**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Peptídeos RALF em tecido reprodutivo: caracterização e efeito dos
AtRALF4, 25, 26 e 34**

Tábata Bergonci

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2016**

Tábata Bergonci
Licenciada em Ciências Biológicas

**Peptídeos RALF em tecido reprodutivo: caracterização e efeito dos AtRALF4, 25,
26 e 34**

Orientador:
Prof. Dr. **DANIEL SCHERER DE MOURA**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2016

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Bergonci, Tábata

Peptídeos RALF em tecido reprodutivo: caracterização e efeito dos AtRALF4, 25, 26 e 34 / Tábata Bergonci. - - Piracicaba, 2016.
114 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Interação pólen-pistilo 2. Ruptura de tubo polínico 3. Inibição de crescimento
4. Germinação de grão de pólen 5. *Arabidopsis thaliana* 6. Sinalização celular
7. Fecundação 8. Sinalização de Ca⁺⁺ I. Título

CDD 583.122
B499p

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

Dedico a minha mãe, Fátima Justo Bergonci,
que com amor e compreensão me apoiou em todos esses anos de ausência familiar,
ao meu pai, Hermínio Carlos Bergonci,
fonte de inspiração que tão cedo se foi, mas deixou todo o seu amor pela ciência conosco,
aos meus irmãos Richard e Renan Bergonci,
orgulho maior de minha vida e exemplos de caráter e inteligência

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço imensamente a oportunidade de trabalhar com meu orientador, Daniel Scherer de Moura. Todos esses anos no laboratório me fez crescer cientificamente e pessoalmente. Muito obrigada por todos os ensinamentos e também pela grande amizade.

Agradeço ao professor Marcio de Castro Silva-Filho por ter disponibilizado o laboratório. Agradeço a professora Helaine Carrer, pelo companheirismo e confiança e a sempre disponibilidade do laboratório.

A professora Alice Yatpak Cheung, da University of Massachusetts Amherst, que além de grande cientista é também pessoa maravilhosa, e me acolheu em seu laboratório com tanto carinho. Agradeço todos os ensinamentos científicos e toda a confiança depositada.

Agradeço às agências de fomento FAPESP, pelo financiamento de projetos no laboratório, CAPES, pelos meses iniciais de bolsa e, principalmente, ao CNPq, pela bolsa de doutorado concedida, e ao programa Ciência sem Fronteiras, que me possibilitou uma experiência pessoal e científica incrível.

À minha família, que foi meu refúgio em Santa Bárbara d'Oeste/SP sempre quando Piracicaba pareceu sufocante, os meus mais dedicados agradecimentos. A minha mãe, a quem esta tese dedico e que me ensinou a ser forte e lutar pelo que quero, sempre me dando toda a liberdade para arriscar profissionalmente, estando sempre pronta para escutar meus motivos. Aos meus irmãos: Richard Bergonci, pelo exemplo de paciência; Renan Bergonci, por todas as risadas e falta de paciência; Matheus Messias Fonseca Moro, irmãozinho que a vida me deu, que alegra meus dias com esse jeito positivo de ver as coisas. A Carla Cristina Fonte, cunhadinha companheira que entrou nas nossas vidas pra somar. A vocês quatro: obrigada por todas as conversas, risadas, momentos culturais, isso faz com que a vida seja mais leve. Ao meu padrasto Irineu Moro, pelo amor e paciência. As minhas irmãszinhas da vida Daiany Fonseca Moro e Adrielle Fonseca Moro, por entenderem minha ausência de todos os almoços e jantares. Ao Simba, por ser o único a conseguir me alegrar quando todo o resto da família já não foi suficiente, se você pudesse ler em português odiaria esse agradecimento.

Ao Gilvano Ebling Brondani, pelo amor incondicional, pelo companheirismo, pelo exemplo de profissional, cientista e, principalmente, caráter. Muito obrigada por todo o carinho e cuidado de todos os dias nesses quatro anos de doutorado. Pela paciência eterna, pela presença constante mesmo longe. Foi muito mais leve com você sempre me apoiando.

Ao Matheus Macedo-Lima, por todo o companheirismo, por acreditar em mim quando eu desacreditei, pelas longas conversas científicas e culturais, pela cumplicidade. Obrigada por todo amor e amizade, por fazer de Massachusetts um lugar melhor mesmo quando a neve passava a altura dos joelhos, e por estar presente aí de longe. À Kaline Mello, por ter sido grande companheira em Massachusetts e ter virado uma amiga pra vida toda.

Ao Augusto Lima Diniz, pelo companheirismo, amor e amizade, por não me deixar sozinha nessa vida acadêmica. Obrigada por toda a compreensão e paciência, pelo exemplo de caráter. À Carina Anoni, pela amizade sincera e duradoura, por todas as risadas, por formar o trio perfeito.

Ao Juan Carlos Guerrero Abad, por todos esses anos me aturando todos os dias no laboratório. Pela amizade e companheirismo, por todos os debates científicos. À Akemi Lueli Niitsu, pela amizade e cumplicidade, pelo apoio mesmo quando eu estava tão longe. Ao Guilherme Hosaka, pela amizade e apoio. Vocês três são muito importantes pra mim.

Ao técnico do nosso laboratório e, mais que isso, grande amigo Antônio Francisco de Campos Amaral, pelo apoio diário, conversas e risadas. Às minhas grandes amigas e ex-companheiras de laboratório Bianca Ribeiro e Marina Lyra Soriano Saleme, que agora estão longe e fazem falta todos os dias. À Aparecida Leonir Silva e Perla Novais de Oliveira, pelo apoio diário no laboratório e pela amizade. Ao Lucas Alves Neubus Claus, ex-bolsista de iniciação científica que faz parte desse projeto tanto quanto eu, muito obrigada por estar sempre disposto a ajudar. Aos colegas de laboratório Fernando Henrique Silva Garcia e Larissa Helena Visioli, pelo convívio.

Aos amigos do laboratório da professora Cheung, em especial ao David Vyshedsky, que tornava a ciência sempre mais emocionante e as horas do café muito mais divertidas. À minha estagiária Shayla Thomas, por toda a ajuda no laboratório e pela amizade. Ao Hunter Carpenter, Jake Maman, Aaron Feinstein e Jeff Stith. Vocês todos são demais meninos, podem traduzir isso.

À Marcela Fernanda Esteves pela amizade, carinho e companheirismo. Amiga, a minha falta de tempo pra você não significa que te amo menos, você sabe. Às vezes quando tudo na ESALQ parece desabar você é o que me faz saber que tenho um lugar em Piracicaba pra chamar de casa, aonde as coisas são mais fáceis.

Ao Guilherme Pereira, João Ricardo Bachega Feijó Rosa e Gabriel Dequigiovanni por serem exemplos de profissionais dedicados. Mas também pela grande amizade. Ao Gui por todas as ligações e longas conversas. Ao João pelo apoio em tudo, principalmente nos eventos

organizados. Ao Gabs por todos os cafés e por toda a companhia durante nossa representação discente.

Aos meninos do laboratório do professor Fábio Tebaldi, muito obrigada pelos almoços, discussões científicas e risadas. Em especial, ao Geraldo Felipe Ferreira e Silva, pelos longos anos de amizade. Às meninas do laboratório do professor Marcio de Castro, pela companhia. À técnica do laboratório da professora Helaine, Valentina de Fátima de Martin, por todos os ensinamentos, e também pelos anos de amizade.

EPIGRAFE

“E, se bem que seja obscuro
Tudo pela estrada fora,
E falso, ele vem seguro,
E, vencendo estrada e muro,
Chega onde em sono ela mora.
E, inda tonto do que houvera,
A cabeça, em maresia,
Ergue a mão, e encontra hera,
E vê que ele mesmo era A Princesa que dormia.”.

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

RESUMO	15
ABSTRACT	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Peptídeo hormonal RALF	21
2.1.1 Peptídeos RALF em tecido reprodutivo	26
2.2 Tecido reprodutivo	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Material vegetal	33
3.2 Confirmação de mutantes	34
3.3 Extração de DNA genômico.....	34
3.4 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	35
3.5 Análise de expressão gênica.....	35
3.6 Obtenção de plantas transgênicas	37
3.6.1 Clonagem da sequência do promotor do gene AtRALF26 para fusão com a proteína verde fluorescente GFP	37
3.6.2 Produção de células eletrocompetentes de <i>Escherichia coli</i> e <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	38
3.6.3 Extração de DNA plasmidial	38
3.6.4 Geração de plantas transgênicas	39
3.7 Visualização de plantas transgênicas no microscópio confocal	39
3.8 Análise fenotípica de plantas transgênicas, mutantes e tratadas com os peptídeos AtRALFs	40
3.9 Transformação de grãos de pólen através de microprojéteis.....	40
3.10 Clonagem, produção e purificação dos peptídeos AtRALFs	40
3.10.1 Clonagem e recombinação.....	40
3.10.2 Produção e purificação.....	41
3.11 Ensaio de germinação e crescimento de tubo polínico <i>in vitro</i>	41
3.12 Ensaio de crescimento de tubo polínico semi <i>in vivo</i>	42
3.13 Ensaio de alimentação de pistilo excisado	42
3.14 Ensaio de alcalinização e mobilização de Ca^{++}	42

3.15 Análise estatística.....	43
4 RESULTADOS	45
4.1 Peptídeos AtRALFs em tecido reprodutivo	45
4.1.1 Análise da expressão in silico dos genes que codificam os peptídeos AtRALF4, 8, 9, 25, 26 e 34.....	45
4.1.2 Estrutura primária dos peptídeos AtRALF4, 8, 9, 25, 26 e 34.....	46
4.1.3 Atividades de alcalinização, inibição da raiz primária, inibição da expansão do hipocótilo e mobilização de Ca ²⁺ dos peptídeos AtRALF4, 25, 26 e 34.....	48
4.2 Peptídeo presente em ovários.....	50
4.2.1 Estudo da expressão do gene AtRALF34.....	50
4.2.2 Análise fenotípica do tecido reprodutivo de plantas que superexpressam ou silenciam o gene AtRALF34.....	51
4.2.3 Análise da interação tubo polínico-óvulo em mutantes atralf34 e plantas 35S:AtRALF34.....	58
4.2.4 Ensaio de crescimento do tubo polínico semi in vivo na presença do peptídeo AtRALF34	61
4.2.4.1 Análise do papel do Ca ⁺⁺ no efeito do peptídeo AtRALF34 em tubos polínicos....	64
4.2.5 Tratamento do pistilo com o peptídeo AtRALF34.....	66
4.3 Peptídeos presentes em grãos de pólen e tubos polínicos.....	67
4.3.1 Estudo da expressão dos genes AtRALF4, 8, 9, 25 e 26.....	67
4.3.2 Mutantes atralf4, atralf25 e atralf26	71
4.3.2.1 Análise fenotípica do tecido vegetativo, raiz e hipocótilo dos mutantes atralf4, atralf25 e atralf26	71
4.3.2.2 Análise fenotípica do tecido reprodutivo dos mutantes atralf4, atralf25 e atralf26 ..	75
4.3.2.3 Crescimento do tubo polínico em mutantes atralf4, atralf25 e atralf26	79
4.3.3 Localização subcelular do peptídeo AtRALF4	81
4.3.4 Germinação e crescimento do tubo polínico na presença dos peptídeos AtRALF4, AtRALF25 e AtRALF26	83
4.3.4.1 Ensaio do crescimento do tubo polínico in vitro na presença dos peptídeos AtRALF4, AtRALF25 e AtRALF26	83
4.3.4.2 Ensaio de crescimento de tubo polínico semi in vivo na presença dos peptídeos AtRALF4, AtRALF25 e AtRALF26	86
5 DISCUSSÃO.....	95
6 CONCLUSÃO	99

REFERÊNCIAS	101
APÊNDICES	111

RESUMO

Peptídeos RALF em tecidos reprodutivos: caracterização e efeito dos AtRALFs 4, 25, 26 e 34

Pequenos peptídeos são importantes sinalizadores celulares e estão envolvidos na comunicação célula-a-célula em diversos aspectos do desenvolvimento da planta. Durante a reprodução sexual, moléculas sinalizadoras atuam na interação entre o gametófito feminino e o masculino, controlando processos como germinação do grão de pólen, alongamento do tubo polínico e liberação das células espermáticas, entre outros. RALF é um peptídeo de sinalização codificado por genes de expressão ubíqua ou tecido-específica e que regulam negativamente a expansão celular. Em *Arabidopsis*, peptídeos AtRALFs podem ser agrupados em uma família de 39 membros e, interessantemente, os maiores níveis de expressão gênica dessa família são encontrados nos *AtRALFs* expressos em tecidos reprodutivos. No presente trabalho, os genes *AtRALF4*, 8, 9, 25 e 26 foram encontrados como sendo expressos exclusivamente em grãos de pólen, enquanto o gene *AtRALF34* teve sua expressão localizada em diversos tecidos, sendo a maior em ovário. Buscando esclarecer a função desses peptídeos nos tecidos reprodutivos, foi feita a caracterização das isoformas *AtRALF4*, 25, 26 e 34. Mutantes para as isoformas estudadas foram selecionados e tiveram seus fenótipos analisados. O mutante *atralf34* apresentou supercrescimento e entradas múltiplas de tubos polínicos em 20% dos seus óvulos. Siliques de *atralf34*, apesar de maiores que as de plantas selvagens, apresentaram maior número de óvulos não fecundados. Mutantes *atralf4*, *atralf25* e *atralf26* apresentaram menor germinação dos grãos de pólen e menor alongamento dos tubos polínicos. Semelhantes ao mutante *atralf34*, as siliques dos mutantes para *AtRALFs* expressos em pólen também apresentaram maior número de óvulos não fecundados. Os peptídeos foram produzidos heterologicamente em *E. coli* e a aplicação de *AtRALF34* em tubos polínicos causou ruptura dos mesmos em 30 s. A porcentagem de tubos polínicos rompidos aumentou conforme o acréscimo na concentração do peptídeo, chegando a 72,2% de ruptura no tratamento com 5000 nM. O efeito de ruptura causado pelo peptídeo foi drasticamente inibido quando o meio extracelular apresentava baixa concentração de Ca^{++} . Os peptídeos *AtRALF4*, 25 e 26 inibiram a germinação dos grãos de pólen e o alongamento dos tubos polínicos sendo que a inibição da germinação mostrou-se dose-dependente. A inibição do alongamento mostrou-se dependente de Ca^{++} e do comprimento do tubo polínico, quanto maior o comprimento, maior a concentração do peptídeo para causar a inibição.

Palavras-chave: Interação pólen-pistilo; Ruptura de tubo polínico; Inibição de crescimento; Germinação de grão de pólen; *Arabidopsis thaliana*; Sinalização celular; Fecundação; Sinalização de Ca^{++}

ABSTRACT

RALF peptides in reproductive tissue: characterization and effect of AtRALF4, 25, 26 and 34

Small peptides are important cell signaling and are involved in cell-to-cell in several aspects of plant development. During sexual reproduction, signaling molecules act in the interaction between the female gametophyte and male, controlling processes such as germination of pollen grain, elongation of the pollen tube, release of sperm cells, among others. RALF and a signaling peptide might be expressed ubiquitously or tissue-specifically regulates basic aspects of development. In Arabidopsis, AtRALFs peptides have a family of 39 members and, interestingly, the largest gene expression levels are found in AtRALFs expressed in reproductive tissue. The AtRALF4 genes, 8, 9, 25 and 26 are more expressed in pollen grains, while the AtRALF34 gene is highly expressed in the ovary. This study aimed to characterize the AtRALF4 isoforms, 25, 26 and 34, trying to clarify the role of these in the female and male gametophyte. To this it was made the production of heterologous peptides in *E. coli*, and these were used in different tests of germination and pollen tube growth. Mutants for the studied isoforms were analyzed.

Keywords: Pollen-pistil interaction; Break pollen tube; Growth inhibition; Pollen grain germination; *Arabidopsis thaliana*; Cell signaling

1 INTRODUÇÃO

A comunicação célula-a-célula é essencial nos diversos processos que envolvem o crescimento e desenvolvimento em plantas. Diferentes aspectos do desenvolvimento reprodutivo, tais como formação e desenvolvimento do gameta, interação pólen-pistilo e embriogênese, ocorrem através da regulação por sinalização intercelular mediada por hormônios (HISCOCK; ALLEN, 2008). Assim como outros hormônios vegetais, peptídeos hormonais também estão envolvidos na sinalização celular (MATSUBAYACHI; SAKAGAMI, 2006).

Os peptídeos RALF (Rapid Alkalinization Factor) estão presentes em todo o reino vegetal, sendo sinalizadores celulares relacionados ao desenvolvimento (MOURA; SILVA-FILHO, 2006; PEARCE et al., 2001). Estes peptídeos apresentam isoformas expressas ubiquamente ou tecido-específicas (MORATO DO CANTO et al., 2014). As proteínas precursoras dos peptídeos RALF possuem um peptídeo sinal em sua porção N-terminal e uma região C-terminal conservada que contém o peptídeo maduro (PEARCE et al., 2001).

Em *arabidopsis*, peptídeos RALFs compõem uma família gênica composta de 39 isoformas denominadas AtRALFs (SHARMA et al., 2016). A superexpressão de três dessas isoformas, AtRALF1, AtRALF8 e AtRALF23, resultaram em plantas com um fenótipo semi-anão (ATKINSON; LILLEY; URWIN, 2013; MATOS et al., 2008; SRIVASTAVA et al., 2009). O silenciamento gênico parcial da isoforma AtRALF1 obtido por meio de construção gênica contendo sequências repetidas e invertidas (irAtRALF1) gerou plantas com células de raízes e hipocótilos maiores, enquanto células menores foram encontradas em plantas que superexpressam esse gene (35S:AtRALF1). Ainda, irAtRALF1 possui maior número de raízes laterais enquanto plantas 35S:AtRALF1 mostram um menor número destas (BERGONCI et al., 2014).

Algumas isoformas de RALF com função em tecidos reprodutivos já foram caracterizadas (CHEVALIER et al., 2013; COVEY et al., 2010). Análises de bibliotecas de cDNA de ovário e óvulos fertilizados de *Solanum chacoense* identificaram 5 isoformas (*ScRALF1-5*) com expressão menor durante a polinização e fertilização e sofrendo aumento considerável durante o processo de maturação dos frutos (GERMAIN et al., 2005). Dos peptídeos ScRALF, sabe-se que ScRALF3 está envolvido na comunicação intercelular entre os gametófitos masculino e feminino durante o desenvolvimento do óvulo (CHEVALIER et al., 2013).

No presente trabalho, foram caracterizadas as isoformas exclusivamente expressas em grãos de pólen, *AtRALF4*, 25 e 26, e a isoforma mais expressa em ovário, *AtRALF34*. O

mutante *atralf34* apresentou 20% dos óvulos com supercrescimento e entradas múltiplas de tubos polínicos. O peptídeo AtRALF34 causou ruptura em tubos polínicos tratados, sendo esse efeito Ca^{++} -dependente. Os peptídeos AtRALF4, 25 e 26 inibiram a germinação dos grãos de pólen e o alongamento de tubos polínicos. A inibição do alongamento causada pelos peptídeos também é dependente de Ca^{++} .

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Peptídeo hormonal RALF

A comunicação célula a célula em plantas ocorre através de mecanismos de sinalização mediados, principalmente, por hormônios (KENDE; ZEEVAART, 1997; VANSTRAELEN; BENKOVÁ, 2012; YAMAMURO; ZHU; YANG, 2016). Nas últimas décadas, pequenos peptídeos de sinalização têm sido descobertos como tendo importante papel na comunicação entre as células. Esses peptídeos participam dos mais diversos processos como crescimento, desenvolvimento, divisão celular, diferenciação celular e defesa nas plantas (CZYŻEWICZ et al., 2013; LINDSEY; CASSON; CHILLEY, 2002; MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 2006; MOURA; SILVA-FILHO, 2006).

O peptídeo RALF (Rapid Alkalinization Factor) foi descoberto em extratos proteicos de folhas de *Nicotiana tabacum* (NtRALF), utilizando-se de um ensaio para identificar peptídeos que causam aumento no pH do meio de cultivo de suspensões celulares (PEARCE et al., 2001). NtRALF foi identificado quando causou uma alcalinização mais forte e mais rápida que os peptídeos até então conhecidos. Também foi mostrado que NtRALF induz a ativação de uma proteína quinase ativada por mitógeno (MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE, MAPK) (PEARCE et al., 2001). O gene NtRALF codifica uma pré-pró-proteína de 115 aminoácidos que compreende um peptídeo sinal presente na região N-terminal e o peptídeo maduro com 5 kDa localizado na região C-terminal (PEARCE et al., 2001). Um sítio dibásico (RR) localizado acima da região N-terminal do peptídeo maduro é essencial para o processamento deste em AtRALF1 (MATOS et al., 2008). Srivastava et al. (2009) mostraram que o processamento da pró-proteína AtRALF23 é feita por uma subtilase SUBTILISIN-LIKE SERINE PROTEASE 1 (AtS1P).

A estrutura primária do peptídeo maduro entre os homólogos de NtRALF é altamente conservada (Figura 1), sendo o motivo YISY, ou pequenas alterações neste, presente em todas as isoformas já estudadas (PEARCE et al., 2001; PEARCE et al., 2010). Pearce et al. 2010, mostraram que a substituição da isoleucina desse motivo por uma alanina causa severa redução na atividade do peptídeo. O peptídeo maduro possui quatro cisteínas que formam duas pontes dissulfeto; sendo que a redução e alquilação dessas cisteínas torna o peptídeo inativo (MATOS et al., 2008; PEARCE et al., 2001). Peptídeos RALF também foram purificados de folhas de tomateiro e alfafa e exibiram as mesmas respostas de alcalinização rápida do meio de cultura de células (PEARCE et al., 2001).

Figura 1 - Estrutura primária do peptídeo NtRALF. Esquema mostrando os 49 aminoácidos que formam o peptídeo maduro em NtRALF. Em vermelho, o motivo YISY. Em laranja, as quatro cisteínas com tracejado indicando a formação da ponte dissulfeto entre elas

Quando um peptídeo RALF idêntico ao de tomateiro foi quimicamente sintetizado, sua aplicação exógena inibiu o crescimento radicular de plantas de tomateiro e de *Arabidopsis*. A redução e alquilação das cisteínas do peptídeo sintético fez com que o peptídeo perdesse a capacidade de inibir o crescimento radicular (PEARCE et al., 2001). O peptídeo purificado de folhas de cana-de-açúcar, SacRALF1, inibiu a elongação celular quando adicionado ao meio de crescimento de microcalos (MINGOSSÍ et al., 2010). O peptídeo AtRALF1, que apresenta mais de 80% de similaridade a SacRALF1, foi produzido de forma recombinante e apresentou o mesmo efeito inibitório no crescimento de microcalos. AtRALF1 ainda provocou a inibição da elongação de hipocótilos de plantas estioladas de *Arabidopsis*. Morato do Canto et al. (2014) produziram, heterologicamente, nove isoformas de AtRALF (AtRALF1, 4, 19, 22, 23, 24, 31, 33 e 34) e encontraram que, quando aplicados exogenamente, todas as isoformas, exceto a isoforma expressa apenas em pólen, AtRALF4, inibem crescimento de raiz e elongação de hipocótilo e alcalinizam o meio extracelular de células em suspensão de *Arabidopsis*.

