

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADA
A EVENTOS DE MORTE CELULAR PROGRAMADA EM
SEMENTE DE SOJA**

FERNANDA SILVA COELHO

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO DE 2018**

FERNANDA SILVA COELHO

**Análise da expressão de genes relacionada a eventos de morte
celular programada em semente de soja**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Centro de Biociências e Biotecnologia
da UENF como parte das exigências
para obtenção do título de Mestre
em Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Kátia Valevski Sales Fernandes

Co-orientadora: Prof. Dra. Clícia Grativol Gaspar de Matos

**Campos dos Goytacazes - RJ
Fevereiro de 2018**

Análise da expressão de genes relacionada a eventos de morte celular programada em semente de soja

FERNANDA SILVA COELHO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da UENF como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em: ___ / ___ / ___

Aprovada por:

Dr. Luiz Mors Cabral (UFF)

Dr. Thiago Motta Venâncio (UENF)

Dr. Ricardo Enrique Bressan-Smith (UENF)

Dra. Clícia Grativol Gaspar de Matos (co-orientadora) (UENF)

Dra. Kátia Valevski Sales Fernandes (orientadora) (UENF)

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ter me dado saúde, força, coragem e disposição para conduzir este trabalho, podendo assim amadurecer em minha vida pessoal e profissional.

À minha orientadora Dr^a. Kátia Valevski Sales Fernandes pela sua dedicação, paciência e atenção em me orientar.

À minha co-orientadora Dr^a Clícia Grativol Gaspar de Matos pelas orientações, conselhos, conversas, incentivos que contribuíram para o meu crescimento científico e profissional.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pela oportunidade de realização de uma Pós-Graduação gratuita e de qualidade.

Ao Dr. Luiz Cabral Mors, ao Dr. Thiago Mota Venâncio e ao Dr. Ricardo Enrique Bressan-Smith, por aceitarem a fazer parte da banca examinadora.

À Dr^a. Nathália Bastos Lima de Andrade, por aceitar revisar a Dissertação e por me incentivar na realização desta pós-graduação.

À Dr^a. Antônia Elenir Amâncio por me ensinar e auxiliar diversas vezes em meus experimentos.

Aos professores, alunos e técnicos dos LQFPP, que prontamente me auxiliaram quando precisava utilizar algum equipamento ou tirar alguma dúvida.

Aos meus pais, José e Creide que sempre apoiaram minhas decisões e meus estudos. Ao meu irmão, tias, tios, primos e minha avó que sempre me incentivaram e torceram por mim. Amo muito vocês!

À minha amiga Cida (Maria Aparecida Aride Bertonceli), pelo carinho, amizade de anos, incentivo e pela ajuda em meus experimentos.

Agradeço aos outros colegas de laboratório (Jaqueline, Walaci, Juliana, Leandro, Maria Luíza, Sara, Deíse, Paula), por fazerem do LQFPP um local agradável para se trabalhar.

Ao meu namorado, Marcos Pedrosa Pereira, por sempre estar ao meu lado, por apoiar minhas escolhas, por sempre me ajudar, por ter paciência, pela força nas inúmeras vezes que estava preocupada com experimentos, prazos, etc. Enfim, obrigada por essa parceria de anos. Amo você!

Agradeço também as minhas amigas Danielly e Alyne pela amizade, pelas conversas e pelos momentos de descontração que eu tanto precisava.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Classificação botânica, morfologia e origem (<i>Glycine max</i>).....	1
1.2. A Semente de soja e sua importância econômica	3
1.3. Vias de sinalização indutoras de morte celular programada em plantas	7
1.3.1 Genes relacionados à dessecação.....	8
1.3.2. Genes envolvidos com estresse oxidativo	9
1.3.3. Genes envolvidos com morte celular programada	11
1.4.3.1. Binding Proteins (BiP).....	14
1.4.3.2. Proteínas ricas em Asparagina (NRP).....	15
1.4.3.3. Enzimas de Processamento Vacuolar (VPEs).....	16
1.4.3.4. Metacaspases.....	18
2. JUSTIFICATIVA	20
3. OBJETIVOS.....	22
3.1. Objetivo Geral	22
3.2. Objetivos Específicos	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1. Obtenção das bibliotecas de transcriptomas de sementes de soja.....	23
4.2. Análise da expressão global através do Mapman.....	23
4.5. Material vegetal.....	24
4.7. Ensaio Enzimático.....	25
4.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida e Western Blotting	25
5. RESULTADOS	28
5.1. Análise global da expressão de genes.....	28

5.2. Análise da expressão de genes envolvidos com a resposta à dessecação durante o desenvolvimento e germinação de sementes de soja	36
5.3. Análise da expressão de genes envolvidos com estresse oxidativo e atividade enzimática correspondente em sementes de soja	39
5.4. Análise da expressão de genes e proteínas envolvidos com morte celular programada em sementes de soja	42
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÕES	60
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração dos processos fisiológicos que ocorrem durante o desenvolvimento e maturação da semente de soja.....	4
Figura 2: Esquema geral das fases da germinação e pós-germinação de uma semente de eudicotiledôneas	5
Figura 3: Esquema geral das vias envolvidas na ativação de morte celular programada.	7
Figura 4: Genes expressos categorizados pelo Mapman relacionados ao estresse biótico e abiótico. Visão geral da regulação de genes expressos na embriogênese (4 DAF, 12-14 DAF e 22-24 DAF) da semente de soja	30
Figura 5: Expressão de genes categorizadas pelo Mapman relacionados ao estresse biótico e abiótico. Visão geral da regulação da expressão de genes nas fases de início e final da maturação (100-200mgWS/5-6mgWS)	32
Figura 6: Expressão de genes categorizadas pelo Mapman relacionados ao estresse biótico e abiótico. Visão geral da regulação da expressão de genes nas fases.....	34
Figura 7: Genes expressos categorizados pelo Mapman como relacionados ao estresse biótico e abiótico. Visão geral da regulação de genes diferencialmente expressos nas fases 5-6mgSC e 5-6mgCOT	35
Figura 8: Diagrama de Venn mostrando a quantidade de genes expressos em cotilédone, tegumento e nos dois tecidos ao mesmo tempo.	35
Figura 9: Expressão dos genes relacionados à dessecação, nos diferentes estádios de desenvolvimento da semente de soja e eixo embrionário durante a germinação	37
Figura 10: Expressão dos genes relacionados à desidratação nos diferentes estádios de desenvolvimento da semente de soja e eixo embrionário em germinação (frequência em RPKM).	38
Figura 11: Expressão dos genes referentes à SOD nos diferentes estádios de desenvolvimento da semente de soja e eixo embrionário em germinação (frequência em RPKM)	40
Figura 12: (A) Expressão dos genes relacionados à catalase nos diferentes estádios de desenvolvimento da semente de soja e eixo embrionário em germinação (frequência em RPKM). (B) Atividade da catalase (CAT) em diferentes tecidos da semente de soja quiescente.....	41
Figura 13: Representação em “heatmap” dos valores de expressão dos genes NRP (RPKM) em diferentes tecidos de soja.....	43
Figura 14: Representação em “heatmap” dos valores de expressão dos genes VPE (RPKM em log ₂) em diferentes tecidos de soja	44
Figura 15: Representação em “heatmap” dos valores de expressão dos genes metacaspase (RPKM em log ₂) em diferentes tecidos de soja	46

Figura 16: (A) Frequência em RPKM da expressão dos genes referentes à BiP nos diferentes estádios de desenvolvimento da semente de soja e eixo embrionário em germinação. (B) Níveis de expressão de BiP durante a germinação em eixo embrionário e cotilédones de semente de soja 48

Figura 17: Níveis de expressão de BiP durante a germinação de soja. (A) germinação de eixos embrionários e cotilédones dos cultivares BRS284 e (B) germinação de eixos embrionários Embrapa 48 e BR16 49

Figura 18: Representação esquemática dos principais níveis de expressão dos genes que se relacionam ao desencadeamento de morte celular programada durante o desenvolvimento e germinação de sementes de soja..... 51

ABREVIATURAS

MCP – morte celular programada

BiP - binding proteins

NRP - proteínas ricas em asparagina

VPE - enzima de processamento vacuolar

DAF - dias após a fertilização

WS – whole seed (semente inteira)

COT – cotilédones

SC – seed coat

ABA – ácido abcísico

JA - ácido jasmônico

SDS-PAGE – sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel

SDS –Dodecil sulfato de sódio

TEMED - N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina

RPKM - reads per kilobase per million mapped reads

HAE - horas após a embebição

EROs – espécies reativas a oxigênio

SOD – superóxido dismutase

CAT - catalase

RESUMO

A morte celular programada (MCP) é um processo vital e geneticamente controlado durante o desenvolvimento normal de organismos. Identificar genes que estão envolvidos nas vias de sinalização que desencadeiam a MCP permite compreender processos importantes durante o desenvolvimento e germinação da semente de soja, que é uma das culturas mais importantes do mundo, comercializada sob as formas de grão, farelo e óleo bruto ou refinado. A proposta deste trabalho foi analisar a expressão de genes relacionados ao desencadeamento de MCP durante o desenvolvimento e germinação de sementes de soja. Inicialmente, comparamos os perfis globais de expressão dos genes em sementes de soja, durante a embriogênese e maturação. Analisamos também a expressão de genes envolvidos nas vias de estresse hídrico (dessecação e desidratação), oxidativo (superóxido dismutase e catalase), BiP (chaperonas moleculares) e genes marcadores de morte celular (NRP, VPE e metacaspases). Para tal, utilizamos inicialmente bibliotecas de RNA-Seq de diferentes estádios do desenvolvimento e germinação de sementes de soja previamente publicadas. Essa análise mostrou uma maior expressão dos genes no início e ao longo da embriogênese do que ao final deste estágio. Analisamos a expressão dos genes ao longo da maturação e ao final da maturação, observamos maior expressão de genes RD22 (responsivos a dessecação 22) e alta expressão de genes responsivos a desidratação. Porém, essa expressão diminuiu com o passar das horas de germinação. Com relação ao estresse oxidativo, genes CSD (Superóxido Dismutase Citoplasmático) mantiveram expressão significativa durante o desenvolvimento da semente. A catalase mostrou alta expressão em sementes quiescentes, mas essa expressão reduziu-se aos poucos, em eixos embrionários durante a germinação. Sementes de soja BRS 284 quiescentes tiveram seus tecidos separados em eixo embrionário, cotilédones e tegumento e testados para a atividade da catalase. Foi verificada maior atividade da catalase em tegumentos e eixos embrionários. Quanto à expressão de genes marcadores de MCP, foi analisada a expressão de genes metacaspases, VPE e NRP. Estes últimos tiveram maior expressão em tegumentos. Os genes VPE mostraram maior expressão em tegumentos. Um desses genes, além de ter

maior expressão em tegumentos, mostrou ser mais expresso na embriogênese. Os genes de metacaspases são mais expressos em tegumentos, mas também foram expressos em algumas etapas da embriogênese, em cotilédones ao final da maturação e em eixos embrionários em 24 HAE. Sementes de soja, dos cultivares BRS 284, BR 16 e Embrapa 48, foram testadas imunologicamente para a presença de BiP, um atenuador de MCP. No cultivar BRS 284 foram detectadas algumas isoformas de BiP. Em eixos embrionários (0, 6, 12 e 24 HAE), uma banda em torno de 78 kDa foi detectada. Outra banda em torno de 40 kDa aparece em 24 HAE, em cotilédones. Nas amostras BR16 (suscetível a seca) notamos uma banda de ~78 kDa em todas as amostras de eixo embrionário nos tempos de 0, 6, 12 e 24 HAE e, apenas no tempo de 24 HAE aparece outra banda em torno de 35 kDa, perfil similar ao do cultivar BRS284. No cultivar Embrapa 48 (resistente a seca) o padrão de BiP encontrado é diferente dos demais cultivares (BRS 284 e BR 16). Nas amostras Embrapa 48, foram detectadas uma banda aproximadamente de ~78 kDa e uma banda de ~35 kDa nos tempos 0 e 12 HAE. Os resultados do presente trabalho contribuíram para melhor compreensão de genes envolvidos nas vias de sinalização que culminam em MCP.

Palavras-chave: Morte celular programada, expressão de genes, genes marcadores de morte, BiP, semente de soja.

ABSTRACT

Programmed cell death (MCP) is a vital and genetically controlled process during the normal development of organisms. Identifying genes that are involved in signaling pathways that trigger a programmed cell death (MCP) allow processes to generate energy as well as grain form, bran and crude or refined oil. The aim of this work was to analyze the expression of genes related to the triggering of MCP during the development and germination of soybean seeds. Initially, we compared the global gene expression profiles in soybean seeds during embryogenesis and maturation. We analyzed the expression of genes involved in water stress (desiccation and dehydration), oxidative stress (superoxide dismutase and catalase), BiP (molecular chaperones) and cell death marker genes (NRP, VPE and metacaspases). For this, we initially used RNA-Seq libraries from different stages of the development and germination of previously published soybean seeds. We analyzed the expression of the genes along the maturation and at the end of the maturation, we observed higher expression of RD22 genes at the end of maturation and genes responsible for dehydration, but this expression decreased with the passing of the germination hours. CSD (Cytoplasmic Superoxide Dismutase) genes maintained significant expression during seed development. Catalase showed high expression in quiescent seed, but this expression was gradually reduced in embryonic axis during germination. BRS 284 quiescent soybeans had their tissues separated into embryonic axis, cotyledons and integument and tested for catalase activity. Higher catalase activity was observed in teguments and embryonic axes. Regarding the expression of MCP marker genes was analyzed the expression of genes metacaspases, VPE and NRP. The latter had greater expression in teguments. VPE genes showed higher expression in integuments. One of these genes, besides having greater expression in teguments, has been shown to be more expressed in embryogenesis. The metacaspases genes are more expressed in teguments, but were also expressed in some stages of embryogenesis, in cotyledons at the end of maturation and in embryonic axes in 24 HAI. Soybean seeds, cultivars BRS 284, BR 16 and Embrapa 48, were immunologically tested for the presence of BiP, an attenuator of MCP. In the cultivar BRS 284 some BiP isoforms were detected. In embryonic axes (0, 6, 12

and 24 HAI), a band around 78 kDa was detected. Another band around 40 kDa appears in 24 HAI, on cotyledons. In samples BR16 (susceptible to drought) we noticed a band of ~78 kDa in all samples of embryonic axis at the times of 0, 6, 12 and 24 HAI and only in the time of 24 HAI another band appears around 35 kDa, profile similar to that of cultivar BRS284. In the cultivar Embrapa 48 (resistant to drought) the BiP pattern found is different from the other cultivars (BRS 284 and BR 16). In the Embrapa 48 samples, a band of approximately ~78 kDa and a band of ~35 kDa were detected at 0 and 12 HAI times. The results of the present work contributed to a better understanding of the genes involved in the signaling pathways that culminate in MCP.

Keywords: Programmed cell death, gene expression, death marker genes, BiP, soybean seed.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Classificação botânica, morfologia e origem (*Glycine max*)

A soja é uma planta pertencente ao filo/divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Fabales, família Fabaceae (Leguminosae), subfamília Faboideae (Papilionoideae), gênero *Glycine*, espécie *Glycine max* (L.) Merrill (SEDIYAMA, 2009).

De acordo com SEDIYAMA (1996), a planta é uma herbácea anual, de porte ereto, pubescente, de tricomas brancos, pardos, queimados ou tostados e mostra variação na característica morfológica de acordo com o cultivar; a altura da planta pode sofrer influência do ambiente, e assim variar de 30 a 200 cm. A raiz principal é pivotante e possui ramificações distribuídas em quatro ordens, ricas em nódulos de bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico. O caule é ramificado e se desenvolve a partir do eixo embrionário. O crescimento do caule pode ser determinado ou indeterminado. Em cultivares com crescimento determinado, a gema apical encerra sua atividade vegetativa com o início do florescimento. Já no crescimento indeterminado, a gema terminal tem sua atividade vegetativa continuada concomitantemente com a fase reprodutiva da planta (MÜLLER, 1981; SEDIYAMA, 2009). No primeiro nó, possui um par de folhas simples inseridas opostamente, acima do nó cotiledonar, de pecíolos longos. As demais folhas são trifoliadas e as dimensões foliares dependem do tipo foliar, posição na planta, condições de luminosidade e do cultivar e vigor da planta (MÜLLER, 1981; SEDIYAMA, 2009, 1996).

A inflorescência é um racemo axilar, com pedúnculo variando de 2 a 35 cm. As flores variam de coloração podendo ser brancas, amarelas ou violáceas, segundo o cultivar. As vagens são achatadas, curtas, de 2 a 7 cm de comprimento, de cor cinzenta, amarelo-palha ou preta e podem chegar a 400 por planta, com número de grãos variando de 1 a 5 por vagem; porém, na maioria dos cultivares, possuem de 2 a 3 sementes (FEHR & CAVINESS, 1977; MÜLLER, 1981; SEDIYAMA, 2009, 1996).

A descrição dos estádios de desenvolvimento da soja foi proposta por FEHR e CAVINESS (1977) e é a mais utilizada no mundo. Eles dividem o

desenvolvimento da planta em estádios vegetativo (V) e reprodutivo (R). Os estádios vegetativos são determinados pela contagem do número de nós no tronco principal, sendo denominados VE, VC, V1, V2 e V3. Nos estádios vegetativos, VE é caracterizada pela emergência dos cotilédones e VC quando os cotilédones encontram-se completamente abertos e expandidos. Já os estádios reprodutivos são determinados pela letra R, o qual é acompanhado pelos números de um (1) até oito (8), que descrevem com detalhes o período de florescimento/maturação. Os estádios reprodutivos compreendem a fase R1e R2 (florescimento), R3 e R4 (desenvolvimento da vagem), R5 e R6 (desenvolvimento do grão) e a fase R7 e R8 (maturação da planta).

A soja originou-se na costa leste da Ásia, principalmente na China, ao longo do rio Yang-Tsé. A literatura chinesa antiga revela que a soja pode ter sido cultivada extensivamente na China e Manchúria, sendo provavelmente a China o centro genético primário, e a Manchúria, o centro secundário ou centro de diversidade genética (EMBRAPA SOJA, 2000; HYMOWITZ, 1970). Sua dispersão geográfica, então, teria ocorrido a partir dessas regiões (MÜLLER, 1981). A partir do século XVIII, a soja foi introduzida no Ocidente e foi em 1739 introduzida experimentalmente na Europa. O primeiro relato do comportamento da soja nos Estados Unidos foi em 1804, onde foi cultivada como forrageira e, posteriormente, como produtora de grãos (FEDERIZZI, 2005)

No Brasil, a planta foi introduzida em 1882, pelo professor Gustavo D'Utra, na Escola Agrícola da Bahia (SANTOS, 1988), onde cultivou e estudou genótipos de origem desconhecida. Esses genótipos foram levados e semeados na região sul, onde tiveram melhor adaptação, devido às condições climáticas serem semelhantes àquelas das regiões tradicionais de cultivo (VERNETTI, 1983). O cultivo comercial da cultura de soja começou a ter expressão econômica no Rio Grande Sul no início da década de 40. Porém sua grande expansão deu-se nas décadas de 70 e 80, com a criação de programas de melhoramento de soja, o que resultou em cultivares adaptados às condições climáticas brasileiras (EMBRAPA SOJA, 2000). A expansão da cultura de soja à região Centro-Oeste do país foi realizada a partir de adaptações das condições do solo do cerrado e adaptações da soja às condições tropicais (EMBRAPA SOJA, 2000).

1.2. A Semente de soja e sua importância econômica

Em geral as sementes de soja são achatadas e elípticas, lisas por completo e levemente brilhantes, podendo variar a intensidade do brilho em decorrência da existência de cera na superfície da cutícula. A cor do hilo pode variar, podendo ser marrom, amarela, marrom-clara e preta, entretanto essa tonalidade pode sofrer variações em virtude das condições de cultivo e da origem genética (MÜLLER, 1981; SEDIYAMA et al., 1996). O processo reprodutivo da soja se dá principalmente por processo de auto-fertilização e o primeiro dia (R1) em que a flor está totalmente aberta é geralmente considerado o primeiro dia de fertilização (JONES e VODKIN, 2013; RITCHIE et al., 1996).

O desenvolvimento da semente é iniciado por um evento de dupla fertilização, na qual se obtém um embrião zigótico, formado pela fusão do gameta masculino e o núcleo da célula ovo, e o endosperma, produto da fertilização da célula central do gametófito feminino por um segundo gameta masculino, que constitui a reserva que será disponibilizada nas fases iniciais do desenvolvimento da semente. O tecido endospermático desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da semente, tanto em termos nutritivos (leva nutrientes para o embrião em desenvolvimento a partir de tecidos maternos), quanto em termos do crescimento das sementes (BECRAFT e GUTIERREZ-MARCOS, 2012; BERGER et al., 2006; COSTA et al., 2004; LI & BERGER, 2012). A semente, uma vez formada, é diferenciada pelos principais compartimentos: o embrião, o endosperma e o tegumento (LE et al., 2007).

Após a fertilização, o período de desenvolvimento é dividido nas fases da embriogênese, expansão celular e maturação da semente (Figura 1). Na embriogênese ocorre a diferenciação dos tecidos em embrião e cotilédones. Em torno de 3 a 5 dias após a floração (DAF), o embrião passa a ter uma forma esférica (estágio globular) com endosperma acelular e um sistema vascular rudimentar que se desenvolve através do tegumento externo, o qual se tornará o tegumento da semente. Por volta de 8-10 DAF, têm início a formação dos cotilédones na fase de coração (RITCHIE et al., 1996). Ainda na embriogênese, em 12-14 DAF, os cotilédones começam a alongar-se pelo aumento do conteúdo de água e aumento de peso fresco da semente (BEWLEY & BLACK,

1994; RITCHIE et al., 1996) A fase de expansão celular ocorre por volta de 17-19 DAF e nessa fase há deposição de compostos de reserva como proteínas, carboidratos e lipídios nos cotilédones e em outras estruturas de reserva. Em 22-24 DAF, os cotilédones e o primórdio da primeira folha trifoliada começa a se desenvolver (RITCHIE et al., 1996). O conteúdo de água chega a níveis máximos e começa a decair, e o peso seco da semente começa se elevar. Na maturação, o peso seco aumenta, e a semente entra em quiescência; há um acentuado processo de desidratação e o conteúdo de água chega a níveis mínimos necessários para a manutenção do metabolismo basal (BEWLEY & BLACK, 1994).

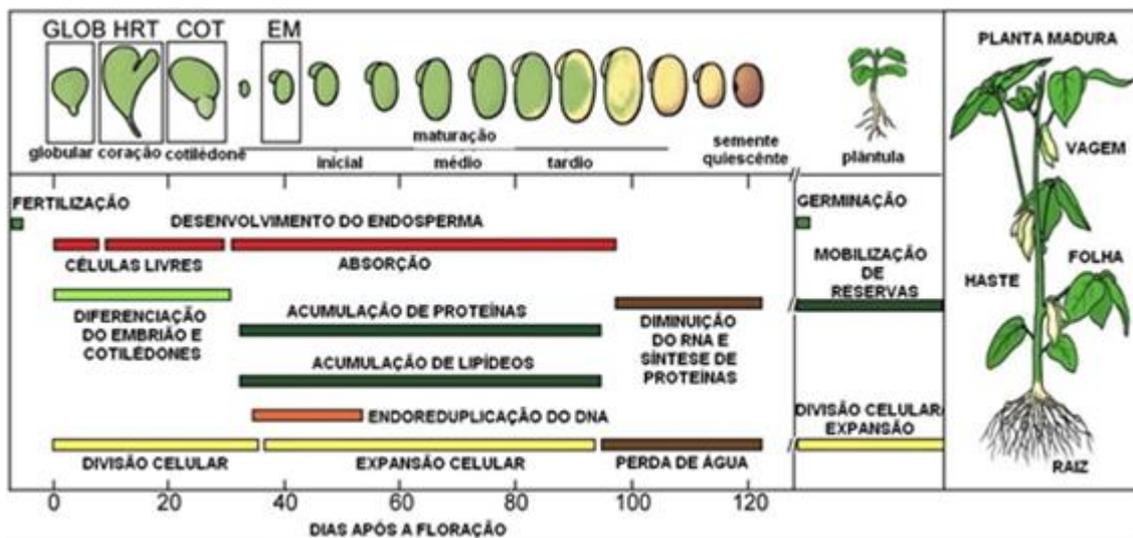


Figura 1: Ilustração dos processos fisiológicos que ocorrem durante o desenvolvimento e maturação da semente de soja. A figura mostra os estágios do desenvolvimento da semente de soja, desde a embriogênese até a quiescência e os principais processos morfológicos e fisiológicos específicos de cada fase. (Adaptada de LE et al., 2007).

