi monitorado por meio de medições periódicas do potencial hídrico (ψ_w) do terceiro trifólio emergente, medido na antemã, com Bomba Scholander (Scholander et al., 1965), até a obtenção de valores próximos a -1,6 MPa em folhas de plantas transformadas e -2,0 MPa em folhas de plantas não transformadas, selvagens (Figura 1A).

Após 19 dias de redução do suprimento diário de água, as diferenças entre plantas transformadas e não transformadas foram registradas (Figura 1B). Plantas transformadas estavam aparentemente túrgidas ($\psi_w=-0,6$ MPa) enquanto plantas WT ($\psi_w=-1,0$ MPa) apresentavam folhas murchas quando fotografadas às 10 horas da manhã. As folhas foram coletadas imediatamente após a medida do potencial hídrico, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C. O conteúdo de água foliar indicou que plantas transformadas foram mais eficientes na proteção contra desidratação e assim conduzidas para o experimento de microarranjos.

Análise dos transcriptomas induzidos por condições de déficit hídrico de folhas de soja WT e 35S::BiP-4.

Com a finalidade de entender o mecanismo pelo qual BiP confere tolerância à seca, a variação global da expressão gênica influenciada pelo acúmulo de BiP, sob condições de déficit hídrico, foi comparada com o transcriptoma induzido por seca em folhas não transformadas, sob condições similares de potencial hídrico das folhas. Assim sendo, RNAs totais de folhas de soja transformadas e não transformadas submetidas a estresse hídrico foram extraídos, o mRNA purificado e utilizado para a síntese de cDNAs e cRNAs (RNA complementar) marcados com Biotina. Chips de microarranjos, *Soybean Genome Array Affymetrix®*, foram hibridizados com cRNAs de plantas superexpressando BiP, com $\psi_w=-1,0$ e $\psi_w=-1,6$ correspondendo a 21 e 25 dias de estresse hídrico [35S::BiP-4 ($\psi_w=-1,0$) 21d e

35S::BiP-4 ($\psi_w=-1,6$) 21d], respectivamente, e plantas WT com $\psi_w=-1,0$, $\psi_w=-1,7$ e $\psi_w=-2,0$, correspondendo a 19, 23 e 25 dias de estresse, respectivamente, além de controles (35S::BiP-4 e WT) irrigados. A análise dos resultados foi realizada no ambiente de programação R/Bioconductor (Version 1.6/Version 2.6.0; Li and Wong, 2001) e a normalização de todos os tratamentos foi conduzida usando o método "Robust Multiarray Analysis" (RMA; Irizarry et al., 2003). Para uma melhor interpretação dos dados, cada um dos tratamentos foi previamente comparado com o controle irrigado [($\psi_w=-1,0$) 21d/WT irrigado e 35S::BiP-4 ($\psi_w=-1,6$) 21d/WT irrigado; WT($\psi_w=-1,0$) 19d/WT irrigado, WT($\psi_w=-1,7$) 23d/WT irrigado e WT($\psi_w=-2,0$) 25d/WT irrigado], eliminando assim genes com expressão semelhante entre plantas sob déficit hídrico e sob irrigação. A qualidade dos resultados de microarranjos foi avaliada por meio de MA *plots* (Figura 2A).

Com o objetivo de obter grupos de genes diferencialmente expressos, foram usados os seguintes critérios: p-value <0,05 e log2 (Fold change) >1,5 para genes induzidos (regulados positivamente) e <-1,5 para genes reprimidos (regulados negativamente). O número de genes diferencialmente expressos aumentou de acordo com a severidade do estresse imposto, sendo que plantas transformadas claramente apresentaram um número de genes diferencialmente expressos bem menor quando comparado as com plantas WT (Figura 2B). Quando comparados sob mesmo potencial hídrico (-1,0 Mpa), plantas WT apresentaram 4049 genes diferencialmente expressos enquanto plantas transformadas apresentaram apenas 542 genes. Este cenário não persistiu com o progresso do estresse, já que ao se comparar o transcriptoma induzido pelo potencial hídrico de -1,6 Mpa (folhas transgênicas) e -1,7 Mpa (folhas controles) o número de genes diferencialmente expressos em folhas transgênicas (4225), foi ligeiramente superior em relação à WT (3719). Coletivamente, estes resultados indicaram que a superexpressão de BiP não somente atrasa (19d x 21d) mas também atenua o estado de estresse imposto pelo mesmo nível de desidratação foliar, já que em condições de $\psi_w=-1,0$ a amplitude de variação global de expressão gênica foi muito inferior em folhas transgênicas do que em plantas controle. Estes resultados são consistentes com observações prévias de que plantas transgênicas apresentam sintomas de estresse atenuados quando submetidos a uma diminuição do suprimento diário de água ou indutores de estresse osmótico (Alvim et al., 2001; Irsigler et al., 2007; Valente et al., 2009; Reis et al., 2011).

O déficit hídrico induz uma complexa rede de respostas em plantas, iniciando com a percepção do estresse e desencadeando eventos moleculares, que causam respostas

fisiológicas, metabólicas e de desenvolvimento para aumentar as defesas contra as condições de estresse. Para facilitar a compreensão dos resultados, os genes diferencialmente expressos foram agrupados em categorias baseadas em processos biológicos via Gene Ontology (<http://amigo.geneontology.org/>) de maneira sistemática, sendo que algumas categorias foram condensadas para permitir a visualização em gráficos. (Figura 3). A divisão em grupos permitiu uma visão geral das funções biológicas dos genes diferencialmente expressos em todos os tratamentos.

No grupo “metabolismo de aminoácidos” prevaleceu uma proporção maior de genes regulados negativamente. Os resultados são similares entre WT($\psi_w=-1,0$)19d, WT($\psi_w - 1,7$)23d e WT($\psi_w - 2,0$)25d (Figuras 3A, 3C, 3E e Figura S1). Estes resultados indicam que o estresse imposto no nível de desidratação $\psi_w=-1,0$ já é suficiente para alterar eficientemente o metabolismo de aminoácidos em folhas de plantas selvagens. Em contraste, o número de genes diferencialmente expressos em folhas de plantas transformadas (35S::BiP-4) ao $\psi_w=-1,0$ foi muito inferior (apenas 3; Figura 3B). Pode-se verificar que processos biológicos e metabólicos englobam um conjunto de genes que desempenham vários papéis no metabolismo da planta e, por isso, o *Gene Ontology* com sua redundância não define uma subcategoria específica. De um modo geral, foi observado, nesta categoria, um número de genes diferencialmente expressos muito superior em plantas WT's do que em linhagens 35S::Bip-4 (Figura 3B e 3C), indicando que plantas transformadas mantêm em níveis normais o seu metabolismo basal, sob condições de estresse moderado ($\psi_w=-1,0$). O perfil de expressão de genes relacionados a metabolismo de carboidratos e genes relacionados ao metabolismo de lipídeos seguiu o mesmo comportamento descrito anteriormente (Figura 3), com maior abundância de genes regulados negativamente em plantas WT, o que reforça o argumento de que BiP protege as células vegetais contra estresse imposto por desidratação foliar. Os genes regulados positivamente relacionam-se em sua maioria com quebra de oligossacarídeos e ácidos graxos, enquanto genes relacionados à síntese de polissacarídeos e carboidratos de parede foram regulados negativamente.

O número de genes envolvidos em processos catabólicos é muito superior em WT(-2,0)25d do que em todos os outros tratamentos (Figura 3E). Nesse potencial hídrico, o número de genes regulados positivamente (55) se tornou maior do que regulados negativamente (27) (Figura S1). O contrário ocorreu em plantas WT(1,0)21d e WT(1,73)23d nas quais predominaram genes regulados negativamente nessa categoria (Figura S1). Em

plantas transformadas, apenas 6 genes foram diferencialmente expressos em 35S::BiP(-1,0)21d (Figura 3B), enquanto esse número sobe para 40 em 35S::BiP(-1,6)23d (Figura 3D) e 82 genes em WT (2,0)25d (Figura 3E).

Um número menor de genes diferencialmente expressos foi relacionado a ciclo celular e divisão, chegando ao máximo de 31 em WT(-2,0)25d (Figura 3E) e 19 em 35S::BiP(-1,6)25d (Figura 3D), enquanto apenas um gene foi reprimido em 35S::BiP(-1,0)21d (Figura 3B). Dentre os principais genes diferencialmente expressos, estão vários tipos de ciclinas envolvidas na regulação da fase G1 da mitose. Genes relacionados a desenvolvimento também foram diferencialmente expressos e, à medida que se aumenta a severidade do estresse, o número de genes regulados positivamente aumenta em relação aos regulados negativamente (Figura S1). Foi observado ainda que em plantas 35S::BiP(-1,0)21d esse número de genes é menor em relação a WT(-1,0), seguindo o mesmo perfil das demais categorias (Figura 3) e evidenciando novamente a menor variação na expressão de genes em plantas transgênicas imposta pelo regime de déficit hídrico. Dentre esses genes, destacam-se aqueles relacionados à germinação do pólen, regulação de crescimento e diferenciação celular.

O grupo de genes relacionados à morte celular, proteólise ou senescência também apresentou o mesmo comportamento das demais categorias, mostrando um maior número de genes regulados positivamente com a persistência do estresse (Figura 3 e S1). Dentre os genes regulados positivamente, destaca-se em plantas WT, as proteínas ricas em asparaginas (*N-rich protein*, NPR, Glyma20g16100), envolvidas na transdução de sinais de morte celular induzido por seca. Consistente com a função de BiP como regulador negativo da via de sinalização de morte celular mediada pelas NRPs (Reis et al., 2011), foi observada a indução de *N-rich protein* em plantas WT aos 23 e 25 dias de estresse e em plantas transformadas somente aos 25 dias, com valores de expressão ligeiramente menores.

Foi verificado um aumento de genes regulados positivamente e diminuição de genes reprimidos relacionados à DNA/RNA (Figura 3 e Figura S1). Dentre esses genes regulados positivamente, estão genes relacionados a mecanismos de reparo, duplicação e transcrição. A categoria funcional de defesa ou resposta a estímulo biótico apresentou uma quantidade crescente de genes diferencialmente expressos com o prolongamento do estresse (Figura 3 and Figura S1), predominando genes regulados negativamente em plantas WT e 35S::BiP(-

1,6)25d (Figura S1). Em contraste, plantas transformadas 35S::BiP(-1,0)21d apresentaram uma predominância de genes de resposta a estresse biótico regulados positivamente (Figura S1). Genes relacionados à energia que atuam na síntese de ATP e transporte de cátions apresentaram pouca variação ao longo dos tratamentos sendo observada uma variação mínima em 35S::BiP(1,0)21d (Figura 3B).

Observa-se ainda um aumento do número de genes diferencialmente expressos que respondem ou participam da síntese de certos hormônios em plantas prevalecendo uma maior quantidade de genes regulados negativamente (Figuras 3A, 3C, 3E e Figura S1), sendo que a imposição do estresse promoveu um aumento de genes regulados positivamente em plantas transformadas (Figura S1). O número de genes regulados negativamente relacionados à fotossíntese aumenta com a severidade do estresse hídrico tanto em plantas WT quanto em plantas transformadas, porém esse número é muito inferior em plantas transformadas submetidas a déficit hídrico, principalmente em 35S::BiP-4($\psi_w=-1,0$)21d (Figura 3B e Figura S1). Estes resultados são consistentes com o mecanismo pelo qual BiP confere tolerância a déficit hídrico (Alvim et al., 2001; Valente et al., 2009). Em plantas transgênicas expostas à seca, o declínio da taxa fotossintética com o progresso do estresse é muito inferior do que em plantas selvagens submetidas ao mesmo regime de desidratação. Genes relacionados a processos que modificam proteínas, como por exemplo, fosforilação, miristoilação, ubiquitinação e defosforilação foram predominantemente reprimidos pelas condições de déficit hídrico. O grupo fatores de transcrição foi representado por grande número de genes diferencialmente expressos, principalmente em plantas WT's (Figura 3), sendo que, em plantas transgênicas 35S::BiP-4(-1,0), predominaram genes regulados positivamente (Figura S1). Foi verificado a presença de representantes de várias famílias de fatores de transcrição, envolvidos nos mais diferentes processos celulares e de resposta a estresses, como por exemplo, NACs MYBs, bZIPs, bHLH e WRKY.

Entre os genes diferencialmente expressos em todos os tratamentos, houve uma clara predominância da categoria de genes responsivos a estímulos abióticos. Nesta categoria, o número de genes diferencialmente expressos aumentou significativamente à medida que o estresse se prolongou (Figura 3), mantendo uma proporção aproximadamente igual de genes regulados positivamente e negativamente em cada tratamento, exceto para plantas transgênicas 35S::BiP($\psi_w=-1,6$)25d, onde o número de genes induzidos foi maior do que os reprimidos (Figura S1). Nesta categoria, foram incluídos genes que respondem a frio,

aquecimento, luz, estresse oxidativo, além de genes de defesa como HSP's, proteínas LEA, peroxidases, inibidores de proteases e desidrinas. As demais categorias, sinalização, estrutural e tradução, apresentaram um perfil de expressão similar, com um número superior de genes regulados negativamente em plantas WT e um número inferior de genes diferencialmente expressos em plantas 35S::BiP-4 (Figura S1). E por fim, a maioria de genes relacionados a transporte em plantas WT foram reprimidos, mas se tornaram regulados positivamente em estádios mais avançados de estresse. Nas plantas transformadas, independente do nível de estresse, a maioria desses genes foi regulada positivamente como, por exemplo, transportadores de açúcar, nitrato e aminoácidos.

Identificação de genes exclusivos e comuns entre plantas WT's e 35S::BiP-4 submetidas a déficit hídrico.

Genes diferencialmente expressos obtidos nos tratamentos em relação ao controle (WT irrigado) foram submetidos a análises por meio do diagrama de Venn, com objetivo de identificar exclusividades e sobreposição de genes entre duas comparações. Uma vez que superexpressão de BiP parece aliviar o estado de estresse imposto por desidratação, as comparações dos transcriptomas induzidos por déficit hídrico entre WT e 35S::BiP-4 foram conduzidas observando os níveis similares de potencial hídrico foliar. Assim sendo, foram comparadas plantas WT($\psi_w=-1,0$) x 35S::BiP-4($\psi_w=-1,0$) e WT($\psi_w=-1,7$) x 35S::BiP-4($\psi_w=-1,6$) (Figure 4). A comparação WT($\psi_w=-1,0$)x35S::BiP-4($\psi_w=-1,0$) resultou em 126 e 349 genes regulados positivamente e negativamente, respectivamente, comuns a ambos os tratamentos, 1213 genes induzidos e 2361 reprimidos, presentes somente em plantas WT($\psi_w=-1,0$), enquanto um número muito menor de genes diferencialmente expressos foi verificado exclusivamente em plantas transformadas no nível de $\psi_w=-1,0$, apenas 134 foram induzidos e 63 reprimidos (Figura 4A). Esses genes foram agrupados em categorias e apresentadas na Figura 4B e Tabelas S1-S6.

Exclusivos em plantas WT ($\psi_w=-1,0$), foram verificados, no grupo de metabolismo de aminoácidos, 22 genes regulados positivamente envolvidos tanto em processos biossintéticos quanto catabólicos e 57 genes regulados negativamente, predominando uma repressão de 41 genes relacionados à biossíntese dessas moléculas (Figura 4C; Tabelas S2 e S4). Nessas plantas o número de genes diferencialmente expressos relacionados ao metabolismo de carboidratos também foi bastante alterado pela imposição do estresse hídrico. 34 genes foram

induzidos, sendo que a maioria (23) está relacionados a processos catabólicos como, por exemplo, hidrólise de oligossacarídeos e 88 genes foram reprimidos envolvidos tanto a biossíntese quanto quebra dessas moléculas (Figura 4C). Essa indução também foi observada no grupo de genes relacionados à morte celular e proteólise. Durante o estresse, sob potencial hídrico de -1,0, plantas WT apresentaram uma maior proporção de genes reprimidos (70) do que induzidos (27). Esses resultados indicam que mesmo sob déficit hídrico plantas tipo selvagem tentam reduzir a expressão de genes relacionados a processos catabólicos e morte celular a fim de garantir a sobrevivência ao estresse.