Os peptídeos RALF são ubíquos no reino vegetal e geralmente se apresentam na forma de famílias multigênicas. O número de genes RALF varia largamente dentre as espécies. Enquanto algumas espécies possuem menos que uma dezena de isoformas de RALF em seus genomas, como *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana attenuata*, *Solanum chacoense* e *Medicago truncatula* (GERMAIN et al., 2005; HOLMES et al., 2008; PEARCE et al., 2001; WU et al., 2007), outras, como *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* e *Zea Mays*, possuem número elevado de isoformas desses genes (CAO; SHI, 2012; OLSEN; MUNDY; SKRIVER, 2002). Recentemente, um homólogo de RALF foi encontrado no fungo *Fusarium oxysporum*, o

peptídeo é responsável por causar alcalinização no meio extracelular promovendo um crescimento da infecção causada pelo fungo em plantas (MASACHIS et al., 2016).

Um estudo buscando desvendar o processo evolucionário dos peptídeos RALF no reino vegetal mostrou que a família gênica RALF apresentou um processo rápido de nascimento (CAO; SHI, 2012). Em espécies com número de isoformas elevada do peptídeo, como arábida e arroz, a duplicação em tandem parece ter tido um papel dominante na expansão da família gênica. Os genes superestáveis, definidos como os que são altamente conservados entre as espécies, provavelmente sofreram pressão seletiva negativa, onde as mutações deletérias dos genes são removidas, produzindo uma diminuição no nível de variação. A seleção neutra, onde mutações que não afetam a viabilidade do indivíduo são fixadas, parece ser responsável pela evolução dos genes RALF estáveis e não-estáveis (não conservados entre as espécies) (CAO; SHI, 2012).

Os genes RALF podem ser tecido-específico ou expressos em toda a planta (GERMAIN et al., 2005; MORATO DO CANTO et al., 2014). O estudo de expressão de RALFs em um híbrido de álamo (PtdRALF1 e PtdRALF2, *Populus trichocarpa* x *Populus deltoides*), mostrou que estes tem expressão elevada em tecidos jovens (HARUTA; CONSTABEL, 2003). SacRALFs foram encontrados como sendo expressos em zonas de elongação de raízes e folhas, enquanto folhas maduras não apresentaram expressão significativa desses (MINGOSSO et al., 2010). Holmes et al. (2008), analisando transcriptoma de meristemas de *M. truncatula*, encontraram duas isoformas de MtRALF sendo altamente expressas.

Haruta et al. (2008) mostraram que AtRALF1 aumenta os níveis de Ca^{++} intracelular em apenas 40 segundos após a aplicação do peptídeo exógeno, estabelecendo que a resposta ao peptídeo é mediada por Ca^{++} . A mobilização rápida de Ca^{++} intracelular também foi observada quando plantas foram tratadas com AtRALF22 (MORATO DO CANTO et al., 2014). Em tomateiro, foi encontrado que SIRALF se ligou fortemente há duas proteínas de membrana não identificadas, com pesos de 25 e 120 kDa (SCHEER; PEARCE; RYAN, 2005). Recentemente, foi mostrado que a isoforma AtRALF1 se liga ao receptor quinase FERONIA (FER) e que a interação AtRALF1-FER causa a fosforilação na serina899 (Ser899) da bomba de prótons ADENOSINA TRIFOSFATASE H^{+} 2 (ATPase AHA2) da membrana plasmática (HARUTA et al., 2014). A fosforilação na Ser899 regula negativamente a ATPase AHA2, levando a alcalinização do apoplasto. Mutantes *fer4* são insensíveis a concentrações de 1 μM do peptídeo AtRALF1, mostrando sensibilidade para concentrações mais elevadas, o que suporta a ideia de que o peptídeo tem mais de um receptor. A PROTEÍNA QUE ANCORA GLICOSILFOSFATIDILINOSITOL LORELEI-

LIKE1 (LLG1) mostrou-se essencial para que FER seja transportada do retículo endoplasmático para a membrana plasmática (LI et al., 2015). Mutantes *llg1* comportam-se como *fer*, apresentando fenótipos indistinguíveis e sendo insensíveis a baixas concentrações do peptídeo AtRALF1 aplicado exogenamente.

O silenciamento de NaRALF (*irNaRALF1*), uma isoforma de *Nicotiana attenuata*, levou ao maior e mais rápido crescimento de raiz das plantas transgênicas, em comparação as plantas selvagens (WU et al., 2007). Em *arabidopsis*, o silenciamento de AtRALF1 (*irAtRALF1*) mostrou plantas com raízes e hipocótilos maiores, enquanto a superexpressão (35S:AtRALF1) produziu plantas semi-anãs, com raízes e hipocótilos menores que plantas selvagens (BERGONCI et al., 2014; MATOS et al., 2008). A superexpressão de outras duas isoformas de *arabidopsis*, AtRALF8 e AtRALF23, também gerou plantas semi-anãs com raízes e hipocótilos menores (ATKINSON; LILLEY; URWIN, 2013; SRIVASTAVA et al., 2009). Mutantes *atralf22* mostraram maior comprimento de raiz em relação a plantas selvagens (SHARMA et al., 2016). Bergonci et al. (2014) mostraram que as células da endoderme da zona de diferenciação, local da expressão de AtRALF1 em raízes, é 44% menor em comprimento em plantas 35S:AtRALF1 e 30% maiores em plantas *irAtRALF1*, quando comparadas as células da mesma região em plantas selvagens. No hipocótilo, plantas 35S:AtRALF1 apresentam células 34% menores, enquanto plantas *irAtRALF1* tem células 27% maiores em comprimento se comparadas as células de plantas selvagens (BERGONCI et al., 2014).

Além de participar na regulação negativa da expansão celular, alguns peptídeos da família RALF já foram associados a outras funções. Plantas 35S:AtRALF1 e 35S:AtRALF8 possuem menor densidade de raiz lateral, enquanto plantas *irAtRALF1* possuem maior número delas (ATKINSON; LILLEY; URWIN, 2013; BERGONCI et al., 2014). Plantas 35S:AtRALF8 também possuem maior densidade de pelos radiculares, sendo que estes também apresentam maior comprimento, quando comparados as plantas selvagens (ATKINSON; LILLEY; URWIN, 2013). Wu et al. (2007) também constataram que NaRALF é essencial para o desenvolvimento de pelos radiculares, sendo que plantas *irNaRALF* apresentam tricoblastos defeituosos, que se rompem, causando má formação dos pelos. Um estudo buscando genes que codificam pequenas proteínas em nódulos de leguminosas encontrou três isoformas de RALF (SILVERSTEIN; GRAHAM; VANDENBOSCH, 2006). Em *Medicago truncatula*, MtRALF foi encontrado como sendo altamente expresso durante as fases iniciais de nodulação (COMBIER et al., 2008).

Peptídeos hormonais muitas vezes realizam suas funções interagindo com outros hormônios (AALEN et al., 2013; CHAIWANON et al., 2016; MENG; FELDMAN, 2010). Haruta e Constabel (2003), investigando a resposta de duas isoformas de álamo a diversos tratamentos, constataram que metil jasmonato reduz a expressão de PtdRALF1 e PtdRALF2. Uma diminuição na expressão desses genes também ocorre quando existe o tratamento com sacarose, enquanto auxinas e citocininas não induziram ou reprimiram os genes. Resultado diferente foi encontrado em *Solanum chacoense*, onde as cinco isoformas identificadas (ScRALF1 a 5) não mostraram alteração na expressão quando plantas foram tratadas com metil jasmonato, ácido salicílico e ácido abscísico (GERMAIN et al., 2005). Quando plantas 35S:AtRALF8 foram tratadas com auxina, estas apresentaram respostas semelhantes as observadas em plantas selvagens (ATKINSON; LILLEY; URWIN, 2013).

Srivastava et al. (2009), estudando a isoforma de arábida AtRALF23, mostraram que esta é regulada negativamente por brassinosteróide. Mutantes *bes1-D*, que apresentam nível endógeno elevado de brassinosteróides, possuem menor expressão de AtRALF23 em relação a plantas selvagens. O tratamento exógeno de plantas selvagens com o hormônio brassinolide (BL) também reduz a expressão de AtRALF23. Plantas que superexpressam AtRALF23 apresentam resposta reduzida à BL quanto a sua atividade de alongação de hipocótilos na presença de luz. Efeito semelhante foi observado por Bergonci et al. (2014) em relação a isoforma AtRALF1, onde plantas 35S:AtRALF1 mostram menos sensibilidade a alongação de hipocótilo causada por BL. 35S:AtRALF1 é também menos sensível a alongação de raiz e aumento no número de raízes laterais causados pela aplicação exógena do hormônio. Transgênicos com menores níveis endógenos de AtRALF1 mostram maior sensibilidade ao efeito de alongação de raízes e aumento de número de raízes laterais provocados por BL. Mutantes *bril*, que não percebem brassinosteróides, apresentam maior sensibilidade ao tratamento exógeno do peptídeo AtRALF1 (BERGONCI et al., 2014).

AtRALF1 regula positivamente a expressão de dois genes envolvidos na biossíntese de BL, CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS AND DWARFISM (CPD) e DWARF4 (DWF4) que, em contrapartida, são regulados negativamente pelo hormônio (BERGONCI et al., 2014). BL regula positivamente a expressão do gene EXPANSIN A5 (AtEXPA5), que codifica uma expansina envolvida na expansão de células de raiz e hipocótilo. AtRALF1 regula negativamente AtEXPA5, sendo que plantas *irAtRALF1* apresentam expressão elevada do AtEXPA5 (BERGONCI; SILVA-FILHO; MOURA, 2014). O peptídeo AtRALF1 também regula positivamente genes que codificam proteínas envolvidas em rearranjo de parede celular, como as PROLINE-RICH PROTEINS1 e 3 (PRP1 e PRP3), a

HYDROXYPROLINE-RICH GLYCOPROTEIN 2 (HRGP2), e a TOUCH 4 (TCH4), uma xiloglicano endotransglicosilase. PRP1, PRP3 e HRGP2 são regulados negativamente por BL (BERGONCI et al., 2014).

Haruta et al. (2014) mostraram que plantas tratadas durante 30 minutos com o peptídeo AtRALF1 inibem a expressão do gene BRASSINOSTEROID-6-OXIDASE 2 (BR6OX2), SMALL AUXIN UP RNA 63 (SAUR63) e GIBERELLIN-3-OXIDASE 1 (GA3OX1), que são conhecidamente proteínas envolvidas com expansão celular. O gene que codifica a proteína que se liga a Ca^{++} , CALMODULIN-LIKE 38 (CML38), é induzido quando plantas de arábidsopsis são tratadas com o peptídeo AtRALF1 (LI et al., 2015).

O mutante defectivo na sinalização de etileno ethylene-insensitive 3 (ein3-1) mostra expressão elevada de AtRALF8. De maneira oposta, AtRALF8 é menos expresso em mutantes com resposta constitutiva ao etileno, constitutive triple response (ctr1) (ATKINSON; LILLEY; URWIN, 2013). O gene que codifica um fator de resposta a etileno ETHYLENE RESPONSE FACTOR 6 (ERF6) são induzidos em plantas de arábidsopsis tratadas com o peptídeo AtRALF1 (LI et al., 2015).

O gene AtRALF31 mostrou ser altamente induzido após 6 horas em folhas de arábidsopsis infiltradas com H_2O_2 (SHARMA et al., 2016).

2.1.1 Peptídeos RALF em tecido reprodutivo

A função dos peptídeos RALF em tecidos reprodutivos é pouco estudada. Um estudo do perfil transcriptacional de pólen em arábidsopsis encontrou AtRALF10 como sendo unicamente expresso no gametófito masculino (BECKER et al., 2003). Análises de transcriptoma do gametófito feminino em arábidsopsis encontrou AtRALF14 e AtRALF18 como sendo expressos em óvulos em desenvolvimento (YU; HOGAN; SUNDARESAN, 2005). Johnston et al. (2007) também encontram AtRALF14 sendo expresso especificamente em saco embrionário.

Em *S. chacoense*, cinco isoformas (ScRALF1-5) foram identificadas em bibliotecas de cDNAs feitas a partir de tecidos de óvulos fertilizados e ovários. As cinco isoformas são mais expressas durante a formação do fruto, tendo menor expressão durante os processos de polinização e fertilização. ScRALF1 e ScRALF3 são específicas de tecido reprodutivo, enquanto as outras três isoformas são expressas em todos os tecidos (GERMAIN et al., 2005). ScRALF3 mostra aumento de expressão em ovários após a fertilização. A polinização autoincompatível não causa o mesmo incremento de expressão, mostrando que o gene é

regulado pelo processo de fertilização e que este é importante na interação entre os gametófitos feminino e masculino. ScRALF1 tem expressão localizada na placenta durante os estágios tardios do desenvolvimento do fruto (GERMAIN et al., 2005). A não sobreposição na expressão desses dois ScRALFs mostra que estes desempenham papéis específicos durante o desenvolvimento do fruto. Plantas com menor expressão de ScRALF3 (irScRALF3) levam a produção de frutos menores, que produzem poucas sementes, devido ao desenvolvimento inadequado do saco embrionário. Os defeitos no saco embrionário incluem a perda de polarização dos núcleos, aumento na divisão assíncrona, culminando em disfunções celulares e detenção do desenvolvimento prematura do saco embrionário. (CHEVALIER; LOUBERT-HUDON; MATTON, 2013).

Uma isoforma específica de pólen identificada em tomateiro (SIPRALF) inibiu a elongação de tubos polínicos em um ensaio in vitro, não afetando a hidratação, viabilidade e germinação dos grãos de pólen. SIPRALF atua regulando negativamente o desenvolvimento do tubo polínico em uma janela específica de tempo, inibindo elongação apenas no início desta. A redução e alquilação das cisteínas de SIPRALF impossibilitam a ação inibitória do peptídeo (COVEY et al., 2010).

Em *Brassica oleracea*, a isoforma BoRALF1 foi encontrada em biblioteca de cDNA de flores e mostrou expressão estrita em grãos de pólen maduros e nas células da antera (ZHANG; WU; WANG, 2010). Em *Brassica campestris*, BcRALF foi encontrada como sendo expressa nos estágios quatro e cinco dos botões florais, mais especificamente nos estames. A ausência de BcRALF afeta a germinação de grãos de pólen. Mutantes com supressão de BcRALF apresentam grãos de pólen com tamanho reduzido e com formato anormal. A elongação do tubo polínico também é irregular, começando a se enrolar e torcer, e parando o crescimento logo após a germinação (LI; NIE; CAO, 2011).

Morato do Canto et al. (2014) mostraram que a isoforma específica de grãos de pólen e tubo polínico AtRALF4, AtRALF19 e AtRALF33 inibem a germinação de grãos de pólen em ensaios de germinação in vitro, sem afetar a hidratação destes. Diferente de outras isoformas já estudadas em *arabidopsis*, AtRALF4 não causou alcalinização em meio de cultura de células em suspensão, e também não inibiu crescimento de raiz e hipocótilo quando aplicado exogenamente.

2.2 Tecido reprodutivo

Durante a reprodução sexual das plantas, a interação entre os órgãos e tecidos femininos e masculinos é essencial para a união dos gametas. Hiscock e Allen (2008) dividem a interação pólen-pistilo em seis principais estágios: captura do pólen e adesão, hidratação do pólen, germinação do pólen para produção do tubo polínico, penetração do tubo polínico no estigma, crescimento do tubo polínico através do estigma e estilete e, finalmente, entrada do tubo polínico no óvulo e liberação das células espermáticas (Figura 2). Ainda, essas interações incluem a elongação de apenas um tubo polínico no gametófito feminino, orientação do crescimento do tubo polínico e a parada do crescimento do tubo polínico e sua ruptura (RUSSELL, 1992; SHIMIZU; OKADA, 2000).

Figura 2 - Esquema dos diferentes estágios da interação pólen-estigma. O diagrama representa um estigma com tipo papilar seco encontrado em *arabidopsis*. O pólen é mostrado em diversos estágios de desenvolvimento no estigma, e crescendo através do tecido transmissor do estilete. Adaptado de Hiscock e Allen (2008)

O tubo polínico interage com muitas células do tecido esporofítico em sua passagem até o gametófito feminino (JOHNSON; PREUSS, 2002). A superfície do estigma recebe o grão de pólen e, subsequentemente, percebe sinais do pólen que desencadeiam a hidratação controlada do grão, permitindo a germinação do tubo polínico (SWANSON; EDLUND; PREUSS, 2004). O tecido esporofítico feminino libera sinais que guiam o tubo polínico, determinando sua polaridade e dirigindo seu crescimento através da matriz extracelular do estilete e do tecido de transmissão (KIM et al., 2003; NASRALLAH et al., 1994; WU et al., 2000). Após passar

pelo tecido de transmissão, o tubo polínico emerge sobre o septo até atingir o funículo, direcionando seu crescimento para a região micropilar do óvulo, que dá acesso ao gametófito feminino. O gametófito feminino é uma estrutura haploide composta por uma célula-ovo e duas células sinérgidas no polo micropilar, uma célula central, e três células antipodais (Figura 3) (YADEGARI; DREWS, 2004). O tubo polínico fica retido dentro de uma das células sinérgidas, e a ponta do tubo se rompe, liberando as duas células espermáticas (RUSSELL, 1992). Este processo de recepção do tubo polínico pelo gametófito feminino é acompanhado pela degeneração da célula sinérgida receptiva, seguida de uma fusão de uma célula espermática com a célula-ovo, e da outra célula espermática com a célula central para produzir o zigoto e o endosperma, respectivamente (WETERINGS; RUSSELL, 2004).

Figura 3 - Esquema mostrando a interação entre os gametófitos feminino e masculino. O esquema mostra a entrada do tubo polínico (TP) no óvulo. CA, células antipodais; GF, gametófito feminino; CC, célula central; CO, célula-ovo; CS, células sinérgidas; TI, tegumento interno; TE, tegumento externo; AF, aparato filiforme; M, micrópila; NV, núcleo vegetativo; CE, célula espermática

A análise de mutantes mostra que o gametófito feminino desempenha um papel determinante na indução da liberação das células espermáticas e na prevenção para que tubos polínicos tardios não entrem em um óvulo já penetrado (TSUKAMOTO et al., 2010; ROTMAN et al., 2003). Dentre esses mutantes, óvulos de mutantes *fer4* mostram uma falha ao induzir a ruptura do tubo polínico e em evitar a entrada de tubos polínicos múltiplos no óvulo. Como consequência, mutantes *fer4* apresentam óvulos com acúmulo de tubos polínicos que crescem mais que o normal (ESCOBAR-RESTREPO et al., 2007; HUCK et al., 2003; ROTMAN et al., 2003). FER é um membro de uma família de genes que codificam PROTEÍNAS RECEPTORAS QUINASE (RLKs) e é expresso em toda a planta com exceção

do pólen, onde outros RLKs são expressos (CHEUNG; WU, 2011). Duan et al. (2014) mostraram que FER induz a produção de alta quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) na entrada do gametófito feminino. Essa alta concentração é necessária para que haja a ruptura do tubo polínico; óvulos com baixa concentração de ROS falham no rompimento dos tubos causando crescimento anormal destes. A ruptura do tubo polínico causada por ROS é dependente de Ca^{++} (DUAN et al., 2014).

A sinalização de Ca^{++} desempenha papel crucial em diversos aspectos do crescimento, desenvolvimento e defesa das plantas (HIMSCHOOT et al., 2015; HOCHMAL et al., 2015; MA; BERKOWITZ, 2007). Durante a germinação e alongação do tubo polínico, Ca^{++} age como sinal primordial, sendo o importante balanço intra e extracelular do íon (IWANO et al., 2004). Calmodulinas são proteínas sensoras de Ca^{++} que mediam a transdução de sinais do íon intracelularmente.

A análise de mutantes mostra que o gametófito feminino desempenha um papel determinante na indução da liberação das células espermáticas e na prevenção para que tubos polínicos tardios não entrem em um óvulo já penetrado (TSUKAMOTO et al., 2010; ROTMAN et al., 2003). Dentre esses mutantes, óvulos de mutantes *fer4* mostram uma falha ao induzir a ruptura do tubo polínico e em evitar a entrada de tubos polínicos múltiplos no óvulo. Como consequência, mutantes *fer4* apresentam óvulos com acúmulo de tubos polínicos que crescem mais que o normal (ESCOBAR-RESTREPO et al., 2007; HUCK et al., 2003; ROTMAN et al., 2003). FER é um membro de uma família de genes que codificam PROTEÍNAS RECEPTORAS QUINASE (RLKs) e é expresso em toda a planta com exceção do pólen, onde outros RLKs são expressos (CHEUNG; WU, 2011). Duan et al. (2014) mostraram que FER induz a produção de alta quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) na entrada do gametófito feminino. Essa alta concentração é necessária para que haja a ruptura do tubo polínico; óvulos com baixa concentração de ROS falham no rompimento dos tubos causando crescimento anormal destes. A ruptura do tubo polínico causada por ROS é dependente de Ca^{++} (DUAN et al., 2014).

A análise de mutantes mostra que o gametófito feminino desempenha um papel determinante na indução da liberação das células espermáticas e na prevenção para que tubos polínicos tardios não entrem em um óvulo já penetrado (TSUKAMOTO et al., 2010; ROTMAN et al., 2003). Dentre esses mutantes, óvulos de mutantes *fer4* mostram uma falha ao induzir a ruptura do tubo polínico e em evitar a entrada de tubos polínicos múltiplos no óvulo. Como consequência, mutantes *fer4* apresentam óvulos com acúmulo de tubos polínicos que crescem mais que o normal (ESCOBAR-RESTREPO et al., 2007; HUCK et al., 2003;

ROTMAN et al., 2003). FER é um membro de uma família de genes que codificam PROTEÍNAS RECEPTORAS QUINASE (RLKs) e é expresso em toda a planta com exceção do pólen, onde outros RLKs são expressos (CHEUNG; WU, 2011). Duan et al. (2014) mostraram que FER induz a produção de alta quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) na entrada do gametófito feminino. Essa alta concentração é necessária para que haja a ruptura do tubo polínico; óvulos com baixa concentração de ROS falham no rompimento dos tubos causando crescimento anormal destes. A ruptura do tubo polínico causada por ROS é dependente de Ca^{++} (DUAN et al., 2014).

A análise de mutantes mostra que o gametófito feminino desempenha um papel determinante na indução da liberação das células espermáticas e na prevenção para que tubos polínicos tardios não entrem em um óvulo já penetrado (TSUKAMOTO et al., 2010; ROTMAN et al., 2003). Dentre esses mutantes, óvulos de mutantes *fer4* mostram uma falha ao induzir a ruptura do tubo polínico e em evitar a entrada de tubos polínicos múltiplos no óvulo. Como consequência, mutantes *fer4* apresentam óvulos com acúmulo de tubos polínicos que crescem mais que o normal (ESCOBAR-RESTREPO et al., 2007; HUCK et al., 2003; ROTMAN et al., 2003). FER é um membro de uma família de genes que codificam PROTEÍNAS RECEPTORAS QUINASE (RLKs) e é expresso em toda a planta com exceção do pólen, onde outros RLKs são expressos (CHEUNG; WU, 2011). Duan et al. (2014) mostraram que FER induz a produção de alta quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) na entrada do gametófito feminino. Essa alta concentração é necessária para que haja a ruptura do tubo polínico; óvulos com baixa concentração de ROS falham no rompimento dos tubos causando crescimento anormal destes. A ruptura do tubo polínico causada por ROS é dependente de Ca^{++} (DUAN et al., 2014).

A análise de mutantes mostra que o gametófito feminino desempenha um papel determinante na indução da liberação das células espermáticas e na prevenção para que tubos polínicos tardios não entrem em um óvulo já penetrado (TSUKAMOTO et al., 2010; ROTMAN et al., 2003). Dentre esses mutantes, óvulos de mutantes *fer4* mostram uma falha ao induzir a ruptura do tubo polínico e em evitar a entrada de tubos polínicos múltiplos no óvulo. Como consequência, mutantes *fer4* apresentam óvulos com acúmulo de tubos polínicos que crescem mais que o normal (ESCOBAR-RESTREPO et al., 2007; HUCK et al., 2003; ROTMAN et al., 2003). FER é um membro de uma família de genes que codificam PROTEÍNAS RECEPTORAS QUINASE (RLKs) e é expresso em toda a planta com exceção do pólen, onde outros RLKs são expressos (CHEUNG; WU, 2011). Duan et al. (2014) mostraram que FER induz a produção de alta quantidade de espécies reativas de oxigênio

(ROS) na entrada do gametófito feminino. Essa alta concentração é necessária para que haja a ruptura do tubo polínico; óvulos com baixa concentração de ROS falham no rompimento dos tubos causando crescimento anormal destes. A ruptura do tubo polínico causada por ROS é dependente de Ca^{++} (DUAN et al., 2014).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

A análise da estrutura populacional a partir dos SNPs gerados por GBS evidenciou a distinção entre os acessos de feijoeiro de acordo com o *pool* gênico, confirmada, igualmente, pela estimativa do coeficiente de parentesco, também realizada a partir da informação genotípica. Ademais, percebeu-se uma tendência de agrupamento entre os acessos provenientes da mesma instituição de melhoramento, principalmente aqueles provenientes do IAC.

Plantas de *Arabidopsis thaliana*, ecótipo Columbia-0, foram utilizadas em todos os experimentos com plantas selvagens. Transgênicos e mutantes utilizados são oriundos do mesmo ecótipo. Plantas transgênicas superexpressando o gene AtRALF34 (35S:AtRALF34) foram geradas previamente, estando a expressão do gene sob o controle do promotor viral Cauliflower Mosaic Virus 35S (35S) (BERGONCI, 2012; RIBEIRO, 2014). O mutante *fer4* foi previamente isolado por HUCK et al. (2003) e doado para o presente trabalho pela prof. Dra. Alice Y. Cheung (UMass Amherst). Os demais mutantes utilizados são descritos na seção 3.2.

As plantas foram crescidas em câmaras Conviron ATC26 com 16 h de luz (200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) e 8 h de escuro a 22°C. As sementes foram umedecidas e colocadas à 4°C, no escuro, por 4 d. Em seguida, as sementes foram transferidas para vasos contendo substrato e vermiculita (2:1).

Para os experimentos realizados em sala de crescimento, sementes de *arabidopsis* foram esterilizadas superficialmente. As sementes foram colocadas em tubos de 1,5 mL e uma solução de 50% de hipoclorito de sódio foi adicionada, os tubos foram deixados sob agitação por 5 min. A solução foi substituída por outra com 50% de etanol e os tubos foram deixados sob agitação por 5 min. As sementes foram lavadas dez vezes com água Milli-Q previamente esterilizada e plaqueadas em meio ½ MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) sem adição de sacarose e com 0,6 g/L de Gellan Gum (PhytoTechnology Laboratories) pH 5,6 ajustado com KOH. As sementes foram colocadas no escuro, a 4°C por 4 d e, depois, foram transferidas para sala de crescimento, 22°C com fotoperíodo de 16 h na luz e 8 h no escuro.

3.2 Confirmação de mutantes

Linhagens nocautes para os genes AtRALF4, AtRALF25, AtRALF26 e AtRALF34 foram obtidas através do Arabidopsis Biological Resource Center – ABRC (<http://abrc.osu.edu/>). Para o gene AtRALF4, foram analisadas duas linhagens com inserção de T-DNA na região codante do gene, SALK_016969 e SALK_016970. AtRALF25 possui três linhagens disponíveis com inserção de T-DNA: SALK_065523, com inserção xxx; CS816633, com inserção xxx; e CS835333, com inserção xxx. Para o gene AtRALF26, foi analisada a linhagem SALK_059781, com inserção xxx. AtRALF34 teve três linhagens analisadas: SALK_102494, com inserção na região promotora; SALK_038321, com inserção na região codante e SALK_003116, com inserção de T-DNA após o códon de terminação do gene.

A presença de T-DNA e ausência de segregação (plantas homozigotas) foram confirmadas pela reação em cadeia de polimerase (PCR) feitas a partir de DNA genômico. O iniciador LBb1.3 (Apêndice A) (ATTTTGCCGATTTTCGGAAC), que anela no T-DNA, foi usado junto com o iniciador gene-específico para a confirmação da inserção. PCR também foi feito com iniciadores que flanqueiam a região da inserção para confirmação de homozigose. Por fim, foram realizadas análises de expressão gênica semi-quantitativa e quantitativa (RT-PCR e qPCR, respectivamente) nas linhagens homozigotas, utilizando cDNA, para confirmar a ausência da expressão do gene.

3.3 Extração de DNA genômico

O DNA de folhas foi extraído utilizando DNAzol® (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. Folhas de arabidopsis foram maceradas em nitrogênio líquido dentro de tubos de 1,5 mL, onde, após a evaporação do nitrogênio, adicionou-se 1 mL do reagente DNAzol. As amostras foram centrifugadas a 10000 rpm, por 10 min, em temperatura ambiente. A fase superior foi transferida para um novo tubo onde foram adicionados 0,5 mL de etanol 100%. Os tubos foram agitados por inversão e deixados em temperatura ambiente por 3 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 2 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e 1 mL de etanol 70% foi adicionado ao tubo para lavagem do precipitado. O tubo foi invertido 6 vezes e o etanol foi descartado. A lavagem foi feita 2 vezes. Após a última lavagem, o etanol foi descartado e os tubos foram deixados abertos por 10 min para secagem. O DNA foi ressuspendido em água livre de DNase e mantido a -20°C.

3.4 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

As reações de PCR foram realizadas com 1 µL de DNA e 0,25 µL da enzima GoTaq DNA Polymerase (Promega), 5 µL de tampão, 0,5 µL de cada iniciador, 0,5 µL de dNTPs 10 mM e 16,95 µL de água milli-Q. As reações foram conduzidas a 94°C/2 min, seguidos de 25 a 30 ciclos de amplificação (94°C/30 seg, 58°C/30 seg, 72°C/30 seg), finalizando com 72°C/7 min. Os produtos da PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose, utilizando-se tampão de corrida TAE (1,14 mL ácido acético 100%, 2 mL 0,5 M sódio EDTA; 996,8 mL H₂O) 1X sob tensão constante de 100V.

3.5 Análise de expressão gênica

3.5.1 Extração de RNA total

O RNA total dos tecidos foi extraído com Trizol® (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. O tecido foi colocado em tubos de 1,5 mL e esse foi macerado em nitrogênio líquido com o auxílio de pistilo. Após a evaporação do nitrogênio foi adicionado 1 mL de Trizol® (Invitrogen) ao tubo, este foi agitado e incubado por 5 min a temperatura ambiente. Adicionou-se 200 µL de clorofórmio, agitou-se por inversão durante 15 s e incubou-se por 3 min a temperatura ambiente. Centrifugou-se a 12000 rpm por 15 min a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo onde foi adicionado 500 µL de isopropanol e incubada a temperatura ambiente por 10 min. A solução foi centrifugada a 12000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75% e centrifugado a 7500 rpm por 5 min a 4°C. O precipitado foi seco a temperatura ambiente por 10 min e ressuspensionado em 20 µL de água ultra-pura. Adicionalmente, as amostras foram tratadas com DNase (descrito em 3.5.2).

3.5.1.1 Extração de RNA total de pólen

Para extração de grãos de pólen maduros, inflorescências de *Arabidopsis thaliana* no estágio 13 de desenvolvimento foram coletadas (ALVAREZ-BUYLLA et al., 2010). As inflorescências foram colocadas em frascos contendo 30 mL de meio de cultura de germinação de pólen e deixadas sob agitação para liberação dos grãos de pólen. O meio foi

filtrado através de uma camada de xxx. O sedimento foi ressuspensão em 200 µL de Trizol e o RNA total foi purificado de acordo com o protocolo descrito na seção 3.5.1.

3.5.1.2 Tratamento de RNA com DNase

As amostras de RNA diluídas em 20 µL de água, foram adicionados 2 µL de enzima RQ1 DNase (Promega), juntamente com 2 µL de tampão (RQ1 DNase buffer) e 8 µL de água livre de RNase. As amostras foram colocadas em incubadora, à 37°C por 30 min. Em seguida, 1 µL de Stop Solution foi adicionado e as amostras foram incubadas à 65°C por 10 min.

3.5.2 Quantificação do RNA

As amostras do RNA total ressuspensas em água tiveram uma alíquota de 1 µL retirada do tubo e quantificada em NanoDrop® (Thermo Scientific). A qualidade do RNA foi avaliada por meio da razão 260/280.

3.5.3 Síntese de cDNA

O cDNA foi produzido a partir de 1 µg de RNA com a enzima Improm II Reverse Transcriptase (Promega) seguindo recomendações do fabricante. Amostras de RNA total (1 µg) foram incubadas por 5 min, a 70°C com 2 µL de oligodT (50 µM), e, em seguida, foram colocadas no gelo por 5 min. Após este período, uma solução contendo tampão Improm II, MgCl₂ (1,5 mM), dNTPs (10 mM) e 1 U de enzima Improm II Reverse Transcriptase foi adicionada e incubou-se por 5 min a 25°C, seguidos de 60 min a 42°C e 15 min a 70°C.

3.5.4 PCR semi-quantitativo (RT-PCR)

O RT-PCR foi realizado com 1 µL de cDNA e 0,25 µL da enzima GoTaq DNA Polymerase (Promega), seguindo o protocolo descrito na seção 3.4. Como controle para todas as análises, foram utilizados um par de iniciadores para amplificar o gene GLICERALDEÍDO 3-FOSFATO DESIDROGENASE (GAPDH). A sequência do GAPDH e dos demais iniciadores utilizados podem ser verificadas no Apêndice A.

3.5.5 PCR quantitativo (RT-qPCR)

O RT-qPCR foi realizado utilizando-se 3 µL de cDNA diluído 10 vezes, 0,3 µL de cada iniciador, 12,5 µL de Maxima SyBR Green Rox (qPCR Master Mix, Thermo Scientific) e 8,9 µL de água Milli-Q. As reações foram feitas em no sistema de PCR em tempo real StepOne™ (Applied Biosystems). O programa utilizado foi: 50°C/2 min, 95°C/2 min, seguidos de 40 ciclos de 95°C/15 s e 60°C/30 s, com detecção do sinal de fluorescência no final de cada etapa de extensão. O gene GAPDH foi utilizado como controle interno. Para cada amostra biológica, três repetições técnicas foram feitas. O ciclo limite (CT) foi determinado automaticamente pelo programa e o cálculo de expressão relativa foi realizado pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

3.6 Obtenção de plantas transgênicas

3.6.1 Clonagem da sequência do promotor do gene AtRALF26 para fusão com a proteína verde fluorescente GFP

O sistema Gateway (Life Technologies) foi utilizado para a clonagem do promotor do gene AtRALF26 em vetor apropriado para a fusão com a sequência codante para a proteína verde fluorescente GFP. A sequência encontrada acima da região codante para o gene AtRALF26 foi amplificada por PCR a partir de DNA genômico. A sequência dos iniciadores utilizados se encontram no Apêndice A. Os fragmentos amplificados foram clonados no vetor pENTR D-TOPO® (Invitrogen) e, posteriormente, transferidos para o vetor pKGWFS7 (KARIMI et al., 2002).

A clonagem foi feita incubando-se o fragmento gerado por PCR e o vetor de entrada por 5 min a temperatura ambiente. A reação foi colocada em células eletrocompetentes de *E. coli* (cepa TOP10, Invitrogen) através de eletroporação (Gene Pulse, BioRad) e foram crescidas em meio SOC líquido (20 g/L de triptona, 10 g/L de extrato de levedura, 0,5 g/L de cloreto de sódio, 1 mL de cloreto de potássio a x M, 180 µL de glicose 20% e 180 µL de cloreto de magnésio 1 M, pH 7,0) (HANAHAN, 1983) á 37°C por 1 h, sob agitação. O meio SOC contendo as bactérias foi centrifugado e 800 µL do sobrenadante foi descartado. As bactérias foram ressuspensas em 200 µL do meio SOC restante no tubo e plaqueadas em placas contendo meio LB semi-sólido (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de

cloreto de sódio e 12 g/L de ágar, pH 7,5) e canamicina 50 mg/L. As placas foram colocadas á 37°C por 18 h.

Colônias de bactérias resistentes ao antibiótico tiveram seu DNA plasmidial extraído. Para a verificação da clonagem foi feita a digestão do plasmídeo com a enzima NotI (Fermentas) e também reações de PCR com iniciadores complementares as sequências do vetor (Apêndice A). Após as confirmações dos tamanhos moleculares dos plasmídeos linearizados e dos fragmentos amplificados, os vetores foram enviados para sequenciamento.

Após a confirmação da clonagem, a sequência clonada foi transferida para o vetor de destino pKGWFS7 por intermédio de recombinação, utilizando-se a mistura enzimática LR Clonase II (Invitrogen). Para a reação de recombinação adicionou-se o vetor clonado, o vetor pKGWFS7, tampão TE e a enzima LR Clonase, com incubação á 25°C, por 18 h. Em seguida, o vetor recombinado foi eletroporado em *E. coli* e as bactérias foram crescidas em meio SOC á 37°C por 1 h, sob agitação. As bactérias foram plaqueadas em meio LB semi-sólido contendo espectinomicina 50 mg/L. A construção foi verificada através de PCR utilizando-se iniciadores do vetor e confirmadas por sequenciamento.

3.6.2 Produção de células eletrocompetentes de *Escherichia coli* e *Agrobacterium tumefaciens*

Células de *Escherichia coli* TOP 10 (Invitrogen) ou *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 foram estriadas em placas contendo meio LB semi-sólido e colocadas a 37°C por 18 h ou 28°C por 48 h respectivamente. No meio LB para *A. tumefaciens* foi adicionado o antibiótico gentamicina 50 mg/L.

O pré-inóculo foi feito a partir de uma colônia da placa estriada em 10 mL de meio LB líquido, estes foram mantidos nas condições de crescimento acima descritos a 180 rpm. Após 18 ou 48 h, 5 mL do pré-inóculo foi adicionado a 500 mL de LB líquido e mantidos nas condições de crescimento até atingir OD600 entre 0,5 e 0,8.

Posteriormente as células foram centrifugadas (10 min, 5000 rpm a 4°C) e 3 lavagens com água ultrapura autoclave mantida a 4°C foram realizadas. As células foram ressuspensas em 3 mL de glicerol 10% filtro esterilizado, aliqotadas em 70 µL e armazenadas a -80°C.

3.6.3 Extração de DNA plasmidial

Colônias resistentes aos antibióticos das placas com meio LB semi-sólido, tanto para clonagem como para recombinação, foram crescidas em 5 mL de meio LB líquido com os

respectivos antibióticos a 180 rpm, 37°C por 18 h. Foram coletados 1 mL e centrifugou-se (12000 rpm, 45 s a temperatura ambiente), o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 75 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 7,6 e 1 mM de EDTA). Adicionou-se 300 µL de TENS (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM de EDTA; 0,1 M de NaOH e 0,5% de SDS) e incubou-se a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente foram adicionados 150 µL de acetato de potássio 3 M (pH 5,2) e centrifugou-se (12000 rpm, 15 min a temperatura ambiente), o sobrenadante foi coletado e o plasmídeo precipitado adicionando 800 µL de etanol 100% (-20°C) seguido de centrifugação (12000 rpm, 5 min a temperatura ambiente). O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% (-20°C) e centrifugado (12000 rpm, 5 min a temperatura ambiente). O sobrenadante foi descartado e o DNA plasmidial foi eluído em 20 µL de água ultrapura. As amostras foram armazenadas a -20°C.

3.6.4 Geração de plantas transgênicas

Plantas de *arabidopsis* transgênicas foram geradas de acordo com o método de imersão das inflorescências (CLOUGH; BENT, 1998) em solução contendo *A. tumefaciens*. Plantas de 30 a 45 d tiveram suas flores e siliques retiradas, para que a inoculação fosse realizada apenas nos botões florais.

O pré-inóculo de *A. tumefaciens* GV3101 carregando o vetor de escolha foi crescido em 10 mL de meio LB líquido por 24 h a 28°C e 180 rpm. Em seguida o pré-inóculo foi adicionado a 500 mL de meio LB, que foi mantido por 48 h a 28°C e 180 rpm. Foi adicionado ao meio LB contendo as bactérias, com OD₆₀₀ entre 0,7 a 0,8, 125 g de sacarose e 70 µL de Silwet-77.

As inflorescências foram mergulhadas nessa solução e as plantas foram colocadas em bandejas cobertas por plásticos. As bandejas com as plantas foram deixadas no escuro por 24 h e, posteriormente, voltaram a casa de vegetação. A esterilização da semente foi feita como descrito na seção 3.1. Após 4 d, estas foram espalhadas em placas contendo ½ MS com antibiótico de seleção.

3.7 Visualização de plantas transgênicas no microscópio confocal

Plantas pAtRALF26:GFP foram crescidas em casa de vegetação e em sala de crescimento. As raízes, hipocótilos, folhas, inflorescências e siliques foram analisadas no microscópio

confocal (Olympus FV1000) para localização da fluorescência da GFP. O laser de excitação utilizado foi de 488 nm e o filtro de emissão foi de 500 e 530 nm.

3.8 Análise fenotípica de plantas transgênicas, mutantes e tratadas com os peptídeos AtRALFs

Para análise do comprimento de raiz de plantas transgênicas e mutantes, sementes foram colocadas em placas contendo ½ MS e deixadas 10 d crescendo verticalmente. Para análise do comprimento de raiz de plantas tratadas com os peptídeos AtRALFs, plantas crescendo verticalmente em placas contendo ½ MS foram transferidas após 2 d para placas contendo os peptídeos. Após 4 d de crescimento com exposição ao hormônio imagens foram capturadas e o programa ImageJ foi utilizado para mensurar o comprimento das raízes primárias.

O comprimento de folhas, pétalas, sépalas, pistilos e estames foi mensurado utilizando-se o program ImageJ. Os órgãos foram excisados e colocados em fundo preto. Fotos foram registradas para posterior medição.

As hastes foram mensuradas utilizando-se uma régua.

Tubos polínicos foram mensurados utilizando-se microscópio.

3.9 Transformação de grãos de pólen através de microprojéteis

Grãos de pólen de arabidopsis foram coletados de plantas e colocados em meio líquido de germinação de grãos de pólen.

3.10 Clonagem, produção e purificação dos peptídeos AtRALFs

3.10.1 Clonagem e recombinação

O sistema Gateway (Life Technologies) foi utilizado para a produção dos peptídeos AtRALFs recombinantes. Morato do Canto et al. (2014) clonaram as sequências para a produção dos peptídeos AtRALF4 e AtRALF34. Para a clonagem de AtRALF25 e AtRALF26, as regiões codantes que correspondem as sequências dos peptídeos maduros foram amplificadas por PCR a partir de DNA genômico. A sequência dos iniciadores utilizados se encontram no Apêndice A. Os peptídeos foram fusionados a uma cauda de histidina, na região N-terminal, para facilitar a purificação do peptídeo recombinante. Os

fragmentos amplificados foram clonados no vetor pENTR D-TOPO® (Invitrogen) e, posteriormente, transferidos para o vetor pDEST17, cepa roseta. A clonagem e recombinação foram feitas como descrito na seção 3.6.1.

3.10.2 Produção e purificação

As culturas bacterianas foram crescidas em pré-inóculos em meio LB á 37°C, 200 rpm, por 18 h. Os inóculos foram feitos a partir de 10 mL de pré-inóculo transferidos para 500 mL de meio LB, que foram deixados sob agitação de 200 rpm, á 37°C, até alcançarem a OD 0,6. As bactérias foram induzidas por 4 h utilizando-se de 1 mM de IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside). Posteriormente, as células bacterianas foram coletadas por centrifugação (8 min, 18°C, 5000 xg) e congeladas. A seguir, foram incubadas em tampão desnaturante (100 mM NaH₂PO₄, 20 mM Tris-HCl, 8 M uréia, pH 8,0) sob agitação durante 40 min e lisadas sob pressão de 1500 psi em bomba de ruptura celular, por pressão de gás nitrogênio. A solução foi centrifugada por 40 min, 4°C, 12000 xg. O sobrenadante foi coletado e o precipitado descartado.

A extração e purificação foram realizadas utilizando cromatografia de afinidade com resina de Níquel (Ni-NTA, Qiagen). A solução coletada após centrifugação foi colocada em uma coluna com a resina equilibrada com 10 vol do tampão desnaturante, pH 8,0. A coluna foi lavada com 5 vol do tampão desnaturante, pH 6,3 e a proteína de interesse foi eluída com o tampão desnaturante, pH 3,3. A proteína recombinante purificada foi dialisada contra 4 L de 0,1% (v/v) de ácido fórmico, em três etapas de 24 h cada (4°C, sob agitação suave). Após a diálise, a amostra foi liofilizada e quantificada na HPLC. Os peptídeos foram confirmados por espectrometria de massas (Apêndice B).

3.11 Ensaio de germinação e crescimento de tubo polínico *in vitro*

Grãos de pólen forem coletados de flores no estágio 13 (recém abertas) (SMYTH; BOWMAN; MEYEROWITZ, 1990) e colocados sobre lâminas com meio de germinação de pólen contendo ou não os peptídeos, conforme descrito em Morato do Canto et al. (2014). As lâminas foram mantidas em câmara úmida por 18 h a 22°C e analisadas com microscópio óptico (Nikon). Foram contados os grãos de pólen não germinados, germinados e não hidratados.

Para o ensaio de crescimento de tubo polínico, os peptídeos foram diluídos em meio líquido de germinação de pólen, e este foi usado como controle. Os peptídeos foram aplicados após 3 h, 4 h, 5 h e 6 h de germinação, e as análises em microscópio foram feitas após 2 h, contadas a partir da aplicação do peptídeo. O comprimento do tubo polínico foi mensurado utilizando-se o programa ImageJ imediatamente antes da aplicação do peptídeo, e 2 h após a aplicação deste.

3.12 Ensaio de crescimento de tubo polínico semi *in vivo*

Para o ensaio de crescimento do tubo polínico semi *in vivo* botões florais foram abertos com uma pinça e tiveram sépalas, pétalas e estames retirados. Os pistilos foram excisados pelo pedúnculo e colocados em uma lâmina contendo meio de germinação de grãos de pólen. Estames de flores abertas foram retirados e utilizados para polinizar os pistilos excisados. Após a polinização, os pistilos foram cortados ao meio e colocados em nova lâmina com meio de germinação de grãos de pólen. As lâminas foram mantidas em câmara úmida a temperatura ambiente por 3 h a 5 h. Microscópio de luz foi utilizado para visualizar os tubos polínicos no momento da aplicação dos tratamentos.

3.13 Ensaio de alimentação de pistilo excisado

Flores no estágio 12 (não abertas) (SMYTH; BOWMAN; MEYEROWITZ, 1990) tiveram sépalas, pétalas e estames retirados e os pistilos (não polinizados) foram excisados na base do pedúnculo. O pedúnculo foi colocado em um meio de germinação de grãos de pólen (0,7% de agarose) contido em uma ponteira de pipeta selada. Os pistilos foram polinizados por pólen de plantas selvagens e mantidos por 20 horas, após o qual foram corados com azul de anilina para detecção de tubos polínicos. (especificar sobre coloração com azul de anilina).

3.14 Ensaio de alcalinização e mobilização de Ca^{++}

O ensaio de mobilização de Ca^{++} citoplasmático em arabisopsis foi feito como descrito previamente em Haruta et al. (2008). Para o ensaio de trocas de nível de Ca^{++} , uma linhagem homozigota com única inserção de um transgene que codifica uma aequorin, expressa no citoplasma, dirigido pelo promotor 35S foi usado (LEWIS et al., 1997). Sementes foram esterilizadas com descrito na seção 3.1 e plaqueadas em meio ½ MS, 3% (p/v) e 0,4% de Gellan Gum (PhytoTechnology Laboratories). Após 4 d de germinação, as plantas foram

transferidas para placas com 96 poços (Thermo Labsystems) contendo 200 μL de $\frac{1}{2}$ MS suplementado com 2,5 μM de coelenterazina cp (Sigma) e incubadas no escuro a 24°C por 16 h. Cada poço da placa recebeu 20 μL do peptídeo para uma concentração final de 10 ou 100 nM. Os resultados da emissão de luminescência foi monitorado usando um leitor de microplaca (Biotec Elx 800) por 10 pontos dentro de 160 s.

3.15 Análise estatística

O programa R (R Development Core Team, 2001) foi utilizado para realizar as análises estatísticas. A comparação de significância foi feita a partir do teste-t de Student.

4 RESULTADOS

4.1 Peptídeos AtRALFs em tecido reprodutivo

4.1.1 Análise da expressão *in silico* dos genes que codificam os peptídeos AtRALF4, 8, 9, 25, 26 e 34

De acordo com a última versão do genoma de *A. thaliana*, existem 39 genes que codificam peptídeos AtRALF (SHARMA et al., 2016). Utilizando-se a ferramenta de análise de expressão gênica *in silico* *Electronic Fluorescent Pictograph Browser*, eFP, encontra-se que, desses 39 genes, 18 são expressos (SCHMID et al., 2005; WINTER et al., 2007). Desses 18 genes, seis mostram expressão elevada em tecido reprodutivo; cinco (*AtRALF4*, 8, 9, 25 e 26) com alta expressão em grãos de pólen e tubo polínico e um (*AtRALF34*) com expressão elevada em ovário (Tabela 1). Dentre os 5 *AtRALFs* expressos em pólen, *AtRALF8* e 9 têm a maior expressão, sendo esta 13,2% mais que *AtRALF26*, que apresenta a terceira maior expressão. *AtRALF4* e *AtRALF25* são 17,9% e 31,5% menos expressos que *AtRALF8* e 9. Estes cinco genes também são altamente expressos no estame, nos estágios finais de formação do grão de pólen (bicelular e triclular), durante a fase de germinação do tubo polínico e no tubo polínico já alongado (Tabela 1 e Apêndice A). Entre os outros genes com dados de expressão *in silico*, *AtRALF17* também apresenta expressão em estames, grão de pólen triclular e grão de pólen maduro, porém tem sua expressão é aproximadamente vinte vezes menor que os *AtRALFs* 4, 8, 9, 25 e 26 (Tabela 1). Embora não expresso em pólen, o gene *AtRALF34* é expresso em toda a planta, sendo a maior expressão relativa do gene encontrada em ovários (Tabela 1 e Apêndice A).

Tabela 1 - Análise de expressão de *AtRALFs* no tecido reprodutivo baseada nos valores de expressão relativa encontrados na ferramenta Arabidopsis eFP Browser. A expressão relativa dos genes em órgãos de plântulas e planta adulta foi tabelada para fins de comparação. A expressão dos genes *AtRALF8* e *9* se encontram na mesma coluna pois estes não foram diferidos pelo método de análise

Tecido/Órgão	AtRALFs																
	1	4	8/9	14	17	18	22	23	24	25	26	27	28	31	32	33	34
Plântulas																	
Raiz	797.5	0.5	8.1	3.8	4.2	6.5	565.0	135.3	74.5	3.6	2.1	35.5	1.4	55.3	805.0	288.9	261.2
Hipocótilo	525.4	0.8	11.9	3.5	7.8	7.9	273.9	222.3	144.4	4.0	2.3	2.3	0.8	108.1	378.5	343.5	824.1
Cotilédone	2.6	1.1	6.5	3.1	13.5	5.3	380.0	435.1	80.0	3.6	4.5	0.6	1.3	34.9	44.7	713.4	229.8
Planta adulta																	
Raiz	563.2	0.5	10.5	4.6	5.0	7.8	527.4	115.5	89.1	3.8	1.3	49.3	1.4	76.7	529.4	295.3	341.3
Roseta	13.4	0.6	5.6	3.2	4.3	2.7	108.2	342.3	125.4	3.7	5.3	0.5	1.2	65.6	105.3	309.6	790.6
Pólen maduro	11.9	11108.1	13520.4	9.2	342.2	8.1	4.1	28.7	7.1	7895.2	11743.3	0.9	6.1	1.1	1.4	6.8	34.0
Flores																	
Estágio 9	221.3	1.2	10.2	1.7	3.4	1.2	89.9	160.9	111.3	2.1	2.6	0.7	2.4	104.4	110.5	91.1	1252.2
Estágio 10/11	46.7	23.5	171.5	1.8	17.7	1.6	112.0	256.4	156.9	2.6	0.8	0.5	1.5	88.6	149.3	165.7	1371.8
Estágio 12	18.4	825.0	2405.4	3.8	169.3	11.2	116.5	276.6	150.1	120.4	135.8	0.8	1.8	81.2	150.7	248.6	1223.0
Estágio 15	8.8	994.7	2400.2	9.9	5.5	10.8	214.4	206.5	137.7	422.4	770.0	0.5	33.6	48.3	166.7	321.7	371.1
Estágio 12, Carpelos	4.7	20.8	122.3	8.0	3.9	34.7	137.8	228.9	177.0	12.2	14.9	0.5	4.9	116.4	161.3	250.5	1172.6
Estágio 12, Pétalas	2.0	224.2	970.3	2.7	23.0	9.0	203.5	484.9	192.4	53.3	67.6	0.7	2.5	80.3	361.4	296.9	1427.9
Estágio 12, Sépala	1.2	127.8	674.2	3.8	18.3	3.5	260.2	403.6	110.0	28.3	39.1	1.0	5.3	25.7	104.7	552.4	314.0
Estágio 12, Estame	24.1	3614.2	4774.5	3.9	818.5	6.5	108.1	263.8	24.0	1028.8	1575.6	0.8	1.3	21.7	92.5	248.6	293.4
Estágio 15, Carpelos	11.4	225.5	1138.9	8.2	5.8	65.2	143.1	191.8	192.7	113.8	167.9	2.1	107.3	89.1	117.9	214.8	834.9
Estágio 15, Pétalas	1.2	168.4	990.1	4.2	4.1	6.5	617.9	220.1	143.3	76.8	138.5	1.3	3.8	16.5	378.2	625.5	80.4
Estágio 15, Sépala	1.9	150.0	971.6	1.5	4.8	10.9	140.6	132.6	125.6	74.4	150.6	0.5	4.2	17.0	124.3	401.4	33.4
Estágio 15, Estame	6.4	3662.0	4697.2	4.8	11.8	9.4	501.8	144.4	44.7	1864.0	2932.6	0.7	2.7	18.7	209.3	590.1	58.4
Estágio 15, Pedicelo	6.4	9.9	58.1	6.2	7.4	4.2	218.2	254.7	175.6	5.2	13.4	2.7	5.8	77.8	58.1	255.9	824.7
Tecidos Reprodutivos																	
Pólen Uninuclear	2.1	205.2	1076.0	10.7	118.0	14.9	2.2	5.5	48.4	35.7	38.4	1.8	111.5	32.1	1.9	4.7	40.9
Pólen Bicelular	7.5	895.7	4033.4	9.3	674.6	9.4	6.8	16.7	42.2	129.5	110.1	1.3	5.8	43.4	1.6	8.0	54.6
Pólen Tricelular	2.6	4702.1	9736.2	12.2	1743.9	24.5	2.8	30.7	1.7	4167.0	4588.8	0.6	3.7	5.7	0.9	1.6	36.9
Grão de Pólen Maduro	20.6	5072.2	10728.9	16.3	281.3	18.6	1.6	34.5	9.4	6014.6	8493.9	1.5	9.1	1.1	1.3	3.4	39.0
Estigma	8.2	53.7	313.5	10.4	16.0	23.1	194.2	112.2	165.9	27.5	58.5	3.5	10.2	101.3	67.2	130.9	817.3
Ovário	13.2	21.8	162.9	46.7	25.4	102.1	262.3	360.9	375.9	20.1	22.5	1.8	18.6	167.0	120.8	201.7	2019.5
Pólen Seco	3.7	5125.3	7011.2	1.4	15.7	3.2	0.9	7.4	0.6	3911.5	4594.9	0.4	2.7	1.7	1.1	5.3	5.5
Pólen (germinado por 30min)	2.1	5244.1	7560.9	2.0	10.5	5.8	0.8	10.5	0.9	3660.2	4638.9	0.7	3.3	0.9	0.8	4.1	12.3
Pólen (germinado por 4h)	5.7	5439.2	7515.2	2.4	9.1	5.0	1.4	7.9	1.2	4051.7	4612.9	0.5	2.4	0.3	0.5	4.3	4.3
Tubo polínico	0.4	5659.7	8614.9	2.8	6.1	8.5	2.6	4.6	0.3	1373.3	4458.4	0.4	4.6	0.9	0.4	11.9	8.6

4.1.2 Estrutura primária dos peptídeos AtRALF4, 8, 9, 25, 26 e 34

Os peptídeos RALF são derivados de precursores maiores que possuem um peptídeo sinal na região N-terminal e o peptídeo maduro localizado no C-terminal da proteína (PEARCE et al., 2001). Em arabidopsis, os precursores de AtRALFs podem ser pré-pró-proteínas, quando possuem a sequência de direcionamento para a via secretória, pré-proteína, e sofrem um processamento posterior liberando o peptídeo maduro, pró-proteína (MATOS et al., 2008; SRIVASTAVA et al., 2009). Alguns precursores possuem apenas o peptídeo sinal e o peptídeo maduro sendo então denominados pré-proteínas. As isoformas AtRALF4 e AtRALF34 são pré-pró-proteínas, com total de 110 e 129 aminoácidos respectivamente (Figura 4). Semelhante a isoforma AtRALF1, AtRALF4 e AtRALF34 possuem uma dupla arginina na porção N-terminal do peptídeo maduro que, em AtRALF1, é responsável pelo processamento da pró-proteína e liberação do peptídeo maduro (MATOS et al., 2008). Os peptídeos AtRALF8, AtRALF9, AtRALF25 e AtRALF26 são pré-proteínas e possuem um total de 82, 75, 74 e 76 aminoácidos respectivamente (Figura 4).

Figura 4 - Alinhamento das sequências de aminoácidos dos precursores dos peptídeos AtRALF expressos em tecidos reprodutivos. O sublinhado mostra o peptídeo sinal predito. A seta aponta o local de processamento do pró-peptídeo. O duplo sublinhado mostra o peptídeo maduro. As cisteínas são indicadas por retângulos e asteriscos

Pearce et al. (2010) demonstraram que o motivo YISY é essencial para a atividade de alcalinização do peptídeo RALF. AtRALF34 apresenta o motivo intacto, enquanto AtRALF4 possui uma glicina em substituição à serina (Figura 4). AtRALF8 e AtRALF9 possuem uma treonina em substituição a serina, sendo que os outros aminoácidos do motivo são conservados. Os peptídeos AtRALF25 e AtRALF26 possuem a primeira tirosina, sendo a isoleucina substituída por uma leucina, com o restante do motivo estando ausente (Figura 4). Todos os peptídeos estudados possuem as quatro cisteínas que formam as duas pontes dissulfeto, essenciais para a atividade do peptídeo (Figura 4; PEARCE et al., 2001).

Utilizando o programa SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) fez-se uma predição da extensão do peptídeo sinal dos AtRALFs do presente estudo. AtRALF4 possuiria um peptídeo sinal com 23 aminoácidos, AtRALF8 e AtRALF9 possuiriam um peptídeo sinal com 28 aminoácidos, AtRALF25 e AtRALF26 teria 22 aminoácidos e os 25 primeiros aminoácidos no N-terminal da proteína AtRALF34 corresponderiam ao seu peptídeo sinal (Apêndice B). Quanto ao peptídeo maduro, o número de aminoácidos variaria entre as isoformas, sendo que os peptídeos AtRALF4, 8, 9, 25, 26 e 34 possuiriam 53, 54, 47, 52, 54 e 56 aminoácidos respectivamente.

Uma árvore filogenética gerada a partir da estrutura primária dos peptídeos maduros previstos mostra a formação de 3 grupos, cada qual com dois peptídeos: peptídeos AtRALF8

e AtRALF9, peptídeos AtRALF25 e AtRALF26 e peptídeos AtRALF4 e AtRALF34 (Figura 5).

Figura 5 - Árvore filogenética da estrutura primária dos peptídeos maduros dos AtRALFs encontrados em tecido reprodutivo. A árvore filogenética foi construída a partir do alinhamento das sequência do peptídeo maduro dos AtRALF4, 8, 9, 25, 26 e 34

4.1.3 Atividades de alcalinização, inibição da raiz primária, inibição da expansão do hipocótilo e mobilização de Ca^{2+} dos peptídeos AtRALF4, 25, 26 e 34

Desde a sua descoberta em 2001, os peptídeos RALFs vem sendo identificados como moléculas que causam uma rápida alcalinização do meio extracelular, a inibição do crescimento da raiz primária e da expansão do hipocótilo (MINGOSSO et al., 2010; PEARCE et al., 2001). Dentre os peptídeos do presente estudo, somente AtRALF34 causou alcalinização em meio de cultura de células em suspensão de arábido (Figura 6A-B; MORATO DO CANTO et al., 2014). Em 5 min, o tratamento com 1000 nM de AtRALF34 mostra uma alcalinização de 0,2 a mais que o controle, em 15 min esta alcalinização chega a 0,9 a mais que o controle. Com 30 min, a alcalinização causada por 1000 nM de AtRALF34 é de 1 unidade de pH a mais que o controle, passando para 1,2 unidades a mais em 60 min após o tratamento (Figura 6A). A figura 6B mostra a alcalinização provocada pelos peptídeos em células tratadas com diferentes concentrações, em 60 min. AtRALF34 incrementa 0,2, 0,9, 1 e 1,2 unidades de pH, quando aplicado em células na concentração de 10, 100, 500 e 1000 nM. Os peptídeos AtRALF4, 25 e 26 aumentam, no máximo, 0,1 unidades de pH.

Figura 6 - Análise das atividades de alcalinização, inibição da raiz primária, inibição da expansão do hipocótilo e mobilização de Ca²⁺ dos peptídeos AtRALF4, 25, 26 e 34. A) Ensaio de alcalinização de meio de cultura de células em suspensão. Células em suspensão foram tratadas com 1000 nM dos peptídeos AtRALF4, 25, 26 e 34 ou com água e o pH foi medido após 5, 15, 30 ou 60 min. Dados mostram o Δ pH. B) Ensaio de alcalinização de meio de cultura de células em suspensão. Células em suspensão foram tratadas com 10, 100, 500 ou 1000 nM dos peptídeos AtRALF4, 25, 26 ou 34 ou com água e o pH foi medido após 60 min. Dados mostram o Δ pH. C) Ensaio de inibição de raiz primária. Plantas de arábidoopsis com 2 d após a germinação foram colocadas em meio de cultura contendo 1 μ M dos peptídeos AtRALF4, 25, 26 ou 34 ou H₂O. Após mais 4 d o comprimento da raiz primária foi mensurado. Colunas mostram a média de uma repetição biológica (n = 60). Barras mostram o desvio padrão. Três repetições biológicas foram realizadas. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os genótipos (t test; ***p $\leq$ 0,0001). D) Ensaio de inibição de alongamento do hipocótilo. Meio de cultura com plantas de arábidoopsis com 2 d após a germinação no escuro tiveram 1 μ M dos peptídeos AtRALF4, 25, 26 ou 34 ou H₂O acrescentados. Após mais 2 d de crescimento no escuro o comprimento do hipocótilo foi mensurado. Colunas mostram a média de uma repetição biológica (n = 60). Barras mostram o desvio padrão. Três repetições biológicas foram realizadas. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os genótipos (t test; ***p $\leq$ 0,0001). E) Ensaio de mobilização de Ca²⁺. Cinética da mobilização de Ca²⁺ desencadeada pelos peptídeos AtRALF1, 4, 25, 26 e 34 após 30 s de tratamento. Colunas mostram a média obtida em três repetições. Barras mostram o desvio padrão. O experimento foi repetido pelo menos três vezes, com três replicatas biológicas por repetição.

A inibição do crescimento da raiz primária e da expansão do hipocótilo no escuro também somente ocorreu em plantas expostas ao peptídeo AtRALF34 (Figura 6C-D; MORATO DO CANTO et al., 2014). Na concentração de 1 μ M do peptídeo, a inibição de raiz causada por AtRALF34 foi de 44,6% (Figura 6C). Em plantas estioladas, a inibição causada por 1 μ M do peptídeo AtRALF34 foi de 39,3% (Figura 6D).

Os peptídeos AtRALF1 e AtRALF22 mobilizam Ca^{++} dos meios extracelular e intracelular (HARUTA et al., 2008; MORATO DO CANTO et al., 2014). Utilizando-se plantas transgênicas de arábida que expressam uma proteína luminescente sensor de Ca^{++} (JOHNSON; SHIMOMURA, 1972), foi possível monitorar *in vivo* a mobilização de Ca^{++} em plantas tratadas com os peptídeos. Somente o peptídeo AtRALF1, usado como controle, mostrou-se capaz de mobilizar Ca^{++} , nas concentrações de 10 e 100 nM do peptídeo (Figura 6E).

4.2 Peptídeo presente em ovários

4.2.1 Estudo da expressão do gene AtRALF34

Os dados de expressão gênica *in silico* de *AtRALF34* foram confirmados por análise quantitativa utilizando qPCR. Para gerar os resultados comparativos, à expressão do gene *AtRALF34* em raiz foi atribuído o valor arbitrário 1 (Figura 7). *AtRALF34* mostrou-se 14 vezes mais expresso em botões florais e flores quando comparado à expressão na raiz. A expressão em pistilos foi a mais elevada, sendo 20 vezes maior que a expressão em raiz. Ainda, o gene *AtRALF34* é expresso em folhas e siliques jovens e não apresenta expressão em grãos de pólen (Figura 7). Os dados estão de acordo com os observados nos dados *in silico* (Tabela 1 e Apêndice A).

Figura 7 - Análise de expressão do gene *AtRALF34* nos diversos tecidos de *Arabidopsis*. A expressão relativa do gene *AtRALF34* foi detectada através de qRT-PCR em raiz, hipocótilo, folha jovem, folha da roseta, folha da haste, haste, botão floral, flor, pistilo, pólen, siliqua e semente. Os dados representam a média encontrada em três repetições biológicas. As barras representam o desvio padrão encontrado entre as repetições. As repetições biológicas consistiram de três replicatas técnicas

4.2.2 Análise fenotípica do tecido reprodutivo de plantas que superexpressam ou silenciam o gene *AtRALF34*

Para obtenção de plantas com ausência de expressão do gene *AtRALF34*, buscou-se linhagens nocautes por inserção de T-DNA utilizando-se ferramentas de buscas disponíveis no TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*, <http://www.arabidopsis.org/>). Três mutantes foram encontrados: SALK_102494, com T-DNA inserido na região promotora; SALK_038321, com inserção na região codante do gene; e SALK_003116, com inserção na região 3'UTR (*Untranslated Region*) (Figura 8A). Das plantas SALK_038321 analisadas, nenhuma possuía inserção de T-DNA e, por esse motivo, não foram utilizadas em experimentos (Figura 8B). O mutante SALK_003116 teve a inserção de T-DNA e a homozigose confirmadas, porém, o gene *AtRALF34* se expressa normalmente nesses mutantes e, desta forma, este não foi utilizado nos experimentos (Figura 8B-C). A inserção do T-DNA foi confirmada em mutantes SALK_102494 em homozigose e a expressão gênica do *AtRALF34* foi 20% daquela observada em plantas selvagens (Figura 8B-D). Esse mutante será, de agora em diante, representado por *atralf34*. Para obter a superexpressão de *AtRALF34*, plantas com o gene sob regulação do promotor constitutivo 35S foram geradas

(35S:AtRALF34) (BERGONCI, 2012; RIBEIRO, 2014) e a elevada expressão do gene foi confirmada (Figura 8E).

Figura 8 - Verificação dos mutantes SALK para o gene *AtRALF34* e quantificação da expressão gênica de *AtRALF34* em mutantes *atralf34* e plantas 35S:*AtRALF34*. A) Esquema da localização das inserções de T-DNA no segmento de DNA onde se localiza o gene *AtRALF34*. A região cinza escura compreende a parte codante do gene, mostrando os códons de iniciação (ATG) e códon de parada da tradução (TAG). UTR: região não traduzida. Triângulos representam o T-DNA das linhagens SALK-102494, SALK_038321 e SALK_003116. As setas dentro dos triângulos representam a direção de inserção do T-DNA. B) Gel de agarose mostrando resultados da amplificação por PCR de DNA dos mutantes SALK. As amplificações foram feitas utilizando iniciadores para o gene *AtRALF34* e iniciador LBb1.3. *GAPDH* foi utilizado como controle. *GAPDH*: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. C) Gel de agarose mostrando análise de expressão gênica semi-quantitativa de *AtRALF34* nos mutantes com inserção confirmada. *GAPDH* foi utilizado como controle. D) Análise de expressão gênica quantitativa (qPCR) para o gene *AtRALF34* em mutantes SALK_102494 (*atralf34*) em comparação a plantas selvagens (WT). Colunas representam a média encontrada em três repetições. Barras representam o desvio padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os genótipos (*t* test; ****p* ≤ 0,0001). E) qPCR para o gene *AtRALF34* em plantas transgênicas 35S:*AtRALF34*(35SR34) em comparação a WT. Colunas representam a média encontrada em três repetições. Barras representam o desvio padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os genótipos (*t* test; ****p* ≤ 0,0001).