Ao final do desenvolvimento as sementes possuem em sua organização: cotilédones, que armazenam compostos de reserva; eixo embrionário, composto pelos eixos hipocótilo-radícula e epicótilo; e tegumento, que protege o embrião (BEWLEY & BLACK, 1994; LE et al., 2007).

A germinação (Figura 2) tem início após o processo de dispersão da semente da planta-mãe, com a absorção de água pela semente, o que permite a reativação das atividades metabólicas, levando à síntese de proteínas a partir de mRNA pré-existentes, à liberação de solutos para o ambiente externo e reparo nas estruturas celulares, como DNA e mitocôndrias. A absorção de água para o interior da semente é posteriormente reduzida e ocorre a síntese *de novo* de proteínas e também ocorre a síntese de novas mitocôndrias. O alongamento da radícula, mobilização das proteínas de reserva, síntese de DNA e a produção de novas células ocorrem na fase conhecida como pós-germinativa. A delimitação entre a fase germinativa *per se* e a fase pós-germinativa é convencionalmente considerada como correspondente ao momento exato da extrusão ou emergência da radícula (BEWLEY & BLACK, 1994).

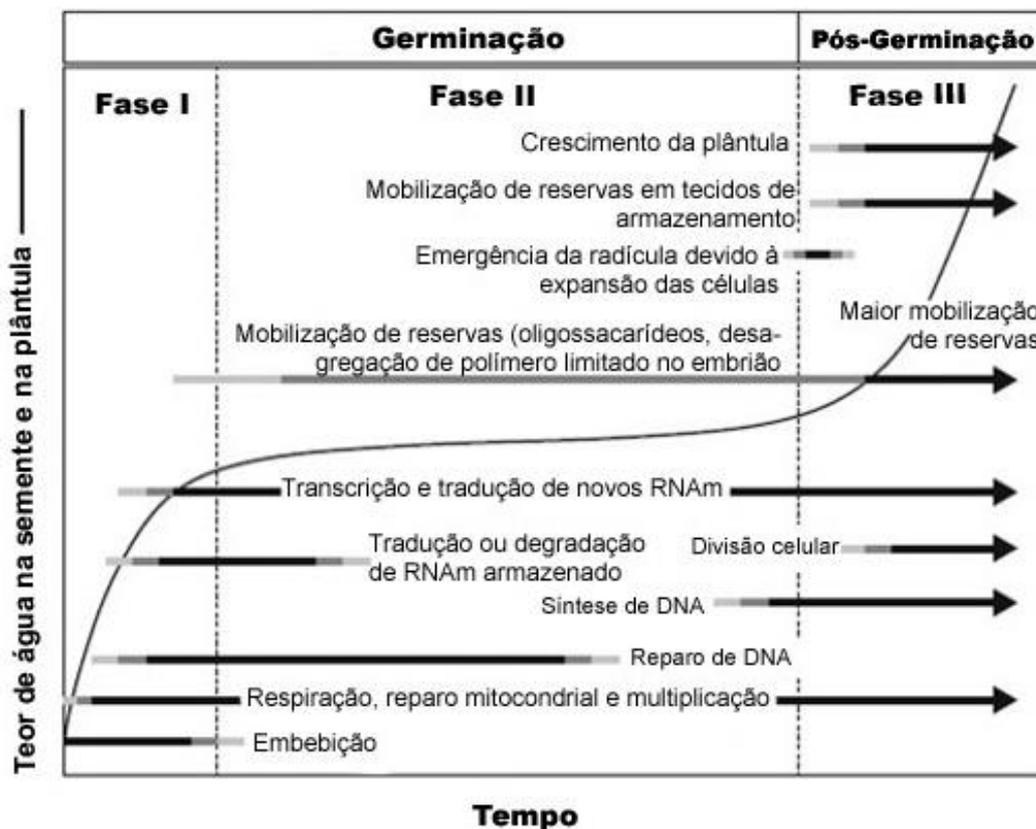


Figura 2: Esquema geral das fases da germinação e pós-germinação de uma semente de eudicotiledôneas. (Adaptada de BEWLEY, 2013).

A semente de soja possui grande quantidade de proteínas e lipídios, e estes estão contidos principalmente nos cotilédones. A composição química da semente depende basicamente das características genéticas e das condições climáticas. Em peso seco, possui aproximadamente 40% de proteínas, 20% de óleos, 35% de carboidratos e 5% de minerais (EMBRAPA SOJA, 2000). As adaptações da semente e os nutrientes de reserva que a mesma possui são fatores-chave para a obtenção da estabilização no ambiente com sucesso, pois estes deverão ser disponibilizados para sustento da planta jovem durante os estádios iniciais do seu crescimento, antes da mesma se tornar um organismo autotrófico, ou seja, capaz de utilizar a energia da luz (BEWLEY & BLACK, 1994).

A soja é uma cultura de relevante importância agro econômica para o Brasil e o mundo, sendo a principal cultura do agronegócio brasileiro (EMBRAPA SOJA, 2000). Essa leguminosa oleaginosa abrange lugar de destaque na indústria de alimentos, sendo ofertada como fonte de proteína e óleo para o consumo humano e como farelo, rico em proteína, para a alimentação animal (KLAHOLD et al., 2006; PAIVA et al., 2006; SÁ, 2006). É cultivada em vários lugares do mundo, devido à facilidade de cultivo. O Brasil é considerado o segundo maior produtor mundial de grãos de soja, com produção, na safra de 2017, de mais de 113,923 milhões de toneladas, ficando atrás apenas dos EUA (CONAB, 2017). Essa posição ocupada pelo Brasil deve-se a diversos programas de melhoramento genético que vêm sendo realizados (CAVALCANTE et al., 2010). No Brasil, o Estado que mais produz soja é o Mato Grosso, em virtude de cultivares geneticamente melhoradas terem se adaptado com sucesso à região, seguido pelo Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e Mato Grosso do Sul (CONAB, 2017; EMBRAPA SOJA, 2000).

Numerosas pesquisas são destinadas a compreender fatores que proporcionam o aumento da produtividade da soja, sendo desenvolvidos cultivares mais resistentes, com alto rendimento e adaptados às diversas condições climáticas do Brasil, que podem ser plantados em áreas antes inexploradas, como o cerrado (GERIBELLO PRIOLLI et al., 2004; GUARESCHI et al., 2008; PELUZIO et al., 2010). O déficit hídrico é um dos fatores que afetam a produtividade de várias culturas, incluindo a soja. Sendo assim,

analisar e compreender genes que atuam em vias que desencadeiam mecanismos de tolerância e defesa em plantas é fundamental para desenvolverem-se cultivares tolerantes à seca.

1.3. Vias de sinalização indutoras de morte celular programada em plantas

A resposta fisiológica das plantas a estresses bióticos e abióticos envolve a ativação de genes que desencadeiam alterações em mecanismos bioquímicos e moleculares, os quais induzem uma série de respostas na planta que podem culminar em eventos de morte celular programada (Figura 3).

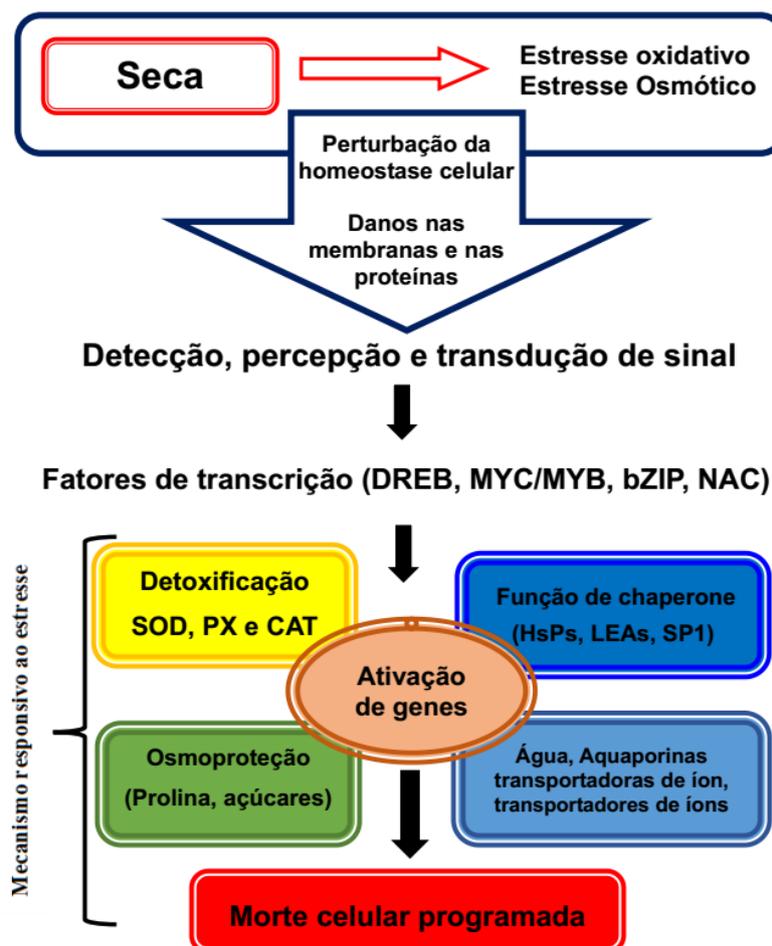


Figura 3: Esquema geral das vias envolvidas na ativação de morte celular programada (Adaptada de SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000 e FONTES, 2016).

1.3.1. Genes relacionados à dessecação

Plantas expostas a baixa disponibilidade de água adquiriram mecanismos de desidratação lenta, ponto considerado chave para o sucesso da tolerância à dessecação. Estudos sobre a tolerância à dessecação de cianobactérias sub-aéreas da espécie *Scytonema geitleri* mostraram que quando as esteiras microbianas secas foram reidratadas, as moléculas de água mostram grau de preferência por locais de ligação específicos em macromoléculas (TIWARI; TRIPATHI, 1998a, 1998b). A lenta desidratação em musgo aquático *Fontinalis* protege as células contra a dessecação induzida pela produção de espécies reativas a oxigênio e por um burst oxidativo (CRUZ DE CARVALHO et al., 2012)

Em sementes, quando o teor de água reduz, há uma redução no metabolismo e a semente fica no estado quiescente. Sementes quiescentes resistem a condições adversas do ambiente e, quando expostas às condições adequadas, o metabolismo é retomado no processo de germinação (BEWLEY & BLACK, 1994). Para sementes, foi proposto que proteínas e açúcares solúveis são importantes na aquisição da tolerância à dessecação durante o desenvolvimento. Proteínas, como as *late embryogenesis abundant* - LEA, são normalmente acumuladas durante as fases finais da embriogênese em resposta à secagem (BLACKMAN et al., 1991), bem como pequenas proteínas de choque térmico (Heat Shock Protein – smHSPs). Foi observado que a expressão dessas proteínas durante o desenvolvimento da semente coincidem com a expressão das LEAs (BEWLEY et al., 2013).

A anidrobiose é uma estratégia que certos organismos apresentam para sobreviver à desidratação extrema. É geralmente observada entre os organismos que apresentam a capacidade de reviver seu metabolismo na reidratação, mesmo após a remoção de toda ou quase toda a água celular sem danos. Este mecanismo requer uma série de eventos, coordenados durante a desidratação, que estão associados à prevenção do dano oxidativo e à manutenção das estruturas de macromoléculas e de membranas (HOEKSTRA et al., 2001). Hormônios podem atuar como reguladores da anidrobiose e da MCP, como por exemplo o ácido abscísico (ABA). Eles promovem a tolerância

à dessecação e ao mesmo tempo regulam negativamente a MCP em células de aleurona de cevada (BETHKE et al., 1999; GUO & DAVID HO, 2008).

Genes ERD (*Early Responsive to Dehydration*) são ativados rapidamente durante o estresse hídrico. As proteínas codificadas por esses genes apresentam grande diversidade estrutural e funcional, como uma classe de proteínas que atuam interligando vias de respostas ao estresse. A família destas proteínas é composta por 16 membros da mesma família, sendo classificadas de ERD1 a ERD16. Estudos mostraram que proteínas ERD15 de diferentes espécies podem atuar como mediadores entre comunicações cruzadas de diferentes vias de respostas. Em soja, ERD15 pode atuar como conector de diferentes vias de respostas ao estresse que desencadeiam sinais de morte celular programada (ALVES et al., 2011a; ALVES et al., 2011b).

1.3.2. Genes envolvidos com estresse oxidativo

De acordo com MØLLER (2001), espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas normalmente durante o metabolismo celular, porém quando em excesso, tornam-se tóxicas à célula. EROs são produzidas também como uma resposta primária da planta ao estresse biótico e abiótico, gerando danos oxidativos (ASADA, 2006). Embora esse aumento na produção de EROs seja uma ameaça à célula, essas espécies podem também agir como sinalizadores para a ativação de respostas a estresse e vias de defesa do vegetal (MITTLER, 2002). Assim, EROs podem ser consideradas indicadores celulares de estresse e mensageiros secundários envolvidos na via de transdução de sinais na resposta ao estresse (MITTLER, 2002).

Para eliminar o excesso de EROs, as células dispõem de vários mecanismos de detoxificação que estão envolvidos na proteção celular, como atuação de enzimas antioxidantes e um sistema mais complexo de detoxificação, que impede a ação nociva das EROs à célula (RESENDE et al., 2003). Espécies reativas de oxigênio, como o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}), são constantemente produzidas como subprodutos de várias vias metabólicas, em diferentes compartimentos celulares (APEL e HIRT, 2004).

A redução do O_2 produz radicais de vida relativamente curta, os chamados superóxidos (O_2^-), que podem ser produzidos por meio de vários mecanismos, tais como pela ativação da NADPH-oxidase/sintase ligada à membrana, por peroxidases (POX) da parede celular e lipoxigenases (LOX) e também como resultado da transferência de elétrons na mitocôndria ou cloroplasto (MØLLER, 2001).

O superóxido (O_2^-) é dismutado, pela enzima superóxido dismutase (SOD), a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e água (H_2O). O H_2O_2 consegue atravessar a membrana e se distribui a partir do local de sua produção (VAN BREUSEGEM et al., 2001), podendo inativar enzimas, como as superóxidos dismutases (SODs Cu/Zn e Fe) e diversas enzimas do ciclo de Calvin, bem como provocar danos aos ácidos nucléicos e proteínas e realizar a peroxidação de lipídeos (BOWLER et al., 1994).

O H_2O_2 produzido por vários estímulos ambientais e de desenvolvimento pode atuar como uma molécula de sinalização que regula o desenvolvimento da planta, a adaptação ao estresse e a morte celular programada (MCP) (APEL & HIRT, 2004). A MCP induzida por H_2O_2 é essencial para diversos processos de desenvolvimento e respostas ambientais (APEL & HIRT, 2004), incluindo a morte de células da camada de aleurona (BETHKE & JONES, 2001), a resposta hipersensível (HR) causada por patógenos e as interações alelopáticas planta-planta (APEL & HIRT, 2004; BAIS et al., 2003).

O radical hidroxila (OH^\cdot) é a última e mais reativa espécie a ser formada. É formado pela redução do H_2O_2 por íons metálicos (Fe^{2+} e Cu^{2+}), na chamada reação de Fenton. Os radicais hidroxila possuem meia-vida curta, pois são radicais potencialmente fortes e com alta afinidade às biomoléculas no sítio de produção (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2000; HALLIWELL, 2006). O estresse oxidativo é resultado de falha nas defesas antioxidantes que levam ao excesso de produção de EROs. Este excesso leva a uma situação em que ocorrem danos oxidativos graves nas biomoléculas celulares, o que compromete a viabilidade das células (GECHEV & HILLE, 2005).

O controle de EROs em plantas é realizado por enzimas antioxidantes que estão presentes em diferentes compartimentos celulares. Dentre as enzimas antioxidantes, destacam-se a superóxido dismutase (SOD), ascorbato

peroxidase (APX), peroxidases (PX), glutathione reductase (GR), catalase (CAT) e polifenoloxidase (PPO). Entre os principais metabólitos antioxidantes, encontram-se o ácido ascórbico (AsA), a glutathione (GSH), o α -tocoferol e os carotenoides. Todos ocorrem em cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (DINAKAR et al., 2012; MITTLER, 2002).

A catalase é uma enzima antioxidante de suma importância para a regulação da homeostase do H_2O_2 , visto que pode funcionar como um dissipador celular do H_2O_2 em H_2O e O_2 . Estudos mostraram que a deficiência de catalase conduz a aumento dos níveis de H_2O_2 e desencadeia MCP (GECHEV et al., 2004; VANDENABEELE et al., 2004).

Trabalhos realizados em tabaco deficiente de catalase mostraram que o H_2O_2 proveniente da elevada fotorrespiração é capaz de desencadear respostas de defesa locais e sistêmica e ativar morte celular programada (CHAMNONGPOL et al., 1998; DAT et al., 2003). Em mutante de cevada com deficiência em catalase foi demonstrada a capacidade do H_2O_2 proveniente da fotorrespiração gerar perturbações no estado redox antioxidante, em folhas (NOCTOR et al., 2002). Em *Arabidopsis thaliana*, existe uma família de multigenes de catalase, que são At1g20630 (CAT1), At4g35090 (CAT2) e At1g20620 (CAT3) (FRUGOLI et al., 1996). Todos os três genes são altamente expressos em inflorescências, mas apenas os genes CAT2 e CAT3 são altamente expressos nas folhas. Foram descritas seis diferentes isoformas enzimáticas de catalase em *Arabidopsis*. VANDENABEELE et al. (2004) relataram, nesta espécie, que a deficiência de catalase afeta drasticamente a expressão gênica induzida por alta incidência de luz.

1.3.3. Genes envolvidos com morte celular programada

A morte celular programada (MCP) é um processo fisiológico geneticamente controlado, envolvendo a morte seletiva de células individuais, tecidos e órgãos inteiros. A apoptose é um tipo de MCP em que há fragmentação do DNA nuclear, formação dos corpos apoptóticos e sua degradação no lisossoma de uma célula fagocítica (LIMA et al., 2012; SCHWEICHEL & MERKER, 1973). A MCP em plantas, não pode ser

denominada apoptose, visto que em plantas não se observa a formação de corpos apoptóticos, pois plantas não apresentam células fagocíticas especializadas (LAM, 2004; VAN DOORN, 2011). A MCP em plantas é caracterizada como um suicídio geneticamente controlado, fundamental durante o crescimento e desenvolvimento normal do organismo, sendo ativada em respostas a estímulos bióticos e abióticos (GREENBERG, 2004; ROCHA et al., 2017; HARRAK et al., 2001).

A MCP difere da necrose, pois ocorre de forma passiva em resposta a perturbações ambientais (PENNELL & LAMB, 1997). A necrose é classificada como um tipo de morte celular não regulada, ocasionada por um estresse mais intenso, em que há inchaço protoplasmático, pois ocorre a perda da capacidade de controlar a osmolaridade e migração de água e íons para a célula (ROCHA et al., 2017; LENNON et al., 1991).

Embora a MCP desempenhe processo regulador, atua também como um dos mecanismos de sobrevivência da planta durante estresses bióticos e abióticos, tais como doenças, estresses hídrico, salino e térmico (TUZHNIKOV et al., 2008). Geralmente, a MCP direciona a morte de células indesejadas ou doentes, controlando assim o número de células em um dado tecido, o que mantém a homeostase.

Além disso, MCP também é observada durante certos processos de desenvolvimento, como em células que são excessivamente produzidas por órgãos ou tecidos que apresentam funções transitórias durante o desenvolvimento da planta, contribuindo para o correto desenvolvimento do organismo. WAN et al. (2002) descobriram que o integumento interno da semente de *Brassica napus* sofre desenvolvimento organizado e em seguida MCP. Também foi observada a ocorrência de MCP no processo de diferenciação dos feixes vasculares (BONKE et al., 2003; KOZELA e REGAN, 2003) e em raízes primárias das Cactaceae *Stenocereus gummosus* e *Pachocereus pringlei* (SHISHKOVA e DUROVSKY, 2005). LIMA et al. (2015) mostraram a ocorrência de MCP durante o desenvolvimento do tegumento de sementes de *Vigna unguiculata*, resultando em modificações celulares severas e na sua completa desidratação ao final do desenvolvimento e na eliminação da células do tegumento quando há reidratação durante a germinação. Foi

também observado MCP em cotilédones de feijão mungo (*Vigna radiata*) durante a germinação, onde a morte das células do parênquima de armazenamento dos cotilédones foi precedida pela mobilização e vacuolização da reserva (EGOROVA et al., 2010).

Como já mencionado anteriormente, a MCP pode ser desencadeada em resposta a estresses abióticos e bióticos. DANON et al. (2004) observaram que *Arabidopsis thaliana*, quando exposta à luz UVC, sofre MCP. Foi observado também que estímulo por choque térmico induziu MCP em plântulas de feijão mungo (EGOROVA et al., 2011). Quando há ataque por patógenos, ocorre HR, que ativa a MCP como alternativa para controlar a proliferação de agentes patogênicos (CHICHKOVA et al., 2004; DEL POZO & LAM, 1998; HATSUGAI et al., 2004; MCLELLAN et al., 2009).

VAN DOORN (2011) relata que podem ser observadas duas principais classes de MCP em plantas. A primeira classificada como autolítica e a segunda, como não autolítica. A morte celular programada autolítica ocorre durante o desenvolvimento normal da planta, no qual há liberação de hidrolases do vacúolo que, em seguida, entra em colapso, resultando em uma rápida degradação do citoplasma e ruptura do tonoplasto. A morte celular programada não autolítica ocorre por interação planta/patógenos, em respostas hipersensíveis (HR).

BALK e LEAVER (2001) sugerem que a mitocôndria desempenha um papel chave em MCP em plantas. São observadas mudanças fisiológicas e estruturais na mitocôndria durante o processo de morte celular programada, podendo variar de acordo com o tipo celular em estudo. Dentre as mudanças fisiológicas, incluem-se alterações no potencial de membrana, acumulação de espécies reativas de oxigênio e diminuição da produção de ATP; dentre as mudanças estruturais, incluem-se inchaço e desorganização das cristas mitocondriais, descontinuidades na membrana externa, inchaços na matriz mitocondrial e perda de densidade eletrônica (THOMAS & FRANKLIN-TONG, 2004).

1.4.3.1. Binding Proteins (BiP)

A proteína de ligação referida como BiP está envolvida na regulação de resposta ao estresse no retículo endoplasmático (RE). BiP também é conhecida como Grp78, uma proteína de 78 kDa pertencente à família das chaperonas Hsp70 (HAAS & MEO, 1988), e é uma das mais bem caracterizadas chaperonas moleculares, que auxilia e monitora processos de enovelamento de proteínas no RE. Atua distinguindo proteínas enoveladas corretamente das enoveladas incorretamente. Para que somente proteínas montadas e enoveladas corretamente sigam para o destino final na via secretória é utilizado o mecanismo de regulação mediado por BiP (ODA et al., 2003).

REIS et al. (2016) observaram que a superexpressão de BiP em soja atenuou o estresse no RE e estresse osmótico, amenizando a morte celular mediada pelo RE. Esse resultado foi confirmado pela diminuição da porcentagem de células mortas e pelas reduções da indução do gene marcador associado à senescência e da fragmentação do DNA. Foi observado também que houve um atraso na indução dos genes N-RICH PROTEIN-A (NRP-A), N-RICH PROTEIN-B (NRP-B) e GmNAC6, que são marcadores de morte celular e estão envolvidos na transdução de sinal de morte celular gerado pelo estresse no RE e estresse osmótico, através da via de sinalização mediada por NRP. Esses resultados indicam que BiP atua como um regulador negativo da resposta de morte celular induzida por NRP (REIS et al., 2016).