Plantas transformadas 35S::BiP-4 submetidas ao mesmo potencial hídrico (-1,0) apresentaram alteração insignificante de genes diferencialmente expressos relacionados ao metabolismo de aminoácidos (Figura 4C). Além disso, nas linhagens transgênicas, foi observada uma ligeira alteração em genes do metabolismo de carboidratos com um predomínio de genes relacionados a processos biossintéticos (5 dentre 8) envolvidos no formação de sacarose e amido e uma variação mínima de genes relacionados a morte celular e proteólise, apenas 1 induzido e 3 reprimidos (Figura 4C). Entre os genes regulados positivamente e exclusivos em WT observa-se *CASP-like protein 3* (Glyma13g01100); *CASP-like protein 8* (Glyma07g38110), *CASP-like protein 10-like* (Glyma11g33030), *Cysteine proteinase* (Glyma10g35100), entre outros; informações detalhadas sobre esses genes como valores de expressão e valores de p podem ser observados na Tabela S2. Destaca-se ainda como exclusivamente reprimido em plantas transformadas, o gene *vacuolar processing enzyme 2* (Glyma14g10620), importante mediador de morte celular programada em plantas (Hara-Nishimura et al., 2005). Estes resultados estão de acordo com a função de BiP como um regulador negativo de vias de morte celular em plantas (Reis et al., 2011) inclusive sob condições de estresse hídrico (Valente et al., 2009).

No nível de estresse com $\psi_w=-1,0$, plantas WT apresentaram uma grande alteração no número de genes envolvidos na resposta a estresse biótico, 17 genes regulados positivamente e 63 negativamente, enquanto que, em plantas transformadas, apenas 6 foram induzidos e 17 reprimidos (Figura 4C). Verifica-se ainda que uma grande quantidade de genes relacionados a hormônios foi diferencialmente expressa em plantas WT's sendo 38 induzidos e 93 reprimidos (Figura 4C). Entre os induzidos em WT, a maioria está relacionada à biossíntese e resposta a ácido abscísico (12), resposta e carreamento de auxinas (10) e etileno (11), listados na tabela S2. Entre os reprimidos a maioria está relacionada a receptores e resposta a ácido

abscísico (9), genes responsivos e induzidos por auxinas (32), sinalização mediada por brassinosteróides (9), síntese e fatores responsivos a etileno (20), biossíntese de giberelinas (4) e ácido jasmônico (19) (Tabela S2, S4). Na linhagem 35S::BiP-4, apenas 8 genes foram induzidos e 8 reprimidos relacionados a esses hormônios (Figura 4C). Entre os induzidos em plantas transgênicas, a maioria corresponde a receptores de ácido abscísico (4), além de genes que respondem a auxinas (2) (Tabela 1). Entre os genes reprimidos em plantas transgênicas, foram observado genes relacionados à biossíntese de ácido jasmônico (3), auxinas (2), regulados por giberelinas (2) e ácido jasmônico/ ácido salicílico (1).

Um grande número de fatores de transcrição ou reguladores de fatores de transcrição se apresentou diferencialmente expressos principalmente em plantas selvagens. Foram induzidos 86 e 4 genes em plantas WT e transgênicas, respectivamente, além de 151 e 3 genes reprimidos em WT e transgênicas, respectivamente (Figura 4C). Entre esses genes, podem ser observadas diversas famílias de fatores de transcrição do tipo bZIP, WRKY, MYB, bHLH e NAC envolvidos nas mais diversas respostas a estresse abiótico. Foi verificado nesse grupo a indução em WT de *GmNAC2* (Glyma06g11970), conhecido por sua resposta à seca (Irsigler et al., 2007) e *GmNAC3* (Glyma06g38410), fortemente induzido por estresse osmótico (Pinheiro et al., 2009). Assim como fatores de transcrição genes responsivos a estímulo abiótico apresentaram a mesma tendência de distribuição no qual um grande número de genes foram induzidos e reprimidos exclusivamente em plantas WT (185 e 248 respectivamente), enquanto plantas transformadas apresentaram 21 induzidos e 12 reprimidos (Figura 4C). Dentre esses genes, podem ser observados genes que respondem diretamente a limitação de água, calor, estresse oxidativo, íons, ritmo circadiano e ultra violeta, como chaperones moleculares e outras proteínas de choque térmico. Em conjunto, esses resultados mostram que num potencial hídrico de -1,0 plantas selvagens e transgênicas apresentam um mecanismo regulatório completamente diferente no qual plantas WTs apresentam a maioria dos seus genes reprimidos diante o estresse enquanto plantas transgênicas exibem uma variação da expressão gênica muito menor, garantindo uma manutenção da homeostase a níveis próximos dos normais por um período de tempo maior.

Com o aumento da severidade do déficit hídrico, ocorreu um aumento considerável do número de genes diferencialmente expressos comuns a plantas transformadas e não transformadas acompanhado de uma diminuição da quantidade de genes exclusivos em WT e um aumento do número de genes exclusivos em plantas transgênicas (Figura 4). Foram

comparados plantas WT($\psi_w=-1,7$)-WTirr x 35S::BiP-4($\psi_w=-1,6$)-WTirr e detectados 1257 e 1697 genes regulados positiva e negativamente, respectivamente, em ambos os tratamentos (Figura 4B). Os genes exclusivos em cada tratamento incluíram 283 genes positivos e 483 negativos presentes somente em plantas WT ($\psi_w=-1,7$), 882 induzidos e 389 reprimidos na planta transformada ($\psi_w=-1,6$). Esses genes foram agrupados em categorias (Tabelas S5-S8) e o número de genes em cada uma delas apresentados na Figura 4C. Estes resultados indicam que em potenciais hídricos mais baixos o nível de estresse em plantas transgênicas se aproxima de plantas WT. Dentro de cada grupo formado foi verificado que a maioria dos genes foi regulada negativamente em plantas WT ($\psi_w=-1,7$) e positivamente em plantas transgênicas (Figura 4C).

Verifica-se nesse montante que apenas 10 genes relacionados a hormônios foram regulados positivamente em plantas WT($\psi_w=-1,7$), envolvidos com ácido abscísico (1), auxinas (1), etileno (5) e giberelinas (1), enquanto que 25 genes foram regulados negativamente, envolvidos com ácido abscísico (4), ácido jasmônico (6), auxinas (10), etileno (2) e giberelinas (2). Assim esses resultados mostram o aumento na expressão de genes relacionados a etileno e uma diminuição na expressão de genes relacionados a auxinas em plantas WT. De modo contrário, foram regulados positivamente em plantas transgênicas 35 genes (Figura 4C) envolvidos com biossíntese e resposta a ácido abscísico (5), biossíntese de ácido jasmônico (8), estímulo promovido por auxinas (11), sinalização e regulação de etileno (7) e giberelinas (4), dentre os regulados negativamente foram observados apenas 16 genes, envolvidos na biossíntese de ácido jasmônico (4), resposta a auxina (6), etileno (3) e giberelinas (3).

No grupo fatores de transcrição, foi observado uma quantidade pequena de genes induzidos positivamente (16) e negativamente (23) em WT(-1,7) e de uma quantidade maior em plantas transformadas (-1,6), no qual 54 foram regulados positivamente e 26 regulados negativamente (Figura 4C, Tabelas S5-8). Entre esses fatores de transcrição, foi observado em plantas transgênicas a regulação negativa de *GmNAC6* (Glyma12g02540), mediador da morte celular induzida por estresses (Irsigler et al., 2007; Costa et al., 2008; Pinheiro et al., 2009). Outra categoria que merece destaque são genes que respondem a estresse abiótico, nos quais foi observado um quantidade semelhante de genes induzidos (53) e reprimidos (56) em plantas WT(-1,7) (Figura 4C). Em plantas transformadas, foram verificados 120 genes regulados positivamente e 48 genes regulados negativamente (Figura 4C). Este perfil de genes

diferencialmente expressos em 35S::BiP-4, demonstra que, sob baixo potencial hídrico, plantas transformadas aumentam a expressão de genes que ajudam na sobrevivência sob seca, estresse oxidativo, salinidade, aquecimento e hipóxia a fim de minimizar fatores que interferem no metabolismo da planta. Conseqüentemente, a indução do nível de estresse em 35S::BiP-4 sob potencial hídrico -1.6 se aproxima daquele induzido em WT, -1.0., reforçando o argumento de que superexpressão de BiP mantém a homeostase celular sob condições de déficit hídrico.

Expressão diferencial de genes envolvidos na resposta a estresse em plantas.

Com o objetivo de verificar a variação global da resposta de genes influenciados pela seca foi utilizado o *gene ontology* associado com Glyma (www.phytozome.com) para selecionar genes em diferentes categorias funcionais e gerar *heatmaps* com valores absolutos de expressão obtidos nos ensaios de hibridizações de microarranjos. Foram examinados genes da via de resposta a proteínas mal dobradas (UPR), genes de degradação associada ao RE (ERAD), genes relacionados à morte celular e genes responsivos a estresse hídrico que puderam ser identificados nos microarranjos. As figuras mostram a expressão absoluta nos microarranjos e permitem ter uma melhor visão do comportamento de um determinado grupo de genes em cada tratamento e com isso possibilitando ainda a comparação entre os chips hibridizados.

Ao analisarmos genes da via UPR, plantas WTs (irrigadas e estressadas) se agruparam num mesmo ramo do *heatmap* enquanto plantas transformadas (irrigadas e estressadas) foram separadas em grupos diferentes. O acúmulo de transcritos correspondentes ao transgene-BiP é evidente nas plantas transformadas (Figura 5). Uma inspeção mais detalhada demonstra a tendência à regulação negativa dos residentes do RE (CNX e CRT) em plantas transformadas com potencial hídrico ($\psi_w = -1,6$). Em plantas WT com baixo potencial hídrico, foi observado uma tendência à regulação positiva dos homólogos de bZip28 e S1P, indicando uma possível ativação da Via UPR. Estes resultados foram confirmados por qRT-PCR (Figure 9A-E). Examinando genes relacionados à degradação associada ao RE (ERAD), destaca-se o grupo formado por plantas irrigadas WTs e 35S::BiP-4, sob potencial hídrico -1.0 e -1.6 (Figura 6), predominando uma tendência à diminuição da expressão desses genes como, por exemplo, HSP's, ATP'ases, SecY, dentre outros. Algumas HSP's foram reguladas positivamente, provavelmente devido ao fato de HSP's responderem a condições adversas além de

participarem da ERAD. Um comportamento próximo a plantas irrigadas foi observado nas plantas 35S::BiP-4($\psi_w=-1,0$)21d, que apresentaram uma distribuição semelhante aos controles. À medida que o estresse se agravou, os genes reprimidos apresentaram uma tendência a se tornarem regulados positivamente, em especial em plantas WT(-2,0)25d. Verificou-se ainda que aqueles genes HSP's e Rad23 regulados positivamente em plantas controles mostraram uma tendência à regulação negativa quando o estresse foi mais severo.

Reforçando esses resultados genes relacionados a estresse hídrico mostraram um mesmo comportamento que genes da via ERAD, no qual plantas irrigadas se agruparam mostrando uma maior quantidade de genes com tendência à regulação negativa (DREB2A, ERD15, ERD4, fosfatases e proteínas LEA) e um grupo menor de genes com tendência à regulação positiva (proteínas LEA, proteínas induzidas por desidratação, aldeído desidrogenase) (Figura 7). À medida que o estresse se prolonga, o comportamento desses genes se inverte, ou seja, ocorre uma ativação da maioria das proteínas LEA e dos outros fatores responsivos ao estresse abiótico. Nota-se ainda a proximidade do transcriptoma em plantas 35S::BiP-4(-1,0)21d com plantas não estressadas, reforçando a ideia de um “menor” estresse em plantas transformadas submetidas a déficit hídrico. Genes relacionados a eventos de morte celular ou proteólise seguiram essa mesma tendência de formação de grupos apresentados anteriormente, no qual plantas irrigadas e plantas transformadas 35S::BiP-4($\psi_w=-1,0$)21 se agrupam num mesmo ramo e genes induzidos e reprimidos invertem o seu comportamento quando o estresse é imposto. Percebe-se ainda a ligeira tendência no aumento da expressão desses genes em plantas WT ($\psi_w=-2,0$) (Figura 8). Coletivamente, estes resultados indicam que expressão ectópica de BiP previne o estabelecimento de estresse endógeno nas células vegetais induzido por baixos potenciais hídrico das folhas, uma vez que o transcriptoma de folhas superexpressando BiP a $\psi_w=-1,0$ se assemelha ao transcriptoma de folhas controle sob irrigação normal.

A indução de genes típicos que respondem à seca e que presumivelmente protegem as células vegetais contra desidratação somente ocorre em plantas transgênicas em potenciais hídricos muito baixos ($\psi_w=-1,6$) em um nível de indução muito inferior às plantas controle sob condições similares de desidratação. Entretanto, não é surpresa o fato de que a expressão de genes da via UPR, de genes envolvidos em ERAD e de genes relacionados com morte celular programada seguirem o mesmo comportamento dos genes responsivos à seca, uma vez que tem sido demonstrado que altos níveis de BiP inibem a ativação da via UPR e atenuam o

processo de morte celular induzido por seca (Costa et al., 2008; Leborgne-Castel et al., 1999; Valente et al., 2009; Reis et al., 2011).

Foi observado ainda por meio de *heatmaps* que genes relacionados a hormônios vegetais (auxina, ABA, brassinosteróides, citocininas, etileno, giberelinas, ácido jasmônico e ácido salicílico) apresentaram o mesmo padrão de agrupamento descrito anteriormente, no qual plantas controle se agrupam num ramo enquanto plantas estressadas vão se distanciando desse ramo à medida que o potencial hídrico diminui. Além disso, plantas transformadas ($\psi_w=-1,0$) permaneceram sempre mais próximas do grupo controle e plantas WT ($\psi_w=-2,0$) sempre apareceram mais distantes desse grupo (Figuras S2-S5).

Expressão diferencial de genes envolvidos na resposta a estresse em plantas e morte celular por PCR em tempo real.

A tendência de expressão diferencial observada nos *heatmaps* de genes responsivos a estresses foi confirmada por qRT-PCR. A análise da expressão gênica por qRT-PCR confirmou o acúmulo de altos níveis do transcrito do transgene *soyBiPD* em plantas transgênicas (Figura 5, Figura 9A). Além disso, os genes marcadores da UPR, como CNX e três homólogos de Ire1, foram induzidos com o declínio do potencial hídrico foliar em plantas WT (Figures 9B, 9C, 9D e 9E). Entretanto, expressão ectópica de BiP resultou na repressão da indução por seca de genes marcadores da UPR, uma vez que os níveis de transcritos dos genes marcadores da UPR foram sempre inferiores em plantas transgênicas comparadas com WT no mesmo *status* de potencial hídrico foliar (Figura 5, Figures 9B, 9C, 9D e). Estes resultados demonstram que estresse por desidratação gradual lenta induz a via UPR em WT e que, nestas condições, superexpressão de BiP impacta negativamente a indução da via UPR. Uma amostragem de genes responsivos à seca como glutathiona-S-transferase (GST; Irsigler et al., 2007), seed maturation protein (SMP; Irsigler et al., 2007), NAC2 (Irsigler et al., 2007) e NAC3 (Costa et al., 2008) foram examinados por qRT-PCR. Consistente com os dados de microarranjos (Tabela S2) e observações prévias (Irsigler et al, 2007), a exposição de plantas WT a deficit hídrico induziu a expressão dos genes representativos da categoria de genes responsivos à seca (Figures 9F, 9G, 9H, 9I). Entretanto, na linhagem 35S::BiP-4, a indução desses genes por seca foi extremamente modesta, confirmando os dados de variação global de expressão gênica que revelam que BiP previne o estabelecimento de estresse endógeno sob condições de desidratação.

Uma vez que BiP exerce um papel regulador da via de sinalização de morte celular induzida por estresse osmótico e estresse hídrico (Reis et al., 2011), foi de nosso interesse confirmar por qRT-PCR os resultados de microarranjo em diferentes condições de potencial hídrico foliar. Dessa forma foi avaliada a expressão de componentes dessa via de sinalização celular, como NRP-A e NRP-B (Costa et al., 2008), NAC6 (Pinheiro et al., 2009) e VPE (Mendes, 2013), em resposta ao déficit hídrico gradual. Em WT, o declínio do potencial hídrico foliar para -1,0 ou -1,7, em WT, induziu a expressão dos genes NRP-A, NRP-B, GmNAC6 e o gene Glyma14g10620, homólogo da VPE (Figure 9J, 9K, 9L, 9N), sendo que os outros dois genes homólogos da VPE não foram induzidos por seca. Entretanto, na linhagem 35S::BiP-4, os genes envolvidos na via integrativa de morte celular mediada por proteínas NRPs foram reprimidos com o declínio do potencial hídrico para -1.0 e modestamente induzido em -1.6, confirmando que BiP atua como regulador negativo da referida via de sinalização, conforme demonstrado anteriormente (Costa et al., 2008; Reis et al., 2011). A repressão do transcrito Glyma14g10620 em plantas 35S::BiP-4 (-1,0) foi também detectada nos resultados de microarranjos que também confirmaram que a expressão dos outros dois genes homólogos da VPE (Glyma04g05250 e Glyma17g34900) não diferiram na planta selvagem em diferentes potenciais hídricos (Tabela S3).