Porque *AtRALF34* é expresso em sépalas, pétalas e pistilo, o comprimento desses órgãos foi analisado (Figura 9). Na comparação com plantas selvagens, mutantes *atralf34* mostram um aumento de 6,8, 15 e 7,4% em sépalas, pétalas e pistilos respectivamente. Plantas 35S:*AtRALF34* mostram redução no comprimento desses órgãos quando comparadas a plantas selvagens, sendo que sépalas são 16% menores, pétalas são 11% menores e pistilos 7,5% (Figura 9). Quanto ao número de pétalas e sépalas, *atralf34* e 35S:*AtRALF34* possuem fenótipo idêntico ao de flores de plantas selvagens, sendo quatro sépalas e quatro pétalas por flor mostrando que *AtRALF34* não interfere na determinação desses órgãos florais (HUALA; SUSSEX, 1992).

Figura 9 - Comprimento de sépalas, pétalas e pistilo em mutantes *atralf34* e plantas 35S:*AtRALF34*. Sépalas, pétalas e pistilos de flores no estágio 15 foram coletados, alinhados, fotografados e mensurados utilizando-se o programa ImageJ. Colunas representam a média encontrada (n = 60). Barras representam o desvio padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os genótipos (*t* test; **p* ≤ 0,01). O experimento foi repetido pelo menos três vezes

O comprimento das siliques de plantas *atralf34* e 35S:*AtRALF34* foi avaliado em comparação a siliques de plantas selvagens. Siliques do mutante *atralf34* são 11,4% maiores que as de plantas selvagens, enquanto que as de plantas 35S:*AtRALF34* são 32,9% menores (Figura 10A). O número de óvulos não fecundados por síliqua foi também investigado. Mutantes *atralf34* apresentam menor número de siliques com todos os óvulos fecundados (30% contra 40% em plantas selvagens), e plantas 35S:*AtRALF34* apresentam 31% de siliques completas (Figura 10B). Em plantas selvagens, 31, 20 e 5% das siliques apresentam 1, 2 e 3 óvulos não fecundados por síliqua respectivamente. Plantas 35S:*AtRALF34* possuem 38, 7 e 5% das siliques com 1, 2 e 3 óvulos não fecundados respectivamente, enquanto que mutantes *atralf34* possuem 28, 22 e 8% das siliques com 1, 2 e

3 óvulos não fecundados respectivamente. A porcentagem de siliques com 4, 5 e 6 óvulos não fecundados em plantas selvagens é de 2,3, 1,1 e 0,6% respectivamente. Já em plantas 35S:AtRALF34, esses valores são de 8, 3 e 3% respectivamente, enquanto que em plantas *atralf34* são de 5, 3 e 2% respectivamente. Plantas selvagens não apresentam siliques com 7 ou 8 óvulos não fecundados por síliqua, enquanto plantas 35S:AtRALF34 apresentam 3 e 2% respectivamente. Plantas *atralf34* apresentam 1% de siliques com 7, e 1% de siliques com 8 óvulos não fecundados (Figura 10B).

Figura 10 - Análise do comprimento de siliques e número de óvulos não fecundados por síliqua em plantas *atralf34* e 35S:AtRALF34. A) Comprimento de síliqua. Siliques foram coletadas, fotografadas e mensuradas no programa ImageJ. Colunas representam a média encontrada ($n = 60$). Barras mostram o desvio padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os genótipos (t test; $*p \leq 0,01$, $**p \leq 0,001$). O experimento foi repetido pelo menos três vezes. B) Porcentagem de siliques com 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 óvulos não fecundados em plantas WT, *atralf34* e 35S:AtRALF34. Colunas representam a porcentagem encontrada ($n = 60$). Barras mostram o desvio padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os genótipos (t test; $*p \leq 0,01$, ns = não significativo)

Porque *AtRALF34* apresenta expressão em sementes foram analisados aspectos fenotípicos de sementes maduras. Quanto a forma das sementes, mutantes *atralf34* e plantas 35S:AtRALF34 não divergem das sementes de plantas selvagens (Figura 11A). Sementes de plantas *atralf34* apresentam mesmo comprimento, diâmetro, relação comprimento/diâmetro, área e peso de sementes de plantas selvagens (Figura 11B-F). Plantas 35S:AtRALF34 apresentam 23,8% menor comprimento de sementes que sementes de plantas selvagens (Figura 11B), com diâmetro 11,4% maior e área 15% menor (Figura 11C-E).

Quanto ao peso, sementes 35S:AtRALF34 são 10% mais leves que sementes de plantas selvagens (Figura 11F).

Figura 11 - Análise de sementes de plantas *atralf34* e 35S:AtRALF34. A) Fotos das sementes de WT, *atralf34* e 35S:AtRALF34. B) Comprimento da semente. C) Diâmetro da semente. D) Relação comprimento/diâmetro. E) Área da semente. F) Peso da semente. Colunas representam a porcentagem encontrada (n = 60). Barras mostram o desvio padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os genótipos (t test; *p ≤ 0,01, ns = não significativo)

O tempo de florescimento de plantas *atralf34* e 35S:AtRALF34 foi comparado com o tempo de florescimento de plantas selvagens (Tabela 2). Plantas *atralf34* apresentam florescimento tardio em relação às plantas selvagens, enquanto plantas 35S:AtRALF34 mostram florescimento precoce. Os fenótipos do tecido reprodutivo de plantas *atralf34* e 35S:AtRALF34 apresentam discretas diferenças em comparação as plantas selvagens.

Tabela 2 - Florescimento de plantas *atralf34* e 35S:AtRALF34. Dias para o florescimento, número de folhas da roseta na época do florescimento, e ramificações de inflorescência 6 semanas após a germinação de plantas de arabidopsis

	Dias para o florescimento	Folhas da roseta na época do florescimento	Ramificações de inflorescência após 6 semanas
WT	28,5 ± 2,3	14,0 ± 1,2	3,3 ± 0,9
<i>atralf34</i>	33,5 ± 1,0*	15,0 ± 1,1 ^{ns}	3,9 ± 0,7*
35S:AtRALF34	21,2 ± 1,9**	10,1 ± 1,0*	1,3 ± 0,5**

4.2.3 Análise da interação tubo polínico-óvulo em mutantes *atralf34* e plantas 35S:AtRALF34

Sabe-se que o gametófito feminino desempenha papel fundamental na indução da ruptura do tubo polínico para liberação das células espermáticas, e, também, impede que novos tubos polínicos entrem em um óvulo já penetrado (ROTMAN et al., 2003). Porque *AtRALF34* é expresso em ovário, buscou-se desvendar seu papel na interação tubo polínico-óvulo. Pistilos polinizados naturalmente e manualmente foram analisados. A polinização manual foi utilizada para se ter controle do número de grãos de pólen utilizados em cada pistilo. Como controle, além de plantas selvagens, foram utilizados mutantes *fer*, que apresentam diversos defeitos na recepção do tubo polínico pelo óvulo (DUAN et al., 2014). A análise de pistilos corados com azul de anilina mostrou que a entrada de tubos polínicos em óvulos de plantas 35S:AtRALF34 é semelhante a que ocorre em plantas selvagens, ou seja, um único tubo polínico penetra o óvulo, não ocorrendo entradas múltiplas de tubos em um óvulo (Figura 12A-C). Plantas 35S:AtRALF34 também apresentam crescimento normal do tubo polínico dentro do óvulo, o que indica que este se rompe ao encontrar uma das células sinérgidas (Figura 12F). Mutantes *atralf34* apresentaram 78,6% de óvulos com apenas um tubo polínico (Figura 12A e Figura 12D) sendo que em mutantes *fer*, somente 35,9% dos óvulos possuem apenas um tubo polínico (Figura 12A). Em *atralf34*, 15,8% dos óvulos

apresentam supercrescimento do tubo polínico (quando este não se rompe e continua crescendo deliberadamente dentro do óvulo), enquanto que em plantas selvagens esse número é de 2,1% e em *fer* 50,1% (Figura 12A, C, E e G). As entradas múltiplas de tubos polínicos em um óvulo ocorrem em 0,1% dos óvulos de plantas selvagens, 5,6% em mutantes *atralf34* e 14,0% em mutantes *fer* (Figura 12A-G). Óvulos de plantas *atralf34* apresentam anormalidade na recepção de tubos polínicos em menor quantidade que mutantes *fer*, mas significativamente em maior número que em plantas selvagens.

Figura 12 - Análise da interação óvulo-tubo polínico em plantas *atralf34* e 35S:AtRALF34. A) Defeitos na interação tubo polínico-óvulo. Colunas representam a porcentagem encontrada (n = 60). Barras mostram o desvio padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os genótipos (*t* test; **p* ≤ 0,01, ns = não significativo). B) Flor de arábidsopsis após polinização corada com azul de anilina. C) Óvulo de flor de plantas WT. D) Óvulo de flor de *atralf34* com entrada de apenas um tubo polínico. E) Óvulo de flor de plantas *atralf34* com entradas múltiplas de tubos polínicos. F) Óvulos de planta 35S:AtRALF34. G) Óvulo de flor de planta *fer* mostrando entradas múltiplas de tubos polínicos

4.2.4 Ensaio de crescimento do tubo polínico semi *in vivo* na presença do peptídeo AtRALF34

Biologicamente, quando o tubo polínico passa através do pistilo para alcançar o óvulo, ele recebe sinais advindos do tecido reprodutivo feminino. No crescimento do tubo polínico semi *in vivo*, grãos de pólen são colocados manualmente em um pistilo excisado, permitindo que o crescimento dos tubos polínicos comece no pistilo e termine em meio de cultura. O meio de cultura pode, então, conter moléculas que se deseja avaliar o efeito no crescimento do tubo polínico. Esta técnica possibilita que tubos polínicos cresçam através do pistilo (*in vivo*), alongando-se por uma certa distância, e emerjam na extremidade cortada, continuando o crescimento *in vitro* (CHEUNG; WANG; WU, 1995). O peptídeo AtRALF34, quando adicionado ao meio de cultura, causou a ruptura do tubo polínico.

A porcentagem de ruptura de tubos polínicos quando da adição do peptídeo cresce concomitantemente ao aumento na concentração deste, enquanto que a adição de meio de germinação de grãos de pólen rompe, no máximo, 6,6% dos tubos polínicos (Figura 13). Quando o peptídeo AtRALF1 (isoforma expressa em raízes) foi adicionado, apenas as concentrações de 1000 nM e 5000 nM mostraram rupturas com porcentagens acima de 6,6%, sendo estas de 10 e 9,9% respectivamente (Figura 13).

Figura 13 - Ensaio de crescimento de tubo polínico semi *in vivo* com o peptídeo AtRALF34. A) Tubos polínicos crescendo através do pistilo. B) Tubos polínicos após 120 s de tratamento com o peptídeo AtRALF34. Setas indicam tubos polínicos que se romperam. C) Tubos polínicos antes do tratamento com o peptídeo. D) Tubos polínicos 30 s após tratamento com o peptídeo. E) Tubos polínicos 60 s após o tratamento com o peptídeo. F) Porcentagem de ruptura de tubos polínicos em diferentes concentrações do peptídeo AtRALF34. Colunas representam a porcentagem encontrada (n = 300). Barras mostram o desvio padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os genótipos (*t* test; **p* ≤ 0,01, ns = não significativo)

Uma ruptura de 10,5% dos tubos polínicos é vista após 30 s da aplicação do peptídeo AtRALF34, sendo que após 60 s 18,5% dos tubos estão rompidos e em 120 s a ruptura é de 22,8% (Tabela 3). Nas concentrações de 25 e 50 nM do peptídeo AtRALF34 a porcentagem de ruptura de tubo polínico aos 30 s é de 18,8% e 17,8% respectivamente (Figura 13F). Após 60 s de tratamento, a taxa de ruptura é de 23,1 e 25% para as concentrações de 25 e 50 nM de AtRALF34 respectivamente. Com 120 s, ocorre ruptura de 25,9% dos tubos polínicos tratados com 25 nM e 28,5% dos tratados com 50 nM (Tabela 3). Quando da aplicação de 100 nM, em 30 s 23,5% dos tubos polínicos rompem, chegando a 29,4% de ruptura após 60 s e mantendo-se assim até o final do experimento (120 s). Com 250 nM do peptídeo, a porcentagem de ruptura do tubo polínico é de 31,1, 42,8 e 43,7% aos 30, 60 e 120 s respectivamente. Na aplicação de 500 nM de AtRALF34 ocorre a ruptura de 43,7% dos tubos polínicos no tempo de 30 s, chegando a 50% aos 60 s e permanecendo assim aos 120 s. No tratamento de tubos polínicos com 1000 nM, aos 30 s vê-se 69,2% de ruptura, e essa porcentagem se mantém aos 60 e 120 s. A dose de 5000 nM de AtRALF34 ocasionou 60,0% de ruptura de tubos polínicos aos 30 e 60 s, chegando a 72,2% aos 120 s (Figura 13F, Tabela 3). Em suma, AtRALF34 é capaz de romper tubos polínicos em concentrações tão baixas quanto 10 nM, sendo essa ruptura dose-dependente. A ruptura é instantânea e peptídeos não presentes em óvulo mimetizam a mesma resposta apenas em concentrações de 1 μ M ou mais.

Tabela 3 - Porcentagem de ruptura de tubos polínicos.

Peptídeo [nM]	% de ruptura de tubo polínico ao longo do tempo		
	30 seg	60 seg	120 seg
MGGP	6,6	6,6	6,6
HisAtRALF1			
10	6,2	6,2	6,2
25	5,9	5,9	5,9
50	3,6	5,8	5,8
100	4,2	4,9	4,9
250	6,0	6,0	6,0
500	5,2	5,5	5,5
1000	9,7	10,0	10,0
5000	8,0	9,8	9,9
HisAtRALF34			
10	10,5	18,5	22,8
25	18,8	23,1	25,9
50	17,8	25,0	28,5
100	23,5	29,4	29,4
250	31,1	42,8	43,7
500	43,7	50,0	50,0
1000	69,2	69,2	69,2
5000	72,2	72,2	72,2

4.2.4.1 Análise do papel do Ca^{++} no efeito do peptídeo AtRALF34 em tubos polínicos

O crescimento do tubo polínico é altamente dependente do gradiente de cálcio em seu citoplasma, como também da ativação de canais de cálcio e do balanço intra e extracelular do íon (HOLDAWAY-CLARKE; HEPLER, 2003). O bloqueio dos canais de cálcio impede o influxo do íon e limita a ruptura do tubo polínico (DUAN et al., 2014). Para saber se a ação do peptídeo AtRALF34 na ruptura do tubo polínico é cálcio dependente, reduções progressivas de Ca^{++} no meio de germinação de grãos de pólen foram feitas, concomitantemente a aplicação de diferentes concentrações do peptídeo. O meio de cultura de germinação de grãos de pólen tem CaCl_2 como única fonte de cálcio (BOAVIDA; MCCORMICK, 2007). Ensaios de crescimento de tubo polínico semi *in vivo* foram realizados com concentrações de 5, 2,5 e 1,0 mM de CaCl_2 no meio de cultura. A concentração padrão

de CaCl_2 no meio de cultura é de 5 mM. A diminuição na concentração de cálcio no meio faz com que os tubos polínicos cresçam menos. Sem a adição do peptídeo, o CaCl_2 na concentração de 2,5 mM inibe 26,7% do crescimento do tubo polínico, enquanto 1,0 mM inibe 45% (Figura 14A).

Figura 14 - Análise semi *in vivo* da ruptura de tubos polínicos causadas por AtRALF34 meios com diferentes concentrações de Ca^{++} . A) Análise de crescimento dos tubos polínicos em meio de germinação de pólen com 5, 2,5 e 1 mM de CaCl_2 . B) Porcentagem de tubos polínicos rompidos em diferentes concentrações do peptídeo AtRALF34, e meio com diferentes concentrações de CaCl_2 . Colunas representam a porcentagem encontrada ($n = 300$). Barras mostram o desvio padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os genótipos (t test; $*p \leq 0,01$, ns = não significativo)

O peptídeo AtRALF34 foi adicionado nas concentrações de 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 e 5000 nM. Em tubos polínicos crescidos sem a adição do peptídeo foi observada um percentual de 6,6% de ruptura de tubos (Figura 14B). Quando 10, 25 ou 50 nM de AtRALF34 foram adicionados ao meio contendo 2,5 mM ou 1,0 mM de CaCl_2 , o peptídeo causou rupturas semelhantes ao controle, com um máximo de 5,9% (Figura 14B). No meio de cultura com 1,0 mM de CaCl_2 e as concentrações de 100, 250, 500 ou 1000 nM do peptídeo, não foi observada ruptura superior ao controle. No entanto, na concentração de 5000 nM foi observada uma ruptura de 7,8% dos tubos polínicos. Nos experimentos realizados com 2,5 mM de CaCl_2 , os tratamentos com 100 ou 250 nM de AtRALF34 causaram 12,4 e 15,8% de ruptura respectivamente. Já no meio padrão, as concentrações de 100 ou 250 nM do peptídeo ocasionaram 23,5 e 31,1% de ruptura respectivamente. Nos tratamentos com 500, 1000 ou

5000 nM do peptídeo AtRALF34 foram observados, para o meio com 2,5 mM de CaCl_2 , 40,1, 62,2 e 50,1% de ruptura de tubo polínico respectivamente. Para as mesmas concentrações do peptídeo, em meio padrão, as taxas de ruptura foram de 49,7, 69,2 e 60% respectivamente (Figura 14B). Com os presentes resultados, é possível concluir que a atividade de ruptura do tubo polínico do AtRALF34 é dependente de Ca^{++} , pelo menos no meio extracelular. A baixa quantidade de Ca^{++} no meio faz com que seja necessária uma maior quantidade do peptídeo para o efeito de ruptura.

4.2.5 Tratamento do pistilo com o peptídeo AtRALF34

Para o tratamento do pistilo com o peptídeo AtRALF34 foi feita a excisão de pistilos e o pedicelo foi imerso em meio de germinação de grãos de pólen com ou sem o peptídeo. Após a polinização, os óvulos com e sem tratamento com o peptídeo (10 μM) não apresentaram diferenças entre si (Figura 15). Óvulos de plantas selvagens apresentam quantidade essencial do peptídeo para o rompimento de tubos polínicos e, por isso, não seria esperado um efeito aditivo.

Figura 15 - Efeito do peptídeo AtRALF34 em óvulos de pistilos tratados com DPI e Tiron. A) Defeitos na interação tubo polínico-óvulo em pistilos tratados com 10 μM de AtRALF34 (R34), 50 μM de DPI, 1 μM de AtRALF34 e 50 μM de DPI, 500 μM de DPI e 10 μM de AtRALF34 e 500 μM de DPI. B) Porcentagem de tubos polínicos com supercrescimento em óvulos de pistilos tratados com 10 μM de AtRALF34, 1 mM de Tiron, 1 μM de AtRALF34 e 1 mM de Tiron, 10 mM de Tiron e 10 μM de AtRALF34 e 10 mM de Tiron. Colunas representam a porcentagem encontrada ($n = 300$). Barras mostram o desvio padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os genótipos (t test; $*p \leq 0,01$, ns = não significativo)

Duan et al. (2014) mostraram que a inibição de espécies reativas de oxigênio (ROS) inibem a ruptura do tubo polínico, causando supercrescimento e entradas múltiplas dos tubos polínicos dentro do óvulo. Para investigar se o peptídeo AtRALF34 está envolvido na formação de ROS no gametófito feminino, pistilos foram tratados simultaneamente com cloreto de difenileno-iodônio (DPI), um inibidor da enzima produtora de ROS, NADPH oxidase (DUNAND; CREVECOEUR; PENEL, 2006). DPI efetivamente suprimiu a produção de ROS, causando supercrescimento e entradas múltiplas de tubos polínicos dentro do óvulo (Figura 15A). O efeito do DPI foi reduzido quando pistilos foram tratados simultaneamente com DPI e AtRALF34. Na concentração de 50 μ M de DPI, o supercrescimento ocorre em 42,6% dos óvulos, já no tratamento com DPI e 1 μ M AtRALF34, o supercrescimento é de 30%. A taxa de entradas múltiplas em óvulos quando os pistilos são alimentados com 50 μ M de DPI é de 5,2%, enquanto que no tratamento simultâneo com 1 μ M do peptídeo a taxa não é diferente do controle. Quando os pistilos são tratados com 500 μ M de DPI, as taxas de supercrescimento e entradas múltiplas de tubo polínico em óvulos são de 63,9 e 8,2% respectivamente. No tratamento com 500 μ M de DPI e 10 μ M de AtRALF34, essas taxas são de 28,5 e 3,1% para supercrescimento e entradas múltiplas respectivamente (Figura 15A).

Ainda com o intuito de entender a importância do peptídeo AtRALF34 na produção de ROS no óvulo, foi feito o tratamento de pistilos com Tiron, um eliminador de ROS (CAROL; DOLAN, 2006). O tratamento de pistilos com 1 mM de Tiron causou 22,1% de supercrescimento de tubos polínicos no óvulo, enquanto o tratamento simultâneo com 1 μ M de AtRALF34 causou 10,2% de supercrescimento (Figura 15B). Com 10 mM de Tiron, o supercrescimento de tubos polínicos no óvulo foi de 60,1%, contra 45,3% de supercrescimento no tratamento simultâneo com 10 μ M de AtRALF34. A suplementação com o peptídeo AtRALF34 de pistilos tratados com cloreto DPI reverteu parcialmente o supercrescimento de tubos polínicos em óvulos, sugerindo que AtRALF34 media a produção de ROS dependente de NADPH oxidase. A adição do peptídeo também reverte parcialmente o efeito sequestrador de ROS causado por aplicação de Tiron.

4.3 Peptídeos presentes em grãos de pólen e tubos polínicos

4.3.1 Estudo da expressão dos genes AtRALF4, 8, 9, 25 e 26

Os dados de expressão *in silico* para os genes *AtRALF4*, 8, 9, 25 e 26 foram confirmados por qPCR. Para fins comparativos, aos valores de expressão dos genes

encontrados na raiz foi atribuído o valor arbitrário de 1. A expressão de *AtRALF4* em flores foi aproximadamente 600 vezes maior que em raízes. *AtRALF8*, *AtRALF9*, *AtRALF25* e *AtRALF26* mostraram expressão gênica em flores aproximadamente 300 vezes mais elevada que em raízes (Figura 16A). Em grãos de pólen, a expressão encontrada para os AtRALFs avaliados foi de 890, 880, 1002, 965 e 947 unidades de expressão relativa respectivamente (Figura 16A-E). A expressão de todos os AtRALFs estudados também foi determinada para siliquas e sementes e os valores encontrados foram 45 para *AtRALF4* até 154 para *AtRALF26* em siliqua, e entre 69 para *AtRALF4* e 189 para *AtRALF26* em sementes (Figura 16F).

