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

**Interação entre o peptídeo sinal RALF e as citocininas e sua função
na regulação do crescimento de raízes de *Arabidopsis thaliana***

Marina de Lyra Soriano

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

**Piracicaba
2014**

**Marina de Lyra Soriano
Engenheira Agrônoma**

**Interação entre o peptídeo sinal RALF e as citocininas e sua função na
regulação do crescimento de raízes de *Arabidopsis thaliana***

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

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

**Piracicaba
2014**

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

Soriano, Marina de Lyra

Interação entre o peptídeo sinal RALF e as citocininas e sua função na
regulação do crescimento de raízes de *Arabidopsis thaliana* / Marina de Lyra
Soriano. - - Piracicaba, 2014.

72 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. ARRs tipo-A 2. Transdução de sinal 3. Desenvolvimento I. Título

CDD 583.128
S714i

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

DEDICATÓRIA

**À Deus, real em minha vida,
por estar sempre ao meu lado
me fortalecendo e iluminando meu caminho.
E aos meus pais e familiares,
que me ensinaram a acreditar nos
meus sonhos e a batalhar para alcançá-los.**

AGRADECIMENTOS

Ao professor e orientador, Daniel Scherer de Moura, um agradecimento especial, pela oportunidade, apoio e ensinamentos essenciais para o meu desenvolvimento científico.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos durante meu Mestrado.

Ao professor Márcio de Castro Silva-Filho e a professora Helaine Carrer por disponibilizarem seus respectivos laboratórios.

Ao CTC- Centro de Tecnologia Canavieira, representado por Maria Cristina Falco e Sabrina Chabregas, por toda atenção e incentivo no início desta jornada.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica de Proteínas, Akemi Niitsu, Antônio Amaral, Bianca Ribeiro, Cindy Guette, Fausto Andrés Ortiz-Morea, Juan Carlos Abad, Keini Dressano, Lucas Claus, Paulo Ceciliato, Tábata Bergonci e Wellington Ferreira pela prontidão em auxiliar-me e ótimo convívio.

Aos companheiros do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular de Plantas, Ana Paula Preczenhak, André Luiz Barboza, Geraldo Silva, Guilherme Hosaka, Tânia Batista, Valentina de Fátima De Martin.

A todos os meus amigos, de maneira especial aos casais Ana Cristina e Alberto Guilherme, Ana Paula e Alexandre Tomé pela boa companhia, momentos de descontração e principalmente pela amizade construída.

Ao meu querido pai, Antônio Soriano, meu grande conselheiro e incentivador da minha profissão, que semeou em mim o desejo de ser cada dia melhor. À minha mãezinha, Maria do Socorro, que sempre me impulsiona para frente, exemplo de fé, força e alegria. Ao meu irmão, Hugo e sua família (Camila e Rodrigo) por todo amor e carinho. A minha irmã Amanda e a sobrinha Beatriz por fazerem parte da minha vida. A todos os meus familiares, avós, tios e primos que são meus referenciais.

Ao meu noivo Davi, que tanto contribuiu com a conclusão dessa etapa tão importante para mim. Estar com você por perto no decorrer dessa jornada tornou tudo mais fácil. Muito obrigada por todo amor, paciência, dedicação, compreensão e apoio.

Enfim, gostaria de agradecer a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

“Nós devemos ser a mudança que queremos ver no mundo.”

Mahatma Gandhi

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Peptídeo sinal RALF	19
2.2 Interação do peptídeo sinal RALF com outros hormônios.....	21
2.3 Citocinina.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Material vegetal e condições de crescimento.....	27
3.2 Produção e purificação dos peptídeos AtRALFs recombinantes.....	28
3.3 Análise do crescimento das raízes de plantas tratadas com _{His} AtRALFs e citocininas.....	29
3.4 Análise de expressão gênica.....	29
3.4.1 Extração de RNA total.....	30
3.4.2 Quantificação do RNA.....	30
3.4.3 Síntese do cDNA.....	30
3.4.4 RT-PCR.....	31
3.4.5 RT-qPCR.....	31
3.5 Análises estatísticas	32
4 RESULTADOS	33
4.1 Efeito combinado da aplicação exógena de _{His} AtRALF1 e citocininas no crescimento das raízes de arabidopsis.....	33
4.2 Efeito combinado da aplicação exógena de _{His} AtRALF19 e citocininas no crescimento das raízes de arabidopsis.....	35
4.3 Efeito combinado da aplicação exógena de _{His} AtRALF34 e citocininas no crescimento das raízes de arabidopsis.....	36
4.4 Crescimento das raízes em plantas com alta concentração endógena de citocinina, mutantes <i>ckx2</i> , e plantas com baixa concentração endógena de citocinina, 35S:CKX2, tratadas com os peptídeos _{His} AtRALF1, _{His} AtRALF19 e _{His} AtRALF34.....	37

4.5	^{His} AtRALF1 interfere na expressão dos genes reguladores de resposta de arabidopsis <i>ARR4</i> , <i>ARR5</i> , <i>ARR6</i> , <i>ARR7</i> e <i>ARR15</i>	39
4.6	^{His} AtRALF19 reprime parcialmente os genes reguladores de resposta de arabidopsis <i>ARR4</i> , <i>ARR5</i> , <i>ARR6</i> , <i>ARR7</i> e <i>ARR15</i>	41
4.7	^{His} AtRALF34 reprime parcialmente os genes reguladores de resposta de arabidopsis <i>ARR4</i> , <i>ARR5</i> , <i>ARR6</i> , <i>ARR7</i> , <i>ARR15</i>	44
5	DISCUSSÃO.....	49
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
	REFERÊNCIAS	55
	APÊNDICES	63
	ANEXOS.....	67

RESUMO

Interação entre o peptídeo sinal RALF e as citocininas e sua função na regulação do crescimento de raízes de *Arabidopsis thaliana*

Peptídeos sinais determinam o crescimento, desenvolvimento e defesa das plantas. RALF (*Rapid Alkalinization Factor*) é um peptídeo de sinalização ubíquo no reino vegetal e que está envolvido com a expansão celular. Os peptídeos RALF em *arabidopsis* estão organizados em uma família multigênica de 37 membros, alguns com expressão tecido-específica, outros expressos em toda a planta. Os mecanismos envolvidos na expansão celular são regulados por vários hormônios, entre os quais as citocininas. A relação existente entre os peptídeos RALF e os demais hormônios é pouco conhecida e um melhor entendimento dessa relação poderá auxiliar na modulação dos processos de crescimento e desenvolvimento vegetal por engenharia genética. O objetivo desse trabalho foi estudar a relação entre o peptídeo AtRALF e as citocininas, principalmente no que diz respeito aos efeitos de ambos no crescimento e desenvolvimento das raízes. Para isso, selecionou-se as isoformas AtRALF1, AtRALF19 e AtRALF34 que apresentam diferentes padrões de expressão. Os resultados sugerem que AtRALF19 e AtRALF34, ambas expressas em toda a planta, contribuem mais com a transdução de sinal da citocinina do que a isoforma AtRALF1, com padrão de expressão específico de raízes. Os peptídeos AtRALF19 e 34 reprimem parcialmente a expressão dos genes reguladores de resposta, *ARRs* tipo-A, que são reguladores negativos da via de sinalização de citocinina.

Palavras-chave: *ARRs* tipo-A; Transdução de sinal; Desenvolvimento

ABSTRACT

Interaction between the RALF signal peptide and cytokinins and their role in regulation of root growth of *Arabidopsis thaliana*

Peptides signals influence the growth, development and plant defense. RALF (Rapid Alkalinization Factor) is a ubiquitous signaling peptide in the plant kingdom and is involved in cell expansion. The RALF peptides in arabidopsis are organized in a multigene family of 37 members, some with tissue-specific expression, others expressed throughout the plant. The mechanisms involved in cellular growth are regulated by various hormones, including cytokinins. The relationship between RALF peptides and other hormones is poorly understood and a better understanding of this relationship assists in modulating the processes of plant growth and development. The aim of this work was to study the relationship of AtRALF peptide with cytokinins, especially with regard to the effects of both in the growth and development of roots. For this, we selected the AtRALF1, AtRALF19 and AtRALF34 isoforms that have different expression patterns. The results suggest that AtRALF19 and AtRALF34, both expressed throughout the plant, contribute more to cytokinin signal transduction than isoform AtRALF1, with specific expression pattern in roots. The AtRALF19 and 34 repressed the expression of type-A *Arabidopsis Response Regulators* (ARRs), whose products act as negative regulators of cytokinin signaling.

Keywords: ARRs type-A; Signal transduction; Development

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Efeito combinado da aplicação exógena de citocinina com $_{His}AtRALF1$ no crescimento das raízes de plantas Col-0 (WT).....	33
Figura 2 - Efeito da aplicação exógena de citocinina no crescimento das raízes, (A) plantas selvagens (Col-0), (B) que silenciam parcialmente $AtRALF1$ ($irAtRALF1$), (C) que superexpressam $AtRALF1$ ($35S:AtRALF1$).....	34
Figura 3 - Efeito combinado da aplicação exógena de citocinina com $_{His}AtRALF19$ no crescimento das raízes de plantas Col-0 (WT)	36
Figura 4 - Efeito combinado da aplicação exógena de citocinina com $_{His}AtRALF34$ no crescimento das raízes de plantas Col-0 (WT)	37
Figura 5 - Tamanho das raízes dos genótipos (A) Col-0, (B) $ckx2$ e (C) $35S:CKX2$..	38
Figura 6 - Efeito da aplicação exógena de $_{His}AtRALF1$, $_{His}AtRALF19$, e $_{His}AtRALF34$ no crescimento das raízes de diferentes genótipos (Col-0, $ckx2$, $35S:CKX2$).....	39
Figura 7 - Análises de expressão por RT-PCR semi-quantitativo dos genes $ARRs$ tipo-A em raízes de plantas Col-0 tratadas com $_{His}AtRALF1$ e BAP.....	40
Figura 8 - Análises de expressão por RT-qPCR dos genes $ARRs$ tipo-A em raízes de plantas Col-0 tratadas com $_{His}AtRALF1$ e BAP.. ..	41
Figura 9 - Análises de expressão por RT-PCR semi-quantitativo dos genes $ARRs$ tipo-A em raízes de plantas Col-0 tratadas com $_{His}AtRALF19$ e BAP.....	42
Figura 10 - Análises de expressão por RT-qPCR dos genes $ARRs$ tipo-A em raízes de plantas Col-0 tratadas com $_{His}AtRALF19$ e BAP	43
Figura 11 - Análises de expressão por RT-PCR semi-quantitativo dos genes $ARRs$ tipo-A em raízes de plantas Col-0 tratadas com $_{His}AtRALF34$ e BAP.....	44
Figura 12 - Análises de expressão por RT-qPCR dos genes $ARRs$ tipo-A em raízes de plantas Col-0 tratadas com $_{His}AtRALF34$ e BAP	45
Figura 13 - Análises de expressão por RT-PCR semi-quantitativo dos genes $ARRs$ tipo-A em raízes de plantas Col-0 e $35S:AtRALF34$	46
Figura 14 - Análises de expressão por RT-qPCR dos genes $ARRs$ tipo-A em raízes de plantas Col-0 e $35S:AtRALF34$	47

1 INTRODUÇÃO

A comunicação entre as células é fundamental para o desenvolvimento de tecidos e órgãos. Nas plantas, pequenos peptídeos funcionam como moléculas de sinalização necessárias para a coordenação das respostas celulares (MOURA; SILVA-FILHO, 2006; MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 2006; SUGANO et al., 2010; KONDO et al., 2011; WHITFORD et al., 2012).

O peptídeo sinal RALF (Rapid ALkalinization Factor) foi descoberto em extratos proteicos de folhas de tabaco através do ensaio de alcalinização do meio extracelular de células em suspensão (PEARCE et al., 2001). Em *Arabidopsis thaliana* a família gênica *RALF* é composta por 37 genes, alguns com expressão tecido-específica, outros expressos em toda a planta (LAMESCH et al., 2011).

Quanto à função dos peptídeos RALF, evidências tais como inibição do crescimento de raízes, inibição do alongamento do hipocótilo e inibição do tubo polínico, indicam que estes peptídeos estão envolvidos na regulação da expansão celular, provavelmente regulando o alongamento das células (PEARCE et al., 2001; MATOS et al., 2008; COVEY et al., 2010; MINGOSSİ et al., 2010).

Os mecanismos envolvidos em expansão celular são regulados por uma complexa rede de interações entre hormônios tais como auxinas, brassinosteróides, citocininas, etileno e giberelinas (SMALLE et al., 1997; WANG et al., 2002; FU; HARBERD, 2003; PARRY; ESTELLE, 2006; VANSTRAELEN; BENKOVA, 2012).