Discussão

Maiores níveis de BiP mantém a homeostase celular sob condições de déficit hídrico

Tem sido demonstrado que a superexpressão do gene *soyBiPD* confere tolerância à seca em tabaco (Alvim, et al., 2001) e, mais recentemente, em soja (Valente et al., 2009). Além de melhor eficiência fotossintética, a manutenção de turgescência foliar é prolongada em plantas superexpressando BiP quando comparada com folhas de plantas selvagens expostas a um mesmo regime de déficit hídrico. Com a finalidade de determinar se o mecanismo pelo qual BiP protege as plantas contra desidratação está associado ao atraso no declínio de potencial hídrico foliar ou em prevenção ao estabelecimento de estresse endógeno, o transcriptoma induzido por um regime de déficit hídrico gradual foi avaliado em plantas superexpressando BiP e em plantas selvagens em níveis similares de potencial hídrico foliar. Conforme observado previamente, a exposição de plantas de soja a um estresse hídrico gradual causou uma diminuição mais lenta do potencial hídrico foliar em plantas

transformadas do que em WT, mantendo as folhas túrgidas por um período maior (Figura 1A e 1B). A análise da variação global da expressão gênica em plantas selvagens claramente demonstrou que um declínio do potencial hídrico foliar para -1.0 já é suficiente para promover uma extensiva reprogramação gênica em resposta à seca. Estes resultados indicam que o $\psi_w = -1,0$ induz um estado de estresse em células foliares que eficientemente acionam um sistema sensor para ativar respostas típicas a estresses por desidratação. Este estado de estresse é refletido diretamente pelo grande número de genes diferencialmente expressos, que se manteve crescente à medida que o potencial hídrico diminuiu com consequente aumento do nível de estresse endógeno (Figure 2B). Uma grande variação no número de genes diferencialmente expressos também foi identificado por Le et al., (2012) na comparação de folhas de soja em estádios V6 e VE, submetidas a déficit hídrico. Em contraste, plantas transformadas submetidas a estresse hídrico correspondente a $\psi_w = -1,0$ apresentaram um número consideravelmente menor de genes diferencialmente expressos. Estes resultados indicam que a superexpressão de BiP parece prevenir a maioria das variações gênicas, garantido uma manutenção da homeostase por um período maior de tempo quando comparado a plantas WTs.

Resultados semelhantes na manutenção da homeostase do RE promovida por BiP foram previamente demonstrados, em estudos de superexpressão do chaperone molecular em tabaco (Alvim et al., 2001; Leborgne-Castel et al., 1999) e células de mamíferos (Morris et al., 1997), os quais demonstraram que níveis elevados de BiP atenuam o estresse no RE imposto por acúmulo de proteínas mal dobradas no lúmen da organela. De modo similar, tem sido comprovado que a superexpressão de BiP em plantas de soja e de tabaco confere tolerância a condições de déficit hídrico, mas não aciona os mecanismos típicos de “avoidance” e/ou de tolerância à seca. De fato, foi observado que a melhoria das relações hídricas foliares mediada por BiP não está associada à indução de fechamento do estômato, redução de fotossíntese e transpiração (Alvim et al., 2001; Valente et al., 2009), nem tampouco ao aumento de osmólitos na folha ou indução de crescimento de raízes (Valente et al., 2009). Similarmente, o nível de indução de genes típicos responsivos à seca é muito inferior em plantas superexpressando BiP comparado a plantas selvagens (Valente et al., 2009). Provavelmente, a atenuação de respostas típicas elicítadas por seca reflete uma menor intensidade de estresse endógeno em plantas superexpressando BiP, indicando que BiP mantém a homeostase celular nestas condições. Assim os resultados dessa investigação,

baseados na análise de variação global de expressão gênica, fornecem evidências adicionais para a capacidade de BiP em prevenir o estabelecimento de estresse osmótico induzido por seca.

Além de se observar uma menor variação de expressão gênica induzida por seca em plantas transgênicas a $\psi_w = -1,0$, a comparação global de sequências expressas de genes responsivos a estresse abiótico entre plantas transgênicas e WT em diferentes potenciais hídricos revelou que o transcriptoma das plantas transgênicas submetidas a déficit hídrico se aproxima mais daquele apresentado por WT irrigado, uma vez que eles se agrupam em um mesmo ramo do *heat map* (Figura 7). Em contraste, o transcriptoma obtido de plantas WT submetidas a diferentes níveis de estresse por déficit hídrico divergem consideravelmente do transcriptoma de WT irrigado, uma vez que eles se agrupam em ramos distantes e separados. Nestes casos, observa-se uma relação direta entre o nível de estresse foliar ($\psi_w = -1,0, -1,7$ e $-2,0$) e a distância entre os *clusters* em que se agrupam os transcriptomas induzidos por seca e o transcriptoma de WT irrigado. Estes resultados de expressão absoluta são consistentes com os dados de expressão diferencial de genes responsivos a estresse abiótico, os quais confirmam um maior número de genes bem como um maior nível de acúmulo desses transcritos à medida que o estresse endógeno aumenta em plantas WT. Em contraste, em plantas transgênicas a $\psi_w = -1,0$, a variação de expressão de genes nesse grupo é muito inferior ao de plantas WT no mesmo nível de estresse endógeno, reforçando o argumento de que BiP alivia o estresse imposto por desidratação através da manutenção da homeostase celular.

Os *heatmaps* de diferentes categorias de genes envolvidos na sinalização e síntese de hormônios vegetais confirmaram a tendência de um comportamento parecido em plantas transformadas e selvagens irrigadas, visto que sempre se agruparam num mesmo ramo, enquanto plantas submetidas a estresse se distanciam desses controles à medida que o estresse se prolonga (Figuras 4-8). Ficou claro que plantas transformadas (35S::BiP-4 $\psi_w = -1,0$), apresentam uma variação muito menor na expressão gênica do que plantas WT's e 35S::BiP-4 ($\psi_w = -1,6$). Coletivamente esses resultados demonstram a capacidade de plantas transgênicas em tolerar o estresse hídrico por um período de tempo maior e sugerem que BiP protege as células vegetais contra seca mantendo a homeostase celular sob condições de desidratação e, consequentemente, diminuindo os sintomas do estresse.

À medida que o estresse aumentou, verificamos que o número de genes comuns aos dois tratamentos também aumentou (Figura 4A). Foi observado um número menor de genes induzidos exclusivamente em plantas WT, provavelmente devido à severidade do estresse, destacando-se genes relacionados a estímulo biótico e alguns relacionados a hormônios, principalmente elementos de resposta a etileno. Etileno é considerado um importante fitohormônio que dispara uma variedade de reações fisiológicas envolvidas em processos de desenvolvimento e estresse ambiental (Bleecker and Kende; 2000) e sua síntese é também induzida em resposta à seca, ferimento, e defesa contra patógenos (Wang et al, 2010). Porém há uma predominância de outros genes reprimidos relacionados à resposta e biossíntese de auxinas (Figura 4). Em contrapartida, ocorreu um aumento de genes regulados positivamente em plantas transformadas ($\psi_w=-1,6$), sendo estes relacionados à defesa, etileno, ácido jasmônico, giberelinas e auxinas, fatores de transcrição WRKY e MYB, indicando que plantas transgênicas ativam os mecanismos de resposta à seca mais tardiamente do que plantas WT submetidas a valores próximos de potenciais hídricos. Assim um número significativo de genes responde ao estresse por seca de maneira diferente em plantas superexpressando BiP. Por ser uma chaperona molecular residente no retículo endoplasmático, BiP parece garantir um bom funcionamento dessa organela por mais tempo perante uma situação de estresse, mantendo a homeostase da via secretória.

BiP atenua expressão de executores de morte celular programada induzida por seca.

O diagrama de Venn (Figura 4) revelou que existe um predomínio de genes diferencialmente expressos em plantas WT ($\psi_w=-1,0$), quando comparada com as variações gênicas praticamente inexistente em plantas 35S::BiP ($\psi_w=-1,0$). Foi observado que em plantas WT a imposição do estresse induziu uma variedade de genes envolvidos em morte celular programada (PCD), como caspases (*CASP-like protein 3, 8 e 10*) que tem sido bem caracterizadas em eventos de PCD em células de tabaco sob choque térmico (Xu et al., 2000) e *Cysteine proteinase* envolvida na morte celular programada em plantas (Xu et al., 1999). Estes resultados são consistentes com estudos recentes, que demonstraram que estresse osmótico promovido por PEG em plântulas de soja induz PCD (Reis et al., 2011). Em contraste, a superexpressão de BiP promoveu a repressão do gene *vacuolar processing enzyme 2* (VPE - Glyma14g10620; Figura 9N e Tabela S3), que codifica uma protease com atividade de caspase-1, executora do processo de PCD único de plantas mediado pelo colapso de vacúolos (Shimada et al., 2003, Hatsugai et al., 2004). Recentemente, foi demonstrado que

VPE é alvo dos fatores de transcrição GmNAC6 e GmNAC30 que funcionam na via de sinalização de morte celular mediada pelas proteínas NRPs (*N-rich proteins*) e induzida por estresses no RE e osmótico (Mendes, 2013; Reis et al., 2011). Indução da expressão de NRPs por estresses osmótico e do RE leva à indução dos genes GmNAC6 e GmNAC30 que agem em conjunto para ativar o promotor e a expressão de VPE, resultando na ativação de PCD. Tem sido demonstrado que BiP funciona como regulador negativo dessa via de sinalização de morte celular induzida por estresse osmótico e também por seca (Valente et al., 2009; Reis et al., 2011). Expressão ectópica de BiP atenua indução por seca e por estresse osmótico dos genes NRPs e GmNAC6. Os resultados dessa investigação fornecem evidências adicionais para a capacidade de BiP em modular morte celular programada induzida por estresses. Além de se observar uma repressão da expressão de VPE em plantas superexpressando BiP a $\psi_w = -1.0$, também foi detectado indução de NRP em plantas selvagens à $\psi_w = -1.0$ (Figura 9J e K) e repressão de *GmNAC6* em 35S::BiP-4 à $\psi_w = -1.6$ (Figura 9L; Tabela 7). Têm sido proposto que a capacidade de BiP em modular a atividade e expressão de componentes dessa via de sinalização mediada por NRPs e induzida por estresse osmótico atenua a morte celular induzida por desidratação e promove uma melhor adaptação de plantas superexpressando BiP à seca.

Desidratação gradual em folhas de soja induz a via UPR e ERAD.

O *heatmap* de genes da UPR revelou que a imposição de estresse lento através de desidratação gradual causa indução de transdutores chaves da UPR, como bZIP28 e bZIP60, bem como genes marcadores da UPR como SP1, e um subconjunto de CNX e CRT (comparando os extremos WT irrigado x WT $\psi_w = -2.0$) (Figura 5). A indução da via UPR pelo declínio gradual do potencial hídrico foliar foi confirmada com a análise da expressão de genes marcadores da UPR por qRT-PCR (Figura 9). A indução desses ramos da UPR (bZIP28 e bZIP60) leva à indução de genes envolvidos na degradação de proteínas associada ao RE (ERAD), como parte do controle de qualidade da organela (Walter & Ron, 2011; Srivastava et al., 2012; Deng et al., 2013). O *heatmap* de genes da ERAD em diferentes níveis de estresse hídrico suporta o argumento de que a UPR é ativada em folhas em resposta a perda de água gradual, uma vez que se observa uma clara tendência de regulação positiva de genes da ERAD à medida que os níveis de potencial hídrico são diminuídos.

Entretanto, foi observado previamente que a exposição de plantas de soja a um regime

de déficit hídrico severo, ou seja, suspensão de irrigação total por um período de sete dias ou tratamento com altas concentrações de PEG, reprime a via UPR (Isrigler et al., 2007; Valente et al., 2009). Nestas condições, foi demonstrado que estresse osmótico severo regula negativamente a expressão de marcadores da UPR, como BiP, CNX e PDI. Resultados contrastantes também foram observados em estudos anteriores que analisaram a expressão de BiP, como único marcador da UPR, em resposta a estresse osmótico ou por seca. Enquanto que em espinafre tem sido demonstrado que seca reduz os níveis de transcritos de BiP, em soja e tabaco, um subconjunto de genes BiP são regulados positivamente por estresse osmótico, déficit hídrico ou tratamento com ABA (Anderson et al., 1994; Cascardo et al., 2000; Alvim et al., 2001). A aparente contradição desses resultados tem sido explicada como sendo uma função do estado de *background* da planta no qual os níveis basais de BiP e a atividade secretória celular sinalizariam pela necessidade de regulação negativa ou positiva de BiP sob condições de seca. Como regulador da UPR em potencial, a célula deve monitorar os níveis de BiP como um indicativo da capacidade de processamento de proteínas do RE. As informações mais recentes em escala genômica sobre mudanças globais na expressão gênica em resposta a estresses tem fornecido uma visão mais aprofundada da reprogramação gênica como resultado direto da interação de plantas com seu meio ambiente. De fato, os resultados da presente investigação, conjuntamente com aqueles em escala genômica sobre resposta de soja a estresse osmótico severo (Isrigler et al., 2007), claramente demonstram que a ativação ou repressão da via UPR em resposta a condições de seca é totalmente dependente da severidade do estresse osmótico a que a planta é exposta. Enquanto que estresse osmótico lento, através de declínio gradual do potencial hídrico foliar, promove a indução de componentes da via UPR, estresse osmótico rápido e severo reprime a via UPR.

Desidratação gradual de folhas de soja no estágio de desenvolvimento V3/V4 aciona um repertório de genes envolvidos em resistência à seca

O estresse hídrico lento disparou uma ampla gama de genes responsivos à seca (Figura 3, 4). No potencial hídrico de -1,0 plantas WT apresentaram tanto genes diferencialmente expressos relacionados à biossíntese quanto ao catabolismo de aminoácidos, predominando uma repressão de genes relacionados à biossíntese. Alguns aminoácidos podem aliviar danos celulares durante a desidratação, sendo prolina o mais comum (Vinocur and Altman, 2005; Schubert et al., 1995), entretanto estudos de plantas submetidas a estresse hídrico brando têm demonstrado ocorrer acúmulo de outros aminoácidos como valina, arginina e leucina, de

forma que existe uma íntima relação entre o acúmulo de aminoácidos e ABA (Asbahi et al., 2012).

As condições de déficit hídrico também promoveram alterações nos níveis dos transcritos relacionados ao metabolismo de carboidratos, lipídeos, energia, DNA/RNA, que se intensificaram com o nível de estresse imposto nas folhas (Figura 3 e 4). Em resposta ao estresse abiótico, às plantas induzem remobilização de nutrientes como suprimento de energia e metabolitos, através do catabolismo de várias moléculas como aminoácidos, polissacarídeos e lipídeos de forma a garantir que as funções básicas continuem operando em condições de estresses (Baena-Gonzalez et al., 2007; Thimm et al., 2004; Buchanan-Wollaston et al., 2005) e a manutenção do turgor pelo acúmulo de osmólitos e açúcares (Harb et al., 2010).

O aumento da tolerância à seca pode ser obtido também pelo atraso da morte celular e senescência foliar (Rivero et al., 2007). Consistente com esta hipótese, foi observado em plantas WT (-1,0) uma grande quantidade de genes diferencialmente expressos envolvidos com processos catabólicos e morte celular (Tabela 2 e 5), enquanto que a superexpressão de BiP parece minimizar alterações nesse grupo de genes quando submetidos a estresse. Resultados semelhantes já foram relatados, quando plantas superexpressando BiP promoveram um considerável atraso na senescência contribuindo para a diminuição dos sintomas do estresse em soja e tabaco (Valente et al. (2009). Com o aumento do catabolismo de certas moléculas as plantas diminuem a expressão de genes relacionados ao ciclo celular, divisão, crescimento e principalmente fotossíntese quando submetidas ao estresse hídrico (Chaves et al., 2009, Schuppler et al., 1998) e isso também foi verificado em maior grau em plantas WT's (Figura 3 e 4C). Já é conhecido que estresse abiótico pode causar inibição de crescimento, desenvolvimento, redução da fotossíntese, respiração e distúrbios no metabolismo de ácidos nucléicos (Kaiser, 1987; Zhang and Blumwald, 2001; Saíram et al., 2002). Uma das primeiras respostas a aclimação à seca é uma diminuição do crescimento foliar. Em *Arabidopsis*, esta redução do crescimento foliar tem sido compensada pelo aumento do tempo de expansão das células e uma suave indução de genes expansinas afim de manter o turgor e reduzir a área de transpiração (Aguirrezabal et al., 2006, Skirycz et al., 2010) Na linhagem 35S::BiP-4, o declínio do potencial hídrico para -1.0 promoveu uma maior indução de expansinas, o que deve contribuir para manutenção do turgor foliar por um período maior sob condições de déficit hídrico, fenótipo típico das plantas transgênicas.