Figura 16 - Análise de expressão quantitativa (qPCR) dos *AtRALF4*, 8, 9, 25 e 26 nos diferentes tecidos de *arabidopsis*. A) Expressão relativa do gene *AtRALF4* B) *AtRALF8* C) *AtRALF9* D) *AtRALF25* E) *AtRALF26* em raiz (RA), hipocótilo (HI), folha jovem (FJ), folha da roseta (FR), folha da haste (FH), haste (HA), botão floral (BF), flor (FL), pistilo (PI) e pólen (PO). F) Expressão relativa dos genes *AtRALF4*, 8, 9, 25 e 26 em siliqua e semente, comparados a expressão da raiz. Colunas representam a média de três repetições biológicas. Barras representam o desvio padrão. As repetições biológicas foram realizadas contendo três replicatas técnicas

Para determinar o estágio em que *AtRALF26* é expresso em grãos de pólen, plantas transgênicas carregando uma construção cujo promotor do gene *AtRALF26* foi fusionado a proteína verde fluorescente (GFP) foram analisadas (Figura 17). Anteras de flores nos estágios 11, 12, 13 e 14 (SMYTH; BOWMAN; MEYEROWITZ, 1990) foram observadas utilizando-se microscópio confocal. A fluorescência emitida pela GFP foi detectada a partir do estágio 12 sendo mais intensa nos estágios 13 e 14 (Figura 17).

Figura 17 - Análise da expressão do promotor do gene *AtRALF26* nas anteras de flores de plantas transgênicas pAtRALF26:GFP em diferentes estágios de desenvolvimento. Botões florais de *Arabidopsis* foram analisados nos estágios 11 (papilas do estigma aparentes), 12 (pétalas nivelas com longos estames), 13 (abertura do botão floral, pétalas visíveis) e 14 (longas anteras que se estendem acima do estigma). A sobreposição da fase de contraste/fluorescência está representada nos painéis superiores. A fluorescência é mostrada nos painéis inferiores. Para a visualização da GFP foi utilizado o laser de excitação de 488 nm e filtro de emissão entre 500 e 530 nm. Plantas selvagens foram utilizadas como controle (WT)

4.3.2 Mutantes *atralf4*, *atralf25* e *atralf26*

4.3.2.1 Análise fenotípica do tecido vegetativo, raiz e hipocótilo dos mutantes *atralf4*, *atralf25* e *atralf26*

Dois mutantes por inserção de T-DNA foram encontrados para o gene *AtRALF4*, ambos com inserção na região codante do gene (SALK_016969 e SALK_016970). A linhagem SALK_016969 foi confirmada estar em homozigose e sem expressão do gene *AtRALF4* em grãos de pólen (Figura 18A-C). Essa linhagem é chamada de agora em diante de *atralf4*. A linhagem SALK_016970 não apresentou a inserção do T-DNA (Figura 18B). Para o gene *AtRALF25* três linhagens foram analisadas. A linhagem com inserção de T-DNA na região promotora, SALK_065523 é homozigota e a expressão do gene *AtRALF25* mostrou-se nula (Figura 18D-F). Os acessos CS816633 e CS835333, com inserções de T-DNA na região codante do gene, não apresentaram a inserção e não foram utilizadas nos experimentos (Figura 18E). A linhagem SALK_065523 foi denominada *atralf25*. O acesso SALK_059781, que apresenta inserção de T-DNA na região promotora do gene *AtRALF26* é também homozigota e a expressão do gene é nula (Figura 18G-I). Esta linhagem foi denominada *atralf26*.

Figura 18 - Análise de mutantes SALK para os genes *AtRALF4*, 25 e 26. A) Esquema da inserção dos SALK_016969 e SALK_016970 na região do DNA onde se encontra o gene *AtRALF4*. B) Análise de inserção de T-DNA e verificação de homozigose para o gene *AtRALF4*. C) Análise de expressão de *AtRALF4* em pólen de plantas selvagens (WT) e mutantes SALK_016969. D) Esquema da inserção dos SALK_016969, CSXXXXXX e CS016970 na região do DNA onde se encontra o gene *AtRALF25*. E) Gel de agarose mostrando resultado de PCR para amplificar a inserção de T-DNA e verificar homozigose. F) Gel de agarose mostrando análise de expressão de *AtRALF25* em grãos de pólen de plantas WT e mutantes SALK_XXXXXX. G) Esquema da inserção dos SALK_016969 na região do DNA onde se encontra o gene *AtRALF26*. H) Gel de agarose mostrando amplificação de T-DNA e verificação de homozigose. I) Gel de agarose mostrando análise de expressão do gene *AtRALF26* em grãos de pólen de plantas WT e SALK_XXXXXX

O comprimento das folhas da roseta, folhas da haste, haste, raiz primária e hipocótilo foram avaliados não foram observadas diferenças significativas entre os mutantes e plantas selvagens (Figura 19A-E). Também foram feitas medições de comprimento do hipocótilo de plantas estioladas e os valores também não diferiram de plantas selvagens (Figura 19F). Os resultados obtidos indicam que a ausência dos genes *ATRALF4*, *ATRALF25* e *ATRALF26* não afeta o comprimento e a expansão da parte aérea e subterrânea de *arabidopsis*. Estes resultados são condizentes com a expressão gênica ser restrita aos tecidos reprodutivos.

Figura 19 - Análise fenotípica dos mutantes *atralf4*, *atralf25* e *atralf26*. A) Comprimento de raiz. B) Comprimento de haste. C) Comprimento de folha da roseta. D) Comprimento de folha da haste. E) Comprimento do hipocótilo. F) Comprimento do hipocótilo em plantas estioladas. Análise fenotípica dos mutantes *atralf4*, *atralf25* e *atralf26*. A) Comprimento de raiz. B) Comprimento de haste. C) Comprimento de folha da roseta. D) Comprimento de folha da haste. E) Comprimento do hipocótilo. F) Comprimento do hipocótilo em plantas estioladas

4.3.2.2 Análise fenotípica do tecido reprodutivo dos mutantes *atralf4*, *atralf25* e *atralf26*

A análise fenotípica das sépalas, pétalas e estames dos mutantes *atralf4*, *atralf25* e *atralf26* mostrou que estes órgãos são idênticos aos das plantas selvagens (Figura 20). O número de sépalas, pétalas e estames nesses mutantes também não mostrou alteração.

Figura 20 - Comprimento de sépalas, pétalas e estames em mutantes *atralf4*, *atralf25* e *atralf26*. Colunas representam a média encontrada em um repetição biológica (n = 60). Barras mostram o desvio padrão. Colunas representam a média encontrada em um repetição biológica (n = 60). Barras mostram o desvio padrão

O comprimento das siliquas dos mutantes também foi avaliado, sendo que *atralf4* apresenta uma redução de 10,6% no comprimento de suas siliquas quando comparado com as de plantas selvagens (Figura 21A). O mutante *atralf25* tem siliquas 26,9% menores e o *atralf26* apresenta siliquas 18,7% menores que as de plantas selvagens (Figura 21A).

Figura 21 - Análise do comprimento de siliqua e número de óvulos não fecundados por siliqua em mutantes *atralf4*, *atralf25* e *atralf26*. A) Comprimento de siliqua. Siliqua foram coletadas, fotografadas e mensuradas no programa ImageJ. Colunas representam a média encontrada (n = 60). Barras mostram o desvio padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os genótipos (t test; *p ≤ 0,01, **p ≤ 0,001). O experimento foi repetido pelo menos três vezes. B) Porcentagem de siliqua com 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 óvulos não fecundados em plantas WT, *atralf34* e 35S:AtRALF34. Colunas representam a porcentagem encontrada (n = 60). Barras mostram o desvio padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os genótipos (t test; *p ≤ 0,01, ns = não significativo)

Em plantas selvagens, o número de siliqua que possuem todos os óvulos fecundados chega a 40%, em mutantes *atralf4*, *atralf25* e *atralf26*, essa taxa é de 22, 23 e 27,3% respectivamente (Figura 21B). Siliqua com 1, 2 e 3 óvulos não fecundados em plantas selvagens são 31, 20 e 5%, respectivamente, enquanto que para o mutante *atralf4* estes valores são 38, 22 e 6,0% respectivamente. Já o mutante *atralf25* apresenta 38, 15 e 5,0% de siliqua com 1, 2 e 3 óvulos não fecundados respectivamente. O mutante *atralf26* possui 42, 10 e 4% de siliqua com 1, 2 e 3 óvulos não fecundados respectivamente. Siliqua com 4, 5 e 6 óvulos não fecundados representam 2,3, 1,1 e 0,6% em plantas selvagens respectivamente.

Em mutantes *atralf4*, os valores observados foram de 3,0, 2,0 e 1,9%. Em plantas *atralf25* e *atralf26* foram observados percentuais de 8,0, 3,0 e 3,0%, e 5,6, 2,3 e 2,8%. Nos 3 mutantes avaliados foram encontradas siliquas com 7 e 8 óvulos não fecundados, tal situação não é observada em plantas selvagens (Figura 21B). Os resultados encontrados sugerem que a ausência dos peptídeo AtRALF4, 25 ou 26 diminuem o sucesso na fertilização.

AtRALF4, *AtRALF25* e *AtRALF26* são expressos em sementes, e sementes dos mutantes *atralf4*, *atralf25* e *atralf26* apresentam forma diferente das sementes de plantas selvagens (Figura 22A). O peso das sementes é 30, 25 e 20% menor em mutantes *atralf4*, *atralf25* e *atralf26* respectivamente (Figura 22B). A área das sementes também é menor em todos os mutantes, apresentando uma redução de 15,0 para os *atralf4* e *atralf25*, e de 20% para o *atralf26* (Figura 22C). Quanto ao comprimento das sementes, apenas mutantes *atralf25* apresentam diferenças significativas em relação as sementes de plantas selvagens, são 15,2% mais compridas (Figura 22D) e com diâmetro 11,4% maior (Figura 22E). O diâmetro de sementes de mutantes *atralf4* não diferiu significativamente de sementes de plantas selvagens, enquanto que *atralf26* apresentou uma redução de 17,2% (Figura 22E). A relação comprimento/diâmetro não mostrou diferenças significativas nos mutantes em comparação com sementes de plantas selvagens (Figura 22F).

Figura 22 - Análise de sementes de mutantes *atralf4*, *atralf25* e *atralf26*. A) Fotos das sementes de WT, *atralf34* e 35S:AtRALF34. B) Comprimento da semente. C) Diâmetro da semente. D) Relação comprimento/diâmetro. E) Área da semente. F) Peso da semente. Colunas representam a porcentagem encontrada (n = 60). Barras mostram o desvio padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os genótipos (*t* test; **p* ≤ 0,01, ns = não significativo)

O tempo de florescimento dos mutantes *atralf4* e *atralf26* foi menor em 3 e 5 dias respectivamente (Tabela 4). O mutante *atralf25* não apresentou diferenças quanto a plantas selvagens. O número de folhas na roseta na época do florescimento e o número de ramificações da inflorescência não diferiram dos mutantes para plantas selvagens (Tabela 4).

Tabela 4 - Florescimento de plantas *atralf4*, *atralf25* e *atralf26*. Dias para o florescimento, número de folhas da roseta na época do florescimento, e ramificações de inflorescência após 6 semanas de vida de plantas de Arabidopsis

	Dias para o florescimento	Folhas da roseta na época do florescimento	Ramificações de inflorescência após 6 semanas
WT	$28,5 \pm 2,3$	$14,0 \pm 1,2$	$3,3 \pm 0,9$
<i>atralf4</i>	$25,5 \pm 2,0^*$	$15,0 \pm 2,1^{ns}$	$3,5 \pm 0,7^{ns}$
<i>atralf25</i>	$27,2 \pm 1,2^{ns}$	$14,1 \pm 2,0^{ns}$	$3,3 \pm 0,8^{ns}$
<i>atralf26</i>	$23,5 \pm 3,2^*$	$13,2 \pm 1,4^{ns}$	$3,4 \pm 2,2^{ns}$

4.3.2.3 Crescimento do tubo polínico em mutantes *atralf4*, *atralf25* e *atralf26*

Grãos de pólen de mutantes *atralf4*, *atralf25* e *atralf26* foram avaliados quanto a germinação *in vitro* e no ensaio semi *in vivo*. No experimento *in vitro*, a germinação dos grãos de pólen dos mutantes foi de 10 a 11% menor do que em plantas selvagens (Figura 23A). O comprimento dos tubos polínicos dos mutantes não diferiu significativamente do comprimento dos tubos polínicos das plantas selvagens (Figura 23B).

Figura 23 - Germinação de grãos de pólen e crescimento de tubo polínico *in vitro* e *in vivo* de mutantes *atralf4*, *atralf25* e *atralf26*. A) Germinação de grãos de pólen *in vitro*. B) Comprimento do tubo polínico em condições *in vitro*. C) Germinação de grãos de pólen semi *in vivo*. D) Crescimento do tubo polínico em ensaio semi *in vivo*. Colunas representam as médias encontradas em um experimento (n = 90). Barras mostram o desvio padrão. Os experimentos foram repetidos pelo menos 3 vezes

No ensaio de crescimento do tubo polínico semi *in vivo*, no mutante *atralf4* germinaram 16,6% dos grãos de pólen, enquanto que nos mutantes *atralf25* e *atralf26* foi observada uma germinação de 20 e 23,3% respectivamente (Figura 23C). Grãos de pólen de plantas selvagens tiveram 86,6% de germinação. Em comparação a plantas selvagens, o comprimento dos tubos polínicos crescidos através do pistilo foi 21,3, 25,4 e 24,2% menor para os mutantes *atralf4*, *atralf25* e *atralf26* respectivamente (Figura 23D). A baixa germinação dos grãos de pólen e a menor elongação dos mutantes no sistema semi *in vivo* podem explicar parcialmente o menor número de óvulos fertilizados em siliques destes.

4.3.3 Localização subcelular do peptídeo AtRALF4

O gene *AtRALF4* foi fusionado ao gene que codifica a proteína GFP e a expressão da quimera *AtRALF4-GFP* foi dirigida pelo promotor LAT52, oriundo de tomateiro, que regula a expressão gênica durante o desenvolvimento do gametófito masculino (TWELL; YAMAGUCHI; MCCORMICK, 1990). Grãos de pólen de arábida foram bombardeados com a construção pLAT52:AtRALF4-GFP e observados após 2 h de crescimento. O peptídeo foi localizado nos grãos de pólen e também ao longo do tubo polínico (Figura 24A). Quanto a localização subcelular de AtRALF4, no tubo polínico em processo de alongamento, foi observada fluorescência em estruturas de movimentação rápida e semelhantes ao Golgi (Figura 24B-C). Quando o processo de elongação termina, AtRALF4 mostra predominância na ponta do tubo polínico (Figura 24D-E).

Figura 24 - Localização subcelular do peptídeo AtRALF4. A) Imagens de microscopia confocal mostram um tubo polínico em processo de elongação com sinal de fluorescência podendo ser observado ao longo do citosol. B) Organelas de alta motilidade podem ser vistas no citosol. C) Aproximação da imagem, mostrando estruturas semelhantes ao complexo de Golgi. D) e E) Mostram um tubo polínico elongado, com sinais de fluorescência visualizados somente na ponta do tubo polínico. F) Comparação do comprimento de tubos polínicos transformados com as construções pLAT52:GFP ou pLAT52:AtRALF4-GFP após 2 h, 3 h, 4 h, 5 h e 6 h de crescimento

O comprimento dos tubos polínicos transformados com a construção pLAT52:AtRALF4-GFP foram mensurados. Como controle, também foram mensurados tubos polínicos transformados com a construção pLAT52:GFP. Após 2 h de crescimento, tubos polínicos transformados com AtRALF4 mostraram uma expansão 33,3% menor que o controle (Figura 24F). Em 3 h, 4 h e 5 h após a germinação, os tubos polínicos transformados com AtRALF4 são 27,5%, 18,5% e 20,8% menores que os controles. A taxa de expansão

mais lenta dos tubos polínicos transformados com o peptídeo é mantida até o completo alongamento do tubo, 6 h após a germinação, quando esses são 21,9% menores que o controle (Figura 24F). Os dados sugerem que o aumento na expressão do AtRALF4 em grãos de pólen retardam a germinação ou o alongamento do tubo polínico.

4.3.4 Germinação e crescimento do tubo polínico na presença dos peptídeos AtRALF4, AtRALF25 e AtRALF26

4.3.4.1 Ensaio do crescimento do tubo polínico *in vitro* na presença dos peptídeos AtRALF4, AtRALF25 e AtRALF26

Para tentar desvendar o papel dos peptídeos AtRALF4, AtRALF25 e AtRALF26 nos grãos de pólen e tubos polínicos, foram realizados experimentos de germinação e crescimento *in vitro*. Grãos de pólen de plantas selvagens foram germinados em meio de cultura contendo diferentes concentrações de AtRALF4, AtRALF25 e AtRALF26. Como controle, foram utilizados água e o peptídeo presente em raízes AtRALF1. Os meios de cultura contendo água ou AtRALF1, em qualquer concentração, apresentaram mais que 70% de grãos de pólen germinados (Figura 25). Quando grãos de pólen foram germinados em meios de cultura contendo 1 nM de AtRALF4, AtRALF25 ou AtRALF26, a germinação dos grãos de pólen foi 62,2, 64,3 e 63,2% respectivamente. Os três peptídeos na concentração de 5 nM apresentaram germinação de grãos de pólen de 30,2, 32,2 e 34,9% para AtRALF4, AtRALF25 e AtRALF26 respectivamente. Com 10 nM, a germinação dos grãos de pólen para os peptídeos AtRALF4, AtRALF25 e AtRALF26 foi de 16,2, 14,1 e 13,8% respectivamente (Figura 25).

Figura 25 - Ensaio de inibição de germinação de grãos de pólen. A) Porcentagem de grãos de pólen não germinados, germinados e não viáveis. B) Fotos das lâminas mostrando a germinação dos tubos polínicos nos tratamentos com diferentes peptídeos

Tubos polínicos de 3 diferentes tamanhos foram tratados com os peptídeos AtRALFs para verificar a sensibilidade desses em decorrência de seu comprimento (Figura 26). Na concentração de 10 nM os peptídeos AtRALF4, AtRALF25 e AtRALF26 inibiram o crescimento do tubo polínico com 50 μm . Em tubos polínicos com 100 μm e 200 μm não

ocorreu inibição (Figura 26B). Quando 50 nM dos peptídeos são utilizados, a inibição do crescimento dos tubos polínicos ocorre quando estes medem 50 μm e uma inibição parcial é observada quando estes medem 100 μm (23,6, 24,5 e 25,3% para AtRALF4, AtRALF25 e AtRALF26 respectivamente). Tubos polínicos com 200 μm são insensíveis aos peptídeos nesta concentração (Figura 26C). Os tubos polínicos com 50 μm e 100 μm tratados com 100 nM dos peptídeos tiveram seu crescimento inibido. Tubos polínicos com 200 μm apresentaram uma inibição de 30,2, 40,1 e 36,5% para AtRALF4, AtRALF25 e AtRALF26 respectivamente (Figura 26D). Os resultados mostram que a ação inibitória dos peptídeos AtRALFs analisados existe enquanto os tubos polínicos estão iniciando o alongamento. Conforme os tubos polínicos apresentam maior comprimento, maior a dose do peptídeo a ser usada para inibir o crescimento deste.

Figura 26 - Tratamento de tubos polínicos com diferentes comprimentos com diferentes doses dos peptídeos AtRALF4, 25 e 26. A) Comprimento do tubo polínico após x horas de comprimento. B) Tubos polínicos com 50, 100 e 200 μm tratados com 10 nM dos peptídeos AtRALF4, 25 e 26. C) Comprimento de tubos polínicos com 50, 100 e 200 μm antes e depois dos tratamentos com 50 nM dos peptídeos AtRALF4, 25 e 26. D) Comprimento de tubos polínicos com 50, 100 e 200 μm antes e depois dos tratamentos com 100 nM dos peptídeos AtRALF4, 25 e 26

4.3.4.2 Ensaio de crescimento de tubo polínico semi *in vivo* na presença dos peptídeos AtRALF4, AtRALF25 e AtRALF26

Os resultados do crescimento dos tubos polínicos expostos aos peptídeos no ensaio semi *in vivo* mostraram que a partir da concentração de 100 nM dos peptídeos ocorre inibição no crescimento (Figura 27). O peptídeo AtRALF4 inibiu 26,2%, enquanto AtRALF25 e AtRALF26 inibiram 37,6 e 34,9% respectivamente. Com 250 nM, os tubos polínicos tiveram 41,4, 49,5 e 29% de inibição para os tratamentos com AtRALF4, 25 e 26 respectivamente. Quando 500 nM do peptídeo AtRALF4 foi adicionado, a inibição no crescimento dos tubos polínicos foi de 73,9%, enquanto que a inibição com o AtRALF25 foi

de 67,3% e de 62,9% com o AtRALF26. O tratamento com 750 nM de AtRALF4 inibiu 80,7%, e a inibição com AtRALF25 e AtRALF26 foi de 71,9 e 68,0% respectivamente. Os tubos polínicos tiveram o crescimento inibido em 100% quando foram tratados com 1000 nM de qualquer um dos três peptídeos. Os resultados sugerem que os peptídeos AtRALF4, 25 e 26 atuam inibindo o alongamento dos tubos polínicos.

Figura 27 - Ensaio semi *in vivo* com tubos polínicos tratados com os peptídeos AtRALF4, 25 e 26. A) Comprimento do tubo polínico após x horas de comprimento. B) Tubos polínicos com 50, 100 e 200 μm tratados com 10 nM dos peptídeos AtRALF4, 25 e 26. C) Comprimento de tubos polínicos com 50, 100 e 200 μm antes e depois dos tratamentos com 50 nM dos peptídeos AtRALF4, 25 e 26. D) Comprimento de tubos polínicos com 50, 100 e 200 μm antes e depois dos tratamentos com 100 nM dos peptídeos AtRALF4, 25 e 26

Em concentrações altas dos peptídeos AtRALF4, AtRALF25 ou AtRALF26, os tubos polínicos começaram a se romper (Figura 28). Na concentração de 750 nM, o peptídeo AtRALF4 e AtRALF26 induziram 10% de rupturas dos tubos polínicos, enquanto AtRALF25 rompeu 12%. Quando tubos polínicos são tratados com 1000 nM de AtRALF4, 15,1% deles se rompem, enquanto que nos tratamentos com AtRALF25 ou AtRALF26 são observadas taxas de 14,5 e 16,9% de rompimento respectivamente. No tratamento com 2000 nM dos peptídeos AtRALF4, AtRALF25 ou AtRALF26, foi observado 18,9, 21 e 20,3% de rompimento dos tubos polínicos respectivamente. Quando 5000 nM do peptídeo AtRALF4 foi aplicado, 22,0% dos tubos polínicos se romperam. Na mesma concentração, AtRALF25 ou AtRALF26 romperam 23 e 25,8% dos tubos polínicos respectivamente. A ação de rompimento dos tubos polínicos dos AtRALF4, 25 e 26 só é vista em concentrações elevadas e, dessa maneira, parece não ser um efeito fisiológico.

Figura 28 - Ensaio semi *in vivo* mostrando que altas concentrações dos peptídeos AtRALF4, 25 e 26 rompem tubo polínico. A) Comprimento do tubo polínico após x horas de comprimento. B) Tubos polínicos com 50, 100 e 200 µm tratados com 10 nM dos peptídeos AtRALF4, 25 e 26. C) Comprimento de tubos polínicos com 50, 100 e 200 µm antes e depois dos tratamentos com 50 nM dos peptídeos AtRALF4, 25 e 26. D) Comprimento de tubos polínicos com 50, 100 e 200 µm antes e depois dos tratamentos com 100 nM dos peptídeos AtRALF4, 25 e 26

4.3.4.3 Importância do Ca^{2+} no efeito dos peptídeos AtRALF4, AtRALF25 e AtRALF26 em tubos polínicos

Para entender a relação do Ca^{2+} no efeito dos peptídeos AtRALF4, AtRALF25 ou AtRALF26, o ensaio de crescimento de tubo polínico *semi in vivo* foi realizado utilizando-se três diferentes concentrações de CaCl_2 no meio de germinação de grãos de pólen (5,0, 2,5 e

1 mM). Porque o crescimento do tubo polínico é dependente de Ca^{2+} , a retirada de 50% da fonte de cálcio do meio (2,5 mM) inibiu 26,7% do alongamento do tubo em relação ao meio de germinação padrão com 5 mM (Figura 13A). No outro meio, com 80% de retirada da fonte de cálcio (1 mM), a inibição do crescimento foi de 45% (Figura 13A).

Para fins comparativos, o crescimento dos tubos polínicos em cada uma das concentrações de CaCl_2 foi considerado como sendo 100% de crescimento. Quando 100 nM do peptídeo AtRALF4 foi adicionado ao meio de germinação padrão (5,0 mM de CaCl_2), o alongamento do tubo polínico foi 73,7%, enquanto que em meio com 2,5 ou 1 mM de CaCl_2 foi igual ao controle (Figura 29A). Com 250 nM do peptídeo AtRALF4, o crescimento do tubo polínico foi de 58,4, 87,8 e 99,4% para as concentrações de 5, 2,5 e 1 mM de CaCl_2 respectivamente. Na concentração de 500 nM, o crescimento foi 26, 48 e 80,1% para as concentrações de 5, 2,5 e 1 mM de CaCl_2 respectivamente. Quando foi aplicado 750 nM do peptídeo em meio de germinação contendo 5, 2,5 ou 1 mM de CaCl_2 , o crescimento do tubo polínico foi de 19,2, 29,1 e 38,2% respectivamente. Na aplicação de AtRALF4 nas concentrações de 1000 nM ou 2000 nM, não houve crescimento do tubo polínico em meio de germinação padrão (5,0 mM de CaCl_2). Já em meio de germinação com 2,5 mM de CaCl_2 , os tubos polínicos cresceram 25% e 23% para as concentrações de 1000 nM e 2000 nM do peptídeo respectivamente. Quando o peptídeo AtRALF4 foi aplicado nas concentrações de 1000 nM ou 2000 nM, em meio de germinação contendo 1 mM de CaCl_2 , o crescimento do tubo polínico foi de 36 e 33,4% respectivamente (Figura 29A).

Figura 29 - A) Comprimento do tubo polínico após x horas de comprimento. B) Tubos polínicos com 50, 100 e 200 μ m tratados com 10 nM dos peptídeos AtRALF4, 25 e 26. C) Comprimento de tubos polínicos com 50, 100 e 200 μ m antes e depois dos tratamentos com 50 nM dos peptídeos AtRALF4, 25 e 26. D) Comprimento de tubos polínicos com 50, 100 e 200 μ m antes e depois dos tratamentos com 100 nM dos peptídeos AtRALF4, 25 e 26

Quanto ao tratamento com o peptídeo AtRALF25, as concentrações de 100, 250, 500 e 750 nM apresentaram, em meio de germinação padrão (5 mM de CaCl_2), crescimento do tubo polínico de 61,3, 41,1, 20% e 11,5% respectivamente. Não foi observado crescimento nas concentrações de 1000 ou 2000 nM. Já em meio de germinação contendo 2,5 mM de CaCl_2 , as concentrações do peptídeo AtRALF25 de 100, 250, 500, 750, 1000 e 2000 nM mostraram crescimento de tubo polínico de 95,2, 89,9, 80,5, 78,6, 75 e 60,4% respectivamente. Em meio de germinação contendo 1 mM de CaCl_2 e AtRALF25 nas concentrações de 100, 250, 500, 750, 1000 e 2000 nM os tubos polínicos cresceram 100, 100, 97,2, 90, 89,7 e 91,2 respectivamente (Figura 29B).

Quando o peptídeo AtRALF26 foi adicionado ao meio com 5 mM de CaCl_2 nas concentrações de 100, 250, 500, 750, 1000 e 2000 nM, os tubos polínicos cresceram 62,9, 56, 23,2, 17,9, 0 e 0% respectivamente. Para o meio de germinação contendo 2,5 mM de CaCl_2 , o crescimento dos tubos polínicos foi de 89,9, 87,8, 78, 59,1, 55 e 53% para as concentrações de 100, 250, 500, 750, 1000 e 2000 nM do peptídeo respectivamente. Com meio de germinação com 1 mM de CaCl_2 , o crescimento foi 100, 99,4, 98,1, 78,2, 68,4 e 65,6% para as concentrações de 100, 250, 500, 750, 1000 e 2000 nM do AtRALF26 respectivamente (Figura 29C).

A concentração de Ca^{++} no meio também influenciou em relação à ruptura de tubos polínicos tratados com concentrações altas dos peptídeos. Quando os tubos polínicos foram tratados com 1, 2, 5 ou 10 μM de AtRALF4, em meio contendo 5 mM de CaCl_2 , a ruptura de tubos polínicos foi de 15,1, 18,9, 22 e 30% respectivamente. Para a concentração de 2,5 mM de CaCl_2 , a ruptura foi de 12,9, 16,2, 19 e 23,8% para 1, 2, 5 ou 10 μM de AtRALF4 respectivamente. Com 1 mM de CaCl_2 , a ruptura para os tratamentos com 1, 2, 5 ou 10 μM foi de 9,9, 10,1, 17 e 19,1% respectivamente (Figura 30A).

Figura 30 - A) Comprimento do tubo polínico após x horas de comprimento. B) Tubos polínicos com 50, 100 e 200 μ m tratados com 10 nM dos peptídeos AtRALF4, 25 e 26. C) Comprimento de tubos polínicos com 50, 100 e 200 μ m antes e depois dos tratamentos com 50 nM dos peptídeos AtRALF4, 25 e 26. D) Comprimento de tubos polínicos com 50, 100 e 200 μ m antes e depois dos tratamentos com 100 nM dos peptídeos AtRALF4, 25 e 26

Quando o peptídeo AtRALF25 foi aplicado em meio de germinação contendo 1 mM de CaCl_2 , o efeito de ruptura do tubos polínicos não foi visto em nenhuma das concentrações utilizadas (Figura 30B). Em meio de germinação contendo 2,5 mM de CaCl_2 , 10 μM rompeu 9,9% dos tubos polínicos, enquanto que o meio com 5 mM rompeu 30,1% dos tubos. As demais concentrações do peptídeo não romperam tubos polínicos germinados em meio com 2,5 mM de CaCl_2 .

Em meio de germinação de pólen contendo 1 mM de CaCl_2 , 10 μM de AtRALF26 rompeu 10,2% dos tubos polínicos, as demais concentrações não causaram ruptura (Figura 30C). Em meio de germinação contendo 2,5 mM de CaCl_2 , 10 μM do peptídeo rompeu 18,9% dos tubos polínicos, 5 μM rompeu 13,2%, 2 μM rompeu 12,1% e 1 μM rompeu 9,9%. Para o meio com 5,0 mM de CaCl_2 , a taxa de ruptura foi de 31,8, 25,8, 20,3 e 16,9% para as concentrações de 10, 5, 2 e 1 μM do peptídeo respectivamente (Figura 30C).

4.3.4.4 Regulação das proteínas semelhantes à calmodulina em mutantes *atralf4*, *atralf25* e *atralf26*

Para buscar outros elementos da via de sinalização dos peptídeos AtRALFs em pólen, a expressão de duas proteínas semelhantes a CALMODULINAS (CALMODULIN-LIKE, CML24 e CML39) foi analisada em grãos de pólen de mutantes *atralf4*, *atralf25* e *atralf26*. CML24 teve sua expressão reduzida em 15, 14 e 10% nos mutantes *atralf4*, *atralf25* e *atralf26* respectivamente (Figura 31). CML39 mostrou redução na expressão em 30,5, 45,8 e 33,2% em grãos de pólen de mutantes *atralf4*, *atralf25* e *atralf26* respectivamente, quando comparados aos grãos de pólen de plantas selvagens (Figura 31).

Figura 31 - Análise de expressão de grãos de pólen de mutantes *atralf4*, *atralf25* e *atralf26* quanto a expressão dos genes *CML24* e *CML39*. A)

5 DISCUSSÃO

Os peptídeos RALF já foram isolados em diversas espécies, e as isoformas estudadas estão, em sua grande maioria, relacionadas ao desenvolvimento (MURPHY; DE SMET, 2014). A expressão de genes RALF em tecidos reprodutivos parece ser algo comum nas mais variadas espécies onde o peptídeo foi identificado. Os peptídeos AtRALF8 e AtRALF9 apresentam elevada similaridade entre si. E BoRALF1 e BcRALF, presentes somente em pólen, apresentam mais de 70% de similaridade ao peptídeo AtRALF9 (LI; NIE; CAO, 2011; ZHANG; WU; WANG, 2010).

A alcalinização é uma característica presente em diversos peptídeos RALF já estudados. Morato do Canto et al. (2014) mostraram que oito, das nove isoformas estudadas pelos autores, alcalinizam meio de cultura de células em suspensão, entre elas a isoforma AtRALF34. A isoforma AtRALF4 não apresenta essa atividade, igualmente a AtRALF25 e AtRALF26. Células em suspensão se assemelham a células de raízes, o que pode explicar a falta de atividade de peptídeos expressos em pólen em promover alcalinização (MENGES; MURRAY, 2002). Curiosamente, Covey et al. (2010), estudando SIPRALF, isoforma presente em pólen, encontraram que o peptídeo consegue alcalinizar células em suspensão de *arabidopsis*. Para a atividade de alcalinização, juntamente com a mobilização de Ca^{++} , é possível que para os AtRALF4, 25 e 26, estas aconteçam durante a germinação e alongação do tubo polínico. Da mesma maneira, AtRALF34 talvez possa mobilizar Ca^{++} durante a interação óvulo-tubo polínico.

A comunicação célula a célula é essencial durante o desenvolvimento do óvulo e o processo de fecundação. AtRALF34 parece ser um bom candidato na contribuição de sinalização de alguns eventos relacionados a esses aspectos. AtRALF34 é similar a ScRALF3, um peptídeo envolvido na comunicação entre os gametófitos feminino e masculino em *S. chacoense* (CHEVALIER et al., 2013). O supercrescimento do tubo polínico ocorre em mais de 50% dos óvulos em mutantes *fer* e *lre* (DUAN et al., 2014; TSUKAMOTO et al., 2010). Em *atralf34*, aproximadamente 20% dos óvulos apresentam esse fenótipo. A alta quantidade de óvulos com fecundação normal em *atralf34* pode ser explicada pela presença de outras isoformas do peptídeo estarem presentes, como AtRALF14 e AtRALF18 (YU; HOGAN; SUNDARESAN, 2005). Em *fer*, a baixa quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) impede que os tubos polínicos se rompam e fecundem o óvulo, causando o supercrescimento (DUAN et al., 2014). A ausência do peptídeo AtRALF34 parece estar diretamente ligada a

baixa produção de ROS e, conseqüentemente, mutantes *atralf34* possuem óvulos com supercrescimento de tubo polínicos.

Os experimentos semi *in vivo* sugerem fortemente que o peptídeo AtRALF34 é responsável pela ruptura do tubo polínico que chega ao óvulo, possibilitando a fecundação. Esse processo é dependente de Ca^{++} no meio extracelular e isso sugere que eventos no tubo polínico podem estar envolvidos. Contudo, a quase instantânea ruptura dos tubos polínicos sob exposição do peptídeo sugere que poucos eventos de sinalização citoplasmática nestes são necessários. A abertura de canais de Ca^{++} está relacionada com o desequilíbrio imediato entre turgor e resistência da parede celular do tubo polínico. A ausência do peptídeo em *atralf34* pode diminuir o surgimento de Ca^{++} no gametófito feminino, inibindo o rompimento do tubo polínico mediado pelo íon.

Recentemente, foi demonstrado que FER é receptor do peptídeo AtRALF1 e que a proteína âncora LLG1 é necessária para que as respostas á AtRALF1-FER ocorram (HARUTA et al., 2014; LI et al., 2015). Por *atral34* apresentar defeitos na interação óvulo-tubo polínico semelhantes, embora mais suaves, aos vistos em *fer*, poderia se especular que FER é receptor de AtRALF34. Morato do Canto et al. (2014) sugerem que AtRALF1 e AtRALF34 não possuem os mesmos receptores ou, pelo menos, em caso de mais de um receptor por peptídeo, um deles é diferente. Assim, a possibilidade de AtRALF34 ter como receptor uma outra RLK não é descartada.

O crescimento celular em plantas requer um constante balanço entre a extensibilidade da parede celular, para possibilitar a expansão, e sua rigidez, proporcionando integridade (COSGROVE, 2005). Os peptídeos AtRALF4, 25 e 26 parecem ser importantes para a que esse balanço seja mantido. O contato com os peptídeos faz com que tubos polínicos interrompam a elongação. A regulação negativa de crescimento é comum a vários RALFs estudados (MATOS et al., 2008; MINGOSSO et al., 2010; PEARCE et al., 2001). O fato dos peptídeos AtRALF4, 25 e 26 inibirem germinação de grãos de pólen e elongação do tubo polínico mostra que essas etapas do desenvolvimento do gametófito masculino são auto regulatórias. Outros peptídeos regulam positivamente esses aspectos, como a fitosulfoquina- α , que estimula germinação e crescimento do pólen e é, igualmente aos AtRALFs estudados, produzido em pólen (CHEN; MATSUBAYACHI; SAKAGAMI, 2000). A presença de várias isoformas durante a formação do grão de pólen e elongação do tubo polínico indica que esses peptídeos regulam o desenvolvimento do gametófito masculino de maneira tecido-temporal específica.

Os mutantes *atralf4*, *atralf25* e *atralf26* apresentam baixa germinação de grãos de pólen e menor elongação do tubo polínico. Um maior número de óvulos não fecundados por silíqua também foi verificado. Um fenótipo mais indicativo poderia ser encontrado em um triplo mutante. Mutantes para os receptores pólen-específico *anx1* e *anx2* são normais, enquanto duplos mutantes *anx1/anx2* são macho estéreis (MIYAZAKI et al., 2009). Os mutantes *myb*, que não possuem as proteínas pólen-específicas responsáveis pela recepção do tubo polínico, só apresentam fenótipo no triplo mutante (LIANG et al., 2013).

Embora a dinâmica de produção e processamento endógeno dos peptídeos do presente estudo sejam ainda desconhecidas, os resultados indicam que a pré-pró-proteína do *AtRALF4* entra pelo processo de endomembranas, onde pode ser processado no sítio dibásico similar a *AtRALF1* e *AtRALF23* (MATOS et al., 2008; SRIVASTAVA et al., 2009). Os resultados sugerem que *AtRALF4* é secretado e age no meio extracelular, se ligando a um receptor para mediar as respostas de inibição. Os peptídeos *AtRALF4*, 25 e 26, provavelmente tem receptores pólen-específicos. Na família das RLKs, *ANX1* e *ANX2* podem ser bons candidatos aos receptores dos peptídeos RALF em pólen.

6 CONCLUSÃO

A análise da estrutura populacional a partir dos SNPs gerados por GBS evidenciou a distinção entre os acessos de feijoeiro de acordo com o *pool* gênico, confirmada, igualmente, pela estimativa do coeficiente de parentesco, também realizada a partir da informação genotípica. Ademais, percebeu-se uma tendência de agrupamento entre os acessos provenientes da mesma instituição de melhoramento, principalmente aqueles provenientes do IAC.

REFERÊNCIAS

- AALEN, R.B.; WILDHAGEN, M.; STØ, I.M.; BUTENKO, M.A. IDA: a peptide ligand regulating cell separation processes in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 17, p. 5253-5261, 2013. DOI: 10.1093/jxb/ert338.
- ALVAREZ-BUYLLA, E.R.; BENÍTEZ, M.; CORVERA-POIRÉ, A.; CADOR, A.C.; FOLTER, S.; BUEN, A.G.; GARAY-ARROYO, A.; GARCÍA-PONCE, B.; JAIMES-MIRANDA, F.; PÉREZ-RUIZ, R.V.; PIÑEYRO-NELSON, A.; SÁNCHEZ-CORRALES, Y.E. Flower development. **The Arabidopsis Book**, Washington, v. 8, p. e0127, 2010. DOI: 10.1199/tab.0127.
- ATKINSON, N.J.; LILLEY, C.J.; URWIN, P.E. Identification of genes involved in the response of *Arabidopsis* to simultaneous biotic and abiotic stresses. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 162, n. 4, p. 2028-2041, 2013. DOI: 10.1104/pp.113.222372.
- BECKER, J.D.; BOAVIDA, L.C.; CARNEIRO, J.; HAURY, M.; FEIJÓ, J.A. Transcriptional profiling of *Arabidopsis* tissues reveals the unique characteristics of the pollen transcriptome. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 133, n. 2, p. 713-725, 2003. DOI: 10.1104/pp.103.028241.
- BERGONCI, T. **Análise funcional dos peptídeos RALF em Arabidopsis**: avaliação do efeito do hormônio brassinolide em plantas superexpressoras e silenciadas para os genes *AtRALF1* e *AtRALF34*. 2012. 78 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- BERGONCI, T.; SILVA-FILHO, M.C.; MOURA, D.S. Antagonistic relationship between *AtRALF1* and brassinosteroid regulates cell expansion-related genes. **Plant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 9, n. 10, p. e976146, 2014. DOI: 10.4161/15592324.2014.976146.
- BERGONCI, T.; RIBEIRO, B.; CECILIATO, P.H.O.; GUERRERO-ABAD, J.C.; SILVA-FILHO, M.C.; MOURA, D.S. *Arabidopsis thaliana* RALF1 opposes brassinosteroid effects on root cell elongation and lateral root formation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, n. 8, p. 2219-2230, 2014. DOI: 10.1093/jxb/eru099.
- BOAVIDA, L.C.; McCORMICK, S. Temperature as a determinant factor for increased and reproducible *in vitro* pollen germination in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 52, n. 3, p. 570-582, 2007. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2007.03248.x.
- BOCK, K.W.; HONY, D.; WARD, J.W.; PADMANABAN, S.; NAWROCKI, E.P.; HIRSCHI, K.D.; TWELL, D.; SZE, H. Integrating membrane transport with male gametophyte development and function through transcriptomics. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 140, n. 4, p. 1151-1168, 2006. DOI: 10.1104/pp.105.074708.
- BOSCH, M.; CHEUNG, A. Y.; HEPLER, P. K. Pectin methylesterase, a regulator of pollen tube growth. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 138, n. 3, p. 1334-1346, 2005. DOI: 10.1104/pp.105.059865

CANTO, A.M.; CECILIATO, P.H.O.; RIBEIRO, B.; MOREA, F.A.O.; GARCIA, A.A.F.; SILVA-FILHO, M.C.; MOURA, D.S. Biological activity of nine recombinant AtRALF peptides: implications for their perception and function in *Arabidopsis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 75, p. 45-54, 2014. DOI: 10.1016/j.plaphy.2013.12.005.

CAO, J.; SHI, F. Evolution of the *RALF* gene family in plants: gene duplication and selection patterns. **Evolutionary Bioinformatics Online**, Auckland, v. 8, p. 271-292, 2012. DOI: 10.4137/EBO.S9652.

CAROL, R.J.; DOLAN, L. The role of reactive oxygen species in cell growth: lessons from root hairs. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 8, p. 1829-1834, 2006. DOI: 10.1093/jxb/erj201.

CHAE, K.; LORD, E.M. Pollen tube growth and guidance: roles of small, secreted proteins. **Annals of Botany**, Oxford, v. 108, n. 4, p. 627-636, 2011. DOI: 10.1093/aob/mcr015.

CHAIWANON, J.; WANG, W.; ZHU, J-Y.; OH, E.; WANG, Z-Y. Information integration and communication in plant growth regulation. **Cell**, Cambridge, v. 164, n. 6, p. 1257-1268, 2016. DOI: 10.1016/j.cell.2016.01.044.

CHEUNG, A.Y.; WU, H-M. Structural and signaling networks for the polar cell growth machinery in pollen tubes. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 547-572, 2008. DOI: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092921.

_____. THESEUS1, FERONIA and relatives: a family of cell wall-sensing receptor kinases? **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.14, n.6, p.632-641, 2011. DOI: 10.1016/j.pbi.2011.09.001

CHEUNG, A.Y.; CHEN, C.Y-H.; TAO, L-Z.; ANDREYEVA, T.; TWELL, D.; WU, H-M. Regulation of pollen tube growth by Rac-like GTPases. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 380, p. 73-81, 2003. DOI: 10.1093/jxb/erg044.

CHEUNG, A.Y.; CHEN, C. Y-H.; GLAVEN, R.H.; GRAAF, B.H.J.; VIDALI, L.; HEPLER, P.K.; WU, H-M. Rab2 GTPase regulates vesicle trafficking between the endoplasmic reticulum and the golgi bodies and is important to pollen tube growth. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 4, p. 945-962, 2002. DOI: 10.1105/tpc.000836.

CHEVALIER, E.; LOUBERT-HUDON, A.; MATTON, D.P. ScRALF3, a secreted RALF-like peptide involved in cell-cell communication between the sporophyte and the female gametophyte in a solanaceous species. **The Plant Cell**, Rockville, v. 73, n. 6, p. 1019-1033, 2013. DOI: 10.1111/tpj.12096.

CLOUGH, S.J.; BENT, A.F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 16, n. 6, p. 735-743, 1998. DOI: 10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x.

COMBIER, J-P.; KÜSTER, H.; JOURNET, E-P.; HOHNJEC, N.; GAMAS, P.; NIEBEL, A. Evidence for the involvement in nodulation of the two small putative regulatory peptide-encoding genes *MtRALFL1* and *MtDVLI*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 21, n. 8, p. 1118-1127, 2008. DOI: 10.1094/MPMI-21-8-1118.

COSGROVE, D.J. Plant expansins: diversity and interactions with plant cell walls. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 25, p. 162-172, 2015. DOI: 10.1016/j.pbi.2015.05.014.

COVEY, P.A.; SUBBAIAH, C.C.; PARSONS, R.L.; PEARCE, G.; LAY, F.T.; ANDERSON, M.A.; RYAN, C.A.; BEDINGER, P.A. A pollen-specific RALF from tomato that regulates pollen tube elongation. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 153, n. 2, p. 703-715, 2010. DOI: 10.1104/pp.110.155457.