As citocininas estão envolvidas na regulação de muitos aspectos do desenvolvimento, incluindo a regulação do crescimento da raiz, a arquitetura da raiz e o desenvolvimento vascular (WERNER et al., 2003; RIEFLER et al., 2006; BISHOPP et al., 2011). Muitos trabalhos descrevem o efeito inibitório da citocinina no crescimento da raiz e na formação das raízes laterais, mas o mecanismo de regulação ainda não está completamente elucidado (LAPLAZE et al., 2007; BISHOPP et al., 2011; EL-SHOWK et al., 2013).

O objetivo desse trabalho foi estudar a inter-relação do peptídeo sinal AtRALF com as citocininas, principalmente, no que diz respeito aos efeitos destes sinais no crescimento e desenvolvimento das raízes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Peptídeo sinal RALF

Diversos processos genético-fisiológicos tais como desenvolvimento, crescimento, defesa e reprodução são mediados pela comunicação entre as células. Inúmeros são os sinais responsáveis por esta comunicação, dentre eles, pequenos peptídeos sinais vem revelando-se cada vez mais importantes e fundamentais para a coordenação das respostas celulares envolvidas nestes processos (RYAN et al., 2002; MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 2006; MOURA; SILVA-FILHO, 2006; SUGANO et al., 2010; KONDO et al., 2011; WHITFORD et al., 2012).

O peptídeo sinal RALF, do inglês Rapid ALkalinization Factor, foi primeiramente isolado de extratos proteicos de folhas de tabaco através do ensaio de alcalinização do meio extracelular de suspensões celulares (PEARCE et al., 2001). Além da indução de uma rápida alcalinização do meio extracelular e aumento de Ca^{2+} no citoplasma, o peptídeo também ativa de forma rápida uma MAP quinase em células de tabaco (PEARCE et al., 2001; HARUTA et al., 2008).

Análises de fosfoproteômica em plantas de *arabidopsis* tratadas com AtRALF1 identificaram várias proteínas fosforiladas, dentre elas o receptor quinase FERONIA e a próton-ATPase AHA2. Neste estudo, os mutantes *feronia*, em relação às plantas selvagens, exibiram maior atividade da próton-ATPase e maior capacidade de acidificar o meio extracelular. Deste modo, foi proposto que AtRALF1 é capaz de se ligar ao receptor quinase de membrana, FERONIA, e assim iniciar uma cascata de fosforilação que inibe a atividade de uma bomba de prótons na membrana, aumentando o pH do apoplasto e reduzindo assim o alongamento celular (HARUTA et al., 2014).

O peptídeo RALF isolado originalmente de tabaco possui 49 aminoácidos, é derivado da porção C-terminal de uma preproteína de 115 aminoácidos, apresenta um sinal de secreção de 23 aminoácidos na porção N-terminal e uma porção intermediária de função ainda desconhecida com 43 aminoácidos. O peptídeo maduro localiza-se após um sítio dibásico (dupla arginina) essencial para o processamento (Anexo A) (MATOS et al., 2008). A estrutura primária do peptídeo maduro ainda apresenta duas características essenciais para atividade, à presença do motivo -YISY- e quatro cisteínas que formam duas pontes dissulfeto (Anexo A) (PEARCE et al., 2001, 2010).

Peptídeos RALFs são ubíquos no reino vegetal. Eles já foram descritos em 20 espécies de plantas distribuídas em nove famílias, incluindo monocotiledôneas e dicotiledôneas (MOURA; SILVA-FILHO, 2006). Segundo a última versão do genoma de *arabidopsis*, existem 37 isoformas do peptídeo RALF (Anexo B) (LAMESCH et al., 2011). Estes são codificados por uma família multigênica distribuídos em todos os 5 cromossomos, alguns com expressão tecido-específica, outros expressos em toda a planta (OLSEN et al., 2002; HARUTA; CONSTABEL, 2003; GERMAIN et al., 2005; MOURA et al., 2006; CAO; SHI, 2012; MORATO DO CANTO et al., 2014).

Destas 37 isoformas, apenas nove (AtRALF1, 4, 19, 22, 23, 24, 31, 33 e 34) apresentam alta identidade de sequência de aminoácidos com o peptídeo originalmente isolado de tabaco (Anexo B), estas nove isoformas também apresentam as características essenciais para a atividade do peptídeo, sendo estas a conservação de um sítio dibásico (dupla arginina) acima do N-terminal do peptídeo maduro, o motivo -YISY- e as quatro cisteínas que formam duas pontes dissulfeto (PEARCE et al., 2001; MATOS et al., 2008; MORATO DO CANTO et al., 2014).

Os peptídeos RALFs estão envolvidos na regulação da expansão celular (PEARCE et al., 2001; MATOS et al., 2008; COVEY et al., 2010; MINGOSSO et al., 2010; MORATO DO CANTO et al., 2014; HARUTA et al., 2014). A superexpressão de três isoformas dos peptídeos RALFs de *arabidopsis*, AtRALF1, AtRALF23 e AtRALF8, resultou em plantas com raízes menores que plantas selvagens e que exibem um fenótipo semianão (MATOS et al., 2008; SRIVASTAVA et al., 2009; ATKINSON et al., 2013).

Em *Nicotiana attenuata* foi identificada uma única isoforma do peptídeo RALF (NaRALF) cujo silenciamento gênico levou a um aumento do crescimento das raízes (WU et al., 2007). Similarmente, Bergonci et al. (2014) ao silenciarem o gene *AtRALF1* (*irAtRALF1*) em plantas de *arabidopsis* também observaram maior alongamento celular tanto em raízes quanto em hipocótilos. O aumento do comprimento das raízes das plantas *irAtRALF1* é inversamente proporcional ao nível de transcritos do gene *AtRALF1*, quanto menor o nível de transcritos, maior o comprimento da raiz (BERGONCI et al., 2014). Além disso, foi observado nessas plantas um maior número de raízes laterais, sendo observado um efeito contrário nas plantas que superexpressam o *AtRALF1* (BERGONCI et al., 2014).

Análises de expressão gênica através de micro-arranjos das plantas que superexpressam *AtRALF1* mostraram que um grupo de genes envolvidos com

rearranjo da parede celular teve sua expressão alterada (NCBI, Gene Expression Omnibus, Series GSE641). Bergonci et al. (2014) estudando esse grupo de genes envolvidos com rearranjo da parede celular, identificaram quatro genes que são induzidos por AtRALF1: duas proteínas ricas em prolina (AtPRP1 e AtPRP3), uma glicoproteína rica em hidroxiprolina (AtHRGP2) e uma endotransglucosilase (AtTCH4). Ensaios com o gene repórter GUS sob controle do promotor do *AtRALF1* revelaram um acúmulo da proteína β -glucuronidase na zona de diferenciação das raízes das plântulas, com grande intensidade nos feixes vasculares, córtex e endoderme (HARUTA et al., 2008).

2.2 Interação do peptídeo sinal RALF com outros hormônios

Nos últimos anos, tornou-se evidente que os hormônios atuam integrados em uma complexa rede de interações (VANSTRAELEN; BENKOVÁ, 2012). Até o momento, poucos estudos descrevem a relação existente entre os peptídeos RALFs e os demais hormônios.

Em arábido, o gene *AtRALF23* tem sua expressão reduzida quando a planta é tratada com brassinolide (BL), mas o mesmo não ocorre com *AtRALF1* (NEMHAUSER et al., 2004; SRIVASTAVA et al., 2009). A superexpressão de *AtRALF1* e também de *AtRALF23* causou nas plantas de arábido uma tolerância ao tratamento com BL (SRIVASTAVA et al., 2009; BERGONCI et al., 2014). Além disso, foi observado que AtRALF1 altera o nível de expressão de três genes envolvidos na via de biossíntese de BL: o *CPD* (*CONSTITUTIVE PHOTOMORPHISM AND DWARFISM*) e o *DWF4* (*DWARF4*) que são induzidos (BERGONCI et al., 2014), e *BR6OX2* (*BRASSINOSTEROID-6-OXIDASE2*) que é reprimido (HARUTA et al., 2014). Quando as plantas são tratadas simultaneamente com AtRALF1 e BL, os genes induzidos por AtRALF1 reduzem o nível de expressão gênica, sugerindo que esses sinais podem competir por componentes que são comuns em ambas as vias de sinalização (BERGONCI et al., 2014). Deste modo, AtRALF1 e BL possuem efeitos opostos, sugerindo que o mecanismo de ação do AtRALF1 possa ser por interferência na via de sinalização de BL (BERGONCI et al., 2014).

Haruta et al. (2014), também mostraram que plantas de arábido tratadas com AtRALF1 exibiram mudanças transcricionais em alguns genes da via de resposta a auxina e giberelina. O peptídeo AtRALF1 reprimiu a expressão gênica de

SAUR63 (SMALL AUXIN UP RNA) e *GA3OX (GIBBERELIN 3-OXIDASE1)*, os quais são induzidos por auxina e giberelina respectivamente. O fato do peptídeo AtRALF1 regular a expansão celular negativamente e os hormônios auxina e giberelina estarem envolvidos no processo de expansão celular positivamente sugere que AtRALF1 atua de modo antagônico a auxina e giberelina. Contudo, é preciso mais estudos para se conseguir elucidar como esses hormônios interagem com o peptídeo sinal AtRALF1. Neste mesmo trabalho, foi observado que AtRALF1 aumenta a transcrição de *ERF (ETHYLENE RESPONSE FACTOR)*, que é um fator transcricional envolvido na via de transdução de sinal do etileno; e também de *ACS (AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLIC ACID SYNTHASE)*, uma enzima da via de biossíntese do etileno. Curiosamente, Atkinson et al. (2013), observaram que a expressão gênica de *AtRALF8* em mutantes insensíveis a etileno, *ein3-1 (ethylene-insensitive)* foi significativamente maior.

Haruta e Constabel (2003), estudando genes que codificam peptídeos RALFs em álamo (híbrido *Populus trichocarpa x Populus deltoides*) observaram que quando células em suspensão foram tratadas com metil jasmonato houve uma inibição da expressão dos dois genes *RALFs* existentes, *PtdRALF1* e *PtdRALF2*, sendo que *PtdRALF2* foi menos expresso que *PtdRALF1* na presença do hormônio. No entanto, não encontraram efeito significativo do hormônio auxina (HARUTA; CONSTABEL, 2003). Diferentemente de álamo, auxina induziu a expressão de *ScRALF3* em ovários de *Solanum chacoense* (CHEVALIER et al., 2013).

Dentre outros hormônios, além dos mencionados acima, que podem interagir com o peptídeo sinal RALF na regulação da expansão celular estaria a citocinina, no entanto, até o momento não existem evidências de tal interação.

2.3 Citocinina

As citocininas fazem parte de uma classe de hormônios que modulam diversos processos essenciais às plantas. Dentre suas funções está a regulação do desenvolvimento radicular, incluindo o crescimento da raiz, a arquitetura da raiz e o desenvolvimento vascular (CARY et al., 1995; WERNER et al., 2003; RIEFLER et al., 2006; BISHOPP et al., 2011).

Muitos trabalhos descrevem o efeito inibitório da citocinina no crescimento da raiz e na formação das raízes laterais, mas o mecanismo de regulação ainda não está completamente elucidado (LAPLAZE et al., 2007; BISHOPP et al., 2011; EL-

SHOWK et al., 2013). O papel negativo da citocinina sobre o crescimento da raiz tem sido comprovado de diversas maneiras, por exemplo, com aplicação exógena e superexpressão dos genes envolvidos na via de biossíntese da citocinina (MEDFORD et al., 1989; SMIGOCKI, 1991; HEWELT et al., 1994; LI et al., 2006; KUDEROVA et al., 2008). Por conseguinte, tem sido observado um efeito oposto, ou seja, crescimento das raízes, quando os níveis de citocinina endógeno são reduzidos através da superexpressão de genes envolvidos na degradação da citocinina (WERNER et al., 2003; YANG et al., 2003; BENKOVÁ; HEJÁTKO, 2009).

A sinalização da citocinina envolve uma cascata de transferência de fosfato semelhante ao sistema de dois componentes bacteriano (KAKIMOTO, 2003; ARGUESO et al., 2010). O sistema de dois componentes é composto por dois elementos, uma proteína histidina quinase e uma proteína reguladora de resposta, que são fosforilados nos resíduos conservados de histidina e aspartato, respectivamente. A transferência de fosfato da proteína histidina quinase para a proteína reguladora de resposta resulta, posteriormente, na ativação gênica (DEL BIANCO et al., 2013).