Genes relacionados à defesa também apresentaram uma expressão diferencial quando plantas foram submetidas a estresse (Figura 3B). Neste trabalho, foi verificada a indução da expressão de PR-5 e PR-10 em plantas transformadas (-1,6). A maioria de genes relacionados a patógenos são expressos em níveis basais sob condições normais podendo ser rapidamente induzidos por patógenos (van Loon et al., 2006) porém alguns estudos têm demonstrado que em *Arabidopsis* PR-1, PR-2 e PR-5 são também induzidos por estímulos abióticos, incluindo seca, possivelmente regulando movimentos estomáticos (Seo et al., 2008, Seo et al., 2010).

No grupo hormônios vegetais, os genes diferencialmente expressos em resposta a déficit hídrico foram relacionados tanto à biossíntese quanto percepção dos diferentes hormônios (Figura 3A, B). A seca influencia na expressão de vários genes envolvidos na síntese, distribuição e sinalização de hormônios. ABA tem sido o mais estudado na resposta a estresse abiótico, sendo que sua síntese representa a resposta mais rápida à seca e dispara a expressão de genes responsivos (Yamaguchi-Shinozaki et al., 2006), causando fechamento do estômato e reduzindo a perda de água via transpiração (Wilkinson et al., 2010). Os resultados dessa investigação mostram receptores de ABA induzidos em plantas transgênicas e reprimidos em WT (-1,0) além da indução em plantas WT do gene *NCED*, enzima chave na biossíntese de ABA (Iuchi et al. 2001). Os outros hormônios citocininas, ácido salicílico, etileno e ácido jasmônico, também podem participar na resposta de plantas a estresse abiótico. Citocininas e ABA têm se mostrados envolvidos na regulação da senescência disparada pelo déficit hídrico (Munné-Bosch et al., 2003). Geralmente, a exposição a déficit hídrico diminui níveis de citocininas e aumenta níveis de etileno (Cowan et al., 1999), sendo que essa tendência foi confirmada nesse trabalho principalmente em plantas WT. Nossos resultados mostram ainda tanto indução quanto a repressão de genes responsivos a auxinas em resposta ao estresse hídrico, com uma ligeira tendência a predominância de repressão. A regulação negativa de genes relacionados a auxinas também foi reportada em folhas de *Arabidopsis* e sorgo submetidas à seca (Matsui et al., 2008; Wang et al., 2010).

Eventos rápidos na percepção do estresse por seca incluem geramente a ativação de fatores de transcrição bZIP, MYB, WRKY. A ativação desses fatores aconteceu em menor grau em Plantas WT(-1,0), enquanto que plantas transformadas apresentaram indução somente no potencial hídrico mais baixo (Figura 4C), indicando que a superexpressão de BiP parece atrasar a percepção do estresse imposto. Os fatores de transcrição são considerados os mais importantes reguladores da expressão gênica (Nakashima et al., 2009), sendo que muitas

famílias têm sido descritas e desempenham papel na resposta ao estresse em plantas (Yang et al. 2010; Uno et al., 2000; Mare et al., 2004; Xue, et al., 2006). Em *Arabidopsis*, mais de 100 fatores de transcrição tiveram expressão aumentada sob desidratação sendo alguns poucos regulados negativamente (Rhizsky et al. 2004). Fatores de transcrição como *GmNAC2* e *GmNAC3* foram induzidos em plantas WT's e não foram induzidos em plantas transformadas pelo menos até ($\psi_w=-1,0$) enquanto *GmNAC6* um importante indutor de morte celular em plantas foi reprimido em plantas transgênicas. Esses genes têm sido fortemente induzidos por estresse osmótico, ABA e JA em soja (Pinheiro et. al., 2009).

O mecanismo pelo qual a superexpressão de BiP confere tolerância à seca em soja parece envolver a manutenção da homeostase celular por um período maior de tempo, garantindo níveis próximos aos normais de uma ampla gama de genes que aparecem alterados em plantas selvagens. Provavelmente, a manutenção da homeostase celular em plantas transgênicas é consequência da capacidade de manutenção da turgidez da folha sob condições de déficit hídrico. Além disso, BiP atua diretamente inibindo a via de sinalização de morte celular mediada pelas proteínas NRPs e induzida por estresse osmótico e por seca.

MÉTODOS

Crescimento das plantas

Sementes de soja não transformadas (WT) (*Glycine max* cv. Conquista) e transgênicas transformadas com o gene *SoyBiPD* sob controle do promotor 35S do *Cauliflower mosaic virus* (35S::BiP-4; Valente et al., 2009) foram germinadas em substrato, transferidas para vasos de 3 litros contendo uma mistura de solo, esterco e areia (3:1:1) e crescidas em casa de vegetação sob condições naturais de luz, umidade relativa (65-85%) e temperatura (15-35°C). Cada vaso foi pesado e adicionado uma mesma quantidade de mistura de solo.

Indução de estresse hídrico em soja transgênica (35S::BiP-4) e WT em casa de vegetação.

As plantas foram cultivadas normalmente até que o terceiro trifólio estivesse completamente expandido. A partir desse momento, foi adicionado água até a capacidade de campo em todos os vasos, ou seja, quando o solo retém o máximo de água que suporta. Após o excesso de água ser drenado pela gravidade, cada vaso foi pesado e anotado. Eles foram distribuídos em blocos com os seguintes tratamentos: 35S::BiP-4 irrigado, 35S::BiP-4 sob

déficit hídrico, WT irrigado e WT sob déficit hídrico. Os vasos foram pesados todos os dias e calculado o peso de água perdida. Em vasos normalmente irrigados, foram adicionados aproximadamente 180 ml de água, quantidade suficiente para não enxarcar o solo. Aos vasos submetidos a estresse hídrico foram adicionados 40% de água do volume perdido a cada dia (Valente et al., 2009). O potencial hídrico (ψ) foi medido na antemanhã, com Bomba Scholander (Scholander et al., 1965), ao longo dos dias até que obtenção de valores próximos -1,5 em plantas transgênicas.

Extração de RNA, síntese de cDNA e purificação de mRNA.

O RNA total foi extraído do terceiro trifólio completamente expandido, usando TRIzol (*Life Technologies Inc*) e tratados com DNA's livre de RNA'se (*Life Technologies Inc*). A partir do RNA total, o mRNA foi purificado usando isolando o Kit *FastTrack® 2.0 mRNA isolation* (*Life Technologies Inc.*) de acordo com instruções do fabricante, quantificado em espectrofotômetro (*Evolution 60 Thermo Scientific*) e observado em gel de agarose desnaturante 1.5% na presença de brometo de etídeo.

Experimentos de Microarranjos e análises de dados.

Os mRNA's provenientes de 3 réplicas biológicas diferentes de plantas transformadas (35S::BiP-4) e não transformadas (WT) foram utilizados para hibridização dos microarranjos de DNA. Foram hibridizados dois chips de cada tratamento, cada um contendo os mRNAs de 3 réplicas diferentes. As hibridizações foram realizadas utilizando chips Affymetrix® GeneChipH Soybean Genome Arrays (<http://affymetrix.com/index.affx>) seguindo instruções do fabricante de acordo com os seguintes passos: (a) síntese da primeira e segunda fita de cDNA, utilizando o kit *One-Cycle*, (b) purificação e limpeza da dupla fita de cDNA com *cDNA Wash Buffer* e *Cleanup Spin Column* c) síntese de cRNA (complementar) marcado com Biotina utilizando o kit *IVT Labeling (in vitro Transcription Labeling)*, (d) após a transcrição, o cRNA foi amplificado com *IVT Master Mix* e purificado como no item (b) e quantificado a 260 e 280 nm em espectrofotômetro (*Evolution 60 Thermo Scientific*). (e) O cRNA marcado foi fragmentado em tamanhos entre 35 e 200 bases por hidrólise química. O cRNA (15 µg) fragmentado foi hibridizado no *chip Soybean Genome Array Affymetrix®* por 16 horas sob agitação lenta e constante e lavados com tampões fornecidos pelo fabricante usando a estação de fluidos 450 GCOS/Microarray Suite (*GeneChip® Operating Software*)

seguidas de três colorações da Probe Array com GeneChip® IVT Labeling Kit. Os chips foram escaneados com Gene Array® Scanner 3000 (Affymetrix) com pixel de 3µm e comprimento de onda a 570nm gerando arquivos cell intensity (CEL).

A análise dos resultados foi realizada nos arquivos de dados do tipo CEL e conduzida usando pacotes do ambiente R/Bioconductor (Version 1.6/Version 2.6.0; Li & Wong, 2001). A normalização foi feita usando o método "Robust Multiarray Analysis" (RMA) (Irizarry et al., 2003), presente no R/Bioconductor, para arrays da Affymetrix (Kerr et al., 2000). O "Microarray Quality Assessment" foi realizado usando funções do pacote Affy em conjunto com funções de gráficos padrões presente no R. Para identificar genes diferencialmente expressos, foi realizada uma análise de variância adaptada para dados de *Microarray* implementado pelo pacote R/MAANOVA (*Microarray Analysis of Variance*, <http://churchill.jax.org/software/rmaanov.html>), e por meio dos testes F e t foi detectada a significância da expressão diferencial dos genes. O p-valor obtido foi corrigido por FDR (*false discover rate*, Benjamin & Hochberg, 1995) e as respectivas listas de genes geradas foram classificadas segundo o p-valor corrigido e o "*fold-change*". Foram considerados genes diferencialmente expressos de acordo com os critérios de p-valor corrigidos maiores do que 0,05 e o log₂fold-change maior ou menor que 1,5. A notação desses genes foram obtidas a partir do arquivo de anotação da Affymetrix (<http://www.affymetrix.com/support/technical/annotationfilesmain.affx>) para o chip usado e então complementada pela anotação do banco de dados Soybase (<http://www.soybase.org/>) e Phytozome (<http://www.phytozome.net>) e um agrupamento foi feito com base em *Biologic Process* usando *gene ontology* (<http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/go.cgi>).

PCR em tempo real

O RNA total foi extraído utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen) e a síntese de cDNA foi realizada utilizando 3 µg de RNA total 5 µM de oligo-dT, 0,5 mM de dNTPs e 1U de Transcriptase Reversa M-MLV (*Life Technologies Inc.*), de acordo com as instruções do fabricante. As reações de Real time PCR (qRT-PCR) foram realizadas no aparelho ABI7500 (*Applied Biosystems*), e foi utilizado o corante SYBR® Green PCR Master Mix (*Applied Biosystems*) com *primers* específicos (Tabela 1).

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

Primers	Sequence (5' – 3')	Gene
BiP trans Fw	ATCTGGAGGAGCCCTAGGCGGTGG	BiPD - nos
BiP trans Rv	CATCGCAAGACCCGGCAACAGGAT	
Helic Fw	TAACCCTAGCCCCTTCGCCT	HELICASE AI736067
Helic Rv	GCCTTGTCGTCTTCCTCCTCG	
Nac6 Fw	CCAACAAAAGCACTTGTGGCA	NAC6 Glyma11g10230
Nac6 Rv	GGACTATTCAACTGAGCCAAAAG	
Calnexin	TGATGGGGAGGAGAAGAAAAGGC	CNX AW508066
Calnexin	ATCTGGAGGAGCCCCAGGCGGTGG	
BiPD Fw	ATCTGGAGGAGCCCCAGGCGGTGG	BiPD AF031241
BiPD Rv	CTTGAAGAAGCTTCGTCTGTAATACTAAG	
GST Fw	CGTTTCTCATCCACAATGGCAAAC	GST Glyma15g40190
GST Rv	CAGCCCAGAATCTAGCCTGAGC	
NAC3 Fw	GAATGCAGCAATGGGTCATCA	Nac3 AY974351
NAC3 Rv	ATCCTGCTGGTGCATTGTTCTG	
NRP Fw	GGCACAAGACTGGTGCTGAGA	NRP-A AJ875407
NRP Rv	CTCTGTATCGTGGAGGCAGACC	
NRich Fw	TACAGGCATCCAATTTGGCGAACC	NRP-B AI973541
NRich Rv	TGACTTGAAAGAGTTGATCTCACCCC	
SMP Fw	GCCGAAGTGGAGAAAAGACGAACC	SMP AW397921
SMP Rv	CTTGGGCTGTTTGTGGGTCTTC	
NAC1 Fw	GGACTACCCAATAGCCCAAATCA	NAC1 AY974349
NAC1 Rv	GACCCAAGTAATCCATTTCCAAAAG	
IRE Fw	GGTATGTTGTAGACCGRGGCTTAGA	IRE Glyma11g09240
IRE Rv	TTGGCGTAGACTTCATTTAGTTTC	
IRE Fw	CAGTGGTTCTGGGAGGGTTTTT	IRE Glyma01g36200
IRE Rv	CATTGATGGGAGCACGATAGG	
IRE Fw	GAACGCCTCAACATCCACAGT	IRE Glyma09g32970
IRE Rv	GTTGCAGCCTTAGGTGGAAGA	
VPE Fw	GAAGCAATGTCTACAGAATGCA	VPE Glyma04g05250
VPE Rv	GGACCCTTTTCAATGCCAAA	
VPE Fw	AACCCAAGGCCTGGAGTCAT	VPE Glyma14g10620
VPE Rv	TCGCCGGTGAATCCTTTG	
VPE Fw	CACCGGCGAAGATGTTACTGT	VPE Glyma17g34900
VPE Rv	TCCCACTGCCACCAGTAAGTG	

Contribuição dos autores

HHC co-escreveu o manuscrito e participou da realização de todos os experimentos, OJBB realizou análises de informática, MRP auxiliou na realização de experimentos de déficit hídrico, JCFS realizou análises de informática e construção de *heat maps*, CSM auxiliou na medição do potencial hídrico, JRLSR auxiliou no experimento de chips de microarranjos, EBPF co-escreveu o manuscrito e delineou todos os experimentos.

Agradecimentos

Laboratório Nacional de Biociências, CNPEM-ABTLuS, Luz Sincrontron, Campinas, SP por disponibilizar a estação de hibridização e escaneamento de chips de microarranjos. Ao departamento de Biologia Vegetal, setor de Fisiologia Vegetal por disponibilizar equipamentos necessários. Essa pesquisa foi financiada pelas seguintes agências de fomento do Governo do Brasil: CNPq, FAPEMIG e FINEP. Aos professores Gilberto Sachetto Martins, Adriano Nunes Nesi e Wagner Luiz Araújo pela sugestões e críticas.

Referências

- Aguirrezabal L, Bouchier-Combaud S, Radziejowski A, Dauzat M, Cookson SJ, Granier C: **Plasticity to soil water deficit in *Arabidopsis thaliana*: dissection of leaf development into underlying growth dynamic and cellular variables reveals invisible phenotypes.** *Plant Cell Environ* 2006, **29(12)**:2216-2227.
- Alves MS, Reis PAB, Dadalto SP, Faria JAQA, Fontes EPB, Fietto LG: **A Novel transcription factor, early responsive to dehydration 15, connects ER stress with an osmotic stress-induced cell death signal.** *J Biol Chem* 2011, **286**:20020-20030.
- Alvim FC, Carolino SMB, Cascardo JCM, Nunes CC, Martinez CA, Otoni WC, Fontes EPB: **Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress.** *Plant Physiol* 2001, **126**:1042-1054.
- Asbahi AAA, Maqtari MAA, Khalid MN: **ABA biosynthesis defective mutants reduce some free amino acids accumulation under drought stress in tomato leaves in comparison with *Arabidopsis* plants tissues.** *JSPB* 2012, **8**:179-192.
- Baena-Gonzalez, E, Rolland F, Thevelein JM, Sheen J: **A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling.** *Nature* 2007, **448**:938-942.
- Bartels D, Sunkar R: **Drought and salt tolerance in plants.** *Crit Rev Plant Sci* 2005, **24(1)**:23-58.
- Benjamini Y, Hochberg Y: **Controlling the false discovery rate - a practical and powerful approach to multiple testing.** *J R Stat Soc* 1995, **57**:289-300.
- Bernales S, Papa FR, Walter, P: **Intracellular signaling by the unfolded protein response.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006, **22**:487-508.
- Bertolotti A, Zhang YH, Hendershot LM, Harding HP, Ron D: **Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response.** *Nat Cell Biol* 2000, **2**:326-332.
- Bhatnagar-Mathur P, Valdez V, Sharma KK: **Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects.** *Plant Cell Rep* 2008, **27**:411-424.
- Bleecker AB, Kende H: **Ethylene: a gaseous signal molecule in plants.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000, **16**:1-18.