CZYZEWICZ, N.; YUE, K.; BEECKMAN, T.; De SMET, I. Message in a bottle: small signalling peptide outputs during growth and development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 17, p. 5281-5296, 2013. DOI: 10.1093/jxb/ert283.

DIXIT, R.; RIZZO, C.; NASRALLAH, M.; NASRALLAH, J. The *Brassica MIP-MOD* gene encodes a functional water channel that is expressed in the stigma epidermis. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.45, n.1, p.51-62, 2001. DOI: 10.1023/A:1006428007826

DRESSELHAUS, T.; FRANKLIN-TONG, F. Male–female crosstalk during pollen germination, tube growth and guidance, and double fertilization. **Molecular Plant**, Oxford, v. 6, n. 4, p. 1018-1036, 2013. DOI: 10.1093/mp/sst061.

DUAN, Q.; KITA, D.; JOHNSON, E.A.; AGGARWAL, M.; GATES, L.; WU, H-M.; CHEUNG, A.Y. Reactive oxygen species mediate pollen tube rupture to release sperm for fertilization in *Arabidopsis*. **Nature Communications**, London, v. 5, n. 3129, p. 1-10, 2014. DOI: 10.1038/ncomms4129.

DUNAND, C.; CRÈVECOEUR, M.; PENEL, C. Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. **New Phytologist**, Oxford, v. 174, n. 2, p. 332-341, 2007. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2007.01995.x.

ESCOBAR-RESTREPO, J-M.; HUCK, N.; KESSLER, S.; GAGLIARDINI, V.; GHEYSELINCK, J.; YANG, W-C.; GROSSNIKLAUS, U. The FERONIA receptor-like kinase mediates male-female interactions during pollen tube reception. **Science**, New York, v. 317, n. 5838, p. 656-660, 2007. DOI: 10.1126/science.1143562.

GERMAIN, H.; CHEVALIER, É.; CARON, S.; MATTON, D.P. Characterization of five RALF-like genes from *Solanum chacoense* provides support for a developmental role in plants. **Planta**, Berlin, v. 220, n. 3, p. 447-454, 2005. DOI: 10.1007/s00425-004-1352-0.

HANAHAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 166, n. 4, p. 557-580, 1983. DOI: 10.1016/S0022-2836(83)80284-8.

HARPER, J. F.; BRETON, G.; HARMON, A. Decoding Ca^{2+} signals through plant protein kinases. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.55, p.263-288, 2004. DOI: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141627

HARUTA, M.; CONSTABEL, C.P. Rapid alkalization factors in poplar cell cultures. Peptide isolation, cDNA cloning, and differential expression in leaves and methyl jasmonate-

treated cells. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 131, n. 2, p. 814-823, 2003. DOI: 10.1104/pp.014597.

HARUTA, M.; MONSHAUSEN, G.; GILROY, S.; SUSSMAN, M.R. A cytoplasmic Ca^{2+} functional assay for identifying and purifying endogenous cell signaling peptides in *Arabidopsis* seedlings: identification of AtRALF1 peptide. **Biochemistry**, Washington, v. 47, n. 24, p. 6311-6321, 2008. DOI: 10.1021/bi8001488.

HARUTA, M.; SABAT, G.; STECKER, K.; MINKOFF, B.B.; SUSSMAN, M.R. A peptide hormone and its receptor protein kinase regulate plant cell expansion. **Science**, New York, v. 343, n. 6169, p. 408-411, 2014. DOI: 10.1126/science.1244454.

HIMSCHOOT, E.; BEECKMAN, T.; FRIML, J.; VANNESTE, S. Calcium is an organizer of cell polarity in plants. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, Amsterdam, v. 1853, n. 9, p. 2168-2172, 2015. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2015.02.017.

HISCOCK, S.J.; ALLEN, A.M. Diverse cell signalling pathways regulate pollen-stigma interactions: the search for consensus. **New Phytologist**, Oxford, v. 179, n. 2, p. 286-317, 2008. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2008.02457.x.

HOCHMAL, A.K.; SCHULZE, S.; TROMPELT, K.; HIPPLER, M. Calcium-dependent regulation of photosynthesis. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, Amsterdam, v. 1847, n. 9, p. 993-1003, 2015. DOI: 10.1016/j.bbabbio.2015.02.010.

HOLDAWAY-CLARKE, T.L.; HEPLER, P.K. Control of pollen tube growth: role of ion gradients and fluxes. **New Phytologist**, Oxford, v. 159, n. 3, p. 539-563, 2003. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2003.00847.x.

HOLMES, P.; GOFFARD, N.; WEILLER, G.F.; ROLFE, B.G.; IMIN, N. Transcriptional profiling of *Medicago truncatula* meristematic root cells. **BMC Plant Biology**, London, v. 8, n. 21, p. 11-22, 2008. DOI: 10.1186/1471-2229-8-21.

HUALA, E.; SUSSEX, I.M. Leafy interacts with floral homeotic genes to regulate *Arabidopsis* floral development. **The Plant Cell**, Rockville, v. 4, n. 8, p. 901-913, 1992. DOI: 10.1105/tpc.4.8.901.

HUCK, N.; MOORE, J.M.; FEDERER, M.; GROSSNIKLAUS, U. The *Arabidopsis* mutant *feronia* disrupts the female gametophytic control of pollen tube reception. **Development**, Cambridge, v. 130, n. 10, p. 2149-2159, 2003. DOI: 10.1242/dev.00458.

IVANOV, R.; FOBIS-LOISY, I.; GAUDE, T. When no means no: guide to Brassicaceae self-incompatibility. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.15, n.7, p.387-394, 2010. DOI: 10.1016/j.tplants.2010.04.010

JOHNSON, M.A.; PREUSS, D. Plotting a course: multiple signals guide pollen tubes to their targets. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 2, n. 3, p. 273-281, 2002. DOI: 10.1016/S1534-5807(02)00130-2.

JOHNSTON, A.J.; MEIER, P.; GHEYSELINCK, J.; WUEST, S.E.; FEDERER, M.; SCHLAGENHAUF, E.; BECKER, J.D.; GROSSNIKLAUS, U. Genetic subtraction profiling

identifies genes essential for *Arabidopsis* reproduction and reveals interaction between the female gametophyte and the maternal sporophyte. **Genome Biology**, London, v. 8, n. 10, R204, 2007. DOI: 10.1186/gb-2007-8-10-r204.

KENDE, H.; ZEEVAART, J.A.D. The five “classical” plant hormones. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 7, p. 1197-1210, 1997. DOI: 10.1105/tpc.9.7.1197.

KIM, S.; MOLLET, J-C.; DONG, J.; ZHANG, K.; PARK, S-Y.; LORD, E.M. Chemocyanin, a small basic protein from the lily stigma, induces pollen tube chemotropism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 26, p. 16125-16130, 2003. DOI: 10.1073/pnas.2533800100.

LAMESCH, P.; BERARDINI, T.Z.; LI, D.; SWARBRECK, D.; WILKS, C.; SASIDHARAN, R.; MULLER, R.; DREHER, K.; ALEXANDER, D.L.; GARCIA-HERNANDEZ, M.; KARTHIKEYAN, A.S.; LEE, C.H.; NELSON, W.D.; PLOETZ, L.; SINGH, S.; WENSEL, A.; HUALA, E. The Arabidopsis information resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 40, n. D1, p. D1202-D1210, 2012. DOI: 10.1093/nar/gkr1090.

LI, C.; YEH, F-L.; CHEUNG, A.Y.; DUAN, Q.; KITA, D.; LIU, M-C.; MAMAN, J.; LUU, E.J.; WU, B.W.; GATES, L.; JALAL, M.; KWONG, A.; CARPENTER, H.; WU, H-M. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins as chaperones and co-receptors for FERONIA receptor kinase signaling in Arabidopsis. **eLife**, Cambridge, v. 4, p. e06587, 2015. DOI: 10.7554/eLife.06587.

LI, Y.; NIE, C.; CAO, J. Isolation and characterization of a novel *BcMF14* gene from *Brassica campestris* ssp. *chinensis*. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 38, n. 3, p. 1821-1829, 2011. DOI: 10.1007/s11033-010-0298-5.

LI, Y.L.; DAI, X.R.; YUE, X.; GAO, X-Q.; ZHANG, X.S. Identification of small secreted peptides (SSPs) in maize and expression analysis of partial *SSP* genes in reproductive tissues. **Planta**, Berlin, v. 240, n. 4, p. 713-728, 2014. DOI: 10.1007/s00425-014-2123-1.

LINDSEY, K.; CASSON, S.; CHILLEY, P. Peptides: new signalling molecules in plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, n. 2, p. 78-83, 2002. DOI: 10.1016/S1360-1385(01)02194-X.

MA, W.; BERKOWITZ, G.A. The grateful dead: calcium and cell death in plant innate immunity. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 9, n. 11, p. 2571-2585, 2007. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2007.01031.x.

MARSCH-MARTÍNEZ, N.; FOLTER, S. Hormonal control of the development of the gynoecium. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 29, p. 104-114, 2016. DOI: 10.1016/j.pbi.2015.12.006.

MASACHIS, S.; SEGORBE, D.; TURRÀ, D.; LEON-RUIZ, M.; FÜRST, U.; EL GHALID, M.; LEONARD, G.; LÓPEZ-BERGES, M.S.; RICHARDS, T.A.; FELIX, G.; Di PIETRO, A. A fungal pathogen secretes plant alkalinizing peptides to increase infection. **Nature Microbiology**, New York, v. 1, n. 16043, p. 21-30, 2016. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2016.43.

MATOS, J.L.; FIORI, C.S.; SILVA-FILHO, M.C.; MOURA, D.S. A conserved dibasic site is essential for correct processing of the peptide hormone AtRALF1 in *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 582, n. 23/24, p. 3343-3347, 2008. DOI: 10.1016/j.febslet.2008.08.025.

MATSUBAYASHI, Y.; SAKAGAMI, Y. Peptide hormones in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 649-674, 2006. DOI: 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144204.

MENG, L.; FELDMAN, L.J. CLE14/CLE20 peptides may interact with CLAVATA2/CORYNE receptor-like kinases to irreversibly inhibit cell division in the root meristem of *Arabidopsis*. **Planta**, Berlin, v. 232, n. 5, p. 10161-1074, 2010. DOI: 10.1007/s00425-010-1236-4.

MINGOSSO, F.B.; MATOS, J.L.; RIZZATO, A.P.; MEDEIROS, A.H.; FALCO, M.C.; SILVA-FILHO, M.C.; MOURA, D.S. SacRALF1, a peptide signal from the grass sugarcane (*Saccharum* spp.), is potentially involved in the regulation of tissue expansion. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 73, n. 3, p. 271-281, 2010. DOI: 10.1007/s11103-010-9613-8.

MURPHY, E.; De SMET, I. Understanding the RALF family: a tale of many species. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 19, n. 10, p. 664-671, 2014. DOI: 10.1016/j.tplants.2014.06.005.

MURPHY, E.; SMITH, S.; De SMET, I. Small signaling peptides in *Arabidopsis* development: how cells communicate over a short distance. **The Plant Cell**, Rockville, v. 24, n. 8, p. 3198-3217, 2012. DOI: 10.1105/tpc.112.099010.

NASRALLAH, J.B.; STEIN, J.C.; KANDASAMY, M.K.; NASRALLAH, M.E. Signaling the arrest of pollen tube development in self-incompatible plants. **Science**, New York, v. 266, n. 5190, p. 1505-1508, 1994. DOI: 10.1126/science.266.5190.1505.

OLSEN, A.N.; MUNDY, J.; SKRIVER, K. Peptomics, identification of novel cationic *Arabidopsis* peptides with conserved sequence motifs. **In Silico Biology**, Amsterdam, v. 2, n. 4, p. 441-451, 2002.

PARK, C. H.; KIM, T-W.; SON, S-H.; HWANG, J-Y.; LEE, S. C.; CHANG, S. C.; KIM, S-H.; KIM, S. W.; KIM, S-K. Brassinosteroids control *AtEXPA5* gene expression in *Arabidopsis thaliana*. **Phytochemistry**, Oxford, n.71, v.4, p.380-387, 2010. DOI: 10.1016/j.phytochem.2009.11.003

PARK, S-Y.; JAUH, G-Y.; MOLLET, J-C.; ECKARD, K. J.; NOTHNAGEL, E. A.; WALLING, L. L.; LORD, E. M. A lipid transfer-like protein is necessary for lily pollen tube adhesion to an in vitro stylar matrix. **The Plant Cell**, Rockville, v.12, n.1, p.151-163, 2000. DOI: 10.1105/tpc.12.1.151

PEARCE, G.; MOURA, D.S.; STRATMANN, J.; RYAN Jr., C.A. RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 22, p. 12843-12847, 2001. DOI: 10.1073/pnas.201416998.

PEARCE, G.; YAMAGUCHI, Y.; MUNSKE, G.; RYAN, C.A. Structure-activity studies of RALF, Rapid Alkalinization Factor, reveal an essential - YISY - motif. **Peptides**, New York, v. 31, n. 11, p. 1973-1977, 2010. DOI: 10.1016/j.peptides.2010.08.012.

RIBEIRO, B. **Análise funcional de peptídeos AtRALFs foliares e purificação por afinidade de proteínas que interagem com o AtRALF1 in planta**. 2014. 77 p. Dissertação (Mestrado Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

ROTMAN, N.; ROZIER, F.; BOAVIDA, L.; DUMAS, C.; BERGER, F.; FAURE, J-E. Female control of male gamete delivery during fertilization in *Arabidopsis thaliana*. **Current Biology**, London, v. 13, n. 5, p. 432-436, 2003. DOI: 10.1016/S0960-9822(03)00093-9.

RUSSELL, S.D. Double fertilization. **International Review of Cytology**, New York, v. 140, p. 357-388, 1992. DOI: 10.1016/S0074-7696(08)61102-X.

RYAN, C.A.; PEARCE, G.; SCHEER, J.; MOURA, D.S. Polypeptide hormones. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, suppl. 1, S251-S264, 2002. DOI: 10.1105/tpc.010484.

SCHEER, J.M.; PEARCE, G.; RYAN, C.A. *LeRALF*, a plant peptide that regulates root growth and development, specifically binds to 25 and 120 kDa cell surface membrane proteins of *Lycopersicon peruvianum*. **Planta**, Berlin, v. 221, n. 5, p. 667-674, 2005. DOI: 10.1007/s00425-004-1442-z.

SCHMID, M.; DAVISON, T.S.; HENZ, S.R.; PAPE, U.J.; DEMAR, M.; VINGRON, M.; SCHÖLKOPF, B.; WEIGEL, D.; LOHMANN, J.U. A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. **Nature Genetics**, New York, v. 37, n. 5, p. 501-506, 2005. DOI: 10.1038/ng1543.

SCHOPFER, C. R.; NASRALLAH, M. E.; NASRALLAH, J. B. The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. **Science**, New York, v.286, n.5445, p.1697-1700, 1999. DOI: 10.1126/science.286.5445.1697

SHARMA, A.; HUSSAIN, A.; MUN, B-G.; IMRAN, Q.M.; FALAK, N.; LEE, S-U.; KIM, J.Y.; HONG, J.K.; LOAKE, G.J.; ALI, A.; YUN, B-W. Comprehensive analysis of plant rapid alkalization factor (RALF) genes. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 106, p. 82-90, 2016. DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.03.037.

SHIMIZU, K.K.; OKADA, K. Attractive and repulsive interactions between female and male gametophytes in *Arabidopsis* pollen tube guidance. **Development**, Cambridge, v. 127, n. 20, p. 4511-4518, 2000.

SILVERSTEIN, K.A.T.; GRAHAM, M.A.; VANDENBOSCH, K.A. Novel paralogous gene families with potential function in legume nodules and seeds. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 9, n. 2, p. 142-146, 2006. DOI: 10.1016/j.pbi.2006.01.002.

SMYTH, D.R.; BOWMAN, J.L.; MEYEROWITZ, E.M. Early flower development in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 2, n. 8, p. 755-767, 1990. DOI: 10.1105/tpc.2.8.755.

SRIVASTAVA, R.; LIU, J.-X.; GUO, H.; YIN, Y.; HOWELL, S. H. Regulation and processing of a plant peptide hormone, AtRALF23, in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 59, n. 6, p. 930-939, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2009.03926.x.

STEIN, J. C.; HOWLETT, B.; BOYES, D. C.; NASRALLAH, M. E.; NASRALLAH, J. B. Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.88, n.19, p.8816-8820, 1991.

SWANSON, R.; EDLUND, A.F.; PREUSS, D. Species specificity in pollen-pistil interactions. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 38, p. 793-818, 2004. DOI: 10.1146/annurev.genet.38.072902.092356.

SZUMLANSKI, A.L.; NIELSEN, E. The Rab GTPase RabA4d regulates pollen tube tip growth in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 21, n. 2, p. 526-544, 2009. DOI: 10.1105/tpc.108.060277.

TAKAYAMA, S.; SHIBA, H.; IWANO, M.; ASANO, K.; HARA, M.; CHE, F.-S.; WATANABE, M.; HINATA, K.; ISOGAI, A. Isolation and characterization of pollen coat proteins of *Brassica campestris* that interact with *S* locus-related glycoprotein 1 involved in pollen-stigma adhesion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.97, n.7, p.3765-3770, 2000. DOI: 10.1073/pnas.97.7.3765

TANG, W.; EZCURRA, I.; MUSCHIETTI, J.; McCORMICK, S. A cysteine-rich extracellular protein, LAT52, interacts with the extracellular domain of the pollen receptor kinase LePRK2. **The Plant Cell**, Rockville, v.14, n.9, p.2277-2287, 2002. DOI: 10.1105/tpc.003103

TANG, W.; KELLEY, D.; EZCURRA, I.; COTTER, R.; McCORMICK, S. LeSTIG1, an extracellular binding partner for the pollen receptor kinases LePRK1 and LePRK2, promotes pollen tube growth *in vitro*. **The Plant Journal**, Oxford, v.39, n.3, p.343-353, 2004. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2004.02139.x

TSUKAMOTO, T.; QIN, Y.; HUANG, Y.; DUNATUNGA, D.; PALANIVELU, R. A role for LORELEI, a putative glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, in *Arabidopsis thaliana* double fertilization and early seed development. **The Plant Journal**, Oxford, v. 62, n. 4, p. 571-588, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2010.04177.x.

TWELL, D.; YAMAGUCHI, J.; McCORMICK, S. Pollen-specific gene expression in transgenic plants: coordinate regulation of two different tomato gene promoters during microsporogenesis. **Development**, Cambridge, v. 109, n. 3, p. 705-713, 1990.

VANSTRAELEN, M.; BENKOVÁ, E. Hormonal interactions in the regulation of plant development. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v.28, p. 463-487, 2012. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-101011-15574

WEI, Z.; LI, J. Brassinosteroids regulate root growth, development, and symbiosis. **Molecular Plant**, Oxford, v.9, n.1, p. 86-100, 2016. DOI: 10.1016/j.molp.2015.12.003

WENGIER, D.L.; MAZZELLA, M.A.; SALEM, T.M.; McCORMICK, S.; MUSCHIETTI, J.P. STIL, a peculiar molecule from styles, specifically dephosphorylates the pollen receptor kinase LePRK2 and stimulates pollen tube growth *in vitro*. **BMC Plant Biology**, London, v. 10, n. 33, p. 1-11, 2010. DOI: 10.1186/1471-2229-10-33.

WETERINGS, K.; RUSSELL, S.D. Experimental analysis of the fertilization process. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, suppl. 1, S107-S118, 2004. DOI: 10.1105/tpc.016873.

WINTER, D.; VINEGAR, B.; NAHAL, H.; AMMAR, R.; WILSON, G.V.; PROVART, N.J. An “electronic fluorescent pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. **PLoS One**, San Francisco, v. 2, n. 8, p. e718, 2007. DOI: 10.1371/journal.pone.0000718.

WU, H-M.; WONG, E.; OGDahl, J.; CHEUNG, A.Y. A pollen tube growth-promoting arabinogalactan protein from *Nicotiana glauca* is similar to the tobacco TTS protein. **The Plant Journal**, Oxford, v. 22, n. 2, p. 165-176, 2000. DOI: 10.1046/j.1365-313x.2000.00731.x.

WU, J.; KURTEN, E.L.; MONSHAUSEN, G.; HUMMEL, G.M.; GILROY, S.; BALDWIN, I.T. NaRALF, a peptide signal essential for the regulation of root hair tip apoplastic pH in *Nicotiana attenuata*, is required for root hair development and plant growth in native soils. **The Plant Journal**, Oxford, v. 52, n. 5, p. 877-890, 2007. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2007.03289.x.

YADEGARI, R.; DREWS, G.N. Female gametophyte development. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, suppl. 1, S133-S141, 2004. DOI: 10.1105/tpc.018192.

YAMAMURO, C.; ZHU, J-K.; YANG, Z. Epigenetic modifications and plant hormone action. **Molecular Plant**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 57-70, 2016. DOI: 10.1016/j.molp.2015.10.008.

YU, H-J.; HOGAN, P.; SUNDARESAN, V. Analysis of the female gametophyte transcriptome of *Arabidopsis* by comparative expression profiling. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 139, n. 4, p. 1853-1869, 2005. DOI: 10.1104/pp.105.067314.

ZHANG, G-Y.; WU, J.; WANG, X-W. Cloning and expression analysis of a pollen preferential rapid alkalization factor gene, *BoRALF1*, from broccoli flowers. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 37, n. 7, p. 3273-3281, 2010. DOI: 10.1007/s11033-009-9912-9.

ZHOU, L.; FU, Y.; YANG, Z. A genome-wide functional characterization of *Arabidopsis* regulatory calcium sensors in pollen tubes. **Journal of Integrative Plant Biology**, Victoria, v. 51, n. 8, p. 751-761, 2009. DOI: 10.1111/j.1744-7909.2009.00847.x.

APÊNDICES

Apêndice A – Tabela de iniciadores utilizados para as reações de PCR

Gene	Sequência do Iniciador	Temp. de Anelamento (°C)
<i>AtRALF1</i>	F: 5' TGTAGCATGGGCTACGACTG 3' R: 5' AAGGCACACTGTTCCGTTTC 3'	60
<i>AtRALF34</i>	F: 5' CGAAGTTACGGAGGAAGACG 3' R: 5' ACTCTATTCGCCGACAATGC 3'	60
<i>CPD</i>	F: 5' AGCAACTCGGTAACGACAGG 3' R: 5' CAGAGAGTGCAACCCTAGCC 3'	61
<i>DWF4</i>	F: 5' GTGGGTGGAAAGTGTTACCG 3' R: 5' CTGTTGCCATCTCCAAGGAT 3'	61
<i>SAUR_AC1</i>	F: 5' AAGGGAATCATCGTCGACAC 3' R: 5' GTATGAAACCGGCACCACAT 3'	60
<i>TCH4</i>	F: 5' TCCTAATGCCTCGAAACAGG 3' R: 5' CTGCACCCATCTCATCCTTT 3'	60
<i>GAPDH</i>	F: 5' TTGGTGACAACAGGTCAAGCA 3' R: 5' AAACCTTGTCGCTCAATGCAATC 3'	60

Apêndice B – Espectometria de massa para identificação dos peptídeos AtRALF25 e AtRALF26.

His-AtRALF25

His-AtRALF26