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

**Análise da expressão gênica dos peptídeos hormonais RALF em
cana-de-açúcar**

Fabiana Bombonato Mingossi

**Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Agronomia. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas**

**Piracicaba
2009**

Fabiana Bombonato Mingossi
Bióloga

Análise da expressão gênica dos peptídeos hormonais RALF em cana-de-açúcar

Orientador:
Prof. Dr. DANIEL SCHERER DE MOURA

**Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Agronomia. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas**

Piracicaba
2009

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

Mingossi, Fabiana Bombonato

Análise da expressão gênica dos peptídeos hormonais RALF em cana-de-açúcar /
Fabiana Bombonato Mingossi. - - Piracicaba, 2009.
70 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2009.
Bibliografia.

1. Cana-de-açúcar 2. Cultura de células vegetais 3. Desenvolvimento vegetal 4.
Expressão gênica 5. Hormônios peptídicos I. Título

CDD 633.61
M663a

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

**DEDICO AOS MEUS PAIS
PELO APOIO, CONFIANÇA
E AMOR INCONDICIONAL**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu orientador, Daniel Scherer de Moura, pela paciência, confiança, oportunidade e amizade. Obrigada por todos os ensinamentos e participação, não só no início mas em todas as fases da realização desta dissertação. Seu incentivo e entusiasmo foram fundamentais nos momentos de dificuldade, quando tudo insistia em dar errado.

Ao professor Marcio de Castro pelo acolhimento em seu laboratório, oportunidade, confiança e amizade.

Aos queridos amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, Ane Medeiros, Celso Fiori, Camila Borgonovi, Christine Stock, Daniele Bononi, Juliana Matos, Lígia Hansen, Luíza Dantas, Marcela Scarso, Marcelo Brandão e Ricardo Rodrigues, pelas trocas de experiências, apoio e agradável convívio durante esses dois anos.

Aos especiais amigos do grupo de pesquisa de peptídeos hormonais: Celso, sempre disposto a ajudar e esclarecer minhas dúvidas e Juliana pela colaboração no experimento de crescimento de microcalli.

Ao professor Antônio Vargas de Oliveira Figueira, do Laboratório de Melhoramento de Plantas, CENA-USP, pela disponibilização do aparelho de PCR em tempo real nas minhas intermináveis horas de uso.

Às queridas Dra Maria Cristina Falco e Sabrina Chabregas, do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), pela gentileza de fornecer sementes e plantas de cana-de-açúcar durante todos os experimentos deste trabalho.

Ao Rafael Colombi, por sempre manter o laboratório organizado e pelo carinho e ao Carlos Alberto de Oliveira pela ajuda e amizade.

Agradeço à minha linda família: minha mãe, Luciana, meu pai, Tato e meu irmão, Celo, pelo apoio, incentivo, confiança e amor em todos os momentos de minha vida.

Aos meus avós, tios e primos, por todo carinho, incentivo e por entenderem meus momentos de ausência devido as várias provas e longas horas de trabalho no laboratório nos finais de semana.

Às minhas queridas nekitas, Elisa Matos, Layanne Souza e Vívian Carvalho, por fazerem cada dia tornar-se inesquecível, pela apoio nos momentos difíceis e companhia nas inúmeras baladas. A amizade, cumplicidade e ótimo convívio foram indispensáveis nesse período em Piracicaba.

Aos amigos de Sertãozinho e de Alfenas que mesmo longe se fizeram presentes nesta caminhada.