- Blum A: **Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential – are they compatible, dissonant, or mutually exclusive?** *Ausy J Agric Res* 2005, **56**:1159–1168.
- Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, Breeze E, Lim PO, Nam HG, Lin JF, Wu SH, Swidzinski J, Ishizaki K, Leaver CJ: **Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation induced senescence in Arabidopsis.** *Plant J* 2005, **42**:567–585.
- Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D: **IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA.** *Nature* 2002, **415**:92–96.
- Cascardo JC, Almeida RS, Buzeli RA, Carolino SM, Otoni WC, Fontes EBP: **The phosphorylation state and expression of soybean BiP isoforms are differentially regulated following abiotic stresses.** *JBC* 2000, **12**:14494-14500.
- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C: **Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell.** *Ann Bot* 2009, **103**:551–560.
- Costa MD, Reis PA, Valente MA, Irsigler AS, Carvalho CM, Loureiro ME, Aragão FJ, Boston RS, Fietto LG, Fontes EP: **A new branch of endoplasmic reticulum stress signaling and the osmotic signal converge on plant-specific asparagine-rich proteins to promote cell death.** *J Biol Chem* 2008, **283**:20209-20219.
- Cowan AK, Cairns ALP, Bartels-Rahm B: **Regulation of abscisic acid metabolism: towards a metabolic basis for abscisic acid-cytokinin antagonism.** *J Exp Bot* 1999, **50**:595–603.
- Cox JS, Shamu CE, Walter P: **Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase.** *Cell* 1993, **73**:1197–1206.
- Cutforth HW, McGinn SM, McPhee KE, Miller PR: **Adaptation of pulse crops to the changing climate of the Northern Great Plains.** *Agron J* 2007, **99**:1684 –1699.
- Deng Y, Srivastava R, Howell SH: **Endoplasmic Reticulum (ER) Stress Response and Its Physiological Roles in Plants.** *Int J Mol Sci* 2013, **14**:8188-8212.
- Haigh NG, Johnson AE: **A new role for BiP: closing the aqueous translocon pore during protein integration into the ER membrane.** *J Cell Biol* 2002, **156**:261–270.
- Hamman BD, Hendersho TLM: **BiP Maintains the Permeability Barrier of the ER Membrane by Sealing the Luminal End of the Translocon Pore before and Early in Translocation.** *Cell* 1998, **92**:747–758.
- Hampton RY: **ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation.** *Curr Opin Cell Biol* 2002, **14**:476–482.
- Hara-Nishimura I, Hatsugai N, Nakaune S, Kuroyanagi M, Nishimura M: **Vacuolar processing enzyme: an executor of plant cell death.** *Curr Opin Plant Biol* 2011, **8**:404-408.

- Harb A, Krishnan A, Ambavaram MMR, Pereira A: **Molecular and physiological analysis of drought stress in Arabidopsis reveals early responses leading to acclimation in plant growth.** *Plant Physiol* 2010, **154**(3):1254-1271.
- Harding HP, Zhang Y, Ron D: **Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase.** *Nature* 1999, **397**:271-274.
- Hatsugai N, Kuroyanagi M, Yamada K, Meshi T, Tsuda S, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I: **A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death.** *Science* 2004; **305**:855–858.
- Hayashi S, Wakasa Y, Takahashi H, Kawakatsu T, Takaiwa F: **Signal transduction by IRE1- mediated splicing of bZIP50 and other stress sensors in the ER stress response of rice.** *Plant J* 2011, **69**:946–956.
- Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori, K: **Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress.** *Mol Biol Cell* 1999, **10**:3787–3799.
- Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP: **Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data.** *Biostatistics* 2003, **4**:249–264
- Irsigler AST, Costa MDL, Zhang P, Braga PA, Dewey R, Boston RS, Fontes EPB: **Expression profiling on soybean leaves reveals integration of ER- and osmotic-stress pathways.** *BMC Genomics* 2007, **8**:431.
- Iuchi SM, Kobayashi T, Taji M, Naramoto M, Seki T, Kato S, Tabata Y, Kakubari K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki: **Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cisepoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis.** *Plant J* 2001, **27**:325-333.
- Iwata Y, Fedoroff NV, Koizumi N: **Arabidopsis bZIP60 is a proteolysis-activated transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response.** *Plant Cell* 2008, **20**:3107–3121.
- Jakoby M, Weisshaar B, Dröge-Laser W, Vicente-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T, Parcy F: **bZIP transcription factors in Arabidopsis.** *Trends in Plant Sci* 2002, **7**:106-111.
- Kaiser WM: **Effect of water deficit on photosynthetic capacity.** *Plant Physiol* 1987, **71**:142-149.
- Kamauchi S, Nakatani H, Nakano C, Urade R: **Gene expression in response to endoplasmic reticulum stress in Arabidopsis thaliana.** *FEBS J* 2005, **272**:3461–3476.
- Kasuga M, Miura S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K: **A combination of the Arabidopsis DREB1A gene and stress-inducible rd29A promoter improved drought and low temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer.** *Plant Cell Physiol* 2004, **45**:346-350.
- Kawahara T, Yanagi H, Yura T, Mori K: **Unconventional splicing of HAC1/ERN4 mRNA required for the unfolded protein response. Sequence-specific and non-sequential cleavage of the splice sites.** *J Biol Chem* 1998, **273**:1802–1807.

- Kerr MK, Mitchell M, Churchill GA: **Analysis of variance for gene expression microarray data.** *J Comp Biol* 2000, **7**:819–837.
- Koizumi N, Martinez IM, Kimata Y, Kohno K, Sano H, Chrispeels M. J: **Molecular Characterization of Two Arabidopsis Ire1 Homologs, Endoplasmic Reticulum-Located Transmembrane Protein Kinases.** *Plant Physio.* 2001, **127**:949–962.
- Ku YS, Au-Yeung WK, Yung YL, Li MW, Wen CQ, Liu X, Lam HM: **Drought Stress and Tolerance in Soybean.** *cdn.intechopen.com*, 2013 (não achei!)
- Le DT, Nishiyama R, Watanabe Y, Vankova R, Tanaka M, Seki M, Ham le H, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LS: **Identification and expression analysis of cytokinin metabolic genes in soybean under normal and drought conditions in relation to cytokinin levels.** *PLoS One* 2012, **7**:42411.
- Leborgne-Castel N, Jelitto-Van Dooren EPWM, Crofts AJ, Denecke J: **Overexpression of BiP in tobacco alleviates endoplasmic reticulum stress.** *The Plant Cell* 1999, **11**:459–470.
- Lee K, Neugeborn L, Kaufman RJ: **The unfolded protein response is required for haploid tolerance in yeast.** *J Biol Chem* 2003, **278**:11818–11827.
- Lee K, Tirasophon W, Shen X, Michalak M, Prywes R, Okada T, Yoshida H, Mori K, Kaufman RJ: **IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response.** *Gene Dev* 2002, **16**:452–466.
- Li J, Wong L: **Emerging patterns and gene expression data.** *Genome Inform* 2001, **12**:3–13.
- Liu JX, Howell SH: **Endoplasmic reticulum protein quality control and its relationship to environmental stress responses in plants.** *Plant Cell* 2010, **22**:2930–2942.
- Liu JX, Srivastava R, Che P, Howell SH: **An endoplasmic reticulum stress response in Arabidopsis is mediated by proteolytic processing and nuclear relocation of a membrane-associated transcription factor, bZIP28.** *Plant Cell* 2007, **19**:4111–4119.
- Lu SJ, Yang ZT, Sun L, Sun L, Song ZT, Liu JX: **Conservation of IRE1-regulated bZIP74 mRNA unconventional splicing in rice (*Oryza sativa* L.) involved in ER stress responses.** *Mol Plant* 2012, **5**:504–514.
- Maattanen P, Gehring K, Bergeron JJ, Thomas DY: **Protein quality control in the ER: the recognition of misfolded proteins.** *Semin Cell Dev Biol* 2010, **21**:500–511.
- Mare C, Mazzucotelli E, Crosatti C, Francia E, Stanca AM, Cattivelli L: **Hv-WRKY38: a new transcription factor involved in cold and drought-response in barley.** *Plant Mol Biol* 2004, **55**:399–416.
- Martinez IM, Chrispeels MJ: **Genomic analysis of the unfolded protein response in Arabidopsis shows its connection to important cellular processes.** *Plant Cell* 2003, **15**:561–576.
- Matsui A, Ishida J, Morosawa T, Mochizuki Y, Kaminuma E, et al.: **Arabidopsis transcriptome analysis under drought, cold, high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array.** *Plant Cell Physiol* 2008, **49**:1135–1149.

- Mendes GC; Reis PAB; Carvalho HH; Aragão JF; Fontes EBP: **Interaction between GmNAC6 and GmNAC30 integrates ER stress- and osmotic stress-induced cell death responses through vacuolar processing enzyme.** *The Plant Cell* 2013, in preparation. (?????)
- Molinari M, Galli C, Piccaluga V, Pieren M, Paganetti P: **Sequential assistance of molecular chaperones and transient formation of covalent complexes during protein degradation from the ER.** *J Cell Biol* 2002, **158**:247-257.
- Moreno AA, Mukhtar MS, Blanco F, Boatwright JL, Moreno I, Jordan MR, Chen Y, Brandizzi F, Dong X, Orellana A, Pajeroska-Mukhtan, KM: **IRE1/bZIP60-mediated unfolded protein response plays distinct roles in plant immunity and abiotic stress responses.** *PLoS ONE* 2012, **7**:e31944.
- Morris JA, Dorner AJ, Edwards CA, Hendershot LM, Kaufman J: **Immunoglobulin binding protein (BiP) function is required to protect cells from endoplasmic reticulum stress but is not required for the secretion of selective proteins.** *J Biol Chem* 1997, **272**:4327–4334.
- Munné-Bosch S, Alegre L: **Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress.** *Funct Plant Biol* 2004, **31**(3):203–216.
- Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-shinozaki K: **Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in Arabidopsis and grasses.** *Plant Physiol.* 2009, **149**:88-95.
- Noh SJ, Kwon CS, Chung WI: **Characterization of two homologs of Ire1p, a kinase/endoribonuclease in yeast, in Arabidopsis thaliana.** *Biochim Biophys Acta* 2002, **1575**:130–134.
- Oikawa D, Kimata Y, Kohno K: **Self-association and BiP dissociation are not sufficient for activation of the ER stress sensor Ire1.** *J Cell Sci* 2007, **120**:1681–1688.
- Okushima Y, Koizumi N, Yamaguchi Y, Kimata Y, Kohno K, Sano H: **Isolation and characterization of a putative transducer of endoplasmic reticulum stress in Oryza sativa.** *Plant Cell Physiol* 2002, **43**:532–539.
- Patil C, Walter P: **Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals.** *Curr Opin Cell Biol* 2001, **13**:349–355.
- Pincus D, Chevalier MW, Aragon T, van Anken E, Vidal SE, El-Samad, Walter P: **BiP Binding to the ER-Stress Sensor Ire1 Tunes the Homeostatic Behavior of the Unfolded Protein Response.** *PLoS Biol* 2010, **8**(7): e1000415.
- Pinheiro GL, Marques CS, Costa MDL, Reis PAB, Alves MS, Carvalho CM, Fietto LG, Fontes EP: **Complete inventory of soybean NAC transcription factors: sequence conservation and expression analysis uncover their distinct roles in stress response.** *Gene* 2009, **444**:10–23.
- Pirot P, Naamane N, Libert F, Magnusson NE, Orntoft TF, Cardozo AK, Eizirik DL: **Global profiling of genes modified by endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta cells reveals the early degradation of insulin mRNAs.** *Diabetologia.* 2007, **50**:1006–1014.

- Price AH, Steele KA, Moore BJ, Jones RGW: **Upland rice grown in soil-filled chambers and exposed to contrasting water deficit regimes: II Mapping QTL for root morphology and distribution.** *Field Crop Res* 2002; **76**:25–43.
- Reis PA, Rosado GL, Silva LA, Oliveira LC, Oliveira LB, Costa MD, Alvim FC, Fontes EP: **The binding protein BiP attenuates stress-induced cell death in soybean via modulation of the N-rich protein mediated signaling pathway.** *Plant Physiol* 2011, **157**:1853–1865.
- Rhizsky L, Liang J, Shuman V, Shulaev S, Davletova, Mittler R: **When defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress.** *Plant Physiol* 2004, **134**:1683–1696.
- Rivero RM, Kojima M, Gepstein A, Sakakibara H, Mittler R, Gepstein S, Blumwald E: **Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant.** *PNAS USA* 2007, **104**:19631–19636.
- Ron D: **Translational control in the endoplasmic reticulum stress response.** *The J Clin Invest* 2002, **110**:1383–1388.
- Ron D, Walter P: **Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, **8**:519–529.
- Rutkowski DT, Kaufman RJ: **A trip to the ER: Coping with stress.** *Trends Cell Biol.* 2004, **14**:20–28
- Saïram RK, Rao, Veerabhadra K, Srivastava GC: **Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration.** *Plant Sci* 2002, **163**:1037–46.
- Sanders SL, Whitfield KM, Vogel JP, Rose MD, Schekman RW: **Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER.** *Cell* 1992, **69**:353–365.
- Scholander PE, Hammel HT, Bradstreet ED, Hemmingsen EA: **Sap pressure in vascular plants.** *Science* 1965, **148**:339–46.
- Schubert A, Restagno M, Novello V, Peterlunger E: **Effects of shoot orientation on growth, net photosynthesis, and hydraulic conductivity of Vitis vinifera L. cv. Cortese.** *Am J Enol Viticult* 1995, **46**:324–328.
- Schuppler U, He PH, John PCL, Munns R: **Effect of water stress on cell division and cell-division-cycle 2-like cell-cycle kinase activity in wheat leaves.** *Plant Physiol* 1998, **117**:667–678.
- Scott M, Lu G, Hallett M, Thomas DY: **The Hera database and its use in the characterization of endoplasmic reticulum proteins.** *Bioinformatics* 2004, **20**:937–944.
- Seki M, Kameiy A, Yamaguchi-Shinozakiz K, Shinozaki K: **Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection.** *Curr Opin Biotech* 2003, **14**:194–199.
- Seo PJ, Kim MJ, Park JY, Jeon J, Lee YH, Kim J, Park CM: **Cold activation of a plasma membrane-tethered NAC transcription factor induces a pathogen resistance response in Arabidopsis.** *Plant J* 2010, **61**:661–671.

- Seo PJ, Lee AK, Xiang FN, Park CM: **Molecular and functional profiling of Arabidopsis pathogenesis-related genes: insights into their roles in salt response of seed germination.** *Plant Cell Physiol* 2008, **49**:334-344.
- Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R: **ERstress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals.** *Dev Cell* 2002, **3**:99-111.
- Sherrard ME, Maherali H: **The adaptative significance of drought escape in *Avena barbata*. An Annual Grass.** *Evolution* 2006, **60(12)**:2478-2489.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K: **Molecular responses to drought and cold stress.** *Curr Opin Biotech* 1997, **7**:161-167.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K: **Gene networks involved in drought stress response and tolerance.** *J Exp Bot* 2007, **58**:221-227.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K: **Molecular Responses to Dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways.** *Curr Opin Plant Biol* 2000, **3**:217-223.
- Sloane RJ, Patterson RP, Carter TE: **Field drought tolerance of a soybean plant introduction.** *Crop Sci* 1990, **30**:118-123.
- Srivastava R, Chen Y, Deng Y, Brandizzi F, Howell SH: **Elements proximal to and within the transmembrane domain mediate the organelle-to-organelle movement of bZIP28 under ER stress conditions.** *Plant J* 2012, **70**:1033-1042.
- Sung DY, Kaplan F, Guy CL: **Plant Hsp70 molecular chaperones: Protein structure, gene family, expression and function.** *Physiologia plantarum* 2001, **113**:443-451. (Não achei)
- Talamè V, Ozturk NZ, Bohmert HJ, Tuberosa R: **Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis.** *J Exp Bot* 2007, **58**:229-240.
- Trombetta ES, Parodi JA: **Quality control and protein folding in the secretory pathway.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003, **19**:649-676.
- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-shinazachi K: **Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathways under drought and high-salinity conditions.** *P Natl Acad Sc USA* 2000, **97**:11632-11637.
- Urade R: **The endoplasmic reticulum stress signaling pathway in plants.** *BioFactors* 2009, **35**:326-331.
- Valente MA, Faria JA, Soares-Ramos JR, Reis PA, Pinheiro GL, Piovesan ND, Morais AT, Menezes CC, Cano MA, Fietto LG, Loureiro ME, Aragão FJ, Fontes EP: **The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco.** *J Exp Bot* 2009 **60**:533-46.
- Valliyodan B, Nguyen HT: **Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants.** *Curr Opin Plant Biol* 2006, **9**:189-195.