Em arábido, o sistema de fosforilação envolvido na transdução de sinal da citocinina é bastante conhecido (Anexo C) (EL-SHOWK et al., 2013). A citocinina é percebida por uma família de receptores transmembrana histidina quinase: ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE 2 (AHK2), AHK3, e AHK4/ WOODENLEG (WOL)/ CYTOKININ RESPONSE 1 (CRE1) (HWANG; SHEEN 2001; INOUE et al., 2001; RIEFLER et al., 2006). Os três receptores possuem, em grande parte, padrões de expressão que se sobrepõem, e função parcialmente redundante na percepção da citocinina (HIGUCHI et al., 2004; NISHIMURA et al., 2004; RIEFLER et al., 2006). Esses receptores estão localizados na membrana plasmática e no retículo endoplasmático (SHI; RASHOTTE, 2012; NONGPIUR et al., 2012).

A transdução de sinal inicia quando a citocinina se liga ao domínio extracelular do receptor, denominado CHASE (Ciclases/Histidine kinases Associated Sensory Extracellular), que desencadeia uma autofosforilação em uma histidina conservada do receptor. Em seguida, o grupo fosfato é transferido para um resíduo de aspartato também conservado dentro do receptor AHK (ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2001; HWANG; SHEEN 2001; INOUE et al., 2001; MOUGEL; ZHULIN, 2001; KIEBER; SCHALLER, 2010; KUREPA et al., 2014).

Subsequentemente, o grupo fosforil é transferido para um resíduo de histidina de um dos cinco membros da família de proteínas ARABIDOPSIS HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER (AHP1-AHP5) (SUZUKI et al., 1998; HWANG; SHEEN, 2001; IMAMURA et al., 2001; HUTCHISON et al., 2006). O sexto membro dessa família, AHP6, não possui o resíduo de histidina conservado atuando como uma pseudo-fosfotransferase que compete com as verdadeiras AHPs. A AHP6 atua como um inibidor da sinalização de citocinina (MÄHÖNEN et al., 2006). As AHPs estão localizadas tanto no citoplasma como no núcleo (PUNWAI et al., 2010). No núcleo, a AHP fosforilada transfere o grupo fosforil para as proteínas reguladoras de resposta, ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR (ARR) (BRANDSTATTER; KIEBER, 1998; D'AGOSTINO et al., 2000; SAKAI et al., 2001; TO et al., 2004; MASON et al., 2005; EL-SHOWK et al., 2013; TAKATSUKA; UMEDA, 2014).

Os ARRs são codificados por uma família multigênica e constituem um dos elementos finais da transdução de sinal da citocinina. Todos os ARRs compartilham um domínio receptor semelhante, com resíduos de aspartato conservados e também alvos de fosforilação (D'AGOSTINO et al., 2000; TO; KIEBER, 2008). Estas proteínas reguladoras de resposta são classificadas em ARR tipo-A, tipo-B e tipo-C, de acordo com seus domínios e capacidade de resposta a citocinina (Anexo D) (KIBA, et al., 2004; TO et al., 2007).

Os ARRs tipo-A apresentam 10 isoformas (ARR3-9 e ARR15-17) que são rapidamente acumulados após o tratamento com citocinina (D'AGOSTINO et al., 2000; MIZUNO, 2004). Os ARRs tipo-A agem como reguladores negativos da via de transdução de sinal da citocinina (D'AGOSTINO et al., 2000). Este mecanismo que inibe a sinalização da citocinina ainda é desconhecido (TO et al., 2007; BISHOPP et al., 2011; KUNIKOWSKA et al., 2013).

Os ARRs tipo-B (ARR1, 2, ARR10-14, ARR18-21) possuem a região C-terminal mais longa que os ARRs tipo-A e, além disso, apresentam um domínio de ligação ao DNA (SAKAI et al., 1998, 2000; D'AGOSTINO et al., 2000). Desse modo, os ARRs tipo-B são fatores transcricionais que desempenham papel positivo na mediação da expressão gênica regulada por citocinina (SAKAI et al., 1998, 2000; D'AGOSTINO et al., 2000). Um dos alvos dos ARRs tipo-B são os genes *ARRs tipo-A* (TO et al., 2004; TO; KIEBER, 2008; TAKATSUKA; UMEDA, 2014).

Os genes que codificam os ARRs tipo-C não são transcricionalmente regulados por citocinina como os ARRs tipo-A e as proteínas não possuem um

domínio de ligação ao DNA como os ARRs tipo-B (KIBA et al., 2004; DEL BIANCO et al., 2013). No entanto, a superexpressão desses genes reduziu a sensibilidade a citocinina, sugerindo um papel negativo semelhante aos ARRs tipo-A (KIBA et al., 2004; DEL BIANCO et al., 2013).

A complexidade da via de sinalização da citocinina é acentuada pela existência de famílias multigênicas que codificam todos os três componentes básicos da transdução de sinal (AHKs, AHPs, ARRs) (BRANDSTATTER; KIEBER, 1998; D'AGOSTINO et al., 2000; HIGUCHI et al., 2004). Embora os dados atuais indiquem que existe uma redundância funcional dentro dessas famílias gênicas, há também evidências que sugerem algum grau de diversificação funcional (SAKAI et al., 2001; MASON et al., 2004, 2005; RIEFLER et al., 2006; ISHIDA et al., 2008). Até o momento, dois tipos de diversificação funcional foram descritos. Primeiramente, foi observado dentro de todas as três famílias de genes que os membros são diferencialmente transcritos, tanto de maneira tecido específica, quanto em termos de abundância relativa (HRADILOVÁ; BRZOBOHATÝ, 2007; STOLZ et al., 2011). Em segundo lugar, embora as proteínas dentro de cada família compartilhem um alto grau de identidade, as regiões que divergem são suficientes para oferecer afinidade por ligantes específicos ou participação em diferentes respostas celulares (MÜLLER, 2011; STOLZ et al., 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e condições de crescimento

Em todos os ensaios foram utilizadas como selvagens plantas de *Arabidopsis thaliana* do ecótipo Columbia-0 (Col-0). O mutante com inserção de T-DNA no *locus* AtCKX2 (*ckx2*, SALK_014046) foi adquirido através do Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) da Universidade de Ohio State (ALONSO et al., 2003). A linhagem mutante é oriunda do ecótipo Col-0. A presença da inserção do T-DNA em homozigose foi confirmada por PCR a partir do DNA genômico. O iniciador LBb1.3 (ATTTTGCCGATTTCGGAAC), que é complementar a um segmento do T-DNA, foi usado juntamente com o iniciador gene-específico para confirmação da inserção. Esse processo também foi realizado com os iniciadores que flanqueiam a região de inserção para confirmação da homozigose. Por fim, análises de expressão semi-quantitativas (RT-PCR) nas linhagens homozigotas foram realizadas para verificar a ausência de expressão do gene. As sequências dos iniciadores utilizados podem ser verificadas no Apêndice A.

Plantas transgênicas de *arabidopsis* transformadas com *CKX2* sob o controle do promotor *Cauliflower Mosaic Virus 35S* para superexpressão da enzima CKX2 (35S:CKX2) foram geradas anteriormente (WERNER et al., 2003). As plantas transgênicas superexpressando o peptídeo AtRALF1 (35S:AtRALF1) e silenciando parcialmente este peptídeo (*irAtRALF1*) foram geradas por Matos et al. (2008) e Bergonci et al. (2014), respectivamente. As plantas que superexpressam o peptídeo AtRALF34 (35S:AtRALF34) também foram geradas previamente (RIBEIRO, 2014).

As condições de crescimento das plantas de *arabidopsis* já foram descritas (BOYES et al., 2001). Brevemente, para todos os ensaios as sementes foram esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio 50%, mantidas sob agitação por 10 minutos e lavadas cinco vezes com água estéril. Em seguida, as sementes foram colocadas no escuro a 4°C por 4 dias. Posteriormente foram cultivadas no solo (2:1, substrato organo-solo Basaplant:vermiculita expandida), ou em meio de cultura Murashige e Skoog (MS 0,5X) (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com sais minerais e vitaminas sem sacarose (PhytoTechnology Laboratories), utilizando-se 2,17g.L⁻¹ e pH 5,8 ajustado com KOH. As plantas foram mantidas em uma sala de crescimento, 22°C ± 2° com fotoperíodo de 16 horas.

3.2 Produção e purificação dos peptídeos AtRALFs recombinantes

Os sistemas Gateway (Life Technologies) e pET (Novagen) foram utilizados para a produção dos peptídeos $_{\text{His}}$ AtRALFs recombinantes (MORATO DO CANTO et al., 2014). Assim, as regiões codantes que correspondem às sequências dos peptídeos ativos foram amplificadas por PCR a partir do DNA genômico. Os fragmentos amplificados das isoformas *AtRALF1* e *34* foram clonados no vetor de expressão pET-28b e da isoforma *AtRALF19* foi clonado no vetor pDEST17. Para o sistema Gateway, o fragmento foi primeiramente clonado no vetor de entrada pENTR D-TOPO e, posteriormente, transferido por recombinação para o vetor pDEST17. Os vetores foram introduzidos nas estirpes BL21 ou Rosetta de *Escherichia coli*. Todos os peptídeos foram fusionados a uma cauda de histidina para facilitar a purificação do peptídeo recombinante por cromatografia de afinidade.

As culturas bacterianas foram cultivadas em meio LB (triptona 10g.L^{-1} , extrato de levedura 5g.L^{-1} , NaCl 10g.L^{-1} e pH 7,5) a 37°C e 200rpm. Depois de alcançar OD de 0,6 as células foram induzidas durante 4 horas, usando 1mM de IPTG (*Isopropylthio- β -D-galactoside*). Posteriormente, as células bacterianas foram coletadas por centrifugação (8 minutos, 18°C , 5000xg) e congeladas. A seguir, foram incubadas em tampão desnaturante (100mM NaH_2PO_4 , 20mM Tris e HCl, 8M uréia, pH 8,0) sob agitação durante 40 minutos e lisadas sob pressão de 1500psi em bomba de ruptura celular por pressão de gás nitrogênio. Depois foi centrifugado por 40 minutos, 4°C , 12000xg.

A extração e purificação foram realizadas utilizando cromatografia de afinidade com resina de Níquel (Ni-NTA, Qiagen). Assim, o sobrenadante foi aplicado em uma coluna com a resina equilibrada com 10 volumes do tampão de ligação (100mM NaH_2PO_4 , 20mM Tris e HCl, 8M uréia, pH 8,0). A coluna foi lavada com 5 volumes do tampão de lavagem (100mM NaH_2PO_4 , 20mM Tris e HCl, 8M uréia, pH 6,3) e a proteína de interesse foi eluída com 5mL do tampão de eluição (100mM NaH_2PO_4 , 10mM Tris e HCl, 8M uréia, pH 3,3). A proteína recombinante purificada foi dialisada contra 4L de 0,1 % (v/v) de ácido fórmico, em três etapas de 24 horas cada (4°C , sob agitação suave). Após a diálise, a amostra foi liofilizada e quantificada na HPLC.

3.3 Análise do crescimento das raízes de plantas tratadas com HisAtRALFs e citocininas

Para avaliar o crescimento das raízes as sementes de *arabidopsis* foram superficialmente esterilizadas, colocadas em placas contendo 1mL de meio MS 0,5X líquido e mantidas sob agitação suave em sala de crescimento ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ e fotoperíodo de 16 horas). Após 2 dias os peptídeos HisAtRALF1 , HisAtRALF19 ou HisAtRALF34 ($10\mu\text{M}$) e/ou as citocininas BAP (6-benzilaminopurina), cinetina ou trans-zeatina ($0,1\mu\text{M}$) foram adicionados ao meio. A medição do comprimento da raiz principal foi realizada 3 dias após o tratamento com os peptídeos HisAtRALFs e/ou as citocininas. Para isso as plantas foram retiradas do meio líquido e colocadas em placas contendo meio semi-sólido (água e ágar). As fotos das placas foram capturadas por meio de uma câmera digital e as medições das raízes foram realizadas com o auxílio do programa ImageJ (National Institutes of Health, USA).

Para analisar o crescimento das raízes no decorrer do tempo, as sementes de *arabidopsis* superficialmente esterilizadas foram germinadas verticalmente em meio MS 0,5X semi-sólido, contendo 8g.L^{-1} de Fitigel (Sigma). Após 2 dias, as plântulas foram transferidas para placas contendo diferentes concentrações de citocinina. O crescimento diário das raízes foi acompanhado durante 10 dias após o tratamento. E as medições das raízes foram realizadas com o auxílio do programa ImageJ (National Institutes of Health, USA).

3.4 Análise de expressão gênica

As análises de expressão gênica foram feitas por meio de RT-PCR semi-quantitativo (RT-PCR) e RT-PCR quantitativo (RT-qPCR). Todos os experimentos realizados tiveram no mínimo duas repetições biológicas.

Essas análises foram realizadas em raízes de *arabidopsis* tratadas com a citocinina (BAP $1\mu\text{M}$) e/ou diferentes concentrações dos peptídeos HisAtRALF1 , HisAtRALF19 ou HisAtRALF34 ($0,25\mu\text{M}$; $0,5\mu\text{M}$ e $1\mu\text{M}$). As plantas utilizadas nestes ensaios cresceram em placas dispostas verticalmente contendo meio MS 0,5X e 8g.L^{-1} de Fitigel (Sigma). Após 12 dias foram transferidas para meio MS (0,5x) líquido e tratadas com citocinina e/ou HisAtRALF durante 30 minutos. Posteriormente, as raízes foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido.

3.4.1 Extração de RNA total

O RNA total foi isolado das raízes de arabidopsis utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. O tecido radicular foi macerado em nitrogênio líquido em tubos de 1,5mL. Em seguida, foi adicionado 1mL do reagente Trizol® (Invitrogen), o tubo foi agitado por 15 segundos e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. Adicionou-se 200µL de clorofórmio e por 15 segundos o tubo foi agitado, a seguir o tubo foi incubado a temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugado (12000rpm, 15 minutos a 4°C). Após a centrifugação, a fase aquosa foi coletada e transferida para um novo tubo onde foi adicionado 500µL de isopropanol, incubando-se a temperatura ambiente por 10 minutos e posteriormente centrifugado (12000rpm, 10 minutos a 4°C). O sobrenadante foi descartado e o RNA precipitado foi lavado com 1mL de etanol 75% e centrifugado (7500rpm, 5 minutos a 4°C). Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e o RNA precipitado foi seco a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, o RNA foi eluído em 20µL de água ultrapura, incubado a 60°C por 10 minutos e armazenado a -80°C.

3.4.2 Quantificação do RNA

O RNA total foi quantificado no NanoDrop® (Thermo Scientific). Alíquotas de 2µL do RNA foram aplicadas no equipamento e realizaram-se leituras no comprimento de onda de 260nm. Para verificar a qualidade do mesmo observou-se a razão 260/280nm utilizada para avaliar a contaminação por proteínas, sendo o valor de referência igual a 2. As amostras com valor de referência menor que 1,8 foram descartadas. A razão 260/230nm foi utilizada para avaliar a contaminação por outros compostos (como sais, polissacarídeos e compostos orgânicos), sendo o valor de referência também em torno de 2.

3.4.3 Síntese do cDNA

O cDNA foi sintetizado utilizando-se 1µg de RNA e a enzima Improm II Reverse Transcriptase (Promega) conforme as recomendação do fabricante. Em um

tubo foi adicionado 2µL de oligodT 50µM e 1µg de RNA , que depois foi incubado por 5 minutos a 70°C. Em seguida, a reação foi colocada no gelo por 5 minutos. Posteriormente, foi adicionado ao tubo o tampão Improm II IX, MgCl₂ 1,5mM, dNTPMix 10mM e 1U da enzima Reverse Transcriptase. Depois foi incubado por 10 minutos a 25°C, 60 minutos a 42°C e 15 minutos a 70°C.

3.4.4 RT-PCR

As reações de RT-PCR foram realizadas com um volume final de 25µL, contendo 1µL de cDNA das amostras; 5µL do Tampão; 0,6µL de cada iniciador (10µM); 0,6µL de dNTPMix 10mM; 0,25µL da enzima Taq DNA Polymerase (Promega) e 16,95 µL de água milli-Q. As reações foram conduzidas a 94°C/2 minutos, seguidos de “n” ciclos de 94°C/30 segundos, 60°C/30 segundos, 72°C/30 segundos, finalizando com uma extensão final de 72°C/8 minutos. O produto da PCR foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose 2%, utilizando-se tampão de corrida TAE 1X sob tensão constante de 100V. Como controle para todas as análises de expressão foi utilizado o par de iniciadores do gene *GAPDH* (*Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase*). Este gene foi utilizado como referência para mostrar o carregamento igual de cDNA nas reações. As sequências de todos os iniciadores utilizados nas análises de expressão podem ser verificadas no Apêndice B.

3.4.5 RT-qPCR

As reações de amplificação via RT-qPCR foram realizadas em um volume final de 25µL, usando 3µL de cDNA diluído 10 vezes; 0,3µL de cada iniciador na concentração de 10mM; 12,5µL Maxima SYBR Green Rox / qPCR Master Mix (Thermo Scientific) e 8,9µL de água milli-Q em um sistema de PCR StepOne™ em tempo real (Applied Biosystems). O programa utilizado foi: 50°C/2minutos, 95°C/2minutos e 40ciclos a 95°C/15 segundos e 60°C/30 segundos, com detecção do sinal de fluorescência ao final de cada etapa de extensão. O gene *GAPDH* foi usado como controle interno. Três réplicas foram analisadas para cada amostra biológica, juntamente com um modelo livre de reações como controle negativo. O ciclo limite (CT) foi determinado automaticamente pelo instrumento e o cálculo de

expressão relativa foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ descrito por Livak e Schmittgen (2001). O método escolhido para análise da expressão gênica é considerado relativo uma vez que a transcrição do gene de interesse não foi expressa em número absoluto de transcritos da amostra, e sim em relação à quantidade relativa de transcritos de outro gene, cuja expressão é tida como constante, sendo denominado gene normalizador (SERENO, 2009).

3.5 Análises estatísticas

O programa “Infostat Statistics Base” (versão 2012, Córdoba, Argentina) foi utilizado para realizar as análises estatísticas. A comparação de significância foi feita a partir do teste de Tukey ou do teste t em conjunto com ANOVA (STEEL et al., 1996).

4 RESULTADOS

4.1 Efeito combinado da aplicação exógena de $_{\text{His}}\text{AtRALF1}$ e citocininas no crescimento das raízes de arabidopsis

Com o intuito de investigar a relação entre o peptídeo sinal AtRALF e a citocinina, plantas de arabidopsis foram tratadas com três tipos de citocinina, BAP (6-benzilaminopurina), cinetina e trans-zeatina, combinados com $10\mu\text{M}$ do peptídeo $_{\text{His}}\text{AtRALF1}$, uma isoforma específica de raízes (HARUTA et al., 2008; LAMESCH et al., 2011). Os resultados dos tratamentos isolados e combinados de $_{\text{His}}\text{AtRALF1}$, BAP, cinetina e trans-zeatina foram expressos em percentual de crescimento das raízes com relação ao observado em plantas não tratadas, controle (Figura 1).

Figura 1 - Efeito combinado da aplicação exógena de citocinina com $_{\text{His}}\text{AtRALF1}$ no crescimento das raízes de plantas Col-0 (WT). Sementes de arabidopsis foram germinadas em meio líquido; após dois dias, $10\mu\text{M}$ do peptídeo $_{\text{His}}\text{AtRALF1}$ (R1) e $0,1\mu\text{M}$ dos diferentes tipos de citocinina, BAP (B), cinetina (K), trans-zeatina (Z), ou igual volume de água (C), foram adicionados no meio de cultura. O crescimento das raízes foi medido após três dias de exposição aos tratamentos ($n=30$). Colunas com letras iguais não são estatisticamente diferentes ($P<0,05$)

O crescimento das raízes nas plantas tratadas somente com as citocininas ou somente com o $_{\text{His}}\text{AtRALF1}$ foi menor que 60% quando comparado com o controle (Figura 1). Plantas tratadas com o peptídeo $_{\text{His}}\text{AtRALF1}$ cresceram 59% em relação ao controle (100%) e plantas tratadas apenas com BAP, cinetina ou trans-

zeatina cresceram 51%, 54% e 50% em relação ao controle, respectivamente (Figura 1).

No efeito combinado de $_{His}AtRALF1$ com os diferentes tipos de citocinina observou-se um menor crescimento da raiz em relação às plantas que foram tratadas apenas com $_{His}AtRALF1$ ou citocinina separadamente (Figura 1). Em percentual, plantas tratadas com $_{His}AtRALF1$ + BAP cresceram 44%, $_{His}AtRALF1$ + cinetina, 47% e $_{His}AtRALF1$ + trans-zeatina, 34% (Figura 1).

Com a finalidade de descobrir se a capacidade da citocinina inibir raiz é influenciada por diferentes concentrações endógenas do peptídeo *AtRALF1*, plantas que superexpressam *AtRALF1* (35S:*AtRALF1*) e que apresentam baixo nível de transcritos para o gene *AtRALF1* (*irAtRALF1*) foram avaliadas quando tratadas com diferentes concentrações de BAP (Figura 2A-C).

Figura 2 - Efeito da aplicação exógena de citocinina no crescimento das raízes de (A) plantas selvagens (Col-0), (B) plantas que apresentam baixo nível de transcritos para o gene *AtRALF1* (*irAtRALF1*) e (C) plantas que superexpressam *AtRALF1* (35S:*AtRALF1*). As sementes de arabisopsis foram germinadas em meio semi-sólido e após dois dias foram transferidas para placas contendo diferentes concentrações da citocinina BAP (0,5 μ M, 0,3 μ M e 0,1 μ M). O crescimento das raízes foram avaliados no decorrer de 10 dias após o tratamento com citocinina (n=30)

Analisando-se os resultados pode-se observar que a citocinina inibe o crescimento da raiz independentemente da quantidade endógena maior (35S:*AtRALF1*) ou menor (*irAtRALF1*) do peptídeo *AtRALF1* (Figura 2A-C). No entanto, o nível de inibição da raiz variou entre os diferentes genótipos tratados com citocinina.

Pode-se observar nas plantas selvagens tratadas com BAP (Figura 2A) que a partir do quarto dia o crescimento das raízes praticamente cessa e não é possível observar uma diferença significativa entre as concentrações de BAP utilizadas. No décimo dia, as raízes das plantas selvagens tratadas com 0,1 μ M de BAP são 3,29 vezes menores do que às raízes das plantas não tratadas (Figura 2A).

Nas plantas que silenciam parcialmente *AtRALF1* (irAtRALF1) tratadas com BAP (Figura 2B), as raízes pararam de crescer no quinto dia. No décimo dia, observou-se que as raízes dessas plantas tratadas com 0,1 μ M de BAP foram 2,32 vezes menores em relação às raízes das plantas selvagens não tratadas (Figura 2A e B).

O crescimento da raiz em plantas que superexpressam *AtRALF1* (35S:AtRALF1) tratadas com BAP (Figura 2C) é interrompido no quarto dia. No décimo dia, as raízes das plantas 35S:AtRALF1 tratadas com 0,1 μ M de BAP são 8,35 vezes menores quando comparadas as plantas selvagens não tratadas com BAP (Figura 2A e C).

4.2 Efeito combinado da aplicação exógena de _{His}AtRALF19 e citocininas no crescimento das raízes de arabidopsis

Os peptídeos RALFs em arabidopsis são constituídos por uma família multigênica que possuem padrões de expressão heterogêneos (LAMESCH et al., 2011; CAO; SHI, 2012). Diante desse cenário, foi avaliado o crescimento das raízes de plantas tratadas com _{His}AtRALF19, uma isoforma de expressão ubíqua, em combinação com três tipos de citocinina (BAP, cinetina e trans-zeatina). Os resultados dos tratamentos isolados e combinados de _{His}AtRALF19, BAP, cinetina e trans-zeatina foram expressos em percentual de crescimento das raízes, com relação ao observado em plantas controle não tratadas (Figura 3).

Quando as plantas selvagens foram tratadas com o peptídeo _{His}AtRALF19 o percentual de inibição foi de 51%. Consequentemente, o percentual de crescimento em relação às plantas controle foi de 49% (Figura 3). Nas plantas tratadas com apenas um dos tipos de citocinina observou-se os seguintes percentuais de crescimento: 50% BAP, 64% cinetina e 54% trans-zeatina (Figura 3).

O efeito combinado de _{His}AtRALF19 com os diferentes tipos de citocinina causou um menor crescimento da raiz, em relação às plantas que foram tratadas

apenas com $_{\text{His}}$ AtRALF19 ou citocinina (Figura 3). Em percentual, plantas tratadas com $_{\text{His}}$ AtRALF19 e BAP cresceram 40%, $_{\text{His}}$ AtRALF19 e cinetina 47%, $_{\text{His}}$ AtRALF19 e trans-zeatina 36% (Figura 3).