O genoma de soja, assim como o de milho, *Arabidopsis* e tabaco, possui vários parálogos do gene BiP (DENECKE et al., 1991; KALINSKI et al., 1995; SUNG et al., 2001; WROBEL et al., 1997).

Em plantas, BiP tem exibido uma expressão tecido-específica, sendo também regulada por eventos de desenvolvimento (BOSTON et al., 1996; PEDRAZZINI & VITALE, 1996). Desempenha papel modulador na via de resposta a proteínas mal enoveladas (UPR – “unfolded protein response”), e sob condições normais atua como um regulador negativo dos transdutores do estresse do RE. A via UPR pode ser ativada por estresses no RE. É uma via de transdução de sinal que permite a comunicação entre o RE e o núcleo, a qual ativa a expressão de diversos genes-alvos envolvidos na manutenção da

homeostase celular, através de processos de translocação, glicosilação, degradação e transporte protéico (KIMATA et al., 2003).

Trabalhos envolvendo superexpressão de BiP em tabaco e soja mostram que BiP atenua a ativação da via UPR (COSTA et al., 2008; LEBORGNE-CASTEL et al., 1999). UPR pode ser ativada por uma variedade de estresses bióticos e abióticos que causam a acumulação de proteínas desenoveladas no lúmen do RE (URADE, 2009). Além de aliviar o estresse do RE, a superexpressão de BiP em plantas também demonstrou aumentar sua tolerância aos déficits hídricos (ALVIM et al., 2001; CASCARDO et al., 2000; VALENTE et al., 2009).

1.4.3.2. Proteínas ricas em Asparagina (NRP)

NRP são proteínas com 368 aminoácidos e ricas em asparagina. São assim designadas, visto que são compostas por dois domínios, sendo o domínio N-terminal extremamente rico no aminoácido asparagina, em torno de 25% (LUDWIG e TENHAKEN, 2001), e o domínio C-terminal, nomeado DCD, por seu envolvimento no desenvolvimento e morte celular em plantas (TENHAKEN et al., 2005). Essas proteínas são consideradas marcadores de morte celular, uma vez que são fortemente induzidas durante HR (LUDWIG e TENHAKEN, 2001). NRP tem a expressão aumentada quando plantas são tratadas com indutores de estresse no RE e osmótico. As NRPs possuem um papel fundamental, pois são capazes de ativar a MCP, sendo induzidas em ambos tipos de estresse (COSTA et al., 2008). No genoma de soja há três genes codificadores de NRP, denominadas NRP-A, NRP-B e NRP-C.

Trabalhos têm demonstrado que quando a planta é exposta a ambos estresses, osmótico e do RE, por período prolongado, a expressão dos genes NRP-A e NRP-B aumenta sinergicamente e desencadeia morte celular programada (COSTA et al., 2008; IRSIGLER et al., 2007). Ao serem ativados, os NRPs traduzem um sinal de MCP, induzindo proteínas da família NAC (“nitrogen assimilation control”), tais como a GmNAC30 e GmNAC81 em soja (MENDES et al., 2013).

NAC são proteínas que fazem parte de uma grande família de fatores de transcrição (TF) específicos de plantas. São altamente conservadas em seu N-terminal, que se liga especificamente ao DNA (COSTA et al., 2008; MENDES et al., 2013). Já a região do C-terminal possui sequências e comprimento divergentes e funcionam como ativadores ou repressores de transcrição (FUJITA, 2004; TRAN, 2004).

NAC tem demonstrado ter papel fundamental na regulação da senescência foliar, no desenvolvimento e na MCP. Em diferentes espécies, foi visto que vários genes NAC desempenham papel fundamental e são altamente expressos durante a senescência foliar (TRAN, 2004).

PINHEIRO et al. (2009) mostraram que, em soja, pelo menos três genes NAC estão associados à senescência. Em soja, foram descritas seis proteínas NAC, sendo classificadas de GmNAC1 a GmNAC6. As proteínas GmNAC2, GmNAC3 e GmNAC4 são fortemente induzidas por estresse osmótico e GmNAC3 e GmNAC4 também foram induzidas por ABA, ácido jasmônico (JA) e salinidade, mas diferiram em sua resposta ao frio. A expressão transitória de GmNAC1, GmNAC5 e GmNAC6 em folhas de tabaco resultou em morte celular e em maior expressão de marcadores de senescência.

1.4.3.3. Enzimas de Processamento Vacuolar (VPEs)

VPEs são enzimas de processamento vacuolar, sendo proteinases cisteínicas, localizada em vacúolos. Primeiramente foi identificada como responsável pela maturação e ativação de proteínas de armazenamento de sementes durante a maturação em abóbora e foi nomeada após seu papel no processamento proteolítico de várias proteínas vacuolares (HARA-NISHIMURA et al., 1991; HARA-NISHIMURA & NISHIMURA, 1987). É considerada ortóloga da caspase animal, pois essa proteinase possui atividade do tipo caspase 1 (HATSUGAI et al., 2004; HATSUGAI et al., 2015).

As VPE foram caracterizadas em *Arabidopsis*, e esta proteinase é expressa em sementes e em órgãos vegetativos (HARA-NISHIMURA et al., 1998; YAMADA et al., 2005). VPEs classificadas como α VPE e γ VPE são expressas principalmente em órgãos vegetativos (KINOSHITA et al., 1995),

β VPE em embriões (KINOSHITA et al, 1995b), e δ VPE especificamente e transitoriamente nas duas camadas celulares do revestimento da semente em um estágio inicial do desenvolvimento (NAKAUNE et al., 2005).

A δ VPE exibiu propriedades enzimáticas semelhantes à da caspase 1, que é uma protease cisteínica que medeia a via de apoptose em animais. Foi mostrado durante o estágio inicial do desenvolvimento da semente de *Arabidopsis*, que a δ VPE é expressa especificamente em duas camadas celulares internas do tegumento da semente, tecido este que sofre MCP nos estágios iniciais para reduzir sua espessura (NAKAUNE et al., 2005).

Sete homólogos de VPE foram identificados em cevada (*Hordeum vulgare*), sendo classificados de HvVPE1 a HvVPE7. Alguns podem estar envolvidos com MCP durante o desenvolvimento de tecidos maternos de sementes, incluindo o núcleo e o pericarpo (JULIAN et al., 2013; LINNESTAD et al., 1998; RADCHUK et al., 2010).

RADCHUK et al. (2010) sugeriram que HvVPE4 está envolvida na MCP do pericarpo, visto que é expressa exclusivamente no pericarpo deteriorado e está associada à degradação do DNA apoptótico. HvVPE2a pode desempenhar um papel no processamento e ou renovação das proteínas da parede celular, visto que estão localizadas em paredes celulares que degeneram no desenvolvimento de grãos de cereais (DOMINGUEZ et al., 2001; LINNESTAD et al., 1998). O envolvimento de HvVPE2a com MCP nuclear é apoiado pela atividade aumentada de caspase-1-like no núcleo e projeção nuclear durante o desenvolvimento de tecidos maternos de sementes em cevada (TRAN et al., 2014).

Contrariamente à BiP, VPE induz MCP por estresse do RE. Quando o estresse no RE é prolongado, supera os mecanismos de proteção celular, como por exemplo o promovido pela BiP, e há a ativação de mecanismos que resultam em MCP. QIANG et al. (2012) observaram, através de análise citológica de interações mutualísticas entre *Arabidopsis* e o fungo *Piriformospora indica*, que o estresse do RE e a indução de MCP é regulada pela atividade de VPE e caspase 1-like. Os fungos mutualistas interagem com raízes, e *P. indica* atua perturbando a via UPR, o que ocasiona a MCP em raízes. Uma análise estrutural mostrou que a colonização por *P. indica* foi

associada ao inchaço do RE, seguido pela ruptura do tonoplasto. Para confirmar a participação da VPE na ruptura do tonoplasto e MCP, foram construídos mutantes VPE-null, e, sob condição de estresse do RE, não foi detectada a ruptura do tonoplasto e nem MCP. Estes resultados indicaram que MCP induzida por estresse do RE é mediada pela ruptura do vacúolo depende de VPE. MENDES et al. (2013) observaram, em protoplastos de soja, que dois fatores de transcrição GmNAC30 e GmNAC81, indutores de MCP, quando expostos aos estresses, osmótico e do RE, são capazes de interagir um com o outro de forma sinérgica, ativando MCP através da indução do aumento da expressão de VPE.

1.4.3.4. Metacaspases

Em animais, a fragmentação do DNA, a condensação da cromatina durante a MCP é realizada por uma família de proteases conhecidas como caspases (EARNSHAW et al., 2006; EARNSHAW, 1995). As plantas não possuem caspases, mas possuem proteínas relacionadas chamadas metacaspases. Metacaspases são proteínas presentes em plantas, fungos e protozoários, possuem domínio catalítico formado pela díade histidina e cisteína, apresentando estrutura semelhante às caspases animais, ausentes em plantas. As metacaspases não possuem a especificidade de clivagem após ácido aspártico, como têm as caspases, mas clivam seus substratos após resíduos de arginina e lisina (BOZHKOV et al., 2005).

As metacaspases são divididas em dois grupos: Metacaspases do tipo I e do tipo II. O que difere um grupo do outro é que metacaspases do tipo I exibem um prodomínio N-terminal com motivos repetitivos ricos em prolina, podem conter também um motivo do tipo “Zinc finger”, semelhante ao de HRda planta/proteína de morte celular Isd-1. Já as metacaspases do tipo II não apresentam esse prodomínio, mas apresentam uma extensão C-terminal de 200 aminoácidos (LAMKANFI et al., 2002). Um trabalho recente, propôs um terceiro grupo de metacaspases, classificado como metacaspase tipo III. Estas foram encontradas em fitoplânctons e não foram agrupadas nos outros dois grupos de metacaspase. Possivelmente, isso acontece devido a um rearranjo

do domínio p10 em metacaspase do tipo III, em que o motif SGCXDXQTSADV está localizado no N-terminal ao invés de no C-terminal, como observado para metacaspase em plantas.

SUAREZ et al. (2004), demonstraram que durante a embriogênese de *Picea abies*, a metacaspase MclIPa é transportado do citosol para o núcleo, onde está relacionado com a detecção da fragmentação do DNA. Mutantes para MclIPa, inibiu MCP em células de suspensores. MclIPa está diretamente envolvida na via de degradação nuclear, ou seja, na fragmentação do DNA, um evento presente na maioria dos programas de MCP em eucariotos.

As metacaspases estão envolvidas na via que resultam em MCP, visto que a alta ou baixa expressão de metacaspases afeta o nível de MCP em células de levedura (MADEO et al., 2002; WATANABE & LAM, 2005) e em embriões de plantas na embriogênese (BOZHKOV et al., 2005). O papel funcional das metacaspases nas vias MCP ainda é desconhecido.

2. JUSTIFICATIVA

A soja é originária do continente asiático e uma das culturas de sementes de leguminosas mais cultivadas no mundo, devido à sua importância agroeconômica. A semente de soja possui em sua composição cerca 40% de proteínas, possuindo alto valor nutricional e relevância industrial. O Brasil ocupa a segunda posição no ranking de produtores mundiais de soja, ficando atrás apenas dos Estados Unidos.

Segundo o levantamento da safra brasileira de grãos 2016/17, divulgado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), as colheitas no Brasil alcançaram a produção de 113.923 milhões de toneladas em 33.890 milhões de hectares cultivados, devido a condições climáticas altamente favoráveis que contribuíram para que essa safra alcançasse recorde histórico. Porém, a estimativa para a safra de grãos deverá ser menor em 2017/2018 com redução de 8,9% na produção, devido à expectativa de condições climáticas desfavoráveis.

As sementes, durante o desenvolvimento, passam pela fase em que há deposição de reserva e um aumento na massa seca. Em soja, as fases de desenvolvimento foram divididas em estágio vegetativo e reprodutivo. O estágio reprodutivo R7 marca o ponto de maturidade fisiológica, que é caracterizado pelo máximo acúmulo de matéria seca na semente e por teores de água variando de 50% a 60%. Na transição do estágio R7 ao R8, os mecanismos do metabolismo de tolerância à dessecação são intensificados e a semente passa a tolerar a secagem. Se os mecanismos de tolerância à dessecação não garantirem a proteção de 100% das células acometidas pelo evento da desidratação, entram em cena os mecanismos de morte celular programada (MCP) para eliminação seletiva de células-alvo danificadas. A MCP é um processo finamente regulado de eliminação seletiva de células-alvo durante eventos naturais do desenvolvimento vegetal, bem como de células sujeitas às perturbações por estresses bióticos ou abióticos, como exemplo, a condição de dessecação enfrentada pelos tecidos de sementes nos estádios acima mencionados.

Outro mecanismo adaptativo que também é observado em plantas é a anidrobiose. Durante o metabolismo celular normal da semente ocorre a

produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e estas, quando em excesso, tornam-se tóxicas à célula, comprometendo sua viabilidade, o que eventualmente pode levar à morte celular programada. Alguns trabalhos relatam que proteínas BiP atenuam a propagação do sinal de morte celular induzida por estresse no RE, enquanto VPEs, NRPs e metacaspases induzem a MCP.

Considerando que o conhecimento sobre a expressão gênica e suas implicações para os estádios de desenvolvimento e germinação da soja ainda são escassos, este estudo tem como objetivo analisar a expressão de genes envolvidos em vias que desencadeiam morte celular programada utilizando bibliotecas de RNA-Seq publicadas em diferentes estágios do desenvolvimento e germinação da semente de soja. A técnica de RNA-Seq visa resolver complexidades dos transcriptomas, inacessíveis por outras técnicas, como expressão alelo-específica e novas isoformas (WANG et al., 2008). É uma abordagem recente que utiliza o sequenciamento de elevada cobertura dos mRNAs ou cDNAs com o objetivo de compreender o perfil do transcriptoma de uma espécie (LISTER et al., 2009). Compreender o transcriptoma de uma espécie tem auxiliado na interpretação dos elementos funcionais do genoma e revelado os constituintes moleculares de células e tecidos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Análise da expressão de genes envolvidos com estresse hídrico, oxidativo e relacionados à morte celular programada durante o desenvolvimento e germinação das sementes de soja.

3.2. Objetivos Específicos

- A. Analisar os níveis globais de transcrição dos genes em diferentes estágios do desenvolvimento e germinação da semente de soja utilizando bibliotecas de RNA-seq.
- B. Avaliar a expressão de genes relacionados à dessecação, estresse oxidativo e os envolvidos com morte celular programada nos transcriptomas de sementes de soja.
- C. Selecionar genes-chave expressos em diversos estágios do desenvolvimento e germinação da semente de soja.
- D. Avaliar a atividade de enzimas antioxidantes em sementes quiescentes de soja.
- E. Avaliar a presença de proteínas BiP em eixo embrionário e cotilédones de sementes quiescentes e germinantes de soja.
- F. Comparar a acumulação de proteínas BiP em eixo embrionário de sementes de soja de cultivares resistente e susceptível ao estresse hídrico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção das bibliotecas de transcriptomas de sementes de soja

Os arquivos das bibliotecas de RNA-Seq de sementes de soja em diversas etapas do desenvolvimento foram obtidos no banco de dados do SRA/NCBI, com número de série acesso GSE42871. Utilizamos também a biblioteca de RNA-Seq de eixo embrionário de sementes de soja durante a germinação (BELLIENY-RABELO et al., 2016) e a biblioteca de RNA-Seq de tegumento normal e defeituoso do trabalho de KOUR et al. (2014).

As bibliotecas obtidas são de diferentes estádios do desenvolvimento da semente de soja, sendo estas: 4, 12-14, 22-24 DAF (dias após a fertilização), 5-6 mg, 100-200 mg WS ("Whole seed" - Semente inteira), 100-200 mg, 400-500 mg COT (Cotilédones), eixo embrionário de sementes de soja quiescentes (0 HAE - Horas Após a Embebição) e durante a germinação (6, 12 e 24 HAE), tegumento nas fases 50–100 mg, 100–200 mg and 400–500 mg em sementes normais e mutantes (defeituosa) de cultivares Clark e Harosoy.

As bibliotecas obtidas foram alinhadas contra o genoma de soja disponível no banco de dados do Phytozome 11 e foi realizada a caracterização da expressão dos genes relacionados à dessecação, estresse oxidativo e os envolvidos com morte celular programada através do valor de FPKM (BELLIENY-RABELO et al., 2016; JONES; VODKIN, 2013).

4.2. Análise da expressão global através do Mapman

Realizamos uma análise da expressão global dos genes mapeados no genoma de soja Gmax_109 e, para isso, usamos o software de visualização MapMan (THIMM et al., 2004), programa que permite a visualização das vias em que os genes podem estar envolvidos.

Utilizamos como mapeamento de referência Gmax_109 e os genes expressos. Os valores de RPKM transformados para \log_2 (*fold change*) foram importados para o MapMan, para visualizar as mudanças na expressão de genes relacionados à estresses bióticos e abióticos. \log_2 Fold change (\log_2 FC) foi usado para criar um conjunto de dados de expressão de genes em duas

condições de interesse. O *fold change* foi calculado dividindo o RPKM de cada gene expresso em duas condições de desenvolvimento da semente de soja. A separação dos genes de soja neste software é realizada por vias, sendo identificadas com *Bin codes*.

4.3. Diagrama de Venn

O diagrama de Venn foi gerado, utilizando a ferramenta online (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>). Foram utilizados dados de expressão das bibliotecas de 5-6mgCOT e 5-6mgSC de genes expressos em cotilédones e tegumento com valores de RPKM transformados para \log_2 (*fold change*).

4.4. Heatmap

Para a construção do HeatMap, foram usados valores de RPKM dos genes NRP, VPE e metacaspase transformados para \log_2 (*fold change*) normalizados com Z-score, usando a ferramenta on-line (<http://www.heatmapper.ca/expression/>).

4.5. Material vegetal

Foram utilizadas as sementes quiescentes de soja BRS 284, que tiveram seus tecidos separados manualmente em eixo embrionário, cotilédones e tegumento e, posteriormente macerados sob nitrogênio líquido.

As sementes de soja (cultivares BRS 284, BR16 e Embrapa 48) foram semeadas em placas de Petri (14 cm de diâmetro) contendo 2 g de algodão embebido com água destilada estéril (30 mL). As placas de Petri foram colocadas em uma incubadora BOD com fotoperíodo de 12/12 h, temperatura controlada a 28°C e 60 % de umidade relativa. Além das sementes quiescentes (0 HAE), as sementes embebidas foram coletadas em 3, 6, 12 e 24 HAE. O procedimento de germinação foi similar ao realizado para a construção do

transcriptoma de eixo embrionário durante a germinação, descrito por BELLIENY-RABELO et al. (2016).

4.6. Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada seguindo as especificações do aparelho NANODROP 2000 Thermo Scientific.

4.7. Ensaio Enzimático

As proteínas totais solúveis das amostras (eixo embrionário, cotilédones e tegumento) da semente de soja BRS284 quiescente foram extraídas usando tampão Tris/HCl 0,5 M pH 8,0, numa razão de 3 mg de farinha de eixo embrionário, cotilédones e tegumento, separadamente para 30 µl de tampão. As suspensões foram agitadas por 2 h a 4°C, centrifugadas a 10.000 x g por 30 min a 4°C. Os sedimentos obtidos foram descartados e foram utilizados 5 µl dos sobrenadantes das amostras misturados em 720 µl de tampão Tris/HCl 0,5M pH 7,4 e 25 µl de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). As soluções derivadas foram colocadas em cubeta de quartzo para leitura da absorbância a 240 nm, usando-se, como branco, água destilada. O tempo de reação para a leitura da absorbância, relativa à atividade de catalase nas amostras, foi de 5 min. A atividade da catalase foi determinada de acordo com Aebi (1983), com modificações.

4.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida e Western Blotting

As proteínas totais solúveis de eixo embrionário e cotilédones de sementes de soja BRS284 quiescentes (0 HAE - Horas Após a Embebição) e durante a germinação (6, 12 e 24 HAE) foram visualizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, contendo SDS, segundo metodologia descrita por LAEMMLI (1970), com modificações. A eletroforese foi realizada utilizando um gel de empacotamento formado por SDS 0,1 %; acrilamida 5 %; bis-acrilamida 0,25 %; Tris-HCl 0,75 M, pH 6,8; TEMED 0,04 % e persulfato de amônio 0,08

% e um gel de separação contendo SDS 0,1 %; acrilamida 12 %; bis-acrilamida 0,06 %; Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8; TEMED 0,02 % e persulfato de amônio 0,5 %.

Para comprovar a presença de proteínas imunorrelacionadas à BiP nas amostras de eixo embrionário de semente de soja (0, 6, 12 e 24 HAE), as proteínas foram visualizadas em um gel de poliacrilamida 12% contendo SDS (nas mesmas condições descritas acima) e posteriormente submetidas a Western Blotting, seguindo a metodologia de (TOWBIN; STAEHELIN & GORDON, 1979).

Todos os tecidos foram congelados por dois dias e liofilizados por três dias. Após a liofilização, os eixos embrionários foram cuidadosamente separados dos cotilédones e do tegumento. Os eixos embrionários e cotilédones foram separadamente macerados em nitrogênio líquido, os tegumentos separados foram armazenados a -70°C.

Para a extração das proteínas totais das amostras, um extrato proteico de eixo embrionário de sementes dos cultivares de soja BRS 284, BR16 e Embrapa 48 (0, 3, 6, 12 e 24 HAE) e cotilédones apenas da BRS 284, foram preparados com 5 mg de farinha em 250 µl de tampão PBS (fosfato de sódio 0,1 M; NaCl 0,5 M, pH 7,2), agitado por 1 h a 4°C, centrifugado a 10000 x g por 10 min a 4°C. O sedimento foi descartado e 15 µl do sobrenadante foram misturados 5 µl de tampão de amostra (Tris-HCl 0,5 M, glicerol 10 %, SDS 10%, azul de bromofenol 1 %, pH 6,8). Foram aplicadas 20 µl das suspensões em cada poço do gel de empacotamento. Foram feitos dois géis semelhantes, sendo um para visualização proteica e outro para Western Blotting.

A eletroforese foi efetuada em ambiente de tampão de corrida Tris-glicina (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1 %, pH 8,3) por aproximadamente 2 h com voltagem de 60 V, para corrida no gel de empacotamento e 100 V no gel de separação. Após corrida, um gel foi corado com um solução corante (0,9 g de Azul Brilhante de Coomassie R, 320 ml de metanol e 80 ml de ácido acético) e descorado por uma solução descorante (35 % de metanol e 10 % de ácido acético).

Após a eletroforese, o gel não corado foi transferido para a membrana de nitrocelulose. O sanduíche de transferência foi montado em sistema semi-

seco usando dois pedaços de papel filtro (3 mm) com dimensões de 8,6 x 13,5 cm. Os papeis e a membrana foram equilibrados por 20 min com tampão Tris 100 mM, metanol 20 %, pH 8,0. O sanduíche foi composto por uma folha de papel filtro, seguido da membrana, o gel e as outras duas folhas. O sistema foi fechado e a transferência ocorreu em uma voltagem de 15 V por 3 h.

Após a transferência, a membrana foi incubada durante a noite (overnight) em tampão bloqueador (fosfato de sódio 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 7,6 contendo 2 % de leite em pó desnatado), a 4°C. A membrana foi lavada 10 vezes com PBS (fosfato de sódio 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 7,2) e incubada por 2 h a temperatura ambiente com o anticorpo anti-BiP (VALENTE et al., 2009), produzido em coelho e diluído em tampão bloqueador (1:100). A membrana foi lavada com PBS 10 vezes e incubada com anticorpo anti-IgG de coelho complexado com peroxidase em uma diluição de 1:1000, por 1 h a temperatura ambiente. A membrana foi lavada 10 vezes com PBS e a reação revelada vertendo-se, sobre a membrana, uma solução composta por 10 mg de DAB (diaminobenzidina) dissolvidos em 5 ml de uma solução composta por 100 µl de tampão Tris-HCl 2 M (pH 7,5), 300 µl de imidazol 0,1 M, 4,9 ml de água destilada e 20 µl de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A solução reveladora foi deixada em contato com a membrana até o aparecimento das bandas. A reação foi parada lavando-se a membrana com água destilada.

5. RESULTADOS

5.1. Análise global da expressão de genes

Para analisar comparativamente os perfis globais de expressão da gênica em sementes de soja, durante a embriogênese e maturação (apenas cotilédones e em sementes inteiras de 5-6mg e 100-200mgWS (whole seed)), foi utilizado o visualizador MapMan. Os resultados podem ser observados nas Figuras 4, 5, 6 e 7.

A figura 4 é a comparação entre as fases da embriogênese da semente de soja, no que se refere a responsividade a estresses bióticos e abióticos. Para esta análise, foi utilizado, como arquivo de entrada, o conjunto de genes expressos com diferença de *fold change* (FC) maiores do que 6 e -6.

Comparando-se os 12-14DAF/4DAF, foram encontrados na categoria de estresse abiótico, 23 genes com FC <-6 e > 6 (21 mais expressos em 4DAF e 2 mais expressos em 12-14DAF). Entre os 21 genes mais expressos em 4 DAF, encontram-se genes das seguintes famílias proteicas: HEAT SHOCK PROTEIN (HSP), DEHYDRATION-RESPONSE, CUPIN, CHAPERONE C-TERMINAL CONTAINING DOMAIN, GERMIN-LIKE PROTEINS, dentre outras. É possível observar que na sinalização mediada por hormônios, os genes são mais expressos em 4DAF (quadrados vermelhos), apenas um gene com resposta a etileno possui maior expressão em 12-14 DAF. Na categoria de fatores de transcrição, as famílias ERF, bZIP, WRKY, MYB e DOF possuem maior expressão em 4 DAF. A via de proteínas PR e Heat Shock proteins possuem maior expressão no início da embriogênese. Apenas um gene Heat Shock Protein possui maior expressão em 12-14DAF.

Na figura 4B, na comparação entre as fases da embriogênese 22-24DAF/12-14DAF, é possível observar que na categoria de estresse abiótico, 14 genes possuem FC < -6 e > 6, sendo 27 genes mais expressos em 12-14DAF. Os genes mais expressos em 12-14DAF relacionados à sinalização por estresse abiótico são ortólogos de *Arabidopsis*, tais como HEAT SHOCK PROTEIN, C2-DOMAIN CONTAINING PROTEIN, CHAPERONE C-TERMINAL DOMAIN-CONTAINING PROTEIN, CUPIN PROTEIN, GERMIN-LIKE, POLLEN OLE E 1 ALLERGEN AND EXTENSIN FAMILY PROTEIN, dentre outros. Na

via de sinalização, 145 genes são regulados, dos quais todos são expressos em 12-14DAF, dentre eles genes codificantes de *leucine-rich repeat transmembrane protein Kinase*, *Disease resistance Family protein*, *protein Kinase faily*, *carbohydrate binding*, *protein binding*, *calcium binding*, entre outros. As proteínas heat shock são em grande maioria induzidas. Na categoria de sinalização mediada por hormônios e proteínas PR os genes são mais expressos em 12-14DAF.

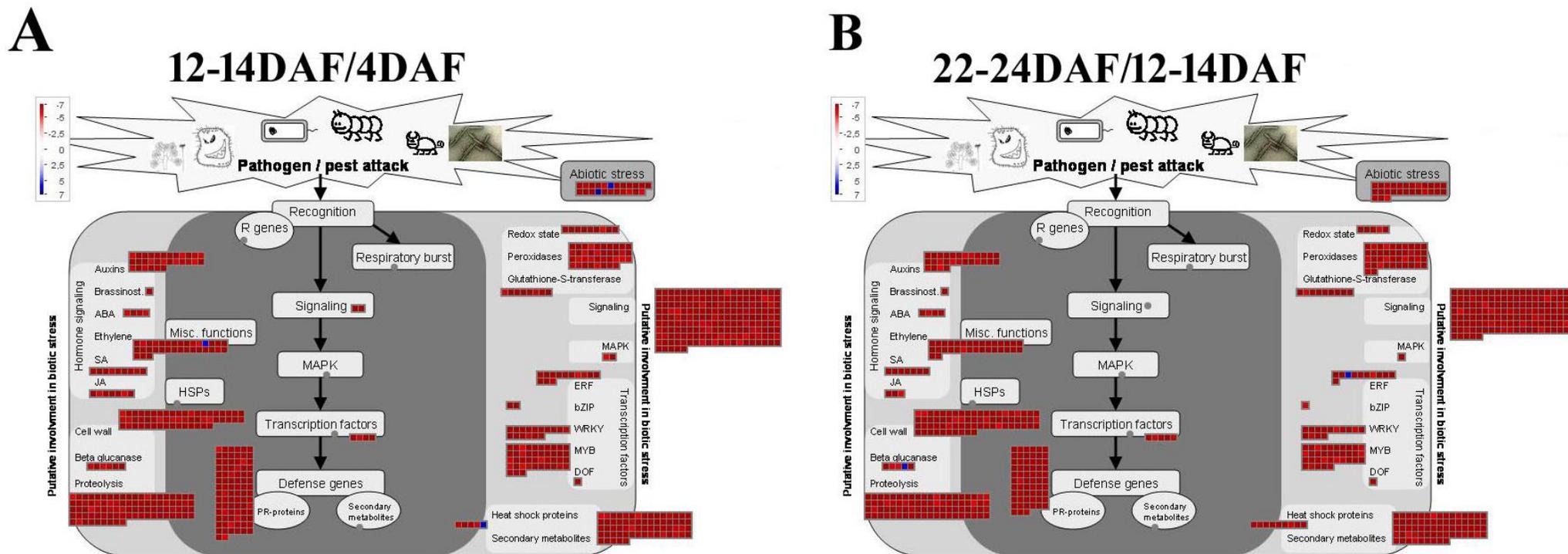


Figura 4: Genes expressos categorizados pelo Mapman relacionados ao estresse biótico e abiótico. Visão geral da regulação de genes expressos na embriogênese (4 DAF, 12-14 DAF e 22-24 DAF) da semente de soja. (A) Comparação entre as fases 12-14DAF/4DAF. Os genes mais expressos em 4DAF estão em vermelho. (B) Comparação entre as fases 22-24DAF/12-14DAF. Os genes mais expressos em 12-14DAF estão em vermelho.

Na figura 5, foi comparada a fase final da maturação com a fase inicial da maturação da semente (100-200mgWS/5-6mgWS) com FC $-7 < e > 7$ no que se refere a estresses bióticos e abióticos. É possível observar na via de estresse abiótico, 57 genes expressos, sendo 37 genes mais expressos em 100-200mgWS (semente quiescente) (FC > 7) e 20 foram mais expressos em 5-6mgWS (início da maturação) (FC > -7). Dos 37 genes mais expressos em 100-200mgWS, dois genes têm função para DEHYDRATION-RESPONSIVE FAMILY PROTEIN, os membros da família de “*heat shock protein*” são bem expressos em semente quiescente, tais como, HSP21 (HEAT SHOCK PROTEIN 21 – 21 kDa), SMALL HEAT SHOCK PROTEIN-LIKE (HSP26.5 - 26.5 kDa), SMALL HEAT SHOCK PROTEIN (HSP17.6 – 17.6 kDa). Dos 20 genes mais expressos em 5-6mgWS, um gene é membro da família HSP70 (HEAT SHOCK PROTEIN 70), dois genes UNIVERSAL STRESS PROTEIN (USP) FAMILY PROTEIN, três genes anotados como DEHYDRATION-RESPONSIVE FAMILY PROTEIN e um EARLY-RESPONSIVE TO DEHYDRATION PROTEIN-RELATED / ERD PROTEIN-RELATED. Na categoria fatores de transcrição, vinte e oito genes são mais expressos na família ERF. Dos 28 genes, 19 genes, tais como, ABR1 (ABA REPRESSOR1), AP2 domain-containing transcription factor, putative (DRE2B), DREB1A (DEHYDRATION RESPONSE ELEMENT B1A), OVULE DEVELOPMENT PROTEIN, PUTATIVE e DNA BINDING/TRANSCRIPTION FACTOR são mais expressos em semente quiescente - 100-200mgWS. Nove genes, como, DDF1 (DWARF AND DELAYED FLOWERING 1), TINY2 (TINY2); *DNA binding/transcription fator*, FLO2/FL1/ AP2 (APETALA 2) transcription factor possuem maior expressão em sementes no início da maturação – 5-6mgWS. A via de defesa por proteínas PR possuem genes com as maiores expressões em semente quiescente, o que deve contribuir para a acumulação de proteínas da defesa inata comumente encontradas em cotilédones de sementes de leguminosas.

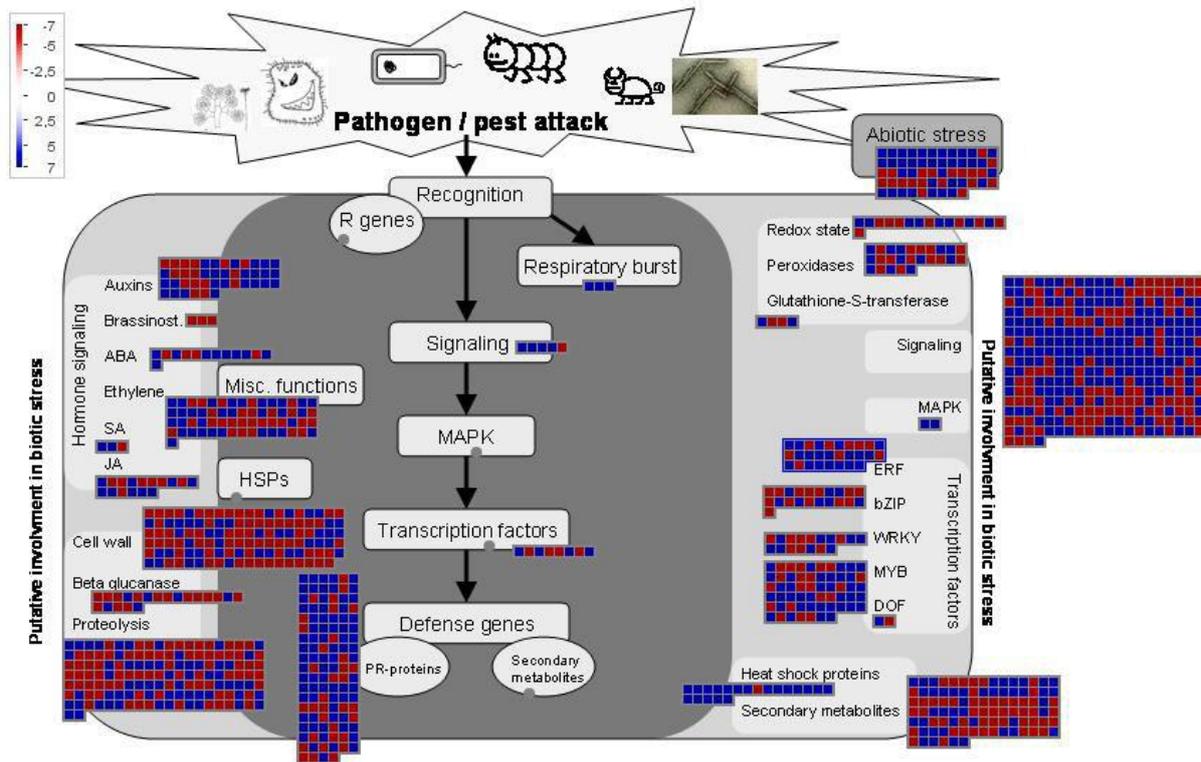


Figura 5: Expressão de genes categorizadas pelo Mapman relacionados ao estresse biótico e abiótico. Visão geral da regulação da expressão de genes nas fases de início e final da maturação (100-200mgWS/5-6mgWS). *WS – Whole seed. Os genes mais expressos em 100-200mgWS estão em azul e os expressos em 5-6mgWS estão em vermelho.

Visto que alguns genes são mais expressos na fase inicial da maturação (5-6mgWS), como mostrado na figura 5, analisamos se a maior contribuição de genes é proveniente dos cotilédones ou tegumento desta mesma fase. Para isso, comparamos as amostras 5-6mgCOT/5-6mgWS (cotilédones e semente inteira, ambos na fase inicial da maturação) e 5-6mgSC/5-6mgWS (tegumento e semente inteira, fase inicial da maturação); o resultado é mostrado nas figuras 6A e B. É possível notar que a maior parte dos genes detectados são mais expressos em semente inteira (5-6mgWS), indicado pela concentração de quadrados vermelhos na via de ambas as figuras. Genes pontuais são mais expressos nos cotilédones (5-6mgCOT) e tegumento (5-6mgSC), indicado

pelos quadrados azuis nas vias de ambas as figuras. Para melhor compreender a contribuição total do cotilédone e do tegumento para a semente inteira no início da maturação, comparamos as fases 5-6mgSC/5-6mgCOT e analisamos a expressão dos genes nas fases. A figura 7 mostra o resultado da comparação entre as fases 5-6mgSC/5-6mgCOT, onde é possível notar que a grande maioria dos genes é expresso em cotilédones (5-6mgCOT) (FC>-6). Entretanto, em duas vias, como a via do hormônio etileno e na via de estresse abiótico os genes são mais expressos em tegumento (5-6mgSC). Na categoria estresse abiótico, 7 genes anotados como RD22 (RESPONSE TO DESSICATION 22) apresentaram maior expressão em cotilédones (FC >7). Genes DEHYDRATION-RESPONSE PROTEIN e HEAT SHOCK N-TERMINAL DOMAIN CONTAINING PROTEIN, HSC70-1 (heat shock cognate 70 kDa protein 1, HSP21 (HEAT SHOCK PROTEIN 21), PATHOGEN-RESPONSIVE ALPHA-DIOXYGENASE, PUTATIVE, PATHOGEN-RESPONSIVE ALPHA-DIOXYGENASE, PUTATIVE, dentre outros, são expressos em cotilédones.

Também analisamos quantos genes são expressos ao mesmo tempo em tegumento e cotilédones na fase 5-6mg. A figura 8 mostra que 2034 genes são expressos ao mesmo tempo em cotilédones e tegumento no início da maturação. Dos 2034 genes, alguns possuem anotação para HEAT SHOCK PROTEIN 42, ETHYLENE-RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR 023, como proteínas de armazenamento de semente (SEED STORAGE PROTEIN CRA1-RELATED), como defensina (DEFENSIN-LIKE PROTEIN 226-RELATED), dentre outros. É possível notar também que os genes são mais expressos em cotilédones, em um total de 1670 genes cotilédone-específico, contra 1107 genes tegumento-específico.

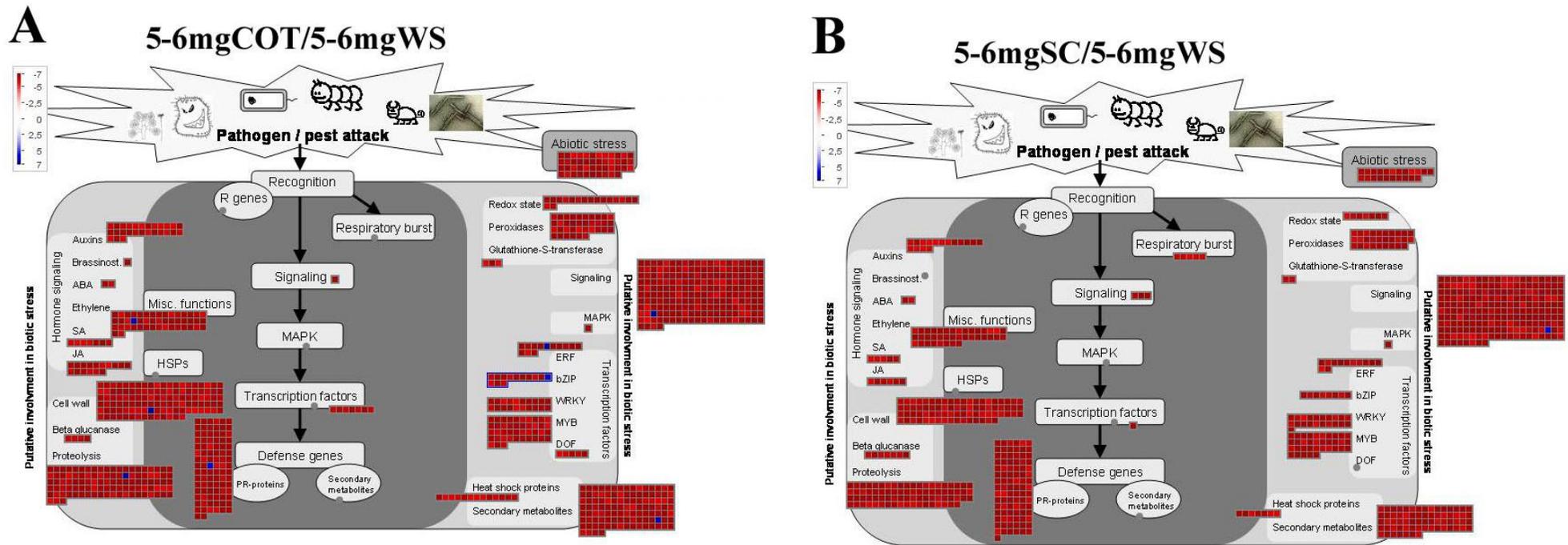


Figura 6: Expressão de genes categorizadas pelo Mapman relacionados ao estresse biótico e abiótico. Visão geral da regulação da expressão de genes nas fases. (A) 5-6mgCOT/5-6mgWS e (B) 5-6mgSC/5-6mgWS. *WS – Whole seed (semente inteira quiescente), *SC – Seed Coat (Tegumento); COT – cotilédones.

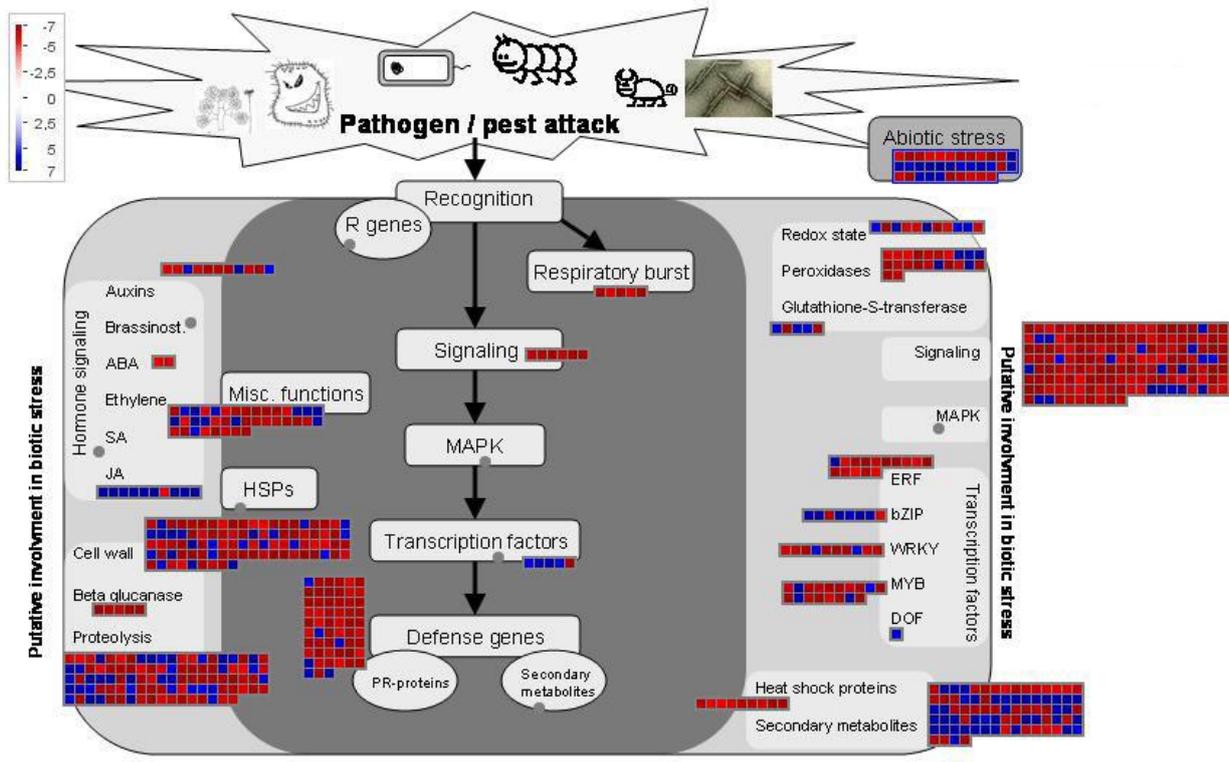


Figura 7: Genes expressos categorizados pelo Mapman como relacionados ao estresse biótico e abiótico. Visão geral da regulação de genes diferencialmente expressos nas fases 5-6mgSC e 5-6mgCOT. *SC – Seed Coat (Tegumento); COT – cotilédones. Os genes mais expressos em 5-6mgSC estão em azul e os expressos em 5-6mgCOT estão em vermelho.

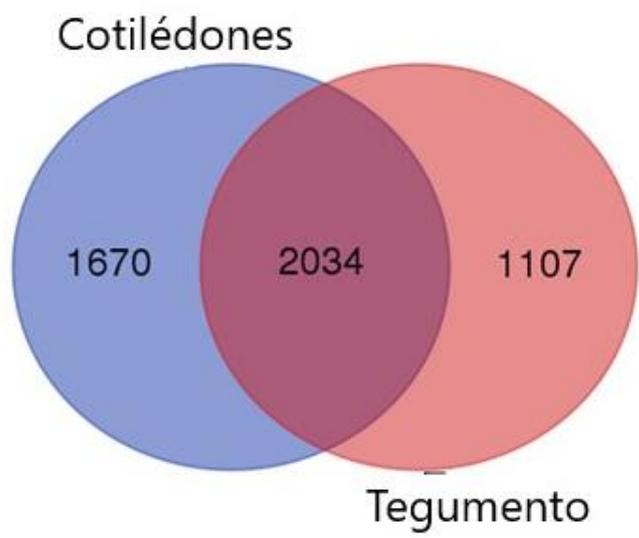


Figura 8: Diagrama de Venn mostrando a quantidade de genes expressos em cotilédone, tegumento e nos dois tecidos ao mesmo tempo.

5.2. Análise da expressão de genes envolvidos com a resposta à dessecação durante o desenvolvimento e germinação de sementes de soja

Considerando que a regulação dos genes envolvidos com a dessecação é crucial para que a semente possa se preparar para a quiescência e que a morte celular programada pode ser induzida por uma cascata de sinalização mediada por alguns desses genes, realizamos uma seleção dos genes mais expressos durante o desenvolvimento e germinação de sementes de soja. A figura 9 mostra o resultado da análise da expressão dos genes Glyma12g34550 e Glyma12g34570, anotados como RD22 (responsivos a dessecação 22). Apresentaram alta expressão em cotilédones, na fase de maturação (100-200mg COT e 400-500mg COT) e baixa expressão em semente inteira quiescente (Dry seed). Durante a germinação, RD22 apresentaram expressão diferenciada em 24 HAE.

A expressão dos genes relacionados à desidratação é mostrada na figura 10. É possível observar que dois genes, Glyma03g28760 e Glyma15g15560, anotados como PROTEIN EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION e PROTEIN DEHYDRATION INDUCED, respectivamente, apresentaram expressão diferenciada ao longo do desenvolvimento da semente de soja. O gene Glyma15g15560 possui um pico de expressão em eixo embrionário quiescente, mas a expressão decresce ao longo da germinação. É importante ressaltar que ambos os grupos de genes de resposta à dessecação e resposta à desidratação parecem ser regulados de forma oposta no eixo embrionário na semente durante a germinação.

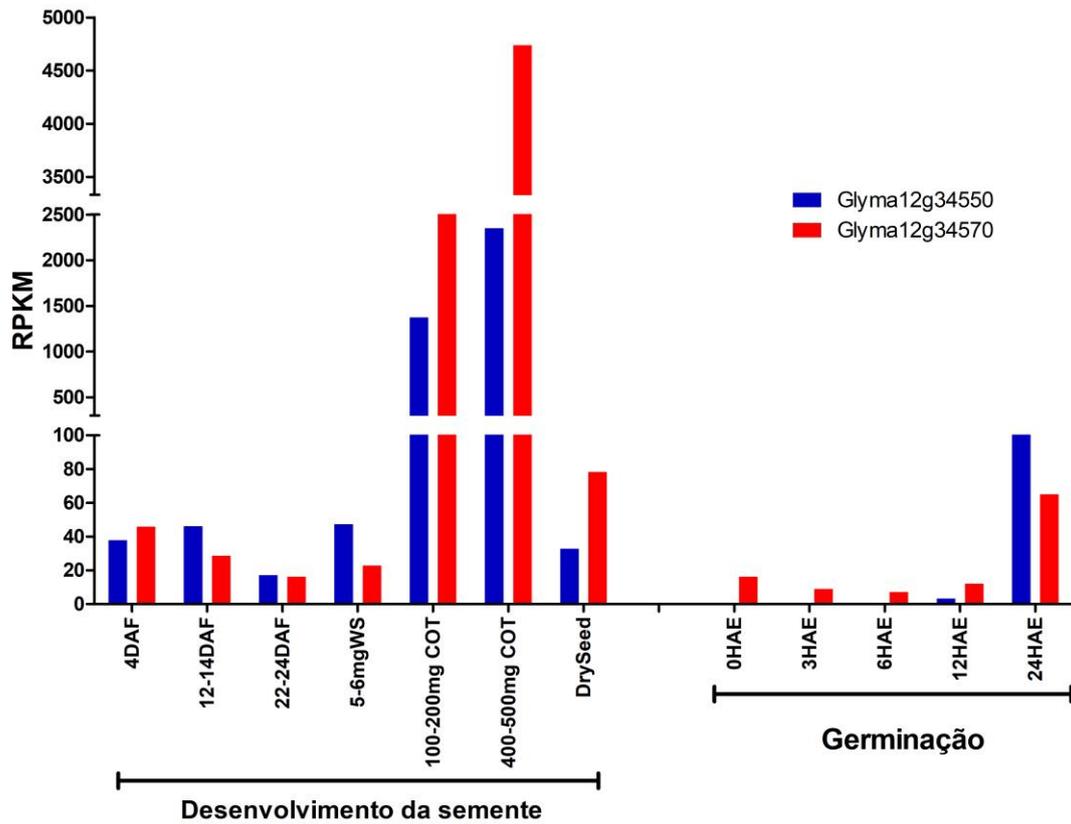


Figura 9: Expressão dos genes relacionados à dessecação, nos diferentes estádios de desenvolvimento da semente de soja e eixo embrionário durante a germinação. *DAF – Dias após a fertilização; WS – Whole seed (semente inteira); COT – cotilédones; Dry seed - Semente inteira quiescente; HAE – Horas após a Embebição.

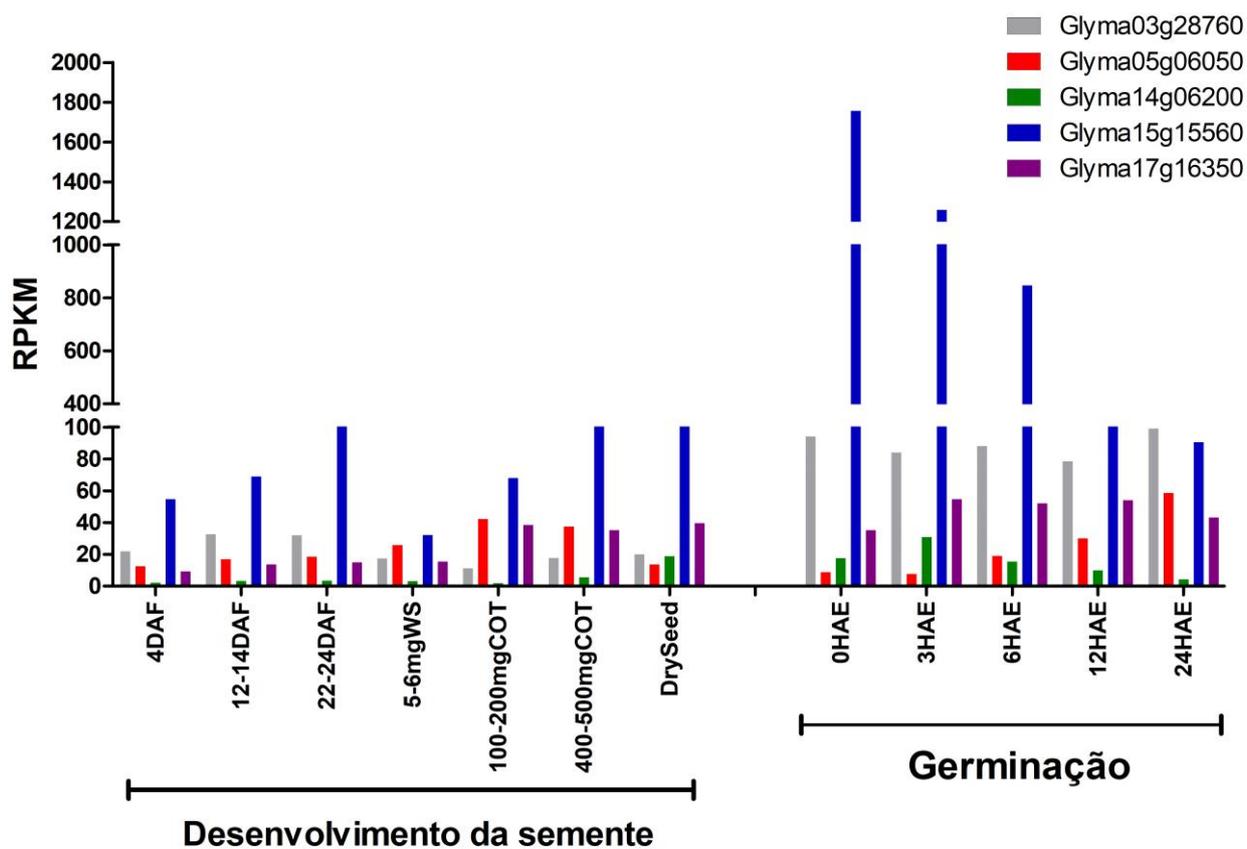


Figura 10: Expressão dos genes relacionados à desidratação nos diferentes estádios de desenvolvimento da semente de soja e eixo embrionário em germinação (frequência em RPKM). *DAF – Dias após a fertilização; WS – Whole seed (semente inteira); COT – cotilédones; HAE – Eixo embrionário - horas após a embebição.

5.3. Análise da expressão de genes envolvidos com estresse oxidativo e atividade enzimática correspondente em sementes de soja

Da mesma forma que a dessecação, o estresse oxidativo também pode levar à morte celular programada. Sendo assim, na figura 11 apresentamos a expressão de três genes referentes à superóxido dismutase (SOD): Glyma11g19840 (CSD2), Glyma19g42890 e Glyma03g40280, ambos CDS1. Todos apresentaram alta expressão durante a embriogênese (4 DAF, 12-14DAF e 22-224DAF), exceto CSD2. Durante a fase da maturação (100-200mgCOT, 400-500mgCOT e 100-200mgWS (semente inteira)), a expressão decresceu um pouco. Durante a germinação, um menor número de genes CSD foi expresso. O gene Glyma03g40280 apresentou a mais alta expressão, dentre os genes CSD com expressão detectada.

Outro importante grupo de genes envolvidos com estresse oxidativo são aqueles que codificam para a enzima catalase. Na figura 12A é possível observar que os genes anotados catalase apresentam baixa expressão durante a embriogênese e maturação da semente de soja. Porém, em 100-200mg de semente inteira quiescente (Dry seed) estes mesmos genes apresentaram alta expressão.

Para confirmar se as sementes quiescentes apresentam atividade da catalase, foi realizado um ensaio de atividade enzimática com amostras de eixo embrionário, cotilédones e tegumento de sementes quiescentes de soja. A figura 12 B mostra o resultado do ensaio enzimático da atividade da catalase nos tecidos selecionados. Há maior atividade da catalase no tegumento e em eixo embrionário do que em cotilédones.

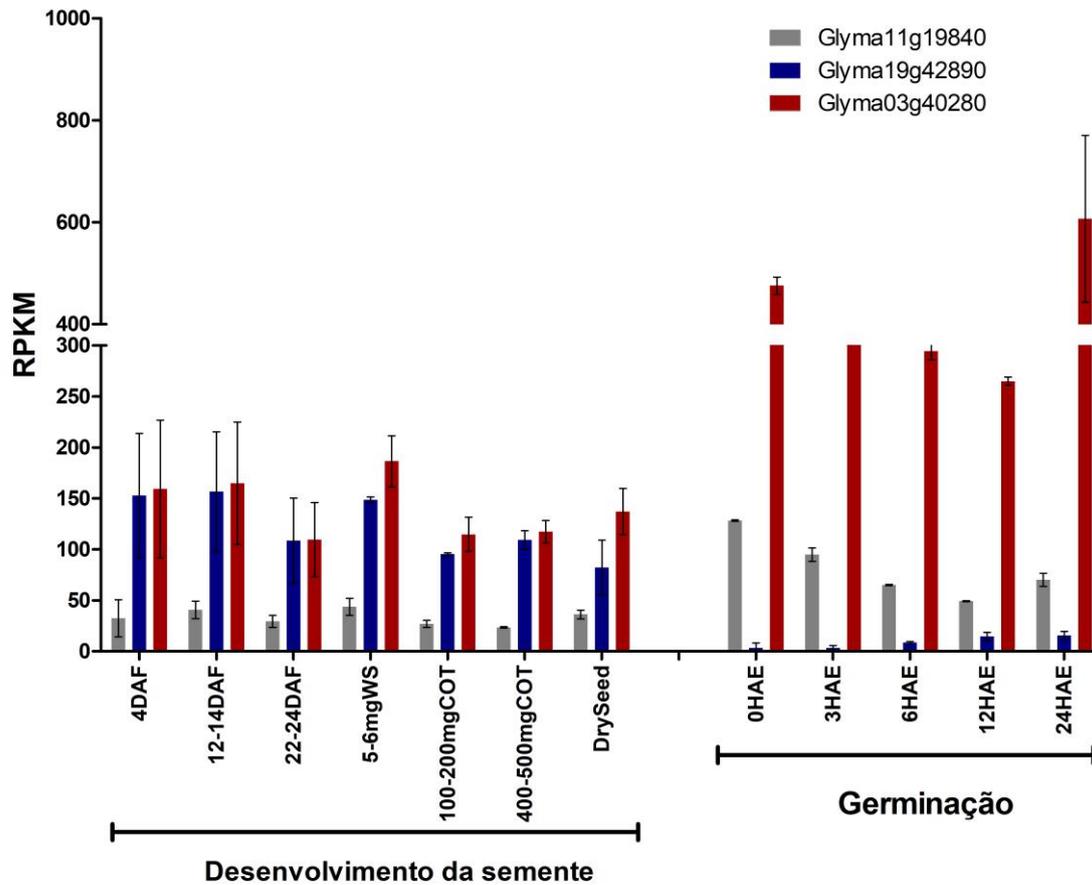


Figura 11: Expressão dos genes referentes à SOD nos diferentes estádios de desenvolvimento da semente de soja e eixo embrionário em germinação (frequência em RPKM). *DAF – Dias após a fertilização; WS – Whole seed (semente inteira); COT – cotilédones; HAE – Eixo embrionário - Horas Após a Embebição.

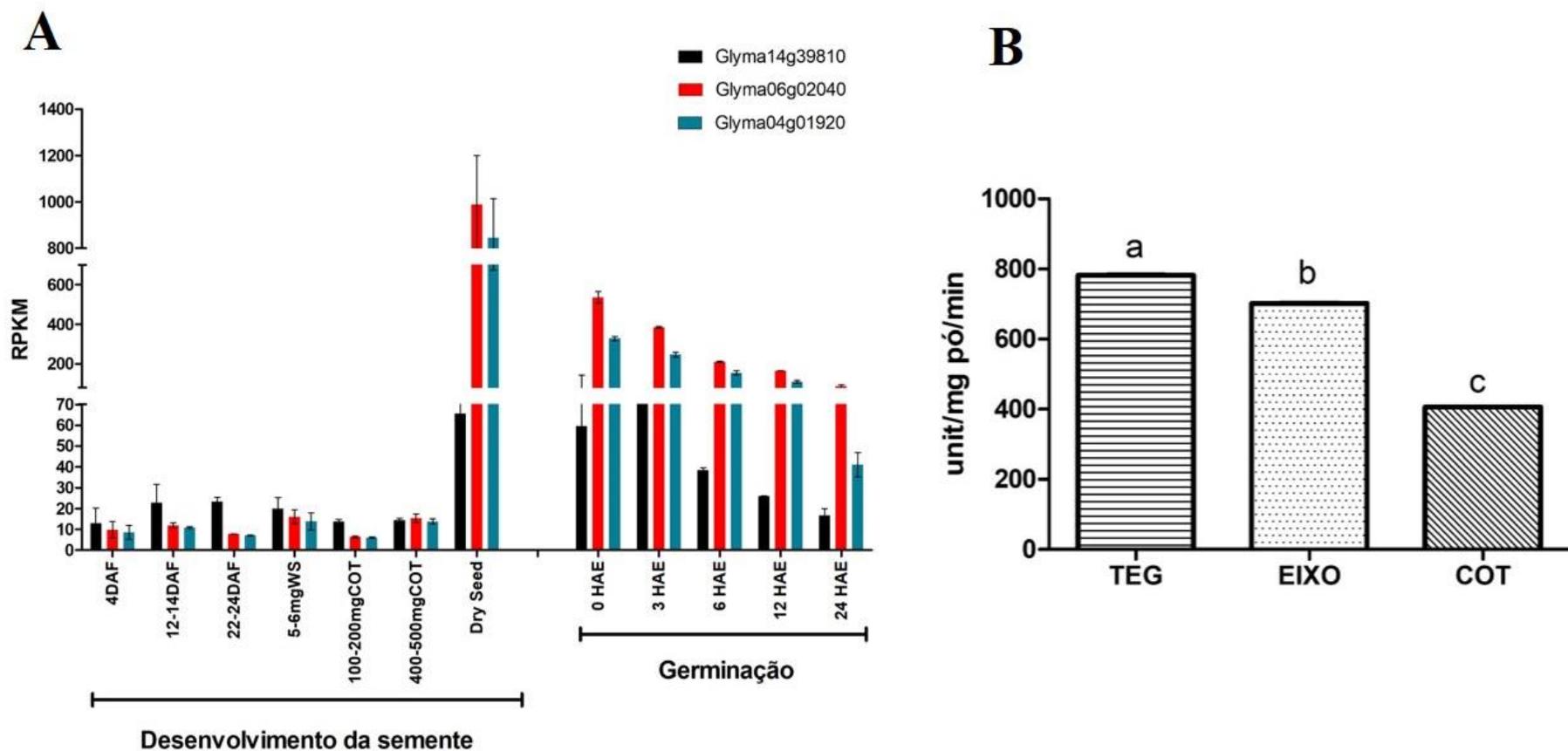


Figura 12: (A) Expressão dos genes relacionados à catalase nos diferentes estádios de desenvolvimento da semente de soja e eixo embrionário em germinação (frequência em RPKM). *DAF – Dias após a fertilização; WS – Whole seed (semente inteira); COT – cotilédones; HAE – Eixo embrionário - Horas Após a Embebição. (B) Atividade da catalase (CAT) em diferentes tecidos da semente de soja quiescente. TEG (Tegumento), EIXO (Eixo Embrionário) e COT (Cotilédones). Acima das barras, letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes de acordo com o teste de comparações múltiplas de Tukey ($P < 0,0001$).

5.4. Análise da expressão de genes e proteínas envolvidos com morte celular programada em sementes de soja

Alguns dos genes já descritos como envolvidos na morte celular programada, como, NRP (REIS et al., 2016; REIS & FONTES, 2012), VPE (HATSUGAI et al., 2004; HATSUGAI et al., 2004; KINOSHITA et al., 1995; YAMADA et al., 2005), metacaspases (CHOI & BERGES, 2013; ROCHA et al., 2017; SUAREZ et al., 2004; WATANABE & LAM, 2005) e BiP (ALVIM et al., 2001; CASCARDO et al., 2000; VALENTE et al., 2009; WROBEL et al., 1997), tiveram as suas expressões analisadas durante o desenvolvimento e germinação de sementes de soja. Na figura 13 é possível observar o perfil da expressão dos genes anotados como NRP. Três genes (Glyma05g36700, Glyma13g10640 e Glyma20g16100) apresentaram baixa expressão nos tecidos da semente em desenvolvimento (4, 12-14 e 22-24DAF, 5-6mgWS, 100-200mg e 400-500mgCOT e Dry seed (semente inteira quiescente) e em eixo embrionário durante a germinação (0, 3, 6, 12 e 24 HAE). O gene Glyma08g24600, de forma oposta, apresentou maior expressão nos tecidos do desenvolvimento da semente e eixo embrionário durante a germinação.

Considerando que o tegumento é o tecido alvo do processo de morte celular programada, foi analisada a expressão de genes NRP em linhagens de soja (Clark e Harosoy), cujos tegumentos são íntegros ou defeituosos (Clark standard (CS)/Clark defective (CD) e Harosoy standard (HS)/Harosoy defective (HD)) (KOUR et al., 2014). O perfil de expressão desses genes foi oposto ao das sementes durante o desenvolvimento e germinação (Figura 13), com três dos genes NRP sendo expressos em tegumento. O defeito no tegumento de ambos os grupos de sementes parece não ter efeito na expressão de genes NRP, uma vez que as sementes com pesos similares foram agrupadas.

Todos os genes anotados como VPE (VACUOLAR PROCESSING ENZYME) apresentam maior expressão (representado pela cor vermelha) em linhagens de soja (Clark e Harosoy), cujos tegumentos são íntegros ou defeituosos (Clark standard (CS)/Clark defective (CD) e Harosoy standard (HS)/Harosoy defective (HD)) (figura 14). O gene Glyma14g10620, diferentes dos demais possui maior expressão em 4 e 22-24 DAF. No entanto, os genes

possuem baixa expressão em tecidos do desenvolvimento da semente (4, 12-14 e 22-24DAF (Dias Após a Fertilização), 5-6mg e 100-200mgWS (Whole seed – semente inteira), 100-200mg e 400-500mgCOT (Cotilédones) e eixo embrionário, durante a germinação nos tempos de 0, 3, 6, 12 e 24 HAE (Horas Após a Embebição).

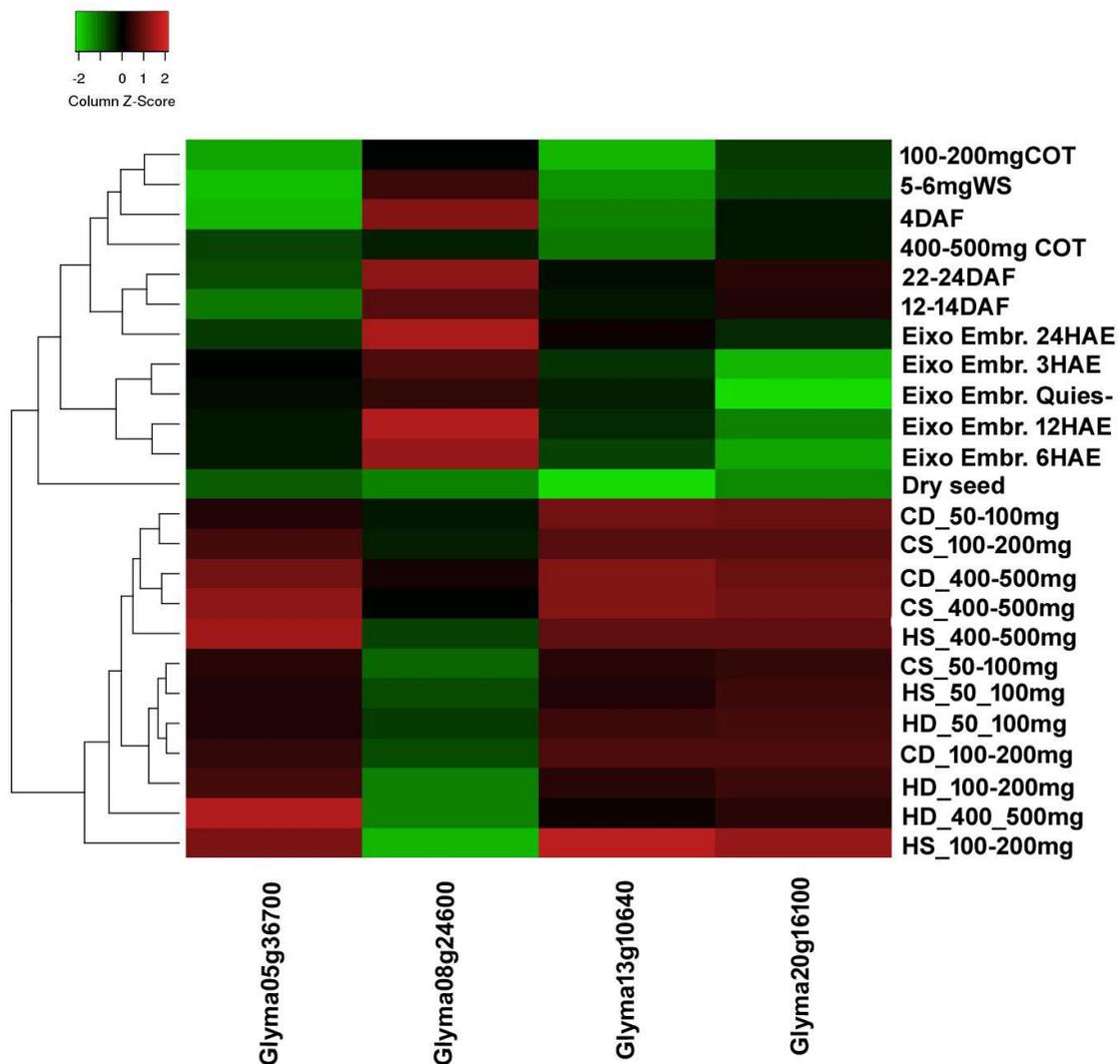


Figura 13: Representação em “heatmap” dos valores de expressão dos genes NRP (RPKM) em diferentes tecidos de soja (4, 12-14 e 22-24DAF (Dias Após a Fertilização), 5-6mg e 100-200mgWS (Whole seed –semente inteira), 100-200mg e 400-500mgCOT (Cotilédones), eixo embrionário 0,3,6,12 e 24HAE (Horas Após a Embebição) e tegumentos linhagem HS/HD (HS – normal e HD – defeituoso) e linhagem CS/CD (CS – normal e CD – defeituoso). As cores de vermelho mais intenso indicam maior expressão dos genes NRP e a verde, menor expressão nos tecidos analisados.

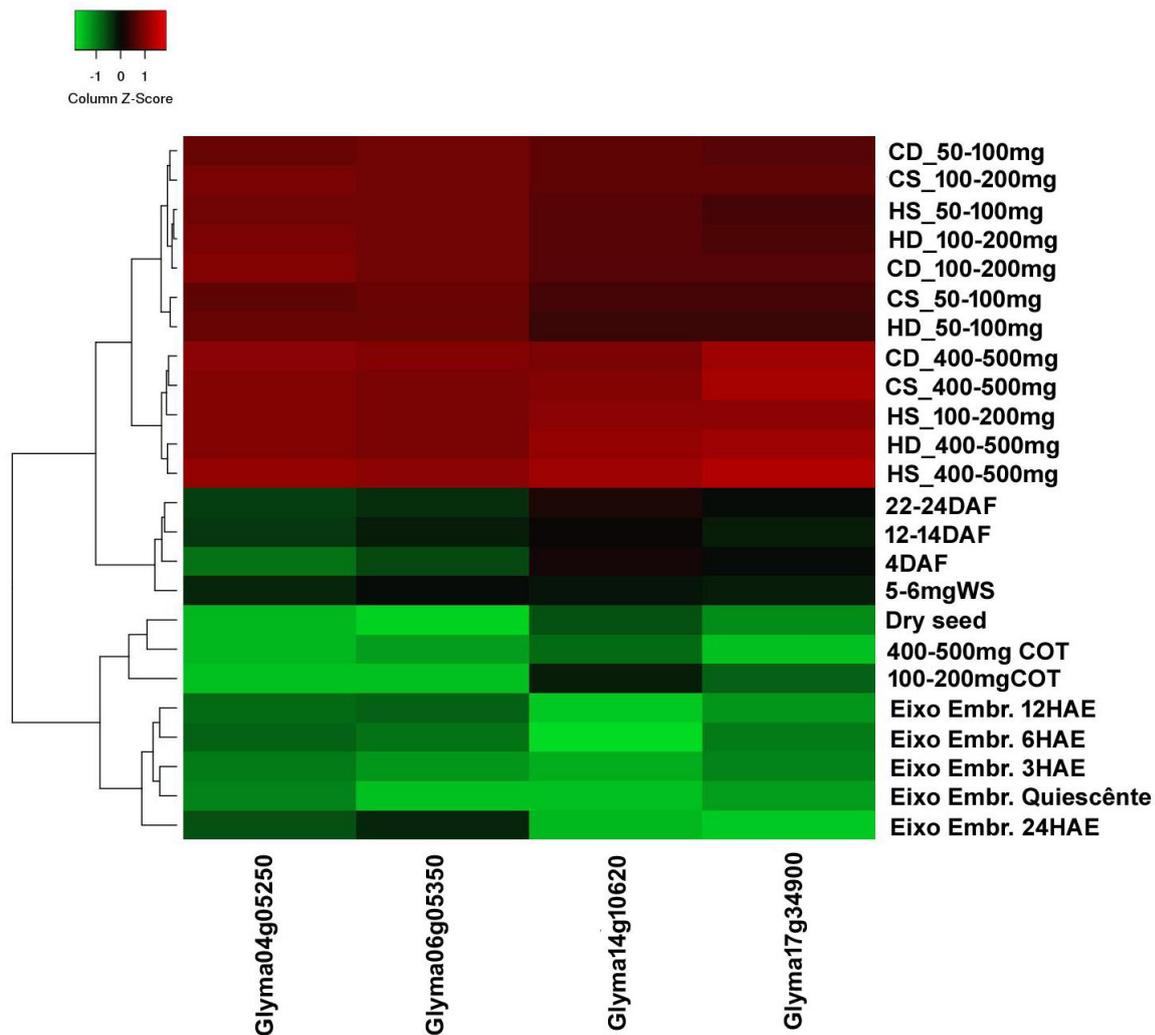


Figura 14: Representação em “*heatmap*” dos valores de expressão dos genes VPE (RPKM em log2) em diferentes tecidos de soja (4, 12-14 e 22-24DAF (Dias Após a Fertilização), 5-6mg e 100-200mgWS (Whole seed – semente inteira), 100-200mg e 400-500mgCOT (Cotilédones), eixo embrionário 0,3,6,12 e 24HAE (Horas Após a Embebição) e tegumentos linhagem HS/HD (HS – normal e HD – defeituoso) e linhagem CS/CD (CS – normal e CD – defeituoso). As cores de vermelho mais intenso indicam maior expressão dos genes NRP e a verde menor expressão nos tecidos analisados.

Genes anotados como metacaspase não apresentaram um padrão de expressão entre os tecidos (Figura 15). É possível observar que seis genes (Glyma01g10880, Glyma08g07630, Glyma08g19050, Glyma0g25150, Glyma08g25170 e Glyma15g31750) mostraram maior expressão em tegumento (HS/HD e CS/CD) e eixo embrionário de 24 HAE. O gene Glyma19g30180 mostrou ser mais expresso em tegumento (HS/HD e CS/CD) e em eixo embrionário em 24 HAE. Glyma01g10880 apresentou maior expressão no tecido de eixo embrionário em 3 HAE. Os genes Glyma08g07640, Glyma13g07850 e Glyma15g5940 apresentaram maior expressão em cotilédones (400-500mgCOT). É possível observar também que o gene Glyma13g07870 é mais expresso em 4 e 22-24 DAF. O gene Glyma08g17320 apresenta maior expressão em 12-14 e 22-24 DAF, nos tecidos durante a embriogênese. Glyma08g07640 possui maior expressão 22-24 DAF, em cotilédones (100-200mg e 400-500mgCOT) e em eixo embrionário (12 e 24 HAE).

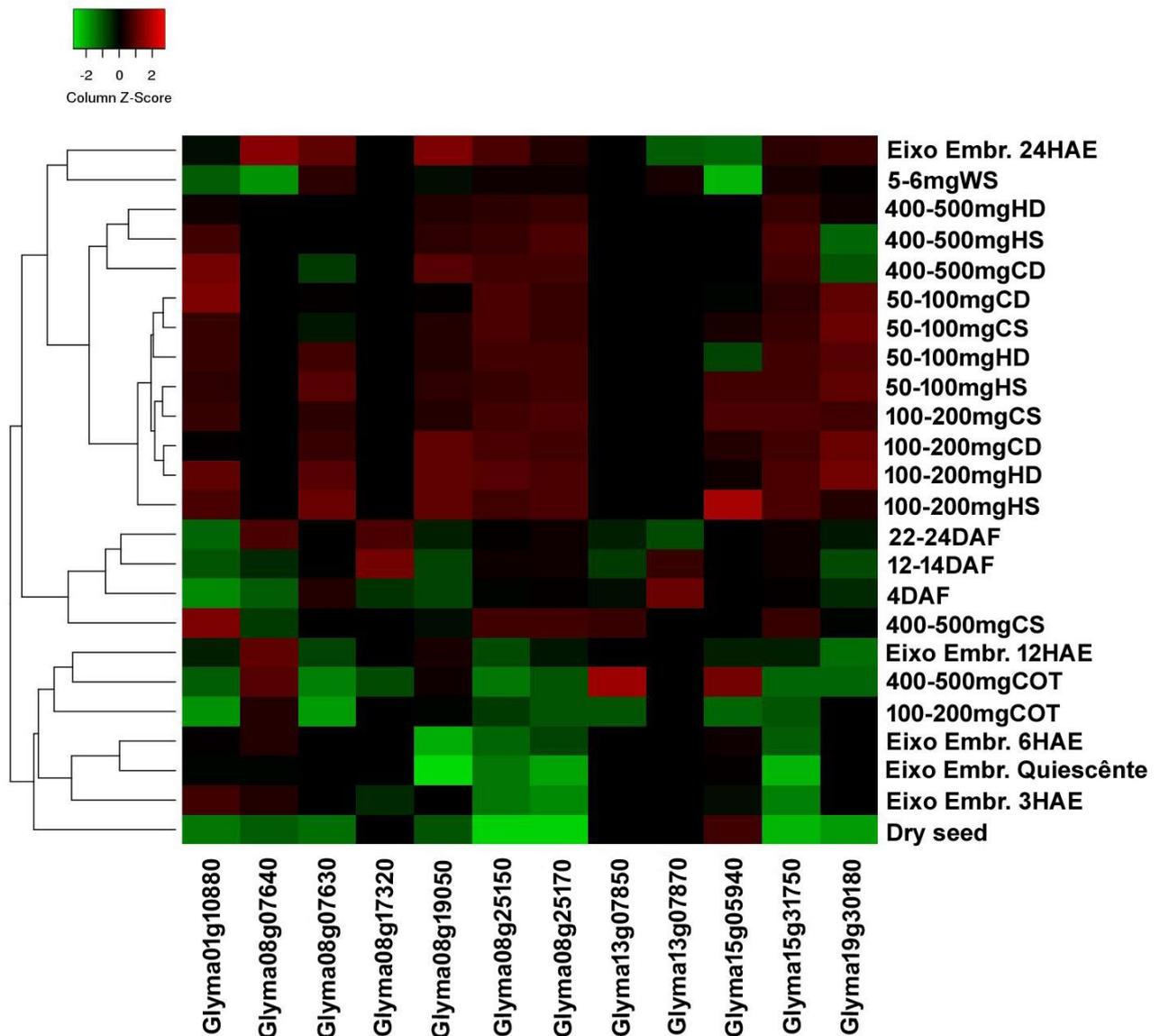


Figura 15: Representação em “heatmap” dos valores de expressão dos genes metacaspase (RPKM em log₂) em diferentes tecidos de soja (4, 12-14 e 22-24DAF (Dias Após a Fertilização), 5-6mg e 100-200mgWS (Whole seed –semente inteira), 100-200mg e 400-500mgCOT (Cotilédones), eixo embrionário 0,3,6,12 e 24HAE (Horas Após a Embebição) e tegumentos das linhagens HS/HD (HS – normal e HD – defeituoso) e CS/CD (CS – normal e CD – defeituoso). As cores de vermelho mais intenso indicam maior expressão dos genes NRP e a verde menor expressão nos tecidos analisados.

Com relação a expressão de BiP, foram encontrados quatro genes no genoma de soja. A figura 16A mostra o resultado da análise de expressão de genes referentes a BiP. Os genes BiP apresentam oscilação de expressão desde a embriogênese até a maturação (100-200mg COT) da semente, sendo reduzida em 400-500mgCOT e diminuindo consideravelmente na semente quiescente. Durante a germinação, em eixo embrionário, a expressão dos genes Glyma05g36620 e Glyma08g02940 aumenta significativamente.

A expressão da proteína BiP foi monitorada por análise de Western Blotting (Figura 16B), o que tornou possível assegurar a expressão de BiP nas amostras de eixo embrionário e cotilédones horas após a embebição (0, 6, 12, 24 HAE). É possível observar uma banda em torno de 78 kDa, em todas as amostras 0, 6, 12 e 24 HAE. Outra banda em torno de 40 kDa aparece em 24 HAE, sendo possivelmente uma isoforma de BiP (as setas indicam a posição de BiP). As proteínas BiP parecem ter uma maior ação no eixo embrionário do que em cotilédones.

A maior abundância de BiP em eixo embrionário do que em cotilédones de sementes de soja, sugere que a morte celular programada deve estar sendo atenuada no eixo embrionário. Utilizando de sementes de soja susceptíveis e resistentes à seca, a presença de BiP foi novamente analisada através de Western Blotting em eixo embrionário durante a germinação. Primeiramente, utilizamos uma diluição de 1:100 do anticorpo anti-BiP nas mesmas amostras de eixo embrionário e cotilédones de 0, 6, 12, 24 HAE, para confirmar a maior abundância de BiP em eixo embrionário. Podemos notar a presença de banda em torno de 78 kDa que não apareceu em amostras de cotilédones, quando utilizamos a diluição de 1:500, na figura 16B. Após isso, monitoramos a presença de BiP nos cultivares Embrapa 48 e BR16, um resistente e o outro suscetível a seca, respectivamente (Figura 17B). É possível observar que nas amostras de Embrapa 48, além da banda de 78 kDa, aparece uma banda em torno de 35 kDa nos tempos 0 e 12 HAE. Nas amostras BR16 é possível observar uma banda de 78 kDa em todas as amostras de eixo embrionário nos tempos de 0, 6, 12 e 24 HAE e, apenas no tempo de 24 HAE aparece outra banda em torno de 35 kDa, perfil similar ao do cultivar BRS284.

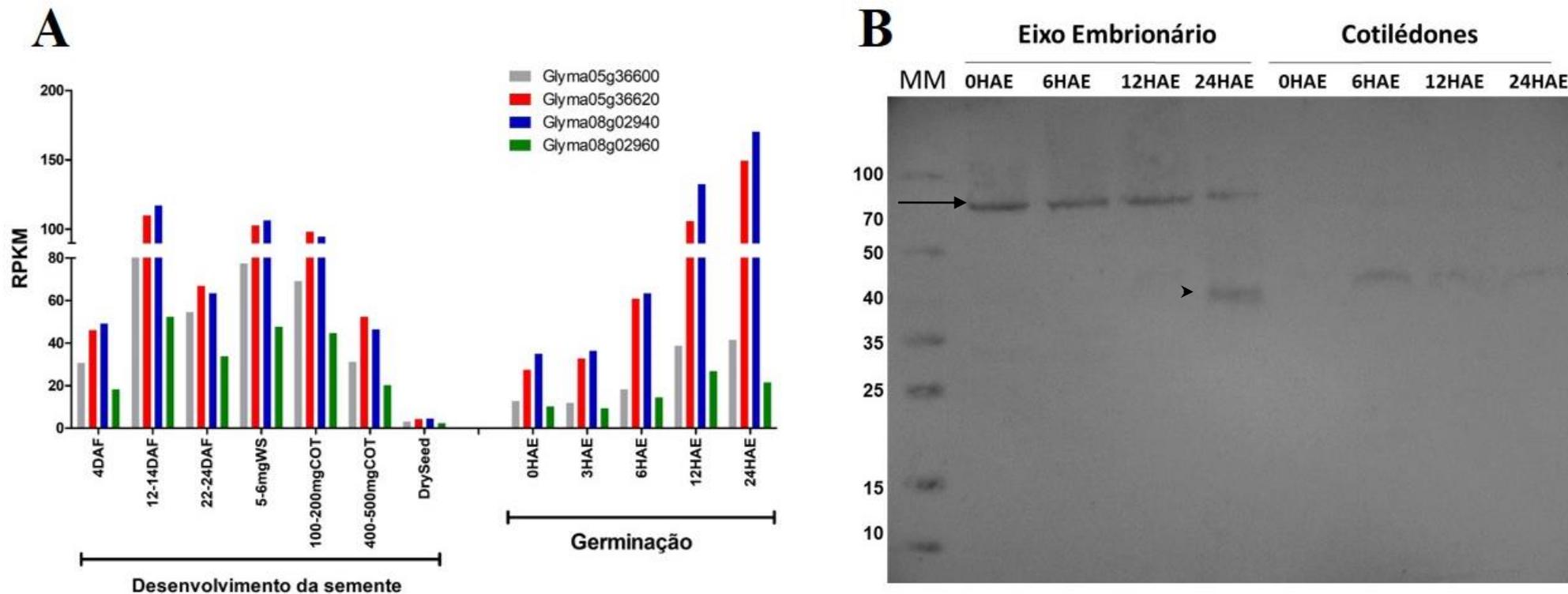


Figura 16: (A) Frequência em RPKM da expressão dos genes referentes à BiP nos diferentes estádios de desenvolvimento da semente de soja e eixo embrionário em germinação. (B) Níveis de expressão de BiP durante a germinação em eixo embrionário e cotilédones de semente de soja. As proteínas foram ajustadas por volume de amostra (15 μ l) e separadas por SDS-PAGE e imunotransferidas para membrana de nitrocelulose, posteriormente sondada com um anticorpo policlonal anti-BiP (1:500). A seta maior indica a posição da banda principal de BiP e as cabeças de setas, um polipeptídeo de cerca de 40 kDa.

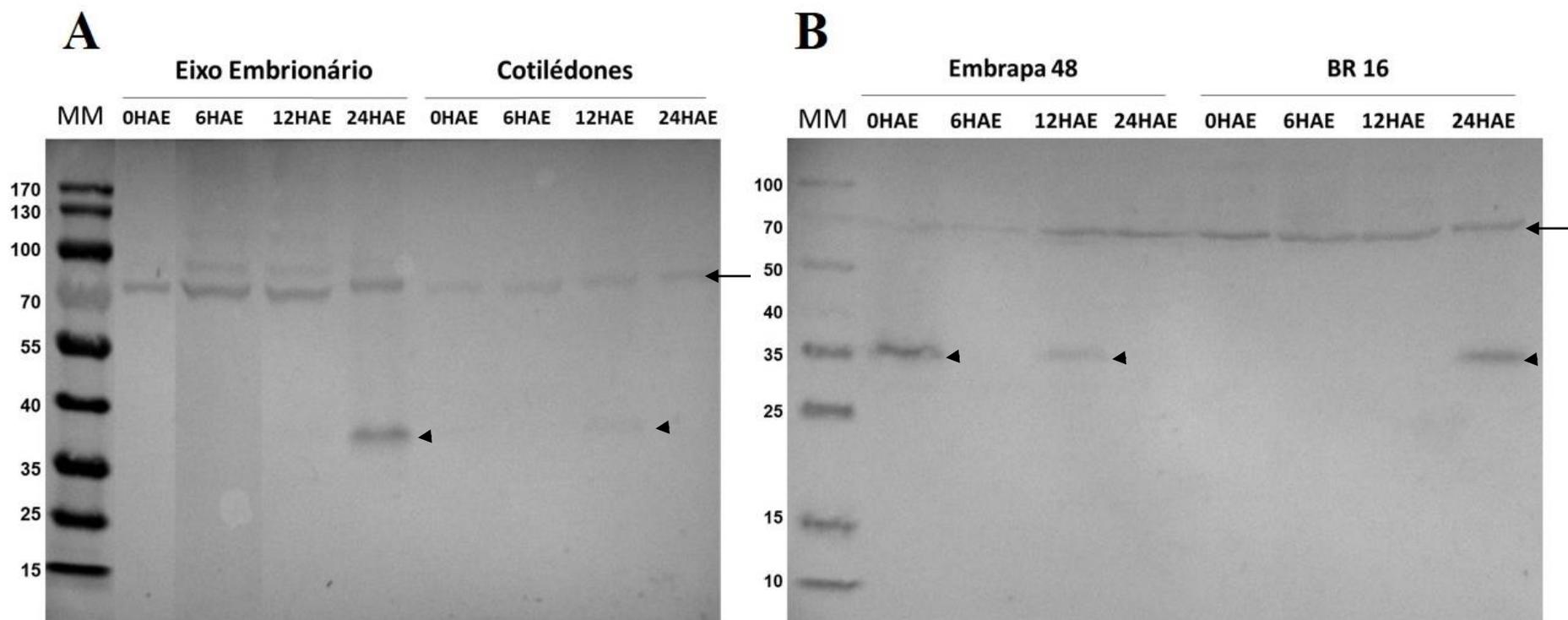


Figura 17: Níveis de expressão de BiP durante a germinação de soja. (A) germinação de eixos embrionários e cotilédones dos cultivares BRS284 e (B) germinação de eixos embrionários Embrapa 48 e BR16. As proteínas foram ajustadas por volume de amostra (15µl) e separadas por SDS-PAGE e imunotransferidas para membrana de nitrocelulose e sondada com anticorpo policlonal anti-BiP (1:100). A seta maior indica a posição da banda principal de BiP e as cabeças de setas, um polipeptídeo acima de 35 kDa.

6. DISCUSSÃO

A morte celular programada é um processo geneticamente controlado no desenvolvimento da planta, no qual apenas as células que estão destinadas a morrer são eliminadas sem gerar nenhum dano às células vizinhas. MCP é notavelmente um processo central para alguns eventos em condições normais de desenvolvimento, como a diferenciação dos elementos traqueais, a formação de tricomas e aerênquimas, raízes, abscisão de órgãos florais, estabelecimento da morfologia de certas folhas, formação de embriões (visto que, em algumas sementes apenas um embrião se desenvolve até a maturidade e os outros degeneram pela morte celular programada), dentre outros (BEWLEY & BLACK, 1994; GADJEV et al., 2008).

VAN DOORN (2011) classificou a morte celular programada como autolítica e não-autolítica. O que difere um tipo de MCP do outro é a participação do vacúolo. Se houver o rompimento do vacúolo e rápida degradação do citoplasma, a MCP é classificada como MCP autolítica. Já a MCP não-autolítica não possui as características mencionadas anteriormente. A classificação da MCP em autolítica e não-autolítica permite distinguir os agentes causadores da MCP, como por exemplo, a MCP autolítica ocorre durante o desenvolvimento normal da planta e sob estresse moderado, já a MCP não-autolítica é encontrada em interação com patógeno (VAN DOORN, 2011). LIMA et al. (2015) observaram eventos típicos de MCP durante o desenvolvimento de tegumentos de *Vigna unguiculata*. A MCP observada foi autolítica e assíncrona, ocorrendo da camada paliçádica (mais externa) em direção as camadas mais internas do parênquima, a partir de 10 DAP (dias após a polinização).

Nos últimos anos, poucos trabalhos sobre morte celular em sementes foram publicados. Em soja, há alguns trabalhos sobre morte celular programada em folhas. Assim, no presente trabalho analisamos a expressão de genes envolvidos em vias que desencadeiam morte celular programada em sementes de soja.

A compreensão acerca de genes alvos que desencadeiam a morte celular programada em sementes de soja permitirá entender processos importantes durante o desenvolvimento da semente e germinação. Para isso, o

presente trabalho analisou genes de vias que possivelmente desencadeiam MCP. A figura 18 representa esquematicamente os principais níveis de expressão dos genes que se relacionam ao desencadeamento de MCP durante o desenvolvimento e germinação de sementes de soja.

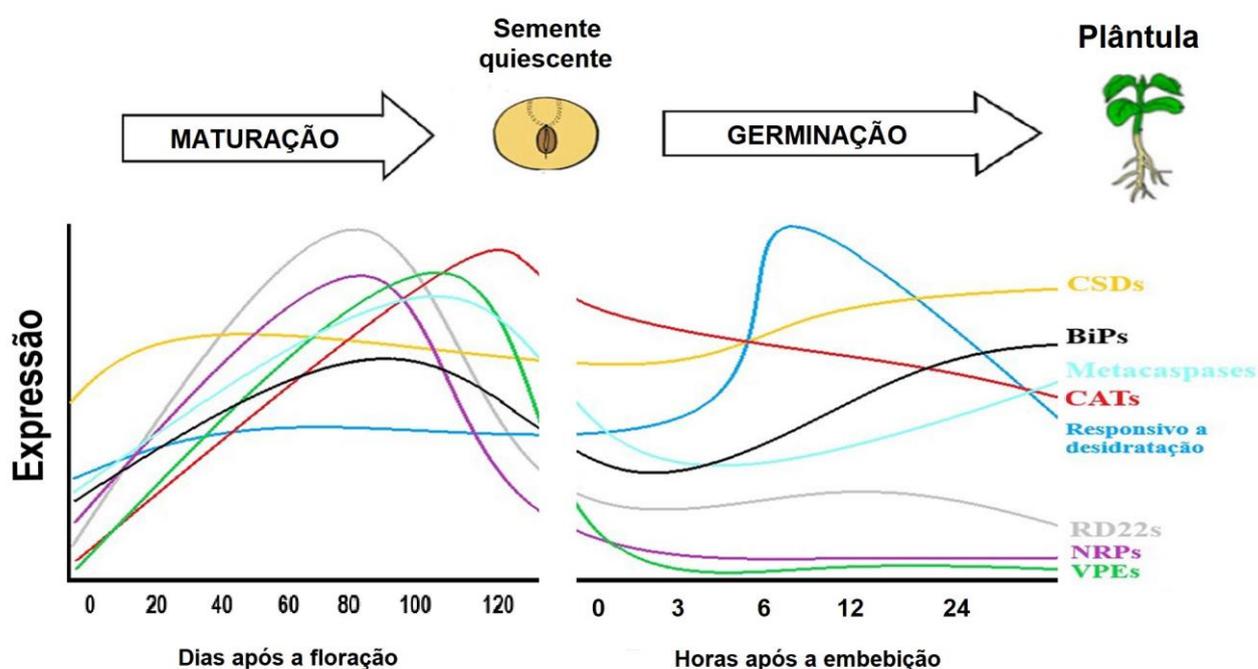


Figura 18: Representação esquemática dos principais níveis de expressão dos genes que se relacionam ao desencadeamento de morte celular programada durante o desenvolvimento e germinação de sementes de soja.

A análise global da expressão dos genes (Figuras 4, 5, 6 e 7) permitiu a visualização da expressão dos genes em diversas vias. É possível observar na figura 4A, que na via de estresse abiótico, há maior expressão de genes na fase de 4 DAF, quando comparada com 12-14 DAF. Essa maior expressão gênica em 4 DAF, possivelmente ocorre pois nessa fase ocorre a histodiferenciação dos tecidos da semente em cotilédones, eixo embrionário e o tegumento, este último proveniente da diferenciação dos integumentos externos do ovário da planta mãe. De acordo com LIMA et al. (2015), eventos de MCP em tegumentos de sementes de *Vigna unguiculata* em desenvolvimento, tais como desorganização celular, vacúolos de tamanhos

aumentados e fragmentação do DNA, são detectados a partir de 10 DAP. GIULIANI et al. (2002) detectaram núcleos TUNEL-positivos no escutelo, coleóptilo, na coifa da raiz e nas células do suspensor em milho, durante a embriogênese. Na figura 4B, podemos notar que os genes são mais expressos em 12-14DAF. Essa maior expressão em 12-14DAF, possivelmente acontece, visto que nesta fase ainda está acontecendo a diferenciação de eixo embrionário e cotilédones e divisão celular (BEWLEY & BLACK, 1994; LE et al., 2007).

Na figura 5, a comparação da fase 100-200mgWS (semente inteira quiescente) com a fase 5-6mgWS (semente inteira no início da maturação) revela que há maior expressão dos genes relacionados ao estresse abiótico tanto no início da maturação quanto em semente seca. Há maior expressão em semente quiescente das proteínas PR, proteínas induzidas rapidamente por infecções patogênicas, também são induzidas por ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e etileno (ET). Genes PR também são regulados por fatores ambientais, como estresse abiótico, como frio, luz e estresse osmótico e durante o desenvolvimento, como a senescência foliar e a maturação do pólen, sugerindo que eles também desempenham um papel em certas respostas de estresse e processos de desenvolvimento (ZEIER et al., 2004).

É possível observar que a maior contribuição no início da maturação é proveniente do cotilédone (Figuras 6, 7 e 8) e 2034 genes são expressos tanto em tegumento quanto em cotilédones. Essa fase é marcada pela expansão celular e o início da maturação, onde a semente encontra-se em alta atividade metabólica, o conteúdo de água pode chegar a níveis máximos e há deposição de compostos de reserva, como proteínas, carboidratos e lipídeos, nos cotilédones e também em outras estruturas de reservas (BEWLEY & BLACK, 1994).

Analisamos também a expressão de genes envolvidos com a dessecação e desidratação da semente (Figuras 9 e 10). Os genes RD22 (figura 9) mostraram expressão significativa na fase de início da maturação apenas em cotilédones e apresentam um pico de expressão nas fases de 100-200mgCOT e 400-500mgCOT, momento em que o peso fresco começa a decair e o peso seco começa a se elevar. Nesta fase de transição, o evento de

desidratação que acomete as células ao final da maturação possivelmente ativa genes responsivos à dessecação, para garantir tolerância a esta. O teor de água das sementes, até próximo do final de seu desenvolvimento, permanece elevado, geralmente acima de 40% de peso fresco. Ao final da maturação o teor de água sofre redução, chegando a cerca de 10%. A semente encontra-se com metabolismo reduzido, fase em que o embrião está metabolicamente inativo. Nessa transição possivelmente ocorre morte celular nos cotilédones, para que haja a remodelação da forma da semente no final do desenvolvimento.

Um aumento na expressão de dois genes responsivos à desidratação ao longo da germinação da semente é mostrado na figura 10. Esses genes podem estar envolvidos em mecanismos de proteção do embrião em ocasionais eventos de desidratação, gerados por condições climáticas desfavoráveis a continuidade do processo germinativo. Possivelmente, os genes envolvidos com dessecação e desidratação trabalham em sinergia, compondo um mecanismo de tolerância a desidratação/reidratação da semente.

Ainda para investigar a via de indução de MCP, analisamos também genes envolvidos com estresse oxidativo. A figura 11 mostra a expressão de genes anotados como SOD. É possível observar que a expressão dos genes SOD se mantém relativamente alta durante a embriogênese e na maturação a expressão reduz. Três genes apresentaram alta expressão durante a germinação da semente. Genes com anotação para CSD (superóxido dismutase citoplasmática) e MSD (superóxido dismutase mitocondrial) expressam proteínas que estão localizadas no citoplasma e na matriz mitocondrial, respectivamente (ALSCHER et al., 2002) e são responsáveis por catalisar a dismutação do superóxido a peróxido de hidrogênio. A enzima superóxido dismutase é a primeira na linha de defesa contra os níveis elevados de espécies reativas de oxigênio e seus efeitos tóxicos. Está presente em todos os organismos aeróbicos e compartimentos subcelulares propensos a uma explosão oxidativa, devido a estresses abiótico ou biótico (GILL & TUTEJA, 2010). SODs realizam a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e O_2 , diminuindo assim o risco de formação no interior celular de radical hidroxila (OH^{\cdot}). O radical OH^{\cdot} é um oxidante que oxida indiscriminadamente as

biomoléculas celulares a uma taxa limitada por difusão (FRIDOVICH, 1989, 1995). As biomoléculas oxidadas por OH^{\bullet} podem se tornar radicais, que propagam ainda maiores danos oxidativos celulares não específicos (EVANS et al., 1998). O acúmulo de EROs causam danos oxidativos em biomoléculas essenciais, como o DNA e leva a várias formas de dano mutacional. Mutações induzidas por oxidação comprometem a integridade e funcionalidade do DNA (CABISCOL et al., 2000; YAKES & VAN HOUTEN, 1997) e também desempenham papel relevante no intermédio da MCP (AVERY, 2011; CHANDRA et al., 2000; JEON et al., 2002). Posteriormente ao estresse abiótico, enzimas antioxidantes são induzidas para diminuir a concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em ambientes intracelulares.

EROs podem ser indicadores de estresse e estarem envolvidos como mensageiros secundários na via de transdução de sinais na resposta ao estresse. Para que a inativação de EROs seja efetiva, há um trabalho, em sincronia, de uma série de enzimas antioxidantes. Enzimas antioxidantes atuam impedindo a ação tóxica de EROs. As enzimas SOD e CAT podem estar envolvidas na preservação da viabilidade e proteção das membranas das sementes contra EROs produzidas durante a germinação (PRODANOVIC et al., 2007).

A expressão de genes com anotação para catalase (Figura 12) permanece baixa na embriogênese e durante a maturação da semente, mas tem pico de expressão em semente quiescente. A catalase é uma enzima detoxificante de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), proveniente da dismutação do superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) em H_2O_2 . Na figura 12B, vê-se que a atividade de catalase é estatisticamente diferente entre tegumentos e eixos embrionários de semente de soja quiescente. A deficiência de catalase induz aumento dos níveis de H_2O_2 e desencadeia MCP (GECHEV et al., 2005; VANDENABEELE et al., 2004). Trabalhos realizados em tabaco deficiente de catalase mostraram que o H_2O_2 proveniente da elevada fotorrespiração é capaz de desencadear respostas de defesa, locais e sistêmica, e ativar morte celular programada (CHAMNONGPOL et al., 1998; DAT et al., 2003). Elevados níveis de H_2O_2 são tóxicos para a planta, já baixas concentrações desempenham importante papel na transdução de sinais em plantas atacadas (PRASAD et al., 1994).

EROs influenciam a expressão de um número de genes e vias de transdução de sinal de resposta a estresses. Um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio geralmente induz mecanismos de indução de MCP, sendo EROs utilizados como mediadores do sinal de tensão. Fatores ambientais podem ser prejudiciais para o correto funcionamento do RE, causando estresse do RE, que é caracterizado pela acumulação de proteínas mal enoveladas (CAI et al., 2014). Esse estresse é superado pela via de resposta a proteínas mal enoveladas (UPR), que enviam sinais do RE para o núcleo, que por sua vez, aumenta a capacidade de enovelamento das proteínas (WATANABE & LAM, 2009). Porém, quando o sinal de estresse do RE é muito intenso, a MCP é desencadeada (BOYCE & YUAN, 2006). Foi visto em *Arabidopsis* que o fator de transcrição ANAC089, foi identificado como um dos controladores que causam MCP em condições de estresse, pois está associado à membrana, e se desloca para o núcleo quando há estresse intenso no RE (PETROV et al., 2015; YANG et al., 2014).

Na figura 13, observamos que três genes NRP (Glyma05g36700, Glyma13g10640 e Glyma20g16100) apresentaram alta expressão em tegumento (Clark standard (CS)/ Clark defective (CD) e Harosoy standard (HS)/ Harosoy defective (HD)) e baixa expressão nos tecidos de desenvolvimento da semente (4, 12-14, 22-24 DAF; 5-6mgWS; 100-200mg e 400-500mg COT; Dry seed (semente inteira seca) e eixo embrionário durante a germinação (0, 3, 6 12 e 24 HAE). O gene Glyma08g24600 apresenta expressão contrária aos demais, é mais expresso em tecidos do desenvolvimento da semente e eixo embrionário do que em tegumento. Genes NRP apresentam em sua estrutura dois domínios, o domínio N-terminal é rico em asparagina e o C-terminal, que possui o domínio do desenvolvimento e de morte celular (DCD). A expressão de NRPs aumenta quando há estresse osmótico e do RE. Durante estresses prolongados, a expressão de NRP-A e NRP-B aumenta de forma sinérgica (COSTA et al., 2008) desencadeando a morte celular, pois a ativação de genes NRPs, traduzem sinal de MCP, induzindo fatores de transcrição da família NAC em soja (REIS et al., 2016). Assim, genes NRPs são considerados marcadores de morte.

REIS et al. (2016) observaram que a superexpressão de BiP atenua a morte celular, devido ao atraso na indução de marcadores de morte, como NRP-A e NRP-B, os quais estão envolvidos na transdução de sinal de MCP proveniente de estresse osmótico e do RE. Notaram uma correlação direta entre os níveis de BiP e a senescência induzida por NRP. Observaram também que a superexpressão de BiP previne clorose induzida por NRP em folhas agroinoculadas, enquanto o silenciamento de BiP endógeno acelera o processo de senescência em linhagem antisense. Assim, BiP atua como modulador da resposta de morte celular programada mediada por NRP.

Para a análise da expressão de VPE, foi realizado um “heatmap” (Figura 14), no qual é possível observar que os genes anotados como VPE apresentam alta expressão durante o desenvolvimento do tegumento de soja (Clark standard (CS)/ Clark defective (CD) e Harosoy standard (HS)/ Harosoy defective (HD)). NAKAUNE et al. (2005) mostraram que a enzima δ VPE é específica e transitoriamente expressa em duas camadas celulares do tegumento de *Arabidopsis*, tendo essa enzima participação fundamental na formação do tegumento, em eventos de MCP durante estágios iniciais da maturação da semente, visto que, em mutantes deficientes de δ VPE a MCP é adiada nestas camadas. Já em *Vigna unguiculata*, não foi detectada a expressão de β VPE em nenhuma das camadas microdissecadas do tegumento em desenvolvimento, indicando que possivelmente essa enzima não participaria do processo de MCP no tegumento durante o desenvolvimento da semente de *V. unguiculata* (LIMA et al., 2015). MENDES et al. (2013) observaram que genes VPE regulam os fatores de transcrição GmNAC6 e GmNAC30, pois possuem em sua região promotora a presença de cis elemento para o sítio de ligação de ambos fatores de transcrição. Assim, a expressão de VPE possui uma correlação positiva com a co-expressão de GmNAC6 e GmNAC30, caracterizando a importância biológica da interação entre ambas as proteínas para aumentar o sinal de morte celular via VPE.

Para analisar se há expressão diferenciada dos genes de metacaspases durante a embriogênese, maturação, desenvolvimento do tegumento e em eixo embrionário durante a germinação, foi realizada um “heatmap” (figura 15) de expressão para os 12 genes de metacaspases. Em soja, foram encontradas 16

metacaspases, sendo 10 do tipo I e 6 do tipo II (TSIATSIANI et al., 2011). Entretanto no genoma de soja disponível no banco de dados phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>), encontramos 15 genes de metacaspases, das quais 3 não são expressos em sementes. Assim, na figura 17, são mostradas apenas 12 metacaspases. Os genes Glyma08g07640, Glyma08g07630, Glyma08g19050 (codificadores de metacaspases envolvidas na regulação de apoptose), Glyma08g25150, Glyma08g25170, Glyma15g31750 (relacionados à metacaspase 4) e Glyma19g30180 (relacionado à metacaspase 9) apresentam expressão diferenciada em eixos embrionários 24 HAE e durante o desenvolvimento do tegumento. A metacaspase 4 de *Arabidopsis* é uma metacaspase do tipo II, não possui prodomínio pro-apoptótico, mas apresenta a região de conexão entre as subunidades p20 e p10. Em *Arabidopsis*, a metacaspase 4 tem como principal função a regulação positiva de MCP induzida por estresses bióticos e abióticos. Em *Picea abies*, a metacaspase do tipo II (mclI-Pa) possui aproximadamente 64% de similaridade com a metacaspase 4 de *Arabidopsis*. Em *P. abies*, o silenciamento do gene mclI-Pa suprime a MCP do suspensor, o que leva a paralisação do desenvolvimento na camada paliçádica, na camada subepidérmica e nos estágios iniciais, intermediários e tardios (8 DAP, 12 DAP e 18 DAP, respectivamente) (SUAREZ et al., 2004), possivelmente indicando que esta metacaspase possua papel fundamental para a execução da MCP em todos os tecidos do tegumento.

As chaperonas moleculares, presentes no reticulo endoplasmático, atuam no enovelamento e montagem correta das proteínas e estão envolvidas na regulação de diversos processos celulares, atenuando a propagação do sinal de morte celular induzido pelo estresse do RE. São expressas constitutivamente em baixos níveis em todas as células, porém são induzidas pelo acúmulo de proteínas mal enoveladas no lúmen dessa organela (VALENTE et al., 2009).

Analizamos o perfil da BiP em eixos embrionários e cotilédones de sementes quiescentes e germinantes de soja. Na figura 16A, podemos observar que a BiP apresenta diferentes níveis de expressão ao longo dos processos de embriogênese e maturação da semente, mas tal expressão é

bruscamente reduzida em sementes quiescentes. Isso provavelmente acontece devido à baixa atividade metabólica que acomete a semente em estado quiescente. Em eixos embrionários, a expressão aumenta progressivamente após a embebição e germinação, tendo um pico de expressão em 24 HAE. No início da germinação, há elevada entrada de água, a semente seca quiescente rapidamente retoma a atividade metabólica, ocorre a síntese de proteínas a partir de RNAm pré-existentes, liberação de solutos para o ambiente externo e reparo nas estruturas celulares, como DNA e mitocôndrias (BEWLEY & BLACK, 1994; BEWLEY, 1997). O aumento progressivo da expressão dos genes BiP durante a germinação provavelmente acontece porque, depois da primeira entrada de água na semente, ocorre uma redução na entrada de água, denominada de fase platô e nesta ocorre a síntese de novo de proteínas e novas mitocôndrias (BEWLEY & BLACK, 1994; BEWLEY, 1997). Além disso, a expressão de BiP atenua sinal de morte celular.

A figura 16B mostra a expressão de BiP em eixos embrionários e cotilédones de soja (cultivar BRS 284) durante a germinação, detectada pela imunorreação ao anticorpo anti-BiP (diluição 1:500). É possível visualizar uma banda de 78 kDa (mostrada pela seta) visível desde 0h até 24 HAE em eixos embrionários, enquanto em cotilédones observamos uma banda em torno de 40 kDa. CASCARDO et al. (2000) mostraram que a família BiP, em soja, apresenta quatro membros, sendo classificados como soyBiPA, soyBiPB, soyBiPC e soyBiPD, apresentando regulação tecido-específico (CASCARDO et al., 2001). A soyBiPA é expressa em folhas, raízes e sementes, soyBiPB apresenta expressão restrita a folhas, soyBiPC é expresso em folhas, sementes e vagens e soyBiPD é expressa em todos os órgãos. Folhas de soja submetidas a estresse hídrico exibem atividade de ligação a proteínas, atividade esta que os autores associam a uma proteína de cerca de 78 kDa induzida pelo estresse, e co-purificada com um polipeptídeo de 28 kDa contaminante (CASCARDO et al., 2000). Deste modo, a expressão de BiP que observamos na semente pode ser proveniente de soyBiPA, soyBiPC e soyBiPD.

No presente estudo, também foi observado a presença de BiP em eixos embrionários e cotilédones de soja (BRS 284) durante a germinação e em

eixos embrionários em germinação de Embrapa 48 e BR 16, usando-se o anticorpo anti-BiP na diluição de 1:100 (Figuras 17A e B). Na figura 16B, é possível observar uma banda em torno de 78 kDa apenas nas amostras de eixo embrionário (0, 6, 12 e 24 HAE) durante a germinação e uma banda em torno de 40 kDa aparece em eixo embrionário 24 HAE e, em cotilédones, a partir de 6 HAE. Entretanto, ao utilizamos a diluição do anticorpo anti-BiP 1:100 (figura 17A), a banda de 78 kDa aparece em todas as amostras (eixos embrionários e cotilédones). Diferentemente do que podemos notar na figura 16B, aparece uma banda em torno de 38 kDa, possivelmente outra isoforma de BiP.

Os cultivares de soja Embrapa 48 e BR16 mostraram respostas contrárias ao déficit hídrico. Embrapa 48 é um cultivar que mostra alta resistência a seca, enquanto BR 16 é muito suscetível (CASAGRANDE et al., 2001; TEXEIRA et al., 2008). Na figura 17B é mostrada a expressão de BiP em eixos embrionários destes dois cultivares diferentes. É possível observar que no cultivar Embrapa 48, resistente a seca, a banda em torno de 78 kDa é mais fraca em 0 e 3 HAE, mas em 0 e 12 HAE aparece outra banda em torno de 35 kDa. Já no cultivar BR16, suscetível a seca, a banda em torno 35 kDa aparece apenas em 24 HAE, e a banda de 78 kDa aparece desde o tempo 0 até 24 HAE.

GUIMARÃES-DIAS et al. (2012) mostraram que quando comparados os cultivares Embrapa 48 e BR 16 cultivados em areia, sob condições de déficit hídrico, há expressão significativamente maior em Embrapa 48 que em BR 16, de genes envolvidos com resposta a seca.

Além de atenuar a morte celular, a superexpressão de BiP exerce aumento da tolerância a seca em soja e atrasa a senescência foliar induzida pela seca em soja e tabaco (VALENTE et al., 2009). Níveis elevados de BiP exercem função protetora contra déficit hídrico em plantas (ALVIM et al., 2001; CAROLINO et al., 2003; VALENTE et al., 2009). A isoforma de BiP encontrada no presente trabalho, uma banda em torno de 35 kDa presente em 0 HAE e 12 HAE, pode estar atuando em sinergia com outros mecanismos tornando o cultivar Embrapa 48 resistente a seca, diferente do que podemos observar para o cultivar BR16.

7. CONCLUSÕES

A identificação de genes que participam de vias de sinalização que culminam em morte celular programada (MCP) permitiu uma melhor compreensão dos processos moleculares durante o desenvolvimento e germinação da semente de soja. Neste trabalho analisamos o perfil de expressão global de genes em fases do desenvolvimento da semente. Esta análise revelou uma maior expressão dos genes em 4 e 12-14 DAF uma redução ao final da embriogênese.

Genes referentes a dessecação possuem alta expressão no final da maturação, momento em que o teor de água decai e o peso seco aumenta. A enzima catalase, possui aumento na expressão em semente quiescente, confirmando seu papel no combate ao aumento de níveis de H_2O_2 , visto que são induzidas quando há um burst oxidativo neste momento final do desenvolvimento da semente. Esse burst oxidativo pode ser ocasionado por diferentes condições de estresses ou em sinais de desenvolvimento da semente.

O tegumento parece ser o tecido alvo da MCP, uma vez que maior expressão dos genes que codificam NRPs, VPEs, metacaspases foi observada durante o desenvolvimento do tegumento. Essas proteínas são consideradas marcadores de morte celular, pois enviam sinal de MCP, para induzir fatores de transcrição NAC que estão envolvidos no processo que desencadeiam MCP; induzir o rompimento do vacúolo, que libera enzimas hidrolíticas no citoplasma, culminando em MCP; e regular positivamente a MCP induzida por estresses bióticos e abióticos.

Além desses genes, analisamos também a regulação de BiP, uma proteína descrita como atenuadora do sinal de MCP e, que confere tolerância ao estresse hídrico. Uma redução drástica na expressão dos genes BiP foi observada em sementes quiescentes. Já durante a germinação, um aumento progressivo de BiP foi observado em eixo embrionário. Assim, identificamos diferentes isoformas de BiP em eixos embrionários e cotilédones, quiescentes e durante a germinação de semente de soja dos cultivares BRS 284, BR 16 e Embrapa 48. Encontramos um perfil similar de proteínas BiP nos cultivares BRS 284 e BR 16 (susceptível a seca) durante a germinação. Já o cultivar

Embrapa 48 (resistente a seca) apresentou um perfil de proteínas BiP diferente dos demais. Além de atenuarem a MCP, as proteínas BiP, aumentam a tolerância a seca em soja, o que pode ser um dos fatores que contribuem para o perfil de resistência a seca deste último cultivar.

Esses resultados podem contribuir para melhor compreensão dos genes envolvidos nas vias de sinalização que desencadeiam o processo de MCP durante o desenvolvimento e germinação de semente de soja.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABASTECIMENTO, C.-C. N. DE. Acompanhamento da safra brasileira: grãos safra 2016/2017. 2017.
- ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. **Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants.** Journal of Experimental Botany. **Anais...**2002
- ALVES, M. S. et al. A novel transcription factor, ERD15 (Early Responsive to Dehydration 15), connects endoplasmic reticulum stress with an osmotic stress-induced cell death signal. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 22, p. 20020–20030, 2010.
- ALVES, M. S.; FONTES, E. P. B.; FIETTO, L. G. **EARLY RESPONSIVE to DEHYDRATION 15, a new transcription factor that integrates stress signaling pathways****Plant Signaling and Behavior**, 2011.
- ALVIM, F. C. et al. Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. **Plant physiology**, v. 126, n. July, p. 1042–1054, 2001.
- APEL, K.; HIRT, H. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, n. 1, p. 373–399, 2004.
- ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology**, v. 141, p. 391–396, 2006.
- AVERY, S. V. Molecular targets of oxidative stress. **The Biochemical journal**, v. 434, n. 2, p. 201–10, 2011.
- BAIS, H. P. et al. Allelopathy and exotic plant invasion: From molecules and genes to species interactions. **Science**, v. 301, n. 5638, p. 1377–1380, 2003.
- BALK, J.; LEAVER, C. J. The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome c

- release. **Plant Cell**, v. 13, n. 8, p. 1803–1818, 2001.
- BECRAFT, P. W.; GUTIERREZ-MARCOS, J. Endosperm development: dynamic processes and cellular innovations underlying sibling altruism. **Developmental Biology**, p. 579–593, 2012.
- BELLIENY-RABELO, D. et al. Transcriptome analysis uncovers key regulatory and metabolic aspects of soybean embryonic axes during germination. **Scientific Reports**, v. 6, n. August, p. 1–12, 2016.
- BERGER, F., GRINI P. E., SCHNTTGER, A. Endosperm: an integrator of seed growth and development. **Plant Biology**, v. 9, p. 664–670, 2006.
- BETHKE, P. C., LONSDALE, J. E., FATH, A., JONES, R. L. Hormonally Regulated Programmed Cell Death in Barley Aleurone Cells. **the Plant Cell Online**, v. 11, n. 6, p. 1033–1046, 1999.
- BETHKE, P. C.; JONES, R. L. Cell death of barley aleurone protoplasts is mediated by reactive oxygen species. **Plant Journal**, v. 25, n. 1, p. 19–29, 2001.
- BEWLEY, J. D. BLACK, M. SEEDS: Physiology of Development and Germination. 3rd ed. **Plenum Press**, v. 35–42, p. 445, 1994.
- BEWLEY, J. D. Seed Germination and Dormancy. **the Plant Cell Online**, v. 9, n. 7, p. 1055–1066, 1997.
- BLACKMAN, S. A et al. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. **Plant physiology**, v. 96, n. 3, p. 868–874, 1991.
- BONKE, M. et al. APL regulates vascular tissue identity in Arabidopsis. **Nature**, v. 426, n. 6963, p. 181–186, 2003.
- BOSTON, R. S.; VIITANEN, P. V.; VIERLING, E. Molecular chaperones and protein folding in plants. **Plant Molecular Biology**, v. 32, n. 1–2, p. 191–222, 1996.
- BOWLER, C., VAN CAMP, W., VAN MONTAGU, M., INZE, D. Superoxide dismutase in plant. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 13, n. 3, p. 199–218, 1994.

- BOYCE, M.; YUAN, J. Cellular response to endoplasmic reticulum stress: A matter of life or death. **Cell Death and Differentiation**, 2006.
- BOZHKOVA, P. V. et al. Cysteine protease mclI-Pa executes programmed cell death during plant embryogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 40, p. 14463–14468, 2005.
- CABISCOL, E. et al. Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 35, p. 27393–8, 2000.
- CAI, Y.-M.; YU, J.; GALLOIS, P. Endoplasmic reticulum stress-induced PCD and caspase-like activities involved. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, 2014.
- CAROLINO, S. M. B. et al. Plant BiP gene family: Differential expression, stress induction and protective role against physiological stresses. **Braslian Journal of Plant Physiology**, v. 15, n. 2, p. 59–66, 2003.
- CASAGRANDE, E. C, FARIAS, J. R. B, NEUMAIER, N, OYA T, PEDROSO J, MARTINS, P. K, BRETON MC AND NEPOMUCENO, A. L. ET AL. Expressão gênica diferencial durante déficit hídrico em soja. **Rev Bras Fisiol Veg**, v. 13, p. 168–184, 2001.
- CASCARDO, J. C. M. et al. Differential expression of the soybean BiP gene family. **Plant Science**, v. 160, n. 2, p. 273–281, 2001.
- CASCARDO, M. et al. The Phosphorylation State and Expression of Soybean BiP Isoforms Are Differentially Regulated following Abiotic Stresses *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 19, p. 14494–14500, 2000.
- CAVALCANTE, A. K. ET AL. Variabilidade genética de genótipos de soja de ciclo precoce no município de Uberaba-MG. v. 5, n. 3, p. 115–119, 2010.
- CHAMNONGPOL, S., WILLEKENS, H., MOEDER, W., LANGEBARTERLS, C. SANDERMANN, H., JR, VAN MONTAGU, M., INZÉ, D. E VAN CAMP, W. Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 5818–5823, 1998.

- CHANDRA, J.; SAMALI, A.; ORRENIUS, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, 2000.
- CHICHKOVA, N. V et al. A plant caspase-like protease activated during the hypersensitive response. **The Plant cell**, v. 16, n. 1, p. 157–171, 2004.
- CHOI, C. J.; BERGES, J. A. New types of metacaspases in phytoplankton reveal diverse origins of cell death proteases. **Cell Death and Disease**, v. 4, n. 2, p. 490, 2013.
- COSTA, L. M., GUTIERREZ-MARCOS, J. F., DICKINSON, H. G. More than a yolk: the short life and complex times of the plant endosperm. **Trends in Plant Science**, p. 507–514, 2004.
- COSTA, M. D. L. et al. A new branch of endoplasmic reticulum stress signaling and the osmotic signal converge on plant-specific asparagine-rich proteins to promote cell death. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 29, p. 20209–20219, 2008.
- CRUZ DE CARVALHO, R. et al. The impact of dehydration rate on the production and cellular location of reactive oxygen species in an aquatic moss. **Annals of Botany**, v. 110, n. 5, p. 1007–1016, 2012.
- DANON, A. et al. Ultraviolet-C Overexposure Induces Programmed Cell Death in Arabidopsis, Which Is Mediated by Caspase-like Activities and Which Can Be Suppressed by Caspase Inhibitors, p35 and Defender against Apoptotic Death. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 1, p. 779–787, 2004.
- DAT, J. F. et al. Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. **Plant Journal**, v. 33, n. 4, p. 621–632, 2003.
- DEL POZO, O.; LAM, E. Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. **Current Biology**, v. 8, n. 20, p. 1129–1132, 1998.
- DENECKE, J. et al. The tobacco luminal binding protein is encoded by a multigene family. **The Plant cell**, v. 3, n. 9, p. 1025–35, 1991.

- DINAKAR, C.; DJILIANOV, D.; BARTELS, D. Photosynthesis in desiccation tolerant plants: Energy metabolism and antioxidative stress defense. **Plant Science**, 2012.
- DOMINGUEZ, F., MORENO, J., AND CEJUDO, F. J. The nucellus degenerates by a process of programmed cell death during the early stages of wheat grain development. **Planta**, v. 213, p. 352–360, 2001.
- EARNSHAW, W. C., MARTINS, L. M. & KAUFMANN, S. H. MAMMALIAN CASPASES: STRUCTURE,ACTIVATION,SUBSTRATES, AND FUNCTIONS DURING APOPTOSIS. **Annu. Rev. Biochem**, v. 40, n. 1, p. 487–503, 2006.
- EARNSHAW, W. C. Nuclear changes in apoptosis. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 7, n. 3, p. 337–343, 1995.
- EGOROVA, V. P., LO, Y., DAI, H. Programmed cell death induced by heat shock in mung bean seedlings. **Botanical Studies**, v. 52, p. 73–78, 2011.
- EMBRAPA SOJA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA. A cultura da soja no Brasil. **Centro Nacional de Pesquisa de Soja**, p. 179, 2000.
- EVANS, D. R. et al. The yeast protein complex containing cdc68 and pob3 mediates core-promoter repression through the cdc68 N-terminal domain. **Genetics**, v. 150, n. 4, p. 1393–1405, 1998.
- FEDERIZZI, L. C. A soja como fator de competitividade no mercosu. **Centro de Estudos e Pesquisas em Agronegocios – CEPAN/UFRGS**, 2005.
- FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of Soybean Development**. [s.l: s.n.]. v. 80
- FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. **Journal of Biological Chemistry**, 1989.
- FRIDOVICH, I. Superoxide Radical and Superoxide Dismutases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, n. 1, p. 97–112, 1995.
- FRUGOLI, J. A et al. Catalase is encoded by a multigene family in Arabidopsis

- thaliana (L.) Heynh. **Plant physiology**, v. 112, n. 1, p. 327–336, 1996.
- FUJITA M, ET AL. A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. **Plant Journal**, v. 39, n. 6, p. 863–876, 2004.
- GADJEV, I.; STONE, J. M.; GECHEV, T. S. Chapter 3: Programmed Cell Death in Plants. New Insights into Redox Regulation and the Role of Hydrogen Peroxide. **International Review of Cell and Molecular Biology**, 2008.
- GECHEV, T. S.; GADJEV, I. Z.; HILLE, J. An extensive microarray analysis of AAL-toxin-induced cell death in Arabidopsis thaliana brings new insights into the complexity of programmed cell death in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 10, p. 1185–1197, 2004.
- GECHEV, T. S.; HILLE, J. Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. **Journal of Cell Biology**, 2005.
- GERIBELLO PRIOLLI, R. H. et al. Diversidade genética da soja entre períodos e entre programas de melhoramento no Brasil. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 39, n. 10, p. 967–975, 2004.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, 2010.
- GIULIANI, C. et al. Programmed cell death during embryogenesis in maize. **Annals of Botany**, v. 90, n. 2, p. 287–292, 2002.
- GREENBERG, J. T., N. Y. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. **Cellular Microbiology**, v. 6, p. 201–211, 2004.
- GUARESCHI, R. F. et al. Adubação fosfatada e potássica na semeadura e a lanço antecipada na cultura da soja cultivada em solo de Cerrado. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 4, p. 769–774, 2008.
- GUIMARÃES-DIAS, F. et al. Expression analysis in response to drought stress in soybean: Shedding light on the regulation of metabolic pathway genes. **Genet Mol Biol**, v. 35, n. 1 (suppl), p. 222–232, 2012.

- GUO, W.-J.; DAVID HO, T.-H. An Abscisic Acid-Induced Protein, HVA22, Inhibits Gibberellin-Mediated Programmed Cell Death in Cereal Aleurone Cells. **Plant Physiology**, v. 147, n. 4, p. 1710–1722, 2008.
- GUSTAVO LEMOS ROCHA, J. H. F.; AND, ANTÔNIA ELENIR AMÂNCIO OLIVEIRA, K. V. S. F. Programmed Cell Death-Related Proteases in Plants. **Enzyme Inhibitors and Activators**, p. 135-152, 2017.
- GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Free Radicals and Antioxidants in the Year 2000: A Historical Look to the Future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, n. 1, p. 136–147, 2000.
- HAAS, I. G., MEO, T. cDNA cloning of immunoglobulin heavy chain binding protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, p. 2250–2254, 1988.
- HALLIWELL, B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 312–322, 2006.
- HARA-NISHIMURA, I., INOUE, K., AND NISHIMURA, M. A unique vacuolar processing enzyme responsible for conversion of several proprotein precursors into the mature forms. **FEBS Lett**, v. 294, p. 89–93, 1991.
- HARA-NISHIMURA, I., KINOSHITA, T., HIRAIWA, N., AND NISHIMURA, M. Vacuolar processing enzymes in protein-storage vacuoles and lytic vacuoles. **Plant Physiol**, v. 152, p. 668–674, 1998.
- HARA-NISHIMURA, I., NISHIMURA, M. Proglobulin processing enzyme in vacuoles isolated from developing pumpkin cotyledons. **Plant Physiol**, v. 85, p. 440–445, 1987.
- HARRAK, H., AZELMAT, S., BAKER, E.N., TABAEIZADEH, Z. Isolation and characterization of a gene encoding a drought-induced cysteine protease in tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Genome**, v. 44, p. 368–374, 2001.
- HATSUGAI, N., KUROYANAGI, M., YAMADA, K., MESHI, T., TSUDA, S., KONDO, M., ET AL. A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. **SCIENCE**, v. 305, p. 855–858, 2004.

- HATSUGAI, N. et al. A plant vacuolar protease, VPE, mediates, virus-induced hypersensitive cell death. **Science**, v. 305, n. 5685, p. 855–858, 2004.
- HATSUGAI, N. et al. Vacuolar processing enzyme in plant programmed cell death. v. 6, n. April, p. 1–11, 2015.
- HOEKSTRA, F. A; GOLOVINA, E. A; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in plant science**, v. 6, n. 9, p. 431–438, 2001.
- HYMOWITZ, T. On the domestication of the soybean. **Economic Botany**, v. 24, n. 4, p. 408–421, 1970.
- J. DEREK BEWLEY., KENT. J. BRADFORD., NONOGAKI, HENK W.M. HILHORST., HIRO, N. **Physiology of Development, Germination and Dormancy, 3rd Edition**. p. 66-67, 2013.
- JEON, S. M. et al. Comparison of antioxidant effects of naringin and probucol in cholesterol-fed rabbits. **Clinica Chimica Acta**, v. 317, n. 1–2, p. 181–190, 2002.
- JONES, S. I.; VODKIN, L. O. Using RNA-Seq to Profile Soybean Seed Development from Fertilization to Maturity. **PLOS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.
- JULIAN, I., GANDULLO, J., SANTOS-SILVA, L. K., DIAZ, I., AND MARTINEZ, M. Phylogenetically distant barley legumains have a role in both seed and vegetative tissue. **Journal of experimental botany**, n. 64, p. 2929–2941, 2013.
- KALINSKI, A. et al. Binding-protein expression is subject to temporal, developmental and stress-induced regulation in terminally differentiated soybean organs. **Planta**, v. 195, n. 4, p. 611–621, 1995.
- KIMATA, Y. et al. Genetic Evidence for a Role of BiP / Kar2 That Regulates Ire1 in Response to Accumulation of Unfolded Proteins. **Molecular Biology of the Cell**, v. 14, n. June, p. 2559–2569, 2003.
- KINOSHITA, T., NISHIMURA, M., AND HARA-NISHIMURA, I. The sequence and expression of the γ -VPE gene, one member of a family of three genes

- for vacuolar processing enzymes in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiol**, v. 36, p. 1555–1562, 1995a.
- KINOSHITA, T., NISHIMURA, M., AND HARA-NISHIMURA, I. Homologues of a vacuolar processing enzyme that are expressed in different organs in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, v. 29, p. 81–89, 1995b.
- KLAHOLD, C. A. ET AL. Resposta da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) a ação de bioestimulante. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 28, n. 2, p. 179–185, 2006.
- KOUR, A.; BOONE, A. M.; VODKIN, L. O. RNA-Seq Profiling of a Defective Seed Coat Mutation in *Glycine max* Reveals Differential Expression of Proline- Rich and Other Cell Wall Protein Transcripts. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 2014.
- KOZELA, C.; REGAN, S. How plants make tubes. **Trends in Plant Science**, 2003.
- LAM, E. Controlled cell death, plant survival and development. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2004.
- LAMKANFI, M. et al. Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. **Cell Death and Differentiation**, v. 9, n. 4, p. 358–361, 2002.
- LE, B. H. et al. Using Genomics to Study Legume Seed Development. **Plant Physiology**, v. 144, n. 2, p. 562–574, 2007.
- LEBORGNE-CASTEL, N. et al. Overexpression of BiP in Tobacco Alleviates Endoplasmic Reticulum Stress. **The Plant Cell**, v. 11, p. 459–469, 1999.
- LENNON, S. V.; MARTIN, S. J.; COTTER, T. G. Dose- dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. **Cell Proliferation**, v. 24, n. 2, p. 203–214, 1991.
- LI, J., BERGER, F. Endosperm: food for humankind and fodder for scientific discoveries. **New Phytologist**, v. 195, p. 290–305, 2012.
- LIMA, N. B., TRINDADE F. G., DA CUNHA, M., OLIVEIRA A. E., TOPPING, J.

- LINDSEY., K., FERNANDES, K. Programmed cell death during development of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed coat. **Plant Cell and Environment**, v. 38, n. 4, p. 718–728, 2015.
- LIMA, N. B.; OLIVEIRA, A. E. A.; FERNANDES, K. V. S. Programmed cell death in plants: the tip of the iceberg. **Recent Research Developments in Phytochemistry**, v. 10, p. 1- 15, 2012.
- LIMA, N. B. et al. Programmed cell death during development of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed coat. **Plant, Cell & Environment**, v. 38, p. 718–728, 2015.
- LINNESTAD, C., DOAN, D. N., BROWN, R. C., LEMMON, B. E., MEYER, D. J., JUNG R., ET AL. Nucellain, a barley homolog of the dicot vacuolar-processing protease, is localized in nucellar cell walls. **Plant Physiol**, v. 118, p. 1169–1180, 1998.
- LISTER, R.; GREGORY, B. D.; ECKER, J. R. Next is now: new technologies for sequencing of genomes, transcriptomes, and beyond. **Current Opinion in Plant Biology**, 2009.
- LUDWIG, A. A.; TENHAKEN, R. A new cell wall located N-rich protein is strongly induced during the hypersensitive response in *Glycine max* L . **European Journal of Plant Pathology**, p. 323–336, 2001.
- MADEO, F. et al. A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. **Molecular Cell**, v. 9, n. 4, p. 911–917, 2002.
- MCLELLAN, H. et al. Functional redundancy in the Arabidopsis Cathepsin B gene family contributes to basal defence, the hypersensitive response and senescence. **New Phytologist**, v. 183, n. 2, p. 408–418, 2009.
- MENDES, G. C. et al. GmNAC30 and GmNAC81 integrate the endoplasmic reticulum stress- and osmotic stress-induced cell death responses through a vacuolar processing enzyme. **National Academy of Sciences**, v. 110, n. 48, p. 19627–19632, 2013.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **TRENDS in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405–410, 2002.

- MØLLER, I. M. Plant Mitochondria and Oxidative Stress: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 561–591, 2001.
- MÜLLER, L. Morfologia, anatomia e desenvolvimento. **A soja no Brasil**, p. 65–104, 1981.
- NAKAUNE, S., YAMADA, K., KONDO, M., KATO, T., TABATA, S., NISHIMURA, M., ET AL. A vacuolar processing enzyme, δ VPE, is involved in seed coat formation at the early stage of seed development. **Plant Cell**, v. 17, p. 876–887, 2005.
- NOCTOR, G. et al. Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: A predominant role for photorespiration? **Annals of Botany**, v. 89, n. SPEC. ISS., p. 841–850, 2002.
- ODA, Y., OSOKAWA, N., WADA, I., NAGATA, K. EDEM as an acceptor of terminally misfold glycoproteins released from calnexin. **SCIENCE**, v. 299, p. 1394–1397, 2003.
- PAIVA, B. M. DE; ALVES, R. M.; HELENO, N. M. Aspecto socioeconômico da soja. **Informe Agropecuário**, v. 27, n. 230, p. 7–14, 2006.
- PEDRAZZINI, A. VITALE, A. The binding protein (BiP) and the synthesis of secretory proteins. **Plant Physiology**, v. 34, p. 207–216, 1996.
- PELUZIO, J. M. et al. Adaptabilidade e estabilidade de cultivares de soja em várzea irrigada no Tocantins. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 41, n. 3, p. 427–434, 2010.
- PENNELL, R. I., LAMB, C. Programmed Cell Death in Plants. **THE PLANT CELL ONLINE**, v. 9, n. 7, p. 1157–1168, 1997.
- PETROV, V. et al. ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. February, p. 1–16, 2015.
- PINHEIRO, G. L. et al. Complete inventory of soybean NAC transcription factors: Sequence conservation and expression analysis uncover their

- distinct roles in stress response. **Gene**, v. 444, n. 1–2, p. 10–23, 2009.
- PRASAD, T. K.; ANDERSON, M. D.; STEWART, C. R. Acclimation, hydrogen peroxide, and abscisic acid protect mitochondria against irreversible chilling injury in maize seedlings. **Plant Physiology**, v. 105, n. 2, p. 619–627, 1994.
- PRODANOVIC, O. et al. Antioxidative enzymes during germination of two lines of Serbian spruce [*Picea omorika* (Panč.) Purkyně]. **Archives of Biological Sciences**, v. 59, n. 3, p. 209–216, 2007.
- QIANG, X., ZECHMANN, B., REITZ, M. U., KOGEL, K. H., AND SCHAFFER, P. The mutualistic fungus *Piriformospora indica* colonizes *Arabidopsis* roots by inducing an endoplasmic reticulum stress-triggered caspase-dependent cell death. **Plant Cell**, v. 24, p. 794–809, 2012.
- RADCHUK, V., WEIER, D., RADCHUK, R., WESCHKE, W., AND WEBER, H. Development of maternal seed tissue in barley is mediated by regulated cell expansion and cell disintegration and coordinated with endosperm growth. **Journal of experimental botany**, n. 62, p. 1217–1227, 2010.
- REIS, P. A. B. et al. Functional and regulatory conservation of the soybean ER stress-induced DCD/NRP-mediated cell death signaling in plants. **BMC Plant Biology**, v. 16, n. 1, p. 156, 2016.
- REIS, P. A. B.; FONTES, E. P. B. A new branch of the ER stress response with implications for plant biotechnology N-rich protein (NRP) -mediated cell death signaling. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, n. June, p. 628–632, 2012.
- RESENDE, M. L. V., SALGADO, S. M. L., CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 123–130, 2003.
- RITCHIE, S.W., HANWAY, J.J., THOMPSON, H.E., BENSON, G. O. How a soybean plant develops. **Special Report**, v. 53, p. Iowa State University of Science and Technology Co, 1996.
- SÁ, M. E. L. DE. Alternativas da soja na prevenção de doenças. **Informe Agropecuário**, v. 27, n. 230, p. 19–21, 2006.

- SANTOS, O. S. A cultura da soja. **Editora Globo**, p. 299, 1988.
- SCHWEICHEL, J. - U; MERKER, H. - J. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. **Teratology**, v. 7, n. 3, p. 253–266, 1973.
- SEDIYAMA, T. Tecnologias de produção e usos da soja. **Mecenas**, v. 1, p. 1–314, 2009.
- SEDIYAMA, T. ET AL. Cultura da Soja – I Parte. **UFV**, p. 1–96, 1996.
- SHISHKOVA, S.; DUROVSKY, J. G. Developmental programmed cell death in primary roots of Sonoran Desert Cactaceae. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 9, p. 1590–1594, 2005.
- SUAREZ, M. F. et al. Metacaspase-dependent programmed cell death is essential for plant embryogenesis. **Current Biology**, v. 14, n. 9, p. 339–340, 2004.
- SUNG, D. Y.; VIERLING, E.; GUY, C. L. Comprehensive expression profile analysis of the Arabidopsis Hsp70 gene family. **Plant physiology**, v. 126, n. 2, p. 789–800, 2001.
- TENHAKEN, R.; DOERKS, T.; BORK, P. DCD – a novel plant specific domain in proteins involved in development and programmed cell death. **BMC Bioinformatics**, v. 6, p. 169, 2005.
- TEXEIRA, L. R. BRACCINI, ADLE. SPERANDIO, D. SCAPIM, C. A. S. I. AND V. J. Avaliação de cultivares de soja quanto à tolerância ao estresse hídrico em substrato contendo polietileno glicol. **Acta Sci Agron**, v. 30, p. 217–223, 2008.
- THIMM, O. et al. MAPMAN: A user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. **Plant Journal**, v. 37, n. 6, p. 914–939, 2004.
- THOMAS, S. G.; FRANKLIN-TONG, V. E. Self-incompatibility triggers programmed cell death in Papaver pollen. **Nature**, v. 429, n. 6989, p. 305–309, 2004.
- TIWARI, B. S.; TRIPATHI, S. N. Water binding in sub-aerial cyanobacteria.

Indian Journal of Biochemistry and Biophysics, v. 35, n. 1, p. 52–61, 1998a.

TIWARI, B. S.; TRIPATHI, S. N. Effect of hydration and dehydration on initiation and dynamics of some physiological reactions in desiccation tolerant cyanobacterium *Scytonema geitleri*. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 35, n. 3, p. 172–178, 1998b.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 9, p. 4350–4354, 1979.

TRAN, L. S., ET AL. Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. **Plant Cell**, v. 16, n. 9, p. 2481–2498, 2004.

TRAN, V., WEIER, D., RADCHUK, R., THIEL, J., AND RADCHUK, V. Caspase-like activities accompany programmed cell death events in developing barley grains. **PLoS ONE**, 2014.

TSIATSIANI, L. et al. Metacaspases. **Cell Death and Differentiation**, v. 18, n. 8, p. 1279–1288, 2011.

URADE, R. The endoplasmic reticulum stress signaling pathways in plants. **BioFactors**, 2009.

VALENTE, M. A. S. et al. 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 Experimental Botany**, v. 60, n. 2, p. 533–546, 2009.

VALENTINE P. EGOROVA, QING, ZHAO, YIH-SHAN, LO, WANN-NENG, JANE., NING, C.; SHENG-YU, H.; DAI, AND H. Programmed cell death of the mung bean cotyledon during seed germination. **Botanical Studies**, v. 51, n. 4, p. 439–449, 2010.

VAN BREUSEGEM, F. et al. The role of active oxygen species in plant signal

- transduction. **Plant Science**, 2001.
- VAN DOORN, W. G. Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 14, p. 4749–4761, 2011.
- VANDENABEELE, S. et al. Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 39, n. 1, p. 45–58, 2004.
- VERNETTI, F. J. Soja: planta, clima, pragas, moléstias e invasoras. **Fundação Cargill**, 1983.
- WAN, L. et al. Early stages of seed development in *Brassica napus*: A seed coat-specific cysteine proteinase associated with programmed cell death of the inner integument. **Plant Journal**, v. 30, n. 1, p. 1–10, 2002.
- WANG, X. et al. Transcriptome-wide identification of novel imprinted genes in neonatal mouse brain. **PLoS ONE**, v. 3, n. 12, 2008.
- WATANABE, N., AND LAM, E. BaxInhibitor-1, a conserved cell death suppressor, is a key molecular switch downstream from a variety of biotic and abiotic stress signals in plants. **Int. J. Mol. Sci**, v. 10, p. 3149–3167, 2009.
- WATANABE, N.; LAM, E. Two *Arabidopsis* metacaspases AtMCP1b and AtMCP2b are arginine/lysine-specific cysteine proteases and activate apoptosis-like cell death in yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 15, p. 14691–14699, 2005.
- WROBEL, R. L.; O'BRIAN, G. R.; BOSTON, R. S. Comparative analysis of BiP gene expression in maize endosperm. **Gene**, v. 204, n. 1–2, p. 105–113, 1997.
- YAKES, F. M.; VAN HOUTEN, B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 2, p. 514–9, 1997.

- YAMADA, K., SHIMADA, T., NISHIMURA, M., AND HARA-NISHIMURA, I. A VPE family supporting various vacuolar functions in plants. **Plant Physiol**, v. 123, p. 369–375, 2005.
- YANG, Z. T. et al. The Membrane-Associated Transcription Factor NAC089 Controls ER-Stress-Induced Programmed Cell Death in Plants. **PLOS Genetics**, v. 10, n. 3, 2014.
- ZEIER, J. et al. Light conditions influence specific defence responses in incompatible plant?pathogen interactions: uncoupling systemic resistance from salicylic acid and PR-1 accumulation. **Planta**, v. 219, n. 4, 2004.