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

SUMÁRIO

RESUMO.....	08
ABSTRACT.....	09
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 Peptídeos hormonais.....	12
2.2 RALF-“Rapid Alkalinization Factor”.....	14
2.3 Desenvolvimento celular.....	17
2.4 Análise da expressão gênica.....	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 Material vegetal.....	24
3.2 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real.....	27
3.2.1 Genes que codificam preproRALFs em cana-de-açúcar (SacRALFs)....	27
3.2.2 Extração de RNA total e síntese de cDNA.....	27
3.2.3 PCR em tempo real.....	28
3.3 Ensaio do crescimento de microcalli.....	30
3.4 Análise da expressão gênica com GUS.....	31
3.4.1 Extração de DNA genômico.....	31
3.4.2 Amplificação das regiões promotoras.....	31
3.4.3 Clonagem no vetor pCR®2.1-TOPO.....	32
3.4.4 Clonagem no vetor binário.....	32
3.4.5 Transformação de plantas.....	34
4 RESULTADOS.....	35
4.1 Isoformas de SacRALF identificadas em cana-de-açúcar.....	35
4.2. Expressão gênica em plantas de cana-de-açúcar.....	36
4.2.1 Expressão gênica dos SacRALFs em raiz.....	36
4.2.2 Expressão gênica dos SacRALFs no limbo e bainha foliar.....	37
4.2.3 Expressão gênica dos SacRALFs em diferentes partes da folha.....	39
4.3 Expressão gênica em culturas de suspensão celular de cana-de-açúcar..	41
4.3.1 Expressão gênica dos SacRALFs em condições normais de cultivo.....	41
4.3.2 Efeito da Latrunculina e Afidicolina na expressão gênica dos SacRALFs	42

4.4. Efeito do RALF no crescimento de microcalli.....	47
4.5 Expressão gênica com GUS.....	49
4.5.1 Clonagens.....	49
5 DISCUSSÃO.....	54
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
REFERÊNCIAS.....	60
APÊNDICES.....	67

RESUMO

Análise da expressão gênica dos peptídeos hormonais RALF em cana-de-açúcar

“**R**apid **A**lkalization **F**actor” (RALF) pertence a uma crescente família de peptídeos com características hormonais em plantas. Inicialmente isolado de folhas de plantas de tabaco, peptídeos RALF podem ser encontrados em todo reino vegetal e são expressos em plantas ubiquamente. Plantas de cana-de-açúcar apresentam quatro isoformas dos genes SacRALF e foi identificado que o gene SacRALF1 é expresso predominantemente. Transcritos de SacRALF1 são abundantes nas zonas de elongação de pontas de raízes, e todos os quatro genes SacRALF são mais expressos em folhas jovens e em expansão do que em folhas expandidas. Nos limbos foliares, transcritos dos genes SacRALF foram encontrados em alta concentração na parte basal da folha e baixa concentração na porção apical. O conjunto das análises de expressão gênica neste estudo sugerem que a expressão dos genes SacRALF está localizada nas zonas de elongação de raízes e folhas. Folhas maduras, que são desprovidas de células em elongação, não mostraram expressão considerável dos genes SacRALF. Culturas de suspensão celular embriogênica de cana-de-açúcar mostraram um nível constitutivo de transcritos de genes SacRALF. O peptídeo SacRALF1 foi adicionado ao meio de cultura e inibiu o crescimento de microcalli derivado de culturas de suspensão celular em concentrações tão baixas quanto 0,1 μ M. Microcalli expostos ao SacRALF1 exógeno mostraram um número reduzido de células alongadas. Os resultados obtidos sugerem que os peptídeos RALF possuem uma função no desenvolvimento de plantas, particularmente na elongação celular.

Palavras-chave: Peptídeos hormonais; Desenvolvimento celular; Expressão gênica; Expansão da folha; Culturas de Suspensão celular; Cana-de-açúcar

ABSTRACT

Gene expression analysis of the peptide hormones RALF in sugarcane

Rapid **A**lkalization **F**actor (RALF) is part of a growing family of peptides with hormone characteristics in plants. Initially isolated from leaves of tobacco plants, RALF peptides can be found throughout the plant kingdom and they are expressed in plants ubiquitously. Sugarcane plants have four isoforms of SacRALF genes and SacRALF1 isoform is expressed predominantly. SacRALF1 transcripts are abundant in the elongation zone of root tips and all four SacRALF genes are more expressed in young and expanding leaves than in expanded leaves. In leaf blades, SacRALF gene transcripts were found at high levels at the basal portion of the leaf and at low levels at the apical portion. The whole set of gene expression analyses showed in this study, suggest that SacRALF genes expression is localized in elongation zones of roots and leaves. Mature leaves that are devoid of elongating cells do not show considerable expression of SacRALF genes. Sugarcane embryogenic cell suspension cultures showed a nearly constitutive level of SacRALF gene transcripts. SacRALF1 peptide was added to culture media and inhibited the growth of microcalli derived from cell suspension cultures at concentrations as low as 0.1 μ M. Microcalli exposed to exogenous SacRALF1 showed a reduced number of elongated cells. The findings suggest that RALF peptides have a role in plant development, particularly in cell elongation.