Figura 3 - Efeito combinado da aplicação exógena de citocinina com $_{\text{His}}$ AtRALF19 no crescimento das raízes de plantas Col-0 (WT). As sementes de arábidoopsis foram germinadas em meio líquido; após dois dias, 10 μ M do peptídeo $_{\text{His}}$ AtRALF19 (R19) e 0,1 μ M dos diferentes tipos de citocinina, BAP (B), cinetina (K), trans-zeatina (Z), ou igual volume de água (C), foram adicionados no meio de cultura. O crescimento das raízes foi medido após três dias de exposição aos tratamentos (n=30). Colunas com letras iguais não são estatisticamente diferentes (P<0,05).

4.3 Efeito combinado da aplicação exógena de $_{\text{His}}$ AtRALF34 e citocininas no crescimento das raízes de arábidoopsis

Também com a finalidade de avaliar as respostas de outros AtRALFs de perfil de expressão mais generalizado e não tecido-específico, o peptídeo AtRALF34 foi avaliado quanto ao seu efeito quando aplicado juntamente com citocinina. O gene AtRALF34 é expresso em diferentes níveis nas folhas, inflorescências e raízes (MORATO DO CANTO et al., 2014).

Os resultados do crescimento da raiz de plantas que foram tratadas com $_{\text{His}}$ AtRALF34, BAP, cinetina ou trans-zeatina estão expressos em percentual de crescimento com relação ao observado em plantas controle não tratadas (Figura 4).

Nas plantas selvagens tratadas com o peptídeo $_{\text{His}}$ AtRALF34, o percentual de crescimento em relação às plantas controle equivale a 77% (Figura 4). As plantas que foram tratadas com um dos tipos de citocinina obtiveram os seguintes percentuais de crescimento: 48% BAP, 60% cinetina e 45% trans-zeatina (Figura 4).

O efeito combinado de HisAtRALF34 com os diferentes tipos de citocinina acarretou menor crescimento das raízes em relação às plantas que foram tratadas somente com HisAtRALF34 ou citocinina (Figura 4). Em percentual, plantas tratadas com HisAtRALF34 e BAP cresceram 41%, HisAtRALF34 e cinetina, 44%, HisAtRALF34 e trans-zeatina, 36% (Figura 4).

Figura 4 - Efeito combinado da aplicação exógena de citocinina com HisAtRALF34 no crescimento das raízes de plantas Col-0 (WT). As sementes de *arabidopsis* foram germinadas em meio líquido; após dois dias, $10\mu\text{M}$ do peptídeo HisAtRALF34 (R34) e $0,1\mu\text{M}$ dos diferentes tipos de citocinina, BAP (B), cinetina (K), trans-zeatina (Z), ou igual volume de água (C), foram adicionados no meio de cultura. O crescimento das raízes foi medido após três dias de exposição aos tratamentos ($n=30$). Colunas com letras iguais não são estatisticamente diferentes ($P<0,05$)

4.4 Crescimento das raízes em plantas com alta concentração endógena de citocinina, mutantes *ckx2*, e plantas com baixa concentração endógena de citocinina, 35S:CKX2, tratadas com os peptídeos HisAtRALF1 , HisAtRALF19 e HisAtRALF34

Para testar se o efeito inibitório dos peptídeos sinais AtRALF1, AtRALF19 e AtRALF34 no crescimento das raízes está relacionado com o teor endógeno de citocinina foi utilizado o mutante *ckx2* com a inserção de um T-DNA no gene *CKX2*. O gene *CKX2* (*CITOKININ OXIDASE/DEHYDROGENASE*) codifica uma enzima que catalisa a degradação de citocininas de forma irreversível, sendo responsável pela maioria da inativação metabólica de citocinina (MOK; MOK, 2001). O mutante *ckx2* apresenta maior teor endógeno de citocinina em relação a uma planta selvagem e, consequentemente, o tamanho das raízes são menores (ALONSO et al., 2003)

(Figura 5A e B). Neste sentido, também foram avaliadas plantas que superexpressam o gene *CKX2* (35S:CKX2), nas quais o comprimento das raízes são maiores, pois, ao contrário do mutante *ckx2*, possui menor quantidade de citocinina (WERNER et al., 2003) (Figura 5A e C).

Figura 5 - Tamanho das raízes dos genótipos (A) Col-0, (B) *ckx2* e (C) 35S:CKX2. As sementes de *arabidopsis* foram germinadas em meio líquido, e as imagens foram obtidas após cinco dias. Barra = 25mm

O efeito inibitório, no crescimento das raízes, dos peptídeos $_{His}AtRALF1$, $_{His}AtRALF19$ ou $_{His}AtRALF34$ nos genótipos Col-0, *ckx2* e 35S:CKX2 foi avaliado.

Nas plantas selvagens (Col-0) não tratadas (controle) as raízes cresceram 0,16cm. O crescimento das raízes nas plantas tratadas com os peptídeos $_{His}AtRALF1$ e $_{His}AtRALF19$ foi semelhante, 0,09cm e 0,07cm respectivamente (Figura 6). O peptídeo $_{His}AtRALF34$ afetou o crescimento das raízes de modo mais sutil (0,13cm), diferentemente das isoformas $_{His}AtRALF1$ e $_{His}AtRALF19$ (Figura 6).

Nos mutantes *ckx2* tratados com a isoforma $_{His}AtRALF1$, $_{His}AtRALF19$ ou $_{His}AtRALF34$ observou-se o mesmo nível de inibição (Figura 6). O crescimento das raízes nas plantas *ckx2* tratadas com $_{His}AtRALF1$, $_{His}AtRALF19$ ou $_{His}AtRALF34$ foi de 0,06cm, 0,05cm e 0,05cm respectivamente. O tamanho das raízes das plantas *ckx2* não tratadas foi de 0,12cm (Figura 6).

As plantas que superexpressam *CKX2* (35S:CKX2) apresentam raízes com o comprimento menor quando tratadas com qualquer uma das três isoformas do peptídeo AtRALF, $_{His}AtRALF1$, $_{His}AtRALF19$ ou $_{His}AtRALF34$ (Figura 6). As plantas 35S:CKX2 tratadas com $_{His}AtRALF1$ apresentam raízes significativamente menores (0,10cm) quando comparadas com o tamanho das raízes tratadas com $_{His}AtRALF19$ (0,15cm) ou $_{His}AtRALF34$ (0,14cm) (Figura 6). O tamanho das raízes nas plantas

35S:CKX2 que não foram tratadas com nenhuma das isoformas do peptídeo AtRALF foi de 0,37cm.

Apesar da intensidade da inibição ser diferente para os AtRALFs testados, os resultados indicam que, independentemente do teor endógeno de citocinina, maior (*ckx2*) ou menor (35S:CKX2), as três isoformas ^{His}AtRALF1, ^{His}AtRALF19 e ^{His}AtRALF34 inibem o crescimento das raízes.

Figura 6 - Efeito da aplicação exógena de ^{His}AtRALF1, ^{His}AtRALF19, e ^{His}AtRALF34 no crescimento das raízes de diferentes genótipos (Col-0, *ckx2*, 35S:CKX2). As sementes de *Arabidopsis* foram germinadas em meio líquido; após dois dias, 10μM de cada peptídeo ^{His}AtRALF1 (R1), ^{His}AtRALF19 (R19), ^{His}AtRALF34 (R34), ou igual volume de água (C), foram adicionados no meio de cultura. O crescimento das raízes foi medido após três dias de exposição aos tratamentos (n=30). ↑[CK] = mais citocinina que Col-0 e ↓[CK] = menos citocinina que Col-0. Colunas com letras iguais não são estatisticamente diferentes (P<0,05)

4.5 ^{His}AtRALF1 interfere na expressão dos genes reguladores de resposta de *Arabidopsis* *ARR4*, *ARR5*, *ARR6*, *ARR7* e *ARR15*

As citocininas aumentam a expressão dos genes reguladores de resposta de *Arabidopsis* (*ARRs*) tipo-A, genes estes que regulam negativamente a via de sinalização da citocinina (D'AGOSTINO et al., 2000). As induções desses genes servem para atenuar as respostas aos níveis elevados de citocinina (D'AGOSTINO et al., 2000). Com o objetivo de saber se o peptídeo AtRALF1 altera o nível de

expressão desses genes induzidos por citocinina foram realizadas análises de expressão semi-quantitativas (RT-PCR) e quantitativas (RT-qPCR).

As análises de expressão foram realizadas em raízes de plantas de *arabidopsis* tratadas com citocinina (BAP 1 μ M) e diferentes concentrações do peptídeo $_{His}$ AtRALF1. Nessas análises foram avaliados os níveis de transcritos dos genes *ARRs* tipo-A que são expressos em raízes, *ARR4*, 5, 6, 7 e 15.

Os dados semi-quantitativos (Figura 7) indicam que o peptídeo AtRALF1 reprime os genes *ARRs* tipo-A. No entanto, a diferença no padrão de expressão gênica entre os tratamentos e genes avaliados é bastante sutil, sendo em algumas situações difícil perceber se o padrão de expressão desses genes foi alterado significativamente.

Figura 7 - Análises de expressão por RT-PCR semi-quantitativo dos genes *ARRs* tipo-A em raízes de plantas Col-0 tratadas com $_{His}$ AtRALF1 e BAP. Esses genes são reguladores negativos da via de sinalização de citocinina. As análises de expressão foram realizadas com plantas selvagens (Col-0) com 12 dias de idade. O RNA total foi extraído das raízes após 30 minutos de tratamento com diferentes concentrações do peptídeo $_{His}$ AtRALF1 e 1 μ M BAP. O gene *GAPDH* foi usado como controle interno

Nas análises quantitativas foi possível confirmar a existência de variações no padrão de expressão dos diferentes genes *ARRs* tipo-A. Dependendo da concentração do peptídeo $_{His}$ AtRALF1 e do gene *ARR* avaliado, o peptídeo $_{His}$ AtRALF1 induz ou reprime os genes *ARRs* avaliados.

Na concentração de 0,25 μ M o peptídeo $_{His}$ AtRALF1 reprime os genes *ARR6*, *ARR7* e *ARR15*, mas na concentração de 1,0 μ M o peptídeo $_{His}$ AtRALF1 induz esses genes (Figura 8). Os genes *ARR4* e *ARR5* são reprimidos pelo peptídeo $_{His}$ AtRALF1

nas concentrações de 0,5 e 1,0 μ M e são induzidos na concentração de 0,25 μ M (Figura 8).

Figura 8 - Análises de expressão por RT-qPCR dos genes *ARRs* tipo-A em raízes de plantas Col-0 tratadas com HisAtRALF1 e BAP. Esses genes são reguladores negativos da via de sinalização de citocinina. As análises de expressão foram realizadas com plantas selvagens (Col-0) com 12 dias de idade. O RNA total foi extraído das raízes após 30 minutos de tratamento com diferentes concentrações do peptídeo HisAtRALF1 e 1 μ M BAP. O gene *GAPDH* foi usado como controle interno. Colunas com letras iguais não são estatisticamente diferentes ($P < 0,01$)

4.6 HisAtRALF19 reprime parcialmente os genes reguladores de resposta de arabidopsis *ARR4*, *ARR5*, *ARR6*, *ARR7* e *ARR15*

Em raízes de arabidopsis tratadas com citocinina (BAP 1 μ M) e diferentes concentrações do peptídeo HisAtRALF19 avaliou-se os níveis de expressão dos

genes *ARRs* tipo-A (*ARR4*, 5, 6, 7 e 15) através de análises semi-quantitativas (RT-PCR) e quantitativas (RT-qPCR).

Nas análises de expressão semi-quantitativas foi observado que o peptídeo AtRALF19 reprime os genes *ARRs* tipo-A (Figura 9). Quando os níveis de transcritos obtidos nas raízes das plantas que foram tratadas apenas com citocinina e aquelas que foram tratadas simultaneamente com o peptídeo HisAtRALF19 e citocinina são comparados pode-se observar uma menor expressão gênica dos *ARRs* tipo-A (Figura 9). A menor expressão dos genes *ARRs* tipo-A na presença do peptídeo HisAtRALF19 é visualizada principalmente nas raízes das plantas que foram tratadas com $1\mu\text{M}$ de HisAtRALF19 e $1\mu\text{M}$ de BAP (Figura 9).

Figura 9 - Análises de expressão por RT-PCR semi-quantitativo dos genes *ARRs* tipo-A em raízes de plantas Col-0 tratadas com HisAtRALF19 e BAP. Esses genes são reguladores negativos da via de sinalização de citocinina. As análises de expressão foram realizadas com plantas selvagens (Col-0) com 12 dias de idade. O RNA total foi extraído das raízes após 30 minutos de tratamento com diferentes concentrações do peptídeo HisAtRALF19 e $1\mu\text{M}$ BAP. O gene *GAPDH* foi usado como controle interno

Com o intuito de quantificar os níveis de expressão de cada um dos genes estudados sob os diferentes tratamentos foram realizadas análises quantitativas por PCR em tempo real. Os resultados confirmam que a expressão dos genes *ARRs* tipo-A avaliados são reprimidos pelo peptídeo AtRALF19 (Figura 10).

Figura 10 - Análises de expressão por RT-qPCR dos genes *ARRs* tipo-A em raízes de plantas Col-0 tratadas com HisAtRALF19 e BAP. Esses genes são reguladores negativos da via de sinalização de citocinina. As análises de expressão foram realizadas com plantas selvagens (Col-0) com 12 dias de idade. O RNA total foi extraído das raízes após 30 minutos de tratamento com diferentes concentrações do peptídeo HisAtRALF19 e 1 μM BAP. O gene *GAPDH* foi usado como controle interno. Colunas com letras iguais não são estatisticamente diferentes ($P < 0,01$)

Nas análises quantitativas observa-se que o peptídeo HisAtRALF19 reprime os genes *ARRs* tipo-A por dose dependência, ou seja, o aumento na concentração do peptídeo HisAtRALF19 ocasiona maior repressão desses genes (Figura 10). O nível de indução e repressão variou entre os genes avaliados. A indução dos genes *ARR4*, *ARR5*, *ARR6*, *ARR7* e *ARR15* nas raízes das plantas tratadas apenas com citocinina foi 10, 38, 32, 39 e 17 respectivamente. E nas raízes tratadas

simultaneamente com 1 μ M de BAP e 1 μ M de $_{\text{His}}$ AtRALF19 a expressão desses genes foi 6, 26, 14, 28 e 5 respectivamente (Figura 10).

4.7 $_{\text{His}}$ AtRALF34 reprime parcialmente os genes reguladores de resposta de arabidopsis *ARR4*, *ARR5*, *ARR6*, *ARR7*, *ARR15*

Os níveis de transcritos dos genes *ARRs* tipo-A (*ARR4-7* e *ARR15*) na presença do peptídeo $_{\text{His}}$ AtRALF34 também foram avaliados por RT-PCR (Figura 11) e RT-qPCR (Figura 12). As análises de expressão gênica, semelhante às mencionadas anteriormente, foram realizadas em raízes de arabidopsis tratadas com citocinina (BAP 1 μ M) e diferentes concentrações do peptídeo $_{\text{His}}$ AtRALF34.

Nas análises de expressão semi-quantitativas (Figura 11) observa-se que os genes *ARRs* tipo-A são parcialmente reprimidos por AtRALF34.

Figura 11 - Análises de expressão por RT-PCR semi-quantitativo dos genes *ARRs* tipo-A em raízes de plantas Col-0 tratadas com $_{\text{His}}$ AtRALF34 e BAP. Esses genes são reguladores negativos da via de sinalização de citocinina. As análises de expressão foram realizadas com plantas selvagens (Col-0) com 12 dias de idade. O RNA total foi extraído das raízes após 30 minutos de tratamento com diferentes concentrações do peptídeo $_{\text{His}}$ AtRALF34 e 1 μ M BAP. O gene *GAPDH* foi usado como controle interno

As diferenças nos níveis de expressão desses genes sob os diferentes tratamentos foram mensuradas nas análises quantitativas por RT-qPCR (Figura 12). Os níveis de indução e repressão variaram entre os genes avaliados. No entanto, apesar dessa variação, observou-se que o peptídeo $_{\text{His}}$ AtRALF34 reprime os genes *ARRs* tipo-A (Figura 12).

Figura 12 - Análises de expressão por RT-qPCR dos genes *ARRs* tipo-A em raízes de plantas Col-0 tratadas com HisAtRALF34 e BAP. Esses genes são reguladores negativos da via de sinalização de citocinina. As análises de expressão foram realizadas com plantas selvagens (Col-0) com 12 dias de idade. O RNA total foi extraído das raízes após 30 minutos de tratamento com diferentes concentrações do peptídeo HisAtRALF34 e 1 μM BAP. O gene *GAPDH* foi usado como controle interno. Colunas com letras iguais não são estatisticamente diferentes ($P < 0,01$)

A expressão dos genes *ARRs* nas raízes das plantas tratadas apenas com BAP foi: 2,5 para *ARR4*; 22 para *ARR5*; 9 para *ARR6*; 24 para *ARR7* e 9 para *ARR15*. Nas raízes das plantas tratadas com 1 μM de BAP e 1 μM HisAtRALF34 a expressão dos genes *ARR4*, *ARR5*, *ARR6*, *ARR7* e *ARR15* foi de 1,3; 17; 4; 12 e 2 respectivamente.

Os níveis de expressão dos genes *ARR4-7* e *ARR15* também foram avaliados em plantas que superexpressam o gene *AtRALF34* (35S:AtRALF34) através de análises semi-quantitativas (Figura 13) e quantitativas (Figura 14). As análises de expressão gênica foram realizadas em raízes de plantas selvagens (Col-0) e 35S:AtRALF34.

Conforme o esperado, plantas que superexpressam o gene *AtRALF34* exibiram menores níveis de transcritos dos genes *ARRs* tipo-A, em relação às plantas selvagens (Figuras 13 e 14).

Figura 13 - Análises de expressão por RT-PCR semi-quantitativo dos genes *ARRs* tipo-A em raízes de plantas Col-0 e 35S:AtRALF34. Esses genes são reguladores negativos da via de sinalização de citocinina. As análises de expressão foram realizadas com plantas selvagens (Col-0) e que superexpressam *AtRALF34* (35S:AtRALF34) com 12 dias de idade. O RNA total foi extraído das raízes. O gene *GAPDH* foi usado como controle interno

Figura 14 - Análises de expressão por RT-qPCR dos genes *ARRs* tipo-A em raízes de plantas Col-0 e 35S:AtRALF34. Esses genes são reguladores negativos da via de sinalização de citocinina. As análises de expressão foram realizadas com plantas selvagens (Col-0) e que superexpressam *AtRALF34* (35S:AtRALF34) com 12 dias de idade. O RNA total foi extraído das raízes. O gene *GAPDH* foi usado como controle interno. O asterisco representa diferença significativa em relação a Col-0 (**P<0,01)

5 DISCUSSÃO

O correto crescimento e desenvolvimento das plantas são influenciados por inúmeros aspectos genéticos, fisiológicos e ambientais. Em raízes, assim como em outros órgãos e tecidos vegetais, diferentes moléculas de sinalização interagem, coordenadamente, para controlar a proliferação, o alongamento e a diferenciação das células (TAKATSUKA; UMEDA, 2014). Diferentes aspectos da interferência hormonal no desenvolvimento radicular foram revistos recentemente (BISHOPP et al., 2011; DEPUYDT; HARDTKE, 2011; ROSS et al., 2011; GARAY ARROYO et al., 2012; HWANG et al., 2012; VANSTAELEN; BENKOVA, 2012). As associações entre hormônios, genes reguladores e genes alvos resultam em interações complexas onde os genes regulam as atividades hormonais e os hormônios regulam a expressão gênica (LIU et al., 2014).

O alongamento celular é controlado por citocinina, no entanto, o mecanismo molecular deste controle negativo permanece desconhecido (TAKATSUKA; UMEDA, 2014). O peptídeo sinal RALF também participa do desenvolvimento radicular regulando negativamente o alongamento celular por um mecanismo que ainda não está completamente elucidado (PEARCE et al., 2001; MINGOSSO et al., 2010; COVEY et al., 2010; BERGONCI et al., 2014; HARUTA et al., 2014). Neste trabalho buscou-se um melhor entendimento da inter-relação do peptídeo AtRALF e da citocinina com o objetivo de melhor entender o papel do peptídeo na regulação da expansão celular e, conseqüentemente, no desenvolvimento e crescimento das raízes.

O fato dos peptídeos RALFs serem encontrados somente em plantas e de serem ubíquos no reino vegetal sugere uma função básica no desenvolvimento dos vegetais. Diante desse cenário, foi avaliado o crescimento das raízes de *arabidopsis* tratadas simultaneamente com a citocinina e o peptídeo $_{His}$ AtRALF. Devido aos diferentes padrões de expressão dos genes que codificam peptídeos RALFs em *arabidopsis*, foram utilizados nos experimentos três isoformas. O peptídeo AtRALF1, expresso principalmente em raízes; o AtRALF19, que possui expressão ubíqua, ou seja, em toda a planta; e o AtRALF34, expresso em diferentes níveis nas folhas e inflorescências, sendo pouco expresso em raiz (HARUTA et al., 2008; LAMESCH et al., 2011; MORATO DO CANTO et al., 2014).

Nas plantas tratadas simultaneamente com citocinina e com os peptídeos recombinantes $_{His}AtRALF1$, $_{His}AtRALF19$ ou $_{His}AtRALF34$ observou-se uma maior inibição do crescimento da raiz, em relação às plantas que foram tratadas apenas com $_{His}AtRALF$ ou citocinina. Sugerindo que ambos os sinais, citocinina e $AtRALF$, funcionam de forma aditiva no processo de inibição da raiz.

Quando as plantas foram tratadas apenas com o peptídeo $_{His}AtRALF34$ houve uma inibição de 23% e o efeito combinado de $_{His}AtRALF34$ com citocinina causou uma inibição em torno de 60%, independentemente da fonte de citocinina utilizada (Figura 4). Em plantas tratadas apenas com o $_{His}AtRALF1$ ou $_{His}AtRALF19$ a inibição foi de 41% e 51%, respectivamente (Figura 1 e 3). O efeito combinado de citocinina (trans-zeatina) com $_{His}AtRALF1$ ou $_{His}AtRALF19$ inibiu o crescimento das raízes em torno de 60% (Figura 1 e 3), similar ao que foi observado nas plantas tratadas com citocinina e $_{His}AtRALF34$ (Figura 4). Desse modo, pode-se observar que os peptídeos $AtRALF1$, $AtRALF19$ e $AtRALF34$ possuem padrões de inibição distintos quando usados isoladamente, no entanto, o efeito combinado dessas isoformas com a citocinina causam o mesmo nível de inibição (Figuras 1, 3 e 4).

Analisando plantas que superexpressam e silenciam parcialmente o gene *AtRALF1* observou-se que a citocinina conseguiu inibir o crescimento da raiz, independentemente da quantidade endógena do peptídeo $AtRALF1$ ser maior (35S:*AtRALF1*) ou menor (ir*AtRALF1*) (Figura 2). Entretanto, a intensidade desta inibição variou em relação ao teor endógeno do peptídeo $AtRALF1$ (Figura 2). As plantas selvagens (Figura 2A) e que superexpressam *AtRALF1* (Figura 2C) quando tratadas com citocinina praticamente cessaram o crescimento da raiz no quarto dia. As raízes das plantas ir*AtRALF1* tratadas com citocinina pararam de crescer no quinto dia (Figura 2B). Estes resultados sugerem que o menor teor endógeno do peptídeo $AtRALF1$ contribui para prolongar o crescimento da raiz.

Plantas superexpressando o gene *AtRALF1* tratadas com citocinina apresentaram maior inibição das raízes do que as plantas selvagens (Figura 2). Plantas selvagens tratadas com 0,1 μ M de BAP exibiram raízes 3,29 vezes menores em relação as não tratadas com citocinina (Figura 2A). No entanto, as plantas 35S:*AtRALF1* tratadas com a mesma concentração de BAP apresentaram raízes 8,35 vezes menores do que as plantas selvagens não tratadas (Figura 2A e C). O tratamento exógeno com o peptídeo $_{His}AtRALF1$ e citocinina apresentou resultados semelhantes (Figura 1), ou seja, há um acréscimo na inibição da raiz quando as

plantas são expostas a essas duas moléculas de sinalização. As plantas *irAtRALF1* tratadas com 0,1 μ M de BAP apresentaram menor inibição de raiz do que as plantas selvagens tratadas com esta mesma concentração de citocinina (Figura 2A e B). Observou-se que as plantas *irAtRALF1* tratadas com citocinina possuem raízes 2,32 vezes menores que as plantas selvagens não tratadas (Figura 2A e B). E as plantas selvagens tratadas com citocinina tiveram raízes 3,29 vezes menores do que as raízes das plantas não tratadas, como mencionado anteriormente (Figura 2A). Esses resultados indicam que peptídeos *AtRALFs* e citocinina regulam negativamente o crescimento da raiz e que a ação conjunta dessas duas moléculas de sinalização potencializa a inibição do crescimento das raízes.

Testando-se o efeito da exposição a *HisAtRALF1*, *HisAtRALF19* e *HisAtRALF34* em plantas com maior e menor teor endógeno de citocinina, *ckx2* e 35S:CKX2, respectivamente, foi possível observar um aumento na inibição das raízes em plantas que possuem maior teor endógeno de citocinina (Figura 6). As plantas que possuem menor teor endógeno de citocinina tratadas com uma das isoformas do peptídeo *AtRALF*, *HisAtRALF1*, *HisAtRALF19* e *HisAtRALF34*, apresentaram potencial de inibição menor ou igual às plantas selvagens tratadas com *HisAtRALF1*, *HisAtRALF19* ou *HisAtRALF34* (Figura 6). Esses resultados se assemelham com o que foi observado nas plantas selvagens tratadas exogenamente com citocinina e peptídeo *HisAtRALF* (Figuras 1, 3 e 4), sugerindo mais uma vez que a ação conjunta dessas duas moléculas potencializa o processo de inibição de raiz.

A utilização de genes que alteram sua expressão como marcadores moleculares da ação de diferentes elicitores têm contribuído para um melhor entendimento não somente dos efeitos, mas também das vias de sinalização envolvidas. Dentre os genes marcadores de citocinina descritos na literatura estão os *ARRs* tipo-A que são induzidos por citocinina (D'AGOSTINO et al., 2000). Esses genes regulam negativamente a sinalização de citocinina e a indução desses genes por citocinina serve para atenuar as respostas aos níveis elevados de citocinina (D'AGOSTINO et al., 2000; TO et al., 2004). Nas análises de expressão realizadas (Figuras 10, 12 e 14) pode-se observar que os peptídeos *AtRALF19* e 34 reprimem os genes *ARRs* tipo-A e dessa forma contribuem com a via de transdução de sinal da citocinina.

A expressão gênica difere entre os vários *ARRs* tipo-A, com *ARR4* exibindo níveis basais relativamente elevados e *ARR5*, *ARR6*, *ARR7* e *ARR15* mostrando a

maior indução em resposta a citocinina (D'AGOSTINO et al., 2000; RASHOTTE et al., 2003; TO et al., 2004; TAKATSUKA; UMEDA, 2014). O mesmo pode ser percebido nas análises de expressão que foram realizadas neste trabalho. Onde podemos observar que o nível de indução do *ARR4* por citocinina é sempre menor que a indução ocasionada por citocinina nos demais *ARRs* avaliados (*ARR5*, *ARR6*, *ARR7* e *ARR15*) (Figuras 8, 10 e 12).

Nas análises de expressão realizadas em raízes de *arabidopsis* foi observado que a repressão dos genes *ARRs* tipo-A causada pelos peptídeos AtRALF19 e AtRALF34 é dependente da concentração do peptídeo (Figuras 9, 10, 11 e 12). O nível de indução e repressão variou entre os genes avaliados. O peptídeo AtRALF1 não apresentou a mesma tendência de repressão (Figuras 7 e 8). Essas divergências no padrão de repressão das diferentes isoformas do peptídeo AtRALF podem estar relacionadas com as diferentes regiões que esses peptídeos e os genes *ARRs* estão sendo expressos nas raízes e a consequente diferença na percepção de cada um. Morato do Canto et al. (2014), utilizando o ensaio de alcalinização, mostraram a existência de múltiplos receptores para os peptídeos AtRALFs.

Os resultados obtidos sugerem a existência de uma inter-relação entre o peptídeo sinal AtRALF e a citocinina na modulação do crescimento das raízes. A inter-relação indica que citocinina e AtRALF compartilham elementos em suas vias de sinalização. A repressão dos *ARRs* tipo-A pelo peptídeo AtRALF leva à ativação da sinalização de citocinina e, consequentemente, a potencialização da inibição das raízes.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os peptídeos sinais AtRALF19 e AtRALF34 regulam positivamente a sinalização de citocinina através da repressão dos genes *ARRs* tipo-A durante o desenvolvimento radicular.

Os *ARRs* tipo-A, possivelmente, posicionam-se no final da via de sinalização do peptídeo AtRALF, no entanto, os mecanismos que alteram a expressão dos *ARRs* tipo-A são específicos para cada AtRALF.

Estudos tecido-específicos sobre a ação dos peptídeos AtRALF e da citocinina podem ajudar a esclarecer se as respectivas redes de regulação em diferentes tecidos são semelhantes, em termos de seus componentes e interações regulatórias.

REFERÊNCIAS

- ALONSO, J.M.; STEPANOVA, A.N.; LEISSE, T.M.; KIM, C.J.; CHEN, H.; SHINN, P.; STEVENSON, D.K.; ZIMMERMAN, J.; BARAJAS, P.; CHEUK, R.; GADRINAB, C.; HELLER C.; JESKE, A.; KOESEMA, E.; MEYERS, C.C.; PARKER, H.; PREDNIS L.; ANSARI, Y.; CHOY, N.; DEEN, H.; GERALT, M.; HAZARI, N.; HOM, E.; KARNES, M.; MULHOLLAND, C.; NDUBAKU, R.; SCHMIDT, I.; GUZMAN, P.; AGUILAR-HENONIN, L.; SCHIMD, M.; WEIGEL, D.; CARTER, D.E.; MARCHAND, T.; RISSEEUW, E.; BROGDEN, D.; ZEKO, A.; CROSBY, W.L.; BERRY, C.C.; ECKER, J.R. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. **Science**, New York, v. 301, p. 653-657, 2003.
- ANANTHARAMAN, V.; ARAVIND, L. The CHASE domain: a predicted ligand-binding module in plant cytokinin receptors and other eukaryotic and bacterial receptors. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 26, p. 579-582, 2001
- ARGUESO, C.T.; RAINES, T.; KIEBER, J.J. Cytokinin signaling and transcriptional networks. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 13, p. 533-539, 2010.
- 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, p. 2028-2041, 2013.
- BENKOVÁ, E.; HEJÁTKO, J. Hormone interactions at the root apical meristem. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 69, p. 383-396, 2009.
- 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, p. 2219-2230, 2014.
- BISHOPP, A.; BENKOVÁ, E.; HELARIUTTA, Y. Sending mixed messages: auxin-cytokinin crosstalk in roots. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 14, p. 10-16, 2011.
- BOYES, D.C.; ZAYED, A.M.; ASCENZI, R.; MCCASKILL, A.J.; HOFFMAN, N.E.; DAVIS, K.R.; GÖRLACH, J. Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 13, p. 1499-1510, 2001.
- BRANDSTATTER, I.; KIEBER, J.J. Two genes with similarity to bacterial response regulators are rapidly and specifically induced by cytokinin in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 10, p. 1009-1019, 1998.
- CAO, J.; SHI, F. Evolution of the *RALF* gene family in plants: gene duplication and selection patterns. **Evolutionary Bioinformatics**, Auckland, v. 8, p. 271-292, 2012.
- CARY, A.J.; LIU, W.; HOWELL, S.H. Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 107, p. 1075-1082, 1995.

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 Journal**, Oxford, v. 73, p. 1019-1933, 2013.

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. 2, p. 703-715, 2010.

D'AGOSTINO, I.B.; DERUÈRE, J.; KIEBER, J.J. Characterization of the response of the Arabidopsis response regulator gene family to cytokinin. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 124, p. 1706-1717, 2000.

DEL BIANCO, M.; GIUSTINI, L.; SABATINI, S. Spatiotemporal changes in the role of cytokinin during root development. **New Phytologist**, London, v. 199, p. 324-338, 2013.

EL-SHOWK, S.; RUONALA, R.; HELARIUTTA, Y. Crossing paths: cytokinin signaling and crosstalk. **Development**, Cambridge, v. 140, p.1373-1383, 2013.

GERMAIN, H.; CHEVALIER, E.; 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. 200, p. 447-454, 2005.

HARUTA, M.; CONSTABEL, C.P. Rapid alkalinization factor in poplar cell cultures: peptide isolation, cDNA cloning, and differential expression in leaves and methyl jasmonate treated cells. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 131, p. 814-823, 2003.

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

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, p. 408-411, 2014.

HEWELT, A.; PRINSEN, E.; SCHELL, J.; VAN ONCKELEN, H.; SCHMULLING, T. Promoter tagging with a promoter less ipt gene leads to cytokinin-induced phenotypic variability in transgenic tobacco plants: implications of gene dosage effects. **The Plant Journal**, Oxford, v. 6, p. 879-891, 1994.

HIGUCHI, M.; PISCHKE, M.S.; MÄHÖNEN, A.P.; MIYAWAKI, K.; HASHIMOTO, Y.; SEKI, M.; KOBAYASHI, M.; SHINOZAKI, K.; KATO, T.; TABATA, S.; HELARIUTTA, Y.; SUSSMAN, M.R.; KAKIMOTO, T. In plant functions of the Arabidopsis cytokinin receptor family. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 101, p. 8821-8826, 2004.

HRADILOVÁ, J.; BRZOBOHATÝ, B. Expression pattern of the *AHP* gene family from *Arabidopsis thaliana* and organ specific alternative splicing in *AHP5* gene. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 51, p. 257-267, 2007.

HUTCHISON, C.E.; LI, J.; ARGUESO, C.; GONZALEZ, M.; LEE, E.; LEWIS, M.W.; MAXWELL, B.B.; PERDUE, T.D.; SCHALLER, G.E.; ALONSO, J.M.; ECKER, J.R.; KIEBER, J.J. The *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling. **The Plant Cell**, Rockville, v. 18, p. 3073-3087, 2006.

HWANG, I.; SHEEN, J. Two-component circuitry in Arabidopsis cytokinin signal transduction. **Nature**, London, v. 413, p. 383-389, 2001.

IMAMURA, A.; YOSHINO, Y.; MIZUNO, T. Cellular localization of the signalling components of Arabidopsis his-to-asp phosphorelay. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 65, p. 2113-2117, 2001.

INOUE, T.; HIGUCHI, M.; HASHIMOTO, Y.; SEKI, M.; KOBAYASHI, M.; KATO, T.; TABATA, T.; SHINOZAKI, K.; KAKIMOTO, T. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from Arabidopsis. **Nature**, London, v. 409, p. 1060-1063, 2001.

ISHIDA, K.; YAMASHINO, T.; YOKOYAMA, A.; MIZUNO, T. Three type-B response regulators, ARR1, ARR10 and ARR12, play essential but redundant roles in cytokinin signal transduction throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 49, p. 47-57, 2008.

KAKIMOTO, T. Perception and signal transduction of cytokinins. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 54, p. 605-627, 2003.

KIBA, T.; AOKI, K.; SAKAKIBARA, H.; MIZUNO, T. Arabidopsis response regulator, ARR22, ectopic expression of which results in phenotypes similar to the wol cytokinin-receptor mutant. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 45, p. 1063-1077, 2004.

KIEBER, J.J.; SCHALLER, G.E. The perception of cytokinin: a story 50 years in the making. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 154, p. 487-492, 2010.

KONDO, Y.; HIRAKAWA, Y.; KIEBER, J.J.; FUKUDA, H. CLE peptides can negatively regulate protoxylem vessel formation via cytokinin signaling. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 4, p. 37-48, 2011.

KUDEROVA, A.; URBANKOVA, I.; VALKOVA, M.; MALBECK, J.; BRZOBOHATY, B.; NEMETHOVA, D.; HEJATKO, J. Effects of conditional IPT-dependent cytokinin overproduction on root architecture of Arabidopsis seedlings. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 49, p. 570-582, 2008.

KUNIKOWSKA, A.; BYCZKOWSKA, A.; DONIAK, M.; KAZMIERCZAK, A. Cytokinins résumé: their signaling and role in programmed cell death in plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 32, p. 771-780, 2013.

KUREPA, J.; LI, Y.; SMALLE, J.A. Cytokinin signaling stabilizes the response activator ARR1. **The Plant Journal**, Oxford, v. 78, p. 157-168, 2014.

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**, London, v. 40, p. 1202-1210, 2011.

LAPLAZE, L.; BENKOVA, E.; CASIMIRO, I.; MAES, L.; VANNESTE, S.; SWARUP, R. Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. **The Plant Cell**, Rockville, v. 19, p. 3889-3900, 2007.

LI, X.; MO, X.; SHOU, H.; WU, P. Cytokinin-mediated cell cycling arrest of pericycle founder cells in lateral root initiation of Arabidopsis. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 47, p. 1112-1123, 2006.

LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, New York, v. 25, p. 402-408, 2001.

MÄHÖNEN, A.P.; BISHOPP, A.; HIGUCHI, M.; NIEMINEN, K.M.; KINOSHITA, K.; TÖRMÄKANGAS, K.; IKEDA, Y.; OKA, A.; KAKIMOTO, T.; HELARIUTTA, Y. Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. **Science**, New York, v. 311, p. 94-98, 2006.

MASON, M.G.; LI, J.; MATHEWS, D.E.; KIEBER, J.J.; SCHALLER, G.E. Type-B response regulators display overlapping expression patterns in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 135, p. 927-937, 2004.

MASON, M.G.; MATHEWS, D.E.; ARGYROS, D.A.; MAXWELL, B.B.; KIEBER, J.J.; ALONSO, J.M.; ECKER, J.R.; SCHALLER, G.E. Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, p. 3007-3018, 2005.

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, p. 3343-3347, 2008.

MATSUBAYASHI, Y.; SAKAGAMI, Y. Peptide hormones in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 649-674, 2006.

MEDFORD, J.I.; HORGAN, R.; EL-SAWI, Z.; KLEE, H.J. Alterations of endogenous cytokinins in transgenic plants using a chimeric isopentenyl transferase gene. **The Plant Cell**, Rockville, v. 1, p. 403-413, 1989.

MINGOSSI, F.B.; MATOS, J.L.; RIZZATO, A.P.; MEDEIROS, A.H.; FALCO, M.C.; SILVAFILHO, 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**, Boston, v. 73, p. 271-281, 2010.

MIZUNO, T. Plant response regulators implicated in signal transduction and circadian rhythm. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, p. 1-7, 2004.

MOK, D.W.S.; MOK, M.C. Cytokinin metabolism and action. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 89-118, 2001.

MORATO DO CANTO, A.; CECILIATO, P.H.O.; RIBEIRO, B.; ORTIZ-MOREA, F.A.; 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.

MOUGEL, C.; ZHULIN, I.B. CHASE: an extracellular sensing domain common to transmembrane receptors from prokaryotes, lower eukaryotes and plants. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 26, p. 582-584, 2001.

MOURA, D.S.; SILVA-FILHO, M.C. Plant peptide hormones, from defense to pollen self-incompatibility, cell fate and development: small peptides as signaling molecules in plants. In: SILVA, J.A.T. **Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues**. London: Global Science Books, 2006. p. 203-209.

MOURA, D.S.; PEARCE, G.; RYAN, C.A. RALF peptides. In: KASTIN, A.J. (Ed.). *The handbook of peptides*. New York: Academic Press, 2006. p.33-36.

MÜLLER, B. Generic signal-specific responses: cytokinin and context-dependent cellular responses. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, p. 3273-3288, 2011.

MURASHIGE, J.L.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

NEMHAUSER, J.L.; MOCKLER, T.C.; CHORY, J. Interdependency of brassinosteroid and auxin signaling in Arabidopsis. **PLOS Biology**, San Francisco, v. 2, p. 1460-1471, 2004.

NISHIMURA, C.; OHASHI, Y.; SATO, S.; KATO, T.; TABATA, S.; UEGUCHI, C. Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. 1365-1377, 2004.

NONGPIUR, R.; SONI, P.; KARAN, R.; SINGLA-PAREEK, S.L.; PAREEK, A. Histidine kinases in plants: cross talk between hormone and stress responses. **Plant Signaling and Behavior**, Georgetown, v. 7, p. 1230-1237, 2012.

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

PEARCE, G.; MOURA, D.S.; STRATMANN, J.; RYAN, C.A. RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 98, p. 12843-12847, 2001.

PEARCE, G.; YAMAGUCHI, Y.; MUNSKE, G.; RYAN, C.A. Structure-activity studies of RALF, rapid alkalization factor, reveal an essential -YISY- motif. **Peptides**, New York, v. 31, p. 1973-1977, 2010.

PUNWANI, J.A.; HUTCHISON, C.E.; SCHALLER, G.E.; KIEBER, J.J. The subcellular distribution of the *Arabidopsis* histidine phosphor transfer proteins is independent of cytokinin signaling. **The Plant Journal**, Oxford, v. 62, p. 473-482, 2010.

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 em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

RIEFLER, M.; NOVAK, O.; STRNAD, M.; SCHUMMÜLING, T. *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. **The Plant Cell**, Rockville, v. 18, p. 40-54, 2006.

RYAN, C.A.; PEARCE, G.; SCHEER, J.M. Polypeptide hormones. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 251-264, 2002.

SAKAI, H.; AYOYAMA, T.; OKA, A. *Arabidopsis* ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. **The Plant Journal**, Oxford, v. 6, p. 703-711, 2000.

SAKAI, H.; AYOYAMA, T.; BONO, H.; OKA, A. Two-component response regulators from *Arabidopsis thaliana* contain a putative DNA-binding motif. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 11, p. 1232-1239, 1998.

SAKAI, H.; HONMA, T.; AOYAMA, T.; SATO, S.; KATO, T.; TABATA, S.; OKA, A. ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. **Science**, New York, v. 294, p. 1519-1521, 2001.

SERENO, M.L. **Caracterização e análise de expressão dos genes de metalotioneínas dos tipos 1, 2 e 3 de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) sob condições de estresse**. 2009. 164 p. Tese (Doutorado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

SHI, X.; RASHOTTE, A.M. Advances in upstream players of cytokinin phosphorelay: receptors and histidine phosphor transfer proteins. **The Plant Cell**, Rockville, v. 31, p. 789-799, 2012.

SMIGOCKI, A.C. Cytokinin content and tissue distribution in plants transformed by reconstructed isopentenyl transferase gene. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 16, p. 105-115, 1991.

SRIVASTAVA, R.; LIU, J.; GUO, H.; YIN, Y.; HOWELL, S.H. Regulation and processing of a plant peptide hormone, AtRALF23, in Arabidopsis. **The Plant Journal**, Oxford, v. 59, p. 930-939, 2009.

STEEL, R.G.; TORRIE, J.H.; DICKEY, D.A. **Principles and procedures of statistics: a biometrical approach**. 3rd ed. New York: McGraw-Hill Companies, 1996, p. 672.

STOLZ, A.; RIEFLER, M.; LOMIN, S.N.; ACHAZI, K.; ROMANOV, G.A.; SCHMÜLLING, T. The specificity of cytokinin signalling in *Arabidopsis thaliana* is mediated by differing ligand affinities and expression profiles of the receptors. **The Plant Journal**, Oxford, v. 67, p. 157-168, 2011.

SUGANO, S.S.; SHIMADA, T.; IMAI, Y.; OKAWA, K.; TAMAI, A.; MORI, M.; HARA-NISHIMURA, I. Stomagen positively regulates stomatal density in Arabidopsis. **Nature**, London, v. 463, p. 241-244, 2010.

SUZUKI, T.; IMAMURA, A.; UEGUCHI, C.; MIZUNO, T. Histidine-containing phosphotransfer (HPT) signal transducers implicated in his-to-asp phosphorelay in Arabidopsis. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 39, p. 1258-1268, 1998.

TAKATSUKA, H.; UMEDA, M. Hormonal control of cell division and elongation along differentiation trajectories in roots. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, p. 2633-2643, 2014.

TO, J.P.; KIEBER, J.J. Cytokinin signaling: two-components and more. **Trends in Plant Science**, Killington, v. 13, p. 85-92, 2008.

TO, J.P.; DERUERE, J.; MAXWELL, B.B.; MORRIS, V.F.; HUTCHISON, C.E.; FERREIRA, F.J.; SCHALLER, G.E.; KIEBER, J.J. Cytokinin regulates type-A Arabidopsis response regulator activity and protein stability via two-component phosphorelay. **The Plant Cell**, Rockville, v.19, p.3901-3914, 2007.

TO, J.P.C.; HABERER, G.; FERREIRA, F.J.; DERUÈRE, J.; MASON, M.G.; SCHALLER, G.E.; ALONSO, J.M.; ECKER, J.R.; KIEBER, J.J. Type-A Arabidopsis response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. 658-671, 2004.

VANSTRAELEN, M.; BENKOVÁ, E. Hormonal interactions in the regulation of plant development. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 28, p. 22.1-22.25, 2012.

WERNER, T.; MOTYKA, V.; LAUCOU, V.; SMETS, R.; ONCKELEN, H.V.; SCHUMÜLING, T. Cytokinin-deficient transgenic Arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, p. 2532-2550, 2003.

WHITFORD, R.; FERNANDEZ, A.; TEJOS, R.; PÉREZ, A.C.; KLEINE-VEHN, J.; VANNESTE, S.; LEITNER, J.; ABAS, L.; AERTS, M.; HOOGEWIJS, K.; BASTER, P.; DE GROODT, R.; LIN, YC.; STORME, V.; VAN DE PEER, Y.; BEECKMAN, T.; MADDER, A.; DEVREESE, B.; LUSCHNIG, C.; FRIML, J.; HILSON, P. GOLVEN secretory peptides regulate auxin carrier turnover during plant gravitropic responses. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 22, p. 678-685, 2012.

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, p. 877-890, 2007.

YANG, S.; YU, H.; XU, Y.; GOH, C.J. Investigation of cytokinin deficient phenotypes in Arabidopsis by ectopic expression of orchid DSCKX1. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 555, p. 291-296, 2003.

APÊNDICES

Apêndice A - Sequências dos iniciadores para confirmação do mutante *ckx2*

Mutante	Gene	Locus	Sequências
SALK_014046C	<i>CKX2</i>	At2g19500	FW:5'GTCTTTTGAAACCACCGTC3' RV:5'GGGTTGTTTCCGTAAATCCTC3'

Apêndice B - Sequências dos iniciadores utilizados nas análises de expressão gênica

Gene	Locus	Sequências
<i>GAPDH</i>	At1g13440	FW: 5'TTGGTGACAACAGGTCAAGCA3' RV: 5'AAACTTGTCGCTCAATGCAATC3'
<i>ARR4</i>	At1g10470	FW: 5'CCGTTGACTGTTTCGACTGA3' RV: 5'AATCCGGGACTCCTCATCTT3'
<i>ARR5</i>	At3g48100	FW: 5'GGAAGTTCATCGAGCGGTTA3' RV: 5'ATCCAGTCATCCCAGGCATA3'
<i>ARR6</i>	At5g62920	FW: 5'ATGCCCCGGTATGACTGGATA3' RV: 5'TTTGAGCTGCGAGTGAACAG3'
<i>ARR7</i>	At1g19050	FW: 5'TGGAAGTAGGGCTTTGCAGT3' RV: 5'TCTGCTAGCTTCACCGGTTT3'
<i>ARR15</i>	At1g74890	FW: 5'TGAGAGGTGGTGAAGCTGAA3' RV: 5'TCGTCATCAAGGGAGGAAAC3'
<i>AtRALF34</i>	At5g67070	FW: 5'CGAAGTTACGGAGGAAGACG3' RV: 5'ACTCTATTGCGCCGACAATGC3'

ANEXOS

Anexo A – Precursor do peptídeo AtRALF1. (A) Representação esquemática do precursor preproAtRALF1. O precursor tem 120 aminoácidos, que incluem um peptídeo sinal N-terminal (Pre), e 49 aminoácidos no C-terminal representado pelo peptídeo maduro. (B) Estrutura primária do preproAtRALF1, indicando o peptídeo sinal (Met1-Ala26), sítio dibásico (Arg68-Arg69), peptídeo maduro (Ala72-Ser120), e domínio YISY (sublinhado). (C) Modelo da estrutura secundária do peptídeo AtRALF1 maduro de arabis, indicando as duas pontes bissulfeto

A

B

1 26
MDKSFTLFLTILVFISSPPVQAGFANDLGGVAWATTGDNGSGCHGSI
69 72
AECIGAEEMDSEINRRILATTKYISYQSLKRNSVPCSRRGASYNCQNG
120
AQANPYSRGCSKIARCRS

C

Anexo B – Árvore de semelhanças da estrutura primária dos RALFs encontrados em arabidopsis (AtRALFs). O RALF originalmente isolado de folhas de tabaco foi incluído para comparação (NtRALF). Os 37 AtRALFs estão organizados em três grupos I, II e III. O subgrupo IIIa apresenta os 9 peptídeos de arabidopsis com as principais características conservadas da isoforma de tabaco

Anexo C – Transdução de sinal da citocinina (EL-SHOWK et al., 2013 modificado)

Anexo D – Árvore filogenética dos genes ARRs (KIBA et al., 2004 modificado)