- van Loon LC, Rep M, Pieterse CM: **Significance of inducible defense-related proteins in infected plants.** *Annu Rev Phytopathol* 2006, **44**:135-162.
- Vinocur B, Altman A: **Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations.** *Curr Opin Biotechnol* 2005, **16**:123-132.
- Vitale A, Boston RS: **Endoplasmic reticulum quality control and the unfolded protein response: insights from plants.** *Traffic* 2008, **9**:1581-1588.
- Vogel JP, Misra LM, Rose MD: **Loss of BiP/GRP78 Function Blocks Translocation of Secretory Proteins in Yeast.** *J Cell Biol* 1990, **110**:1885-1895.
- Walter P, Ron D: **The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation.** *Science* 2011, **334**:1081-1086.
- Wang B, Zheng J, Liu YG, Wang JH, Wang GY: **Cloning and characterization of the stress-induced bZIP gene ZmbZIP60 from maize.** *Mol Biol Rep* 2012, **39**:6319-6327.
- Wang S, Bai Y, Shen C, Wu Y, Zhang S, Jiang D, Guilfoyle TJ, Chen M, Qi Y: **Auxin-related gene families in abiotic stress response in Sorghum bicolor.** *Funct Integr Genomics* 2010, **10**:533-546.
- Wilkinson S, Davies WJ: **Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community.** *Plant Cell Environ* 2010, **33**:510-525.
- Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK: **Cell Signaling during cold, drought, and salt stress.** *The Plant Cell* 2002, 165-183.
- Xu X, Chen C, Fan B, Chen Z: **Physical and functional interactions between pathogen-induced Arabidopsis WRKY18, WRKY40, and WRKY60 transcription factors.** *Plant Cell* 2006, **18**:1310-1326.
- Xu FX, Chye ML: **Expression of cysteine proteinase during developmental events associated with programmed cell death in brinjal.** *Plant J* 1999, **17**:321-327.
- Xu W, Purugganan MM, Polisensky D, Tian RH, Zhang GY, Yan CH, Dai YR: **Involvement of poly (ADP-ribose) polymerase and activation of caspase-like protease in heat shock-induced apoptosis in tobacco suspension cells.** *FEBS Letters* 2000, **474**:11-15.
- Yang SB, Vanderbeld J, Wan, Huang Y: **Narrowing down the targets: towards successful genetic engineering of drought-tolerant crops.** *Mol Plant* 2010, **3**:469-490.
- Ye C, Dickman MB, Whitham SA, Payton M, Verchot J: **The unfolded protein response is triggered by a plant viral movement protein.** *Plant Physiol* 2011, **156**:741-755.
- Zhang HX, Blumwald E: **Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage, but not in fruit.** *Nat Biotechnol* 2001, **19**:765-768.
- Zhu JK: **Salt and drought stress signal transduction in plants.** *Annu Rev Plant Biol* 2002, **53**:247-273.

Figuras

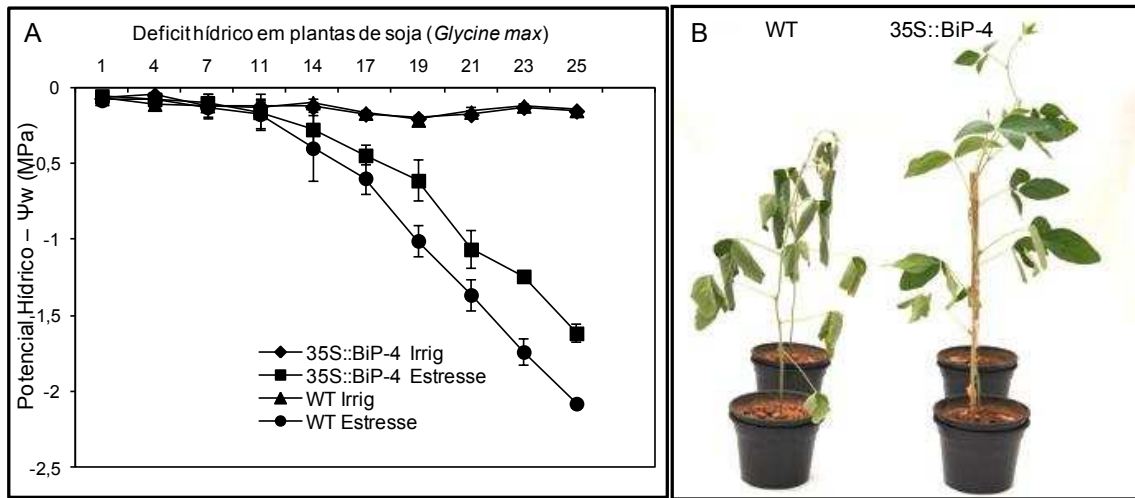


Figura 1 Estresse hídrico em plantas de soja WT e transgênicas submetidas a déficit hídrico. **A)** Plantas de soja foram expostas a um regime de deficit hídrico gradual pela diminuição para 40% do suprimento diário normal O potencial hídrico foi aferido por meio de Bomba de Scholander até valores aproximados de -2,0 em plantas WT e -1,5 em plantas transgênicas. Barras correspondem ao intervalo de confiança com $p=0,05$ e $n=4$. **B)** As plantas expostas ao estresse gradual foram fotografadas aos 19 dias de experimento, sendo que a linhagem 35S::BiP-4 exibiu $\psi_w=-0,6$ Mpa, enquanto que plantas WT exibiam $\psi_w=-1,0$ MPa.

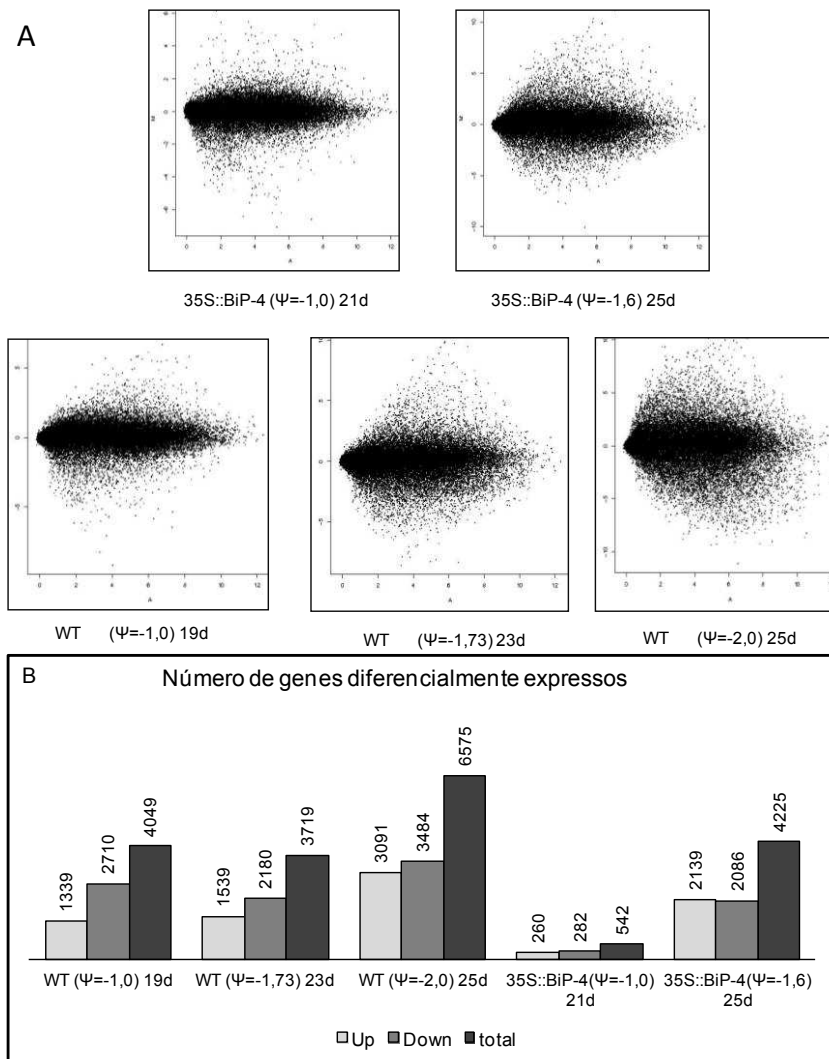


Figura 2 Variação global da expressão gênica em soja WT e transgênicas submetidas a estresse hídrico comparadas com o controle irrigado. **A)** MA plots com intensidade dependente da taxa de variação (\log_2), onde $M = \log_2(\text{fold change})$ e $A = \text{média do log da intensidade}$. **B)** Número de genes diferencialmente expressos totais, regulados positivamente e negativamente. O transcriptoma de plantas superexpressando BiP, com $\psi_w = -1,0$ e $\psi_w = -1,6$ correspondendo a 21 e 25 dias de estresse hídrico [35S::BiP-4 ($\psi_w = -1,0$) 21d e 35S::BiP-4 ($\psi_w = -1,6$) 21d], respectivamente e plantas WT com $\psi_w = -1,0$, $\psi_w = -1,7$ e $\psi_w = -2,0$, correspondendo a 19, 23 e 25 dias de estresse, respectivamente foram comparadas com WT irrigada.

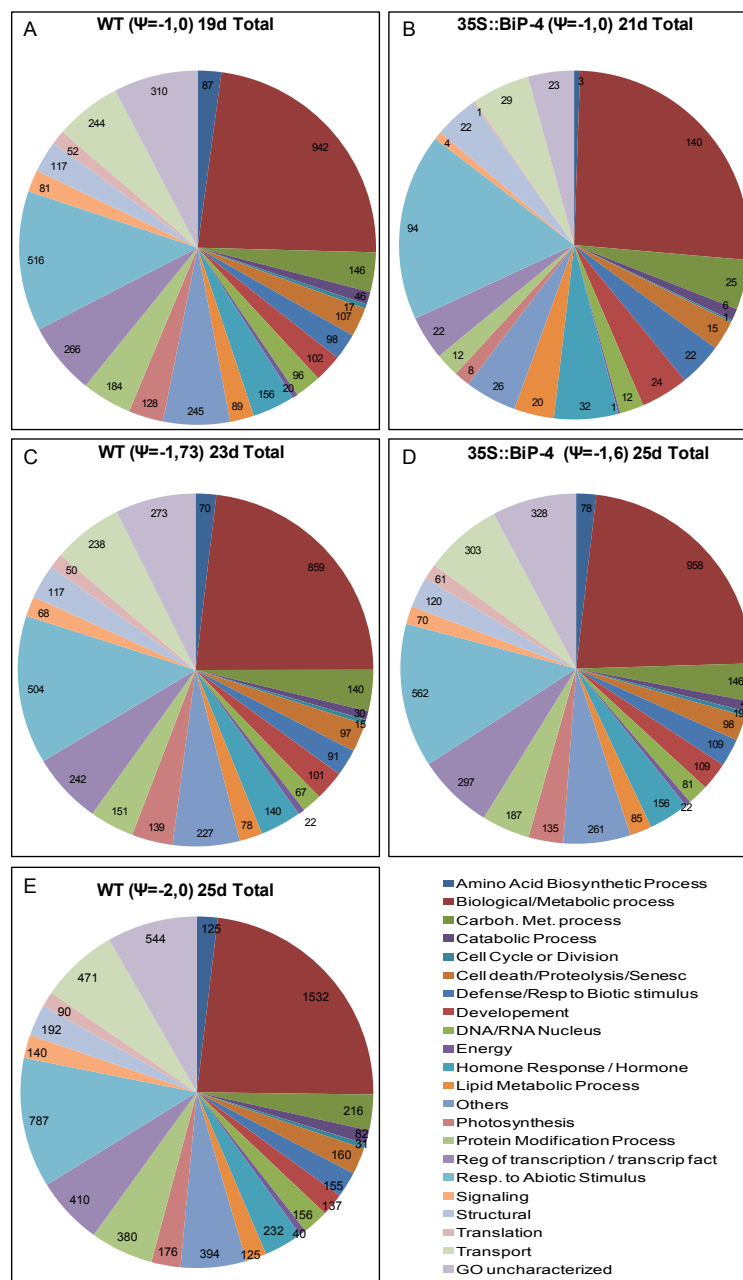


Figura 3 Distribuição de genes diferencialmente expressos em categorias baseadas em processos biológicos (<http://amigo.geneontology.org/>). **A)** Plantas WT aos 19 dias de estresse no potencial hídrico de -1,0; **B)** Plantas 35S::BiP-4 aos 21 dias de estresse no potencial hídrico de -1,0 **C)** Plantas WT aos 23 dias de estresse no potencial hídrico de -1,7; **D)** Plantas 35S::BiP-4 aos 25 dias de estresse no potencial hídrico de -1,6 e **E)** Plantas WT aos 25 dias de estresse no potencial hídrico de -2,0. Os números representam a frequência de genes diferencialmente expressos dentro de cada tratamento comparado com o controle WT irrigado. Genes foram considerados diferencialmente expressos seguindo o critério $\log_2(FC)=\pm 1,5$ e $p\text{-value} > 0,05$.

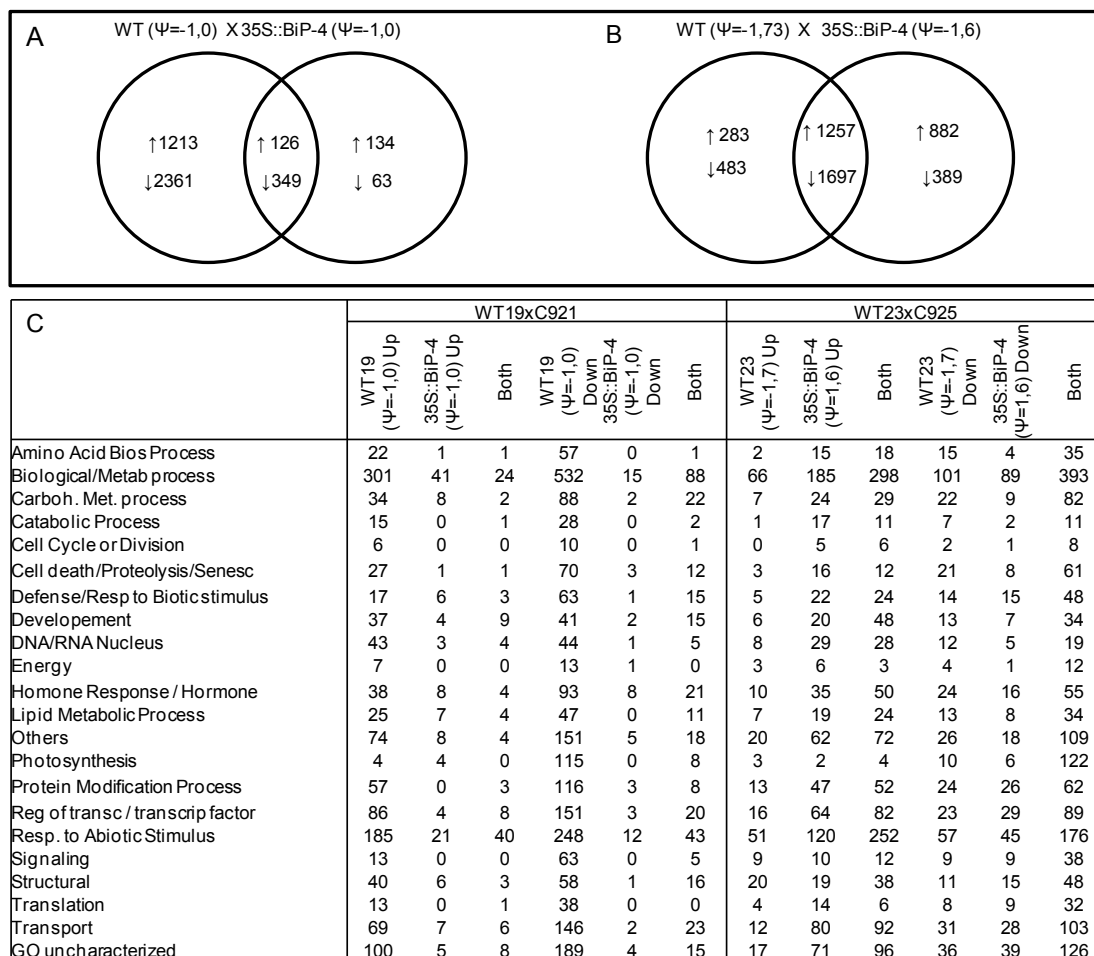


Figura 4 Diagrama de Venn. A) Genes exclusivos e comuns na comparação WT ($\Psi=-1,0$)-WTirr e 35S::BiP-4 ($\Psi=-1,0$)- WTirr e **B)** WT ($\Psi=-1,73$)-WTirr e 35S::BiP-4 ($\Psi=-1,6$)-WTirr. Setas indicam genes regulados positivamente (\uparrow) e negativamente (\downarrow). **C)** Número de genes regulados positivamente e negativamente em cada categoria baseada em Processos Biologicos por meio do *Gene Ontology* .

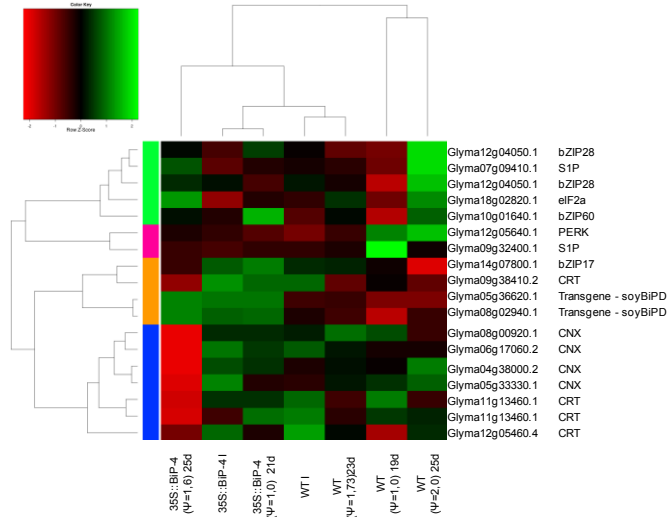


Figura 5 Heatmap englobando genes da via UPR. Expressão absoluta de genes relacionados à via de resposta a proteínas mal dobradas (UPR) em soja WT e 35S::BiP-4 em condições normais de irrigação e submetidas a diferentes graus de déficit hídrico.

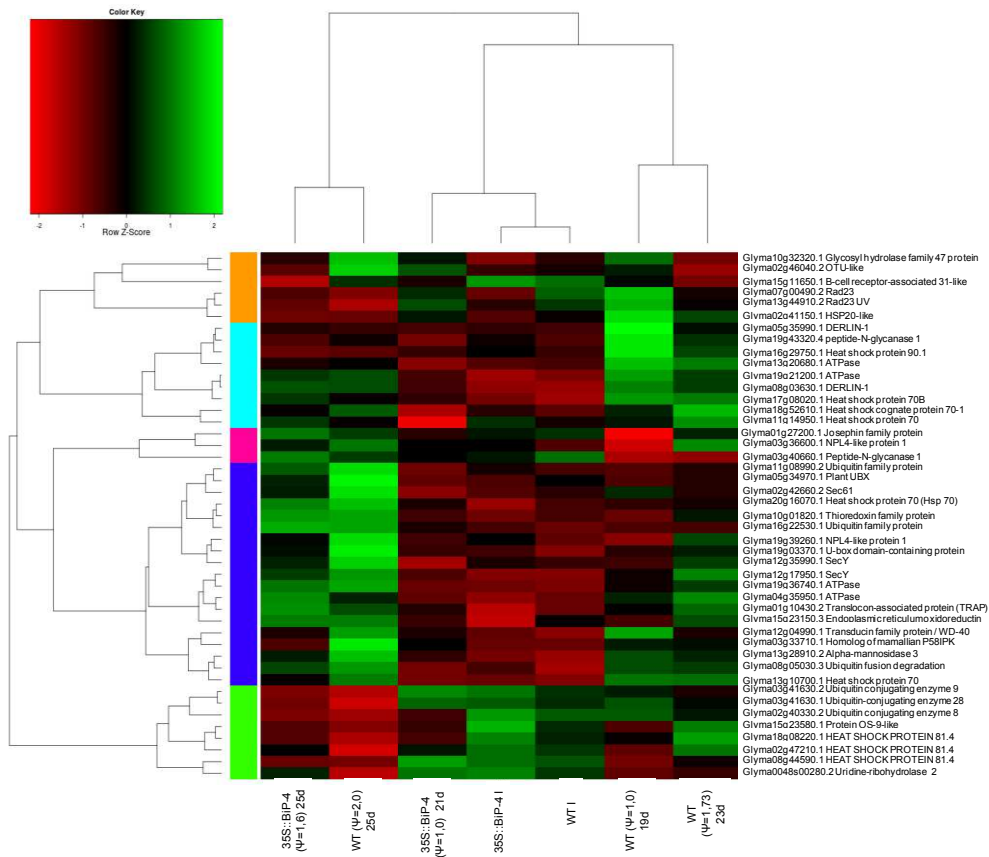


Figura 6 Heatmap englobando genes da via ERAD. Expressão absoluta de genes relacionados à degradação associada ao retículo endoplasmático (ERAD) em soja WT e 35S::BiP-4 em condições normais de irrigação e submetidas a diferentes graus de déficit hídrico.

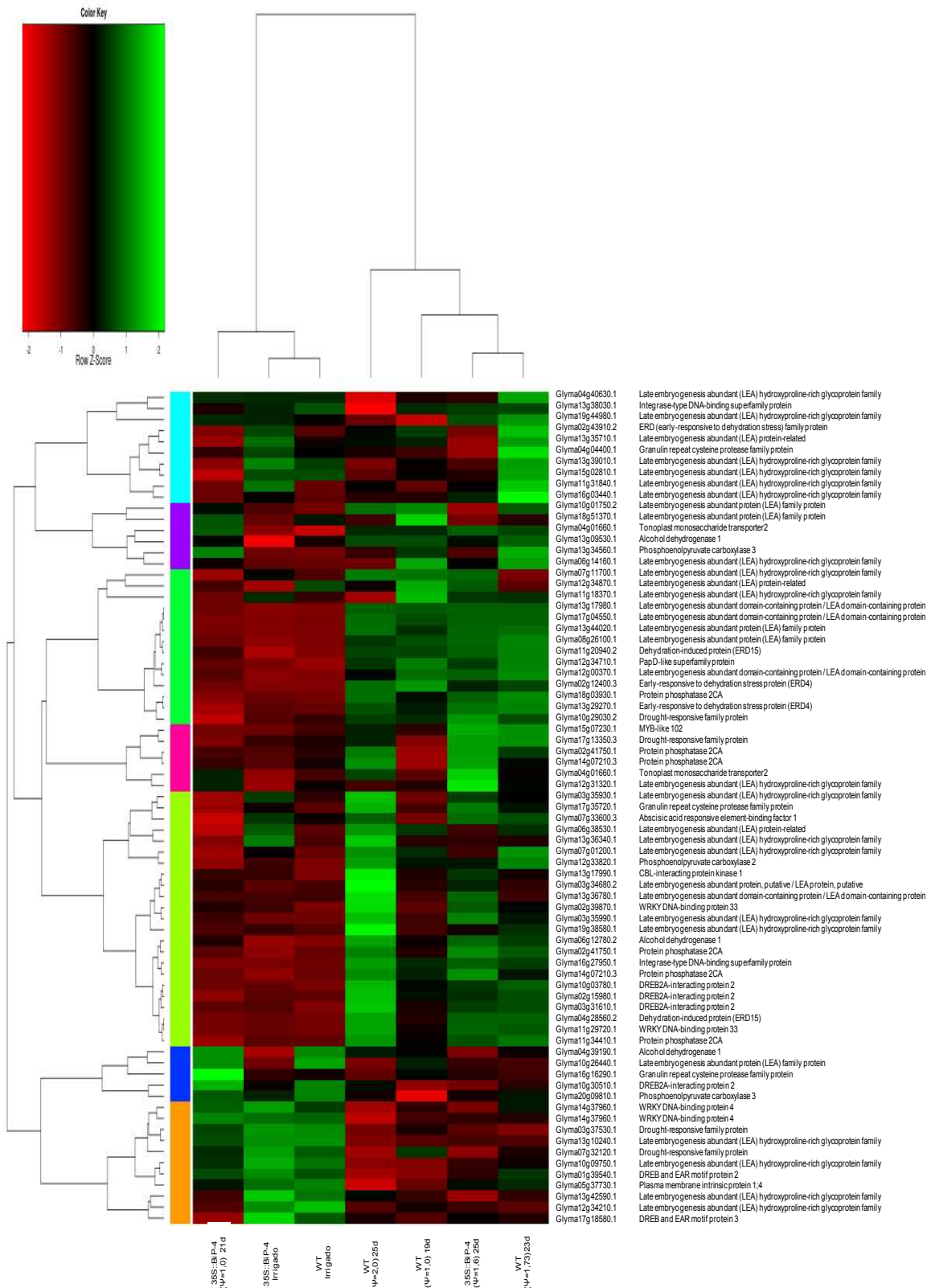


Figura 7 Heatmap englobando genes da resposta a estresse hídrico. Expressão absoluta de genes relacionados ao déficit hídrico em soja WT e 35S;BiP-4 em condições normais de irrigação e submetidas a diferentes graus de déficit hídrico.

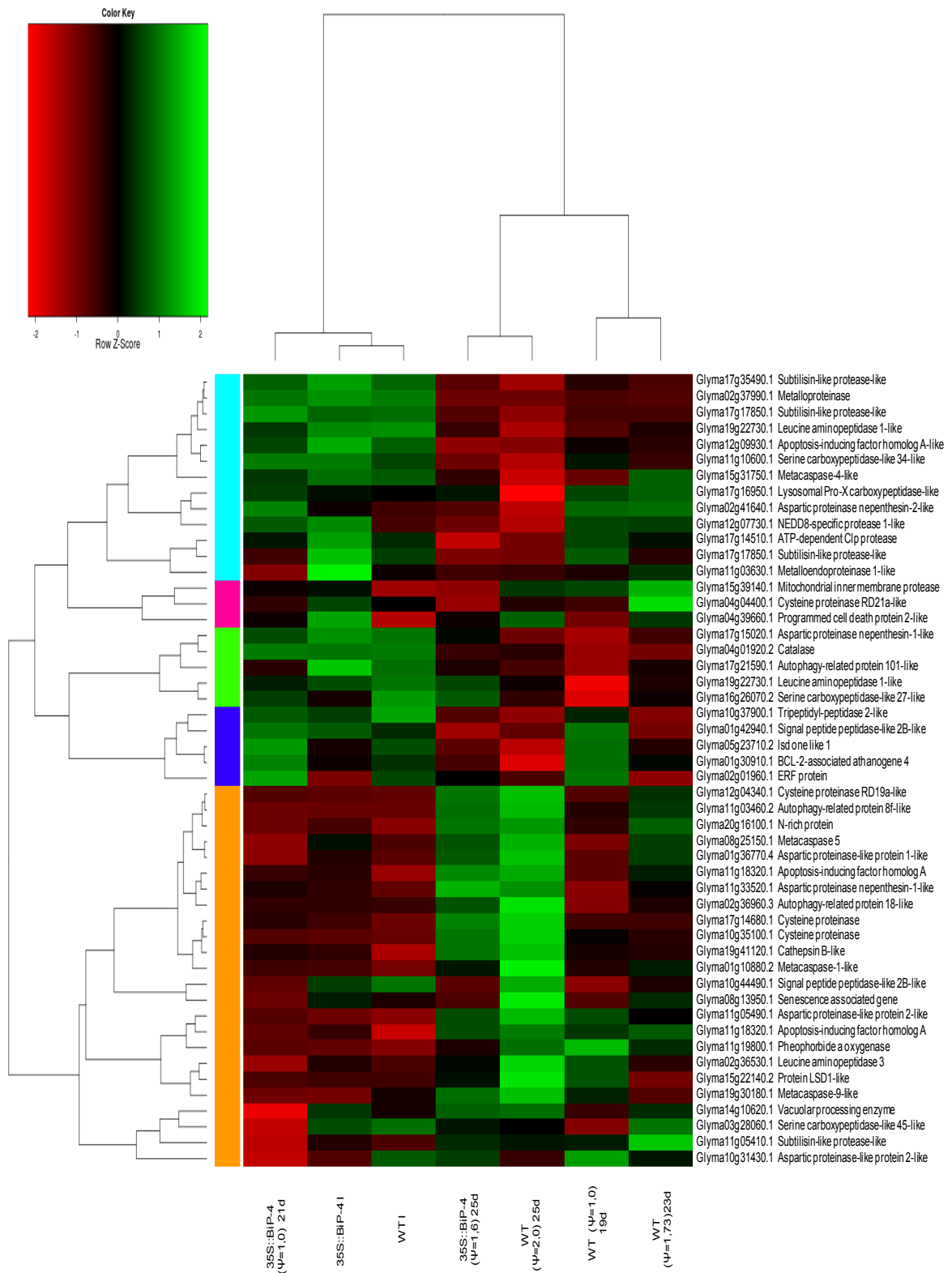


Figura 8 Heatmap englobando genes envolvidos em morte celular. Expressão absoluta de genes relacionados à morte celular em soja WT e 35S::BiP-4 em condições normais de irrigação e submetidas a diferentes graus de déficit hídrico.

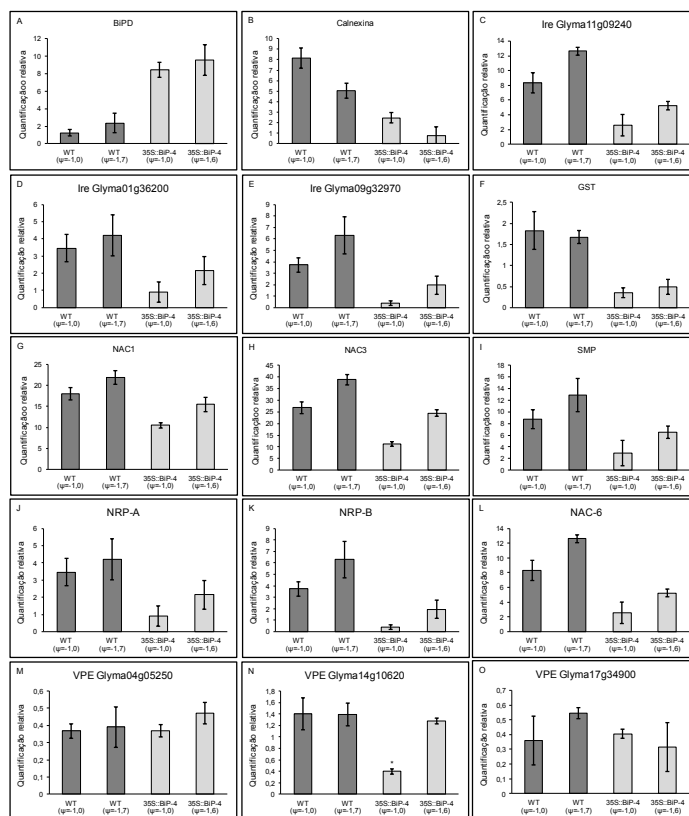


Figura 9 Análise de expressão gênica dos genes relacionados ao RE, UPR, estresse hídrico e morte celular em plantas transgênicas e WT durante condições de déficit hídrico. A-E) Acúmulo de transcritos de genes associados com UPR. F-I) Genes relacionados a estresse abiótico. J-O) Genes relacionados a morte celular. O RNA total foi isolado de plantas WT e 35S::BiP-4 submetidas a estresse hídrico. Valores de expressão foram obtidos usando o método do $2^{-\Delta DCt}$ e utilizando como controle endógeno a *helicase*. As barras indicam o intervalo de confiança com base no teste t ($p < 0,05$, $n = 3$).

	WT		35S::BiP-4		Total		WT		35S::BiP-4		Total		WT		35S::BiP-4		Total	
	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down
Amino Acid Biosynthetic Process	26	61	87	20	50	70	48	77	125	2	1	3	37	41	78			
Biological/Metabolic process	325	617	942	365	494	859	728	804	1532	64	76	140	477	481	958			
Carboh. Met. process	36	110	146	36	104	140	69	147	216	7	18	25	55	91	146			
Catabolic Process	16	30	46	12	18	30	55	27	82	5	1	6	27	13	40			
Cell Cycle or Division	6	11	17	6	9	15	17	14	31		1	1	11	8	19			
Cell death/Proteolysis/Senesc	25	82	107	14	83	97	59	101	160	2	13	15	28	70	98			
Defense/Resp to Biot stimulus	20	78	98	29	62	91	72	83	155	9	13	22	46	63	109			
Development	46	56	102	54	47	101	70	67	137	13	11	24	68	41	109			
DNA/RNA Nucleus	47	49	96	36	31	67	101	55	156	7	5	12	57	24	81			
Energy	7	13	20	6	16	22	26	14	40		1	1	9	13	22			
Hormone Resp./Hormone	42	114	156	60	80	140	97	135	232	12	20	32	85	71	156			
Lipid Metabolic Process	29	60	89	31	47	78	51	74	125	11	9	20	43	42	85			
Others	78	167	245	92	135	227	186	208	394	12	14	26	134	127	261			
Photosynthesis	5	123	128	7	132	139	12	164	176	2	6	8	7	128	135			
Protein Modification Process	60	124	184	65	86	151	218	162	380	5	7	12	99	88	187			
Reg of transcr/transcrip factor	95	171	266	128	114	242	197	213	410	12	10	22	177	120	297			
Resp. to Abiotic Stimulus	225	291	516	274	230	504	397	390	787	61	33	94	343	219	562			
Signaling	13	68	81	21	47	68	52	88	140		4	4	22	48	70			
Structural	43	74	117	58	59	117	82	110	192	9	13	22	57	63	120			
Translation	14	38	52	10	40	50	29	61	90	1		1	20	41	61			
Transport	75	169	244	104	134	238	249	222	471	13	16	29	172	131	303			
GO uncharacterized	106	204	310	111	162	273	276	268	544	13	10	23	165	163	328			
	1339	2710	4049	1539	2180	3719	3091	3484	6575	260	282	542	2139	2086	4225			

Figura S1 Número de genes induzidos e reprimidos exclusivos em plantas WT e transformadas (35S::BiP-4). Plantas foram submetidas a diferentes níveis de estresse hídrico e o transcriptoma induzido comparado por diagrama de Venn. Cada categoria foi definida pelo Gene ontology.

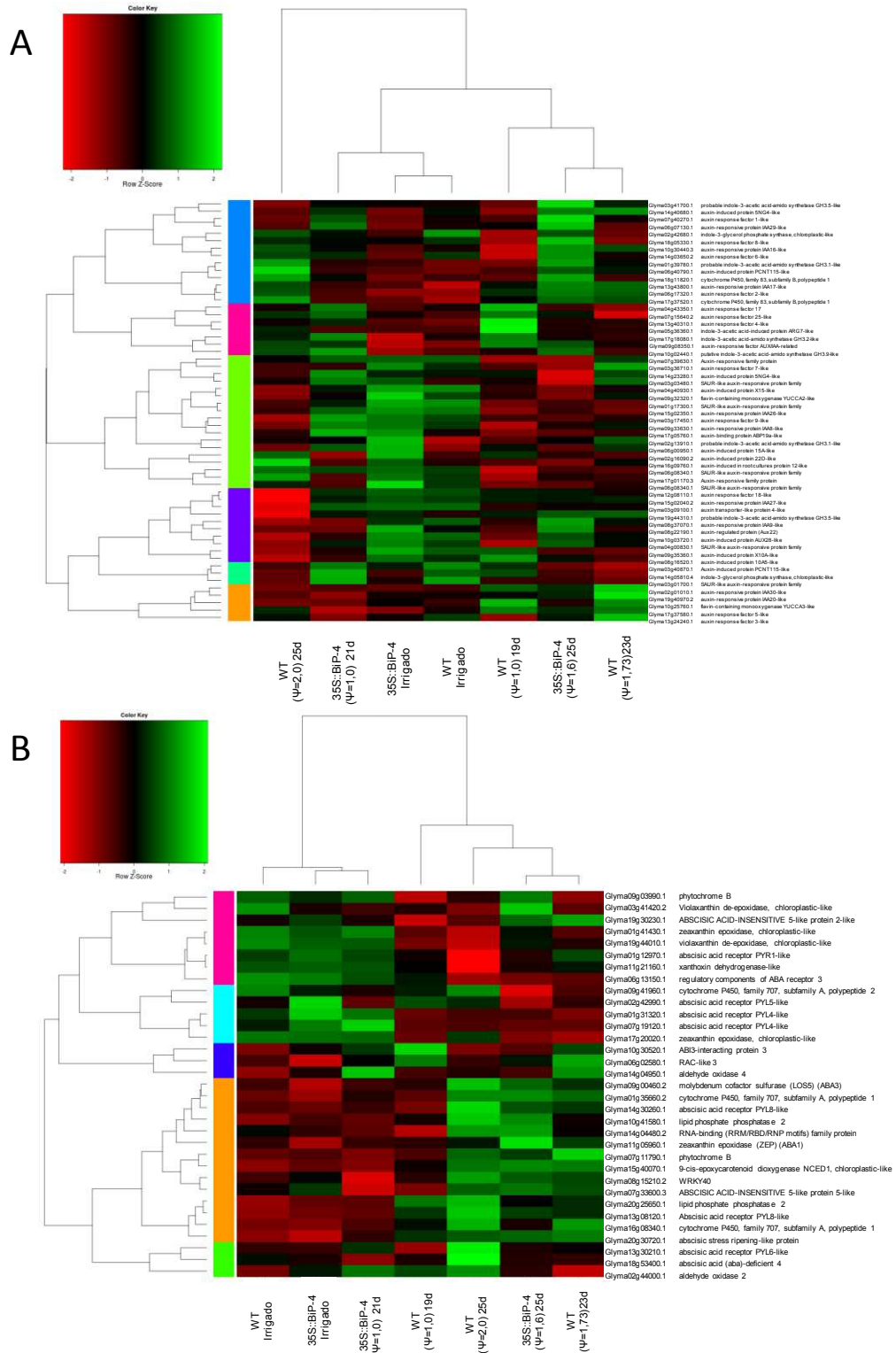


Figura S2 Heatmap englobando genes envolvidos aos hormônios. A) Auxinas, B) Ácido abscísico. Expressão absoluta de genes relacionados aos hormônios em soja WT e 35S::BiP-4 em condições normais de irrigação e submetidas a diferentes graus de déficit hídrico.

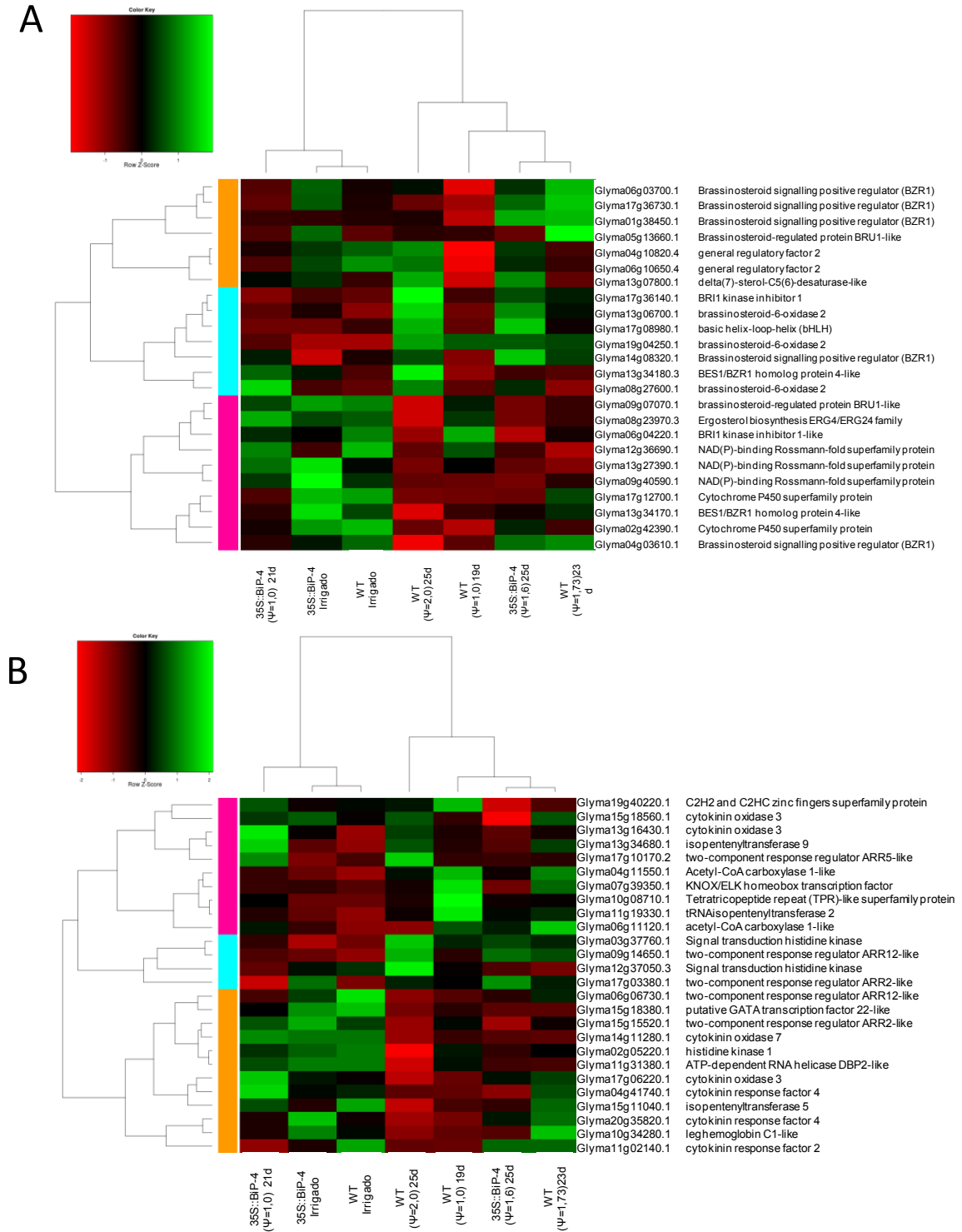


Figura S3 Heatmap englobando genes envolvidos aos hormônios. A) Brassinosteróides B) Citocininas. Expressão absoluta de genes relacionados aos hormônios em soja WT e 35S::BiP-4 em condições normais de irrigação e submetidas a diferentes graus de déficit hídrico.

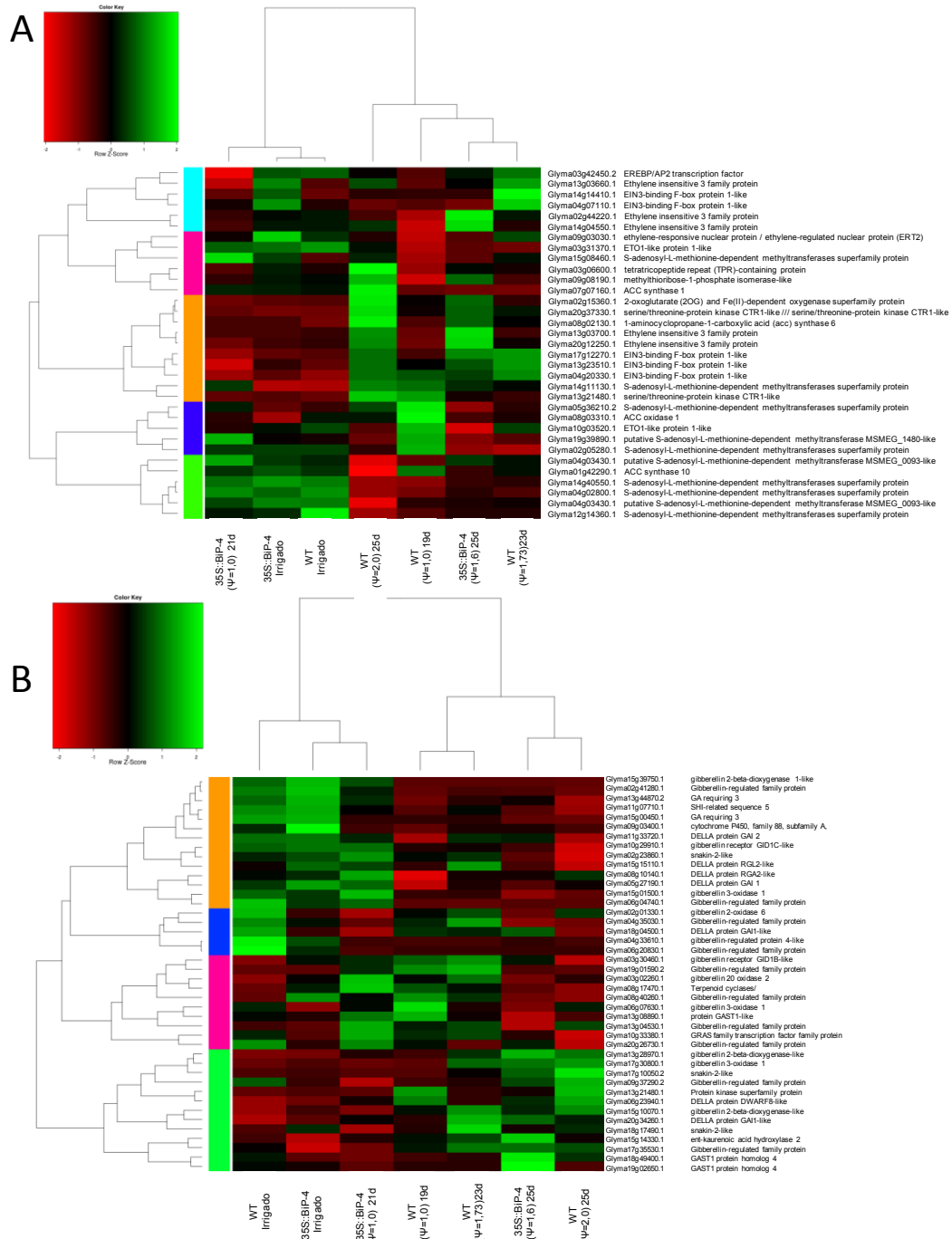


Figura S4 Heatmap englobando genes envolvidos aos hormônios. A) Etileno B) Giberelinas. Expressão absoluta de genes em soja WT e 35S::BiP-4 em condições normais de irrigação e submetidas a diferentes graus de déficit hídrico.

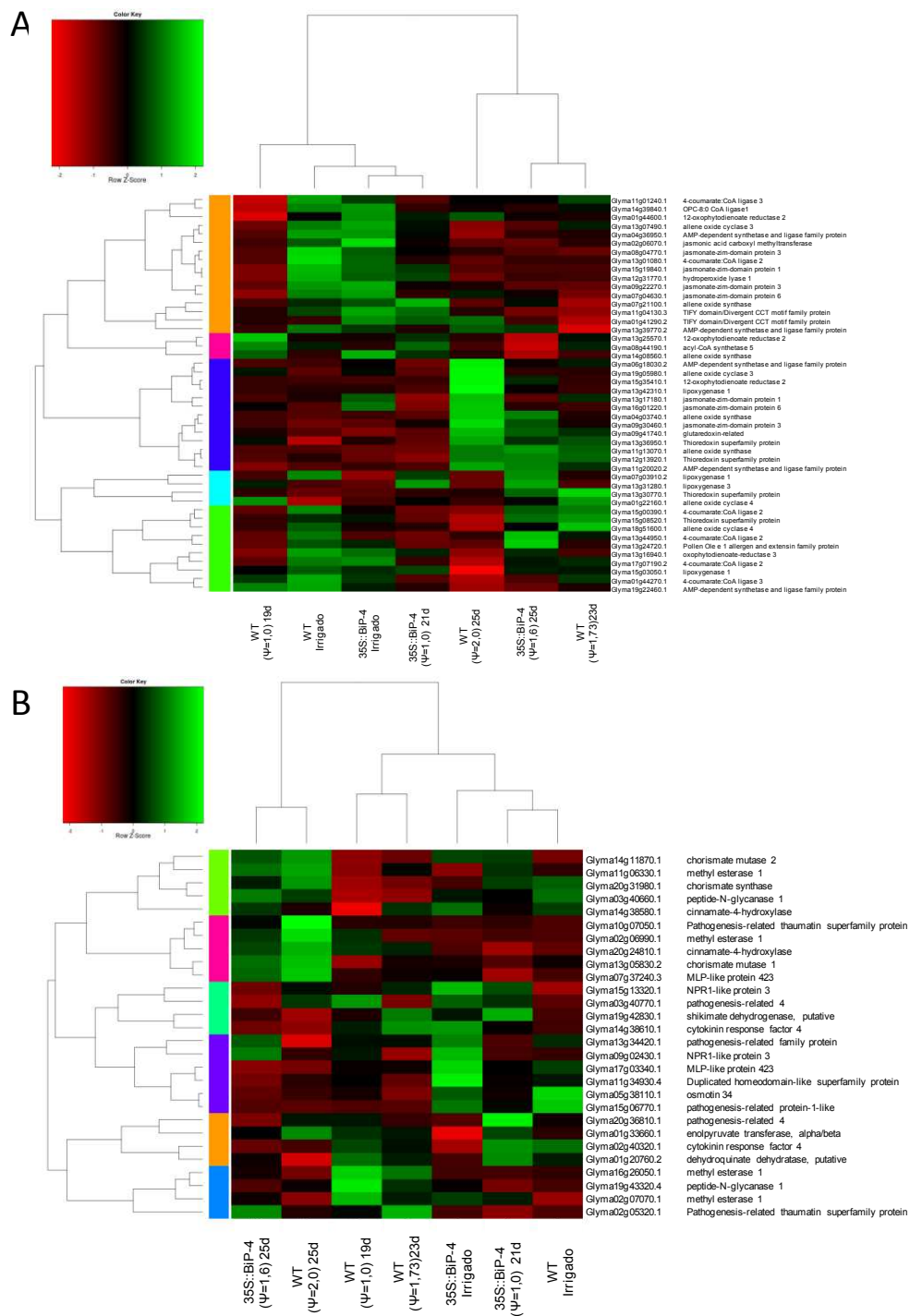


Figura S5 Heatmap englobando genes envolvidos aos hormônios. A) Etileno B) Giberelinas. Expressão absoluta de genes relacionados aos hormônios em soja WT e 35S::BiP-4 em condições normais de irrigação e submetidas a diferentes graus de déficit hídrico.