Keywords: Peptides hormones; Cell development; Gene expression; Expansion of the leaf; Cell suspension cultures; Sugarcane

1 INTRODUÇÃO

Peptídeos hormonais desempenham várias funções em plantas que incluem desde a ativação de respostas de defesa contra insetos herbívoros à determinação do destino de células meristemáticas (MOURA; SILVA-FILHO, 2006; MATSHUBAYASHI; SAKAGAMI 2006; RYAN et al., 2002). Peptídeos RALF (“**R**apid **A**lkalization **F**actor”) são ubíquos em plantas e foram isolados pela primeira vez quando novos peptídeos hormonais em extratos protéicos de folhas de tabaco eram investigados (MOURA; PEARCE; RYAN, 2006, PEARCE et al., 2001a; PEARCE et al., 2001b). Além da rápida alcalinização do meio de cultivo, os peptídeos RALF induzem, rapidamente, uma enzima quinase ativada por mitógeno - MAPK (PEARCE et al., 2001b). Além das aplicações em potencial da descoberta de novos peptídeos hormonais no melhoramento vegetal e na ampliação do nosso conhecimento da biologia celular vegetal, o número crescente de peptídeos e a diversidade dos processos fisiológicos em que eles estão envolvidos são provas da sua importância.

Plantas de cana-de-açúcar são apropriadas para estudos do processo de desenvolvimento pelo seu crescimento unidirecional. A maturação das células da folha ocorre de forma basipetal (DICKINSON, 2000), o meristema da folha e a zona de alongação estão localizados na base da folha e são escondidos pelas bainhas das folhas mais velhas. Células produzidas pelo meristema são deslocadas da base da folha como um resultado da produção celular contínua e expansão das células nas localizações mais basais da folha. A medida que as células se distanciam da base, ocorre a expansão e diferenciação. Esses processos resultam na formação de um gradiente espacial típico do aumento do tamanho das células da epiderme conforme se afastam da base da folha (SCHÄUFELE; SCHNYDER, 2000). Como em outras gramíneas, o limbo da folha de cana-de-açúcar alonga primeiro seguido pela bainha foliar (MOORE, 1987). Este crescimento celular é vantajoso para realização de análises de expressão gênica em tecidos vegetais que apresentam diferentes níveis de amadurecimento.

Em eucariotos multicelulares, o desenvolvimento é um processo regulado pela expressão gênica diferencial, pelo qual as células adquirem destinos específicos. (BIRNBAUM et al., 2003). A elucidação dos padrões de expressão gênica leva a um

melhor entendimento dos processos biológicos (EXPÓSITO-RODRÍGUEZ et al., 2008), e a reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real tem tornado-se um dos métodos mais amplamente utilizados na quantificação gênica (WONG; MEDRANO, 2005). Dessa forma, este estudo teve como objetivo investigar o comportamento das isoformas de RALF em tecidos com diferentes estágios de desenvolvimento, utilizando PCR em tempo real e, conseqüentemente, esclarecer o envolvimento dos genes RALF com processos básicos da biologia celular. Adicionalmente, foi avaliado o efeito do peptídeo SacRALF1 no crescimento de microcalli derivado de culturas de suspensões celulares de cana-de-açúcar com a finalidade de comprovar o papel dos genes SacRALFs na elongação celular.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Peptídeos hormonais

Peptídeos hormonais, ou peptídeos sinais, em plantas têm sido descritos em várias espécies e têm sido relacionados a diversas funções, tais como defesa, desenvolvimento vegetal e organização celular em meristemas (RYAN et al., 2002; MOURA; SILVA-FILHO, 2006). O primeiro peptídeo sinal identificado em planta foi isolado bioquimicamente de extratos foliares de tomateiro. Este peptídeo, denominado sistemina, está relacionado à defesa vegetal e, quando adicionado ao meio de cultivo de suspensões celulares de tomateiro, induz uma alcalinização do meio de cultivo (PEARCE et al., 1991; FELIX; BOLLER, 1995). Esta alteração de pH é causada, provavelmente, pela inibição de bombas de prótons ATPásicas localizadas na membrana plasmática (SCHALLER; OECKING, 1999), e serviu de base para o desenvolvimento do ensaio de alcalinização (PEARCE et al., 2001a). Este ensaio consiste em monitorar as mudanças de pH do meio de cultivo de células em suspensão quando na presença de soluções contendo peptídeos capazes de induzir a alcalinização. A partir deste ensaio foram descobertos novos peptídeos relacionados à defesa (15 a 20 aminoácidos) e uma nova família de peptídeos sinais de aproximadamente 50 aminoácidos (PEARCE et al., 2001a, b; PEARCE; RYAN, 2003). Os novos peptídeos relacionados à defesa foram chamados de hidroxiprolina-sisteminas de tabaco e tomateiro. A exemplo do que ocorre com a sistemina original de tomateiro, estes novos peptídeos são capazes de induzir a síntese e o acúmulo de inibidores de proteases, proteínas de defesa contra o ataque de insetos herbívoros (RYAN; PEARCE, 2003). A nova família de peptídeos sinais de 50 aminoácidos possui precursores ainda maiores que são encontrados em várias espécies e em vários tecidos (PEARCE et al., 2001b). Estes novos peptídeos isolados de folhas de tabaco, posteriormente também isolados de folhas de alfafa e tomateiro, provocam uma alcalinização do meio de cultivo de suspensões celulares mais rápida do que os peptídeos sinais envolvidos no sistema de defesa de tomateiro e tabaco. Por apresentarem esta resposta rápida no ensaio de alcalinização, os peptídeos deste grupo e seus homólogos foram denominados de RALF-“**R**apid **A**Lkalinization **F**actor”, um fator de alcalinização rápida.

Além das sisteminas e do RALF, outros polipeptídeos foram identificados em plantas. As fitosulfoquinas (PSKs) são peptídeos mitogênicos que regulam a proliferação celular em plantas, e foram identificadas em culturas de células em suspensão de *Asparagus officinalis* (MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 1996). Os peptídeos CLE/CLV3 são dodecapeptídeos com dois resíduos de hidroxiprolina que suprimem o desenvolvimento celular do xilema na concentração de 10^{-11} M e promovem a divisão celular (ITO et al., 2006). Análises MALDI-TOF MS (“matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry”) *in situ* determinaram a estrutura de um peptídeo de 12 aminoácidos modificado (MCLV3) derivado de um motivo conservado na sequência de CLV3, e o processamento deste peptídeo é crucial para a construção de um peptídeo CLV3 ativo e maduro (KONDO et al., 2006). SCR/SP11 é composto de uma família de pequenas proteínas ricas em cisteína de 74 a 83 aminoácidos, que desempenham um papel central no sistema de auto-incompatibilidade em Brassicaceae (RYAN et al., 2002). O polipeptídeo sinal ENOD40 foi o segundo polipeptídeo identificado em plantas e o primeiro a ser detectado através de análises gênicas (RYAN; PEARCE, 2001), está presente em várias espécies de leguminosas, arroz e tabaco, e tem um importante papel no desenvolvimento de nódulos em organismos simbiontes (MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 2006). AtPep1, um peptídeo de 23 aminoácidos recentemente isolado de folhas de *Arabidopsis*, sinaliza a ativação de componentes da resposta imune inata contra patógenos (HUFFAKER; PEARCE; RYAN, 2006; YAMAGUCHI; PEARCE; RYAN, 2006; PEARCE et al., 2008). Este peptídeo, codificado pelo gene PROPEP1, ativa expressão de um gene de defesa PDF1.2 (que codifica defensinas) e do seu próprio precursor, PROPEP1, através da via de sinalização do jasmonato/etileno, mediado pelo receptor da superfície celular, PEPR1. A super-expressão de PROPEP1 e PROPEP2 aumentou a resistência de plantas de *Arabidopsis* contra o patógeno *Pythium irregulare*, e PROPEP2 e PROPEP3 expressaram níveis altamente elevados em *Arabidopsis* em resposta a infecções patogênicas e a várias moléculas associadas à patógenos (HUFFACKER; RYAN, 2007). Estudos da relação de atividade e estrutura de AtPep1 com seu receptor, uma quinase de 170 KDa rica em leucina, utilizando o ensaio de alcalinização, revelaram a importância do resíduo glicina para a ligação de AtPep ao seu receptor. Ensaio usando

sondas radioativas confirmaram estes dados. Homólogos de AtPep1 identificados em *Arabidopsis* e outras espécies revelaram uma rigorosa conservação do resíduo glicina (PEARCE et al., 2008).

2.2 RALF-“Rapid Alkalinization Factor”

Após a descoberta dos peptídeos RALF em extratos protéicos de folhas de tabaco, a questão passou a ser a definição do cenário fisiológico onde este peptídeo hormonal se insere, ou seja, qual a função desta família de peptídeos em plantas. Ao contrário da sistemina, primeiro peptídeo hormonal identificado em plantas e de função sinalizadora na defesa sistêmica em solanáceas, os peptídeos RALF, em razão de sua ubiquidade no reino vegetal e de sua expressão gênica em todos os tecidos vegetais, parecem desempenhar um papel básico no desenvolvimento, fisiologia e biologia celular de plantas. Além da alcalinização do meio de cultivo, os peptídeos RALF induzem rapidamente uma enzima quinase ativada por mitógeno - MAPK (PEARCE et al., 2001b). Recentemente, foram identificadas duas proteínas de membrana que se ligam fortemente ao peptídeo (K_D $0,8 \times 10^{-9}$ M), condizente com interações hormônio-receptor em plantas e animais (SCHEER; PEARCE; RYAN, 2005). Em experimentos para identificar e purificar peptídeos endógenos envolvidos com a regulação da sinalização do Ca^{2+} citoplasmático, foi identificada uma molécula ativa predominante, AtRALF1, que induz uma elevação na concentração do Ca^{2+} na superfície de células de raízes de *Arabidopsis thaliana* (HARUTA et al., 2008).

Peptídeos RALF não induzem a síntese de proteínas de defesa em tomateiro e tabaco, a exemplo do efeito dos peptídeos da família das sisteminas (RYAN; PEARCE 2003; PEARCE et al., 2001b). Estudos de expressão gênica em álamo mostraram que os genes RALF não são induzidos por conhecidos elicitores da defesa vegetal (HARUTA; CONSTABEL, 2003). Estes resultados, associados ao fato da alcalinização do meio de cultivo de células ser temporalmente distinta da alcalinização provocada por peptídeos de defesa, sugerem que os peptídeos RALF não estão envolvidos com defesa vegetal.

Com a intenção de descobrir a função dos peptídeos RALF, plântulas de tomateiro e *Arabidopsis* foram incubadas na presença do peptídeo. Após 24 horas de

contato com uma solução contendo 10 μ M de RALF, o crescimento e o desenvolvimento das raízes das plântulas, tanto de tomateiro como de *Arabidopsis*, foram totalmente inibidos (PEARCE et al., 2001b). Ambas plântulas retomaram o crescimento normal das raízes quando colocadas em meio livre do peptídeo. Estudos em *Solanum chacoense* caracterizaram cinco isoformas de RALF (ScRALFs) isolados de óvulo fertilizado e bibliotecas de cDNA de ovário, e estes ScRALFs estavam predominantemente expressos nas fases iniciais do desenvolvimento do fruto, apresentando um declínio da expressão com a maturação do fruto (GERMAIN et al., 2005). Investigações posteriores dos efeitos dos peptídeos RALF na fisiologia celular indicaram que RALF inibe a divisão e a elongação celular (MOURA; PEARCE; RYAN, 2006).

O isolamento do cDNA de tabaco que codifica o peptídeo RALF revelou que este é derivado de uma preproteína composta de uma sequência de direcionamento para a via secretória na porção N-terminal, uma região C-terminal altamente conservada que contém o peptídeo ativo e uma terceira região de baixa conservação entre as duas primeiras (PEARCE et al., 2001a). A análise da estrutura primária do precursor indica que os peptídeos RALF são secretados e processados provavelmente por convertases, a exemplo do que ocorre em animais e fungos. Recentemente, foi mostrado que um sítio dibásico que precede o peptídeo ativo AtRALF1 é essencial para o processamento (MATOS et al., 2008). A super-expressão de preproAtRALF1 causou um fenótipo semi-anão em plantas enquanto que a super-expressão de preproAtRALF1(R69A), o propeptídeo com uma mutação no sítio dibásico, manifestou um fenótipo normal. Extratos protéicos de plantas mutantes revelaram um acúmulo do precursor mutado, e a ausência do peptídeo ativo. Análises *in vitro* mostraram que somente o preproRALF1 foi processado quando incubado com extrato protéico microssomal, e que a preproteína mutante manteve-se intacta (MATOS et al., 2008).

Plantas expressando o gene precursor do RALF fusionado à proteína marcadora GFP mostraram que o peptídeo é localizado na parede celular (ESCOBAR et al., 2003). Em uma tentativa de mapear os genes expressos em raízes de *Arabidopsis*, foi revelado que os genes que codificam os peptídeos RALF são mais expressos na zona de diferenciação celular (aproximadamente 0.45 a 2 mm da ponta da raiz), sendo pouco

expressos nas zonas de divisão e alongação celular (BIRNBAUM et al., 2003). Embora sua função específica e o mecanismo de ação dos peptídeos RALF sejam ainda desconhecidos, as evidências sugerem o seu envolvimento com funções celulares básicas, tais como divisão e alongação celular.

Em *Arabidopsis*, foi identificada uma família contendo 34 potenciais parálogos ao gene RALF originalmente isolado de tabaco, com níveis variados de identidade na estrutura primária (OLSEN; MUNDY; SKRIVER, 2002). Destes 34 parálogos, nove agrupam-se em um clado de maior identidade ao RALF de tabaco e foram eleitos para estudos de super-expressão gênica com plantas transgênicas. A super-expressão de um destes 9 parálogos (locus At1g02900) gerou um fenótipo semi-anão em *Arabidopsis* (MATOS et al. 2008). A análise global da expressão gênica destas plantas semi-anãs através de microarranjos de alta densidade, revelou alterações em um grupo de genes envolvidos com rearranjo de parede celular (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>, amostras GSM9916 a 9919). Em *Nicotiana attenuata*, NaRALF ocorre como um gene de cópia única, altamente expresso em raízes e pecíolos. O silenciamento de transcritos de NaRALF pela transformação de *N. attenuata* (irRALF) produziu raízes mais longas e tricoblastos com pelos radiculares anormais. Esses efeitos foram correlacionados com a ruptura da regulação do pH apoplástico e do acúmulo de espécies reativas de oxigênio nos pelos radiculares. Comparações entre as plantas selvagens e transformadas crescidas em solos básico do habitat natural de *N. attenuata* revelaram folhas menores, caules mais curtos e poucas flores nas plantas transformadas, diferente dos efeitos avaliados em solos ácidos, onde não ocorreu variação entre as plantas. Estes resultados mostraram que NaRALF é necessário para regulação do pH extracelular de pelos radiculares e para o crescimento de plantas em solos básicos (WU et al., 2007).

Recentemente, estudos de nodulação identificaram e caracterizaram dois genes reguladores de fatores de nodulação, MtRALF1 e MtDVL1. A super-expressão destes genes em raízes de *Medicago truncatula* resultaram em uma redução do número de nódulos formados, um aumento no número de infecções abortadas e no desenvolvimento de nódulos anormais. Os resultados sugerem um papel para MtRALF1 e MtDVL1 durante a nodulação, em particular, durante a infecção rizobial simbiótica (COMBIER et al., 2008).

2.3 Desenvolvimento celular

Folhas de gramíneas são apropriadas para estudos do processo de desenvolvimento pelo seu crescimento unidirecional. A maturação da folha ocorre de forma basipetal (DICKINSON, 2000), o meristema da folha e a zona de elongação estão localizados na base da folha e são escondidos pelas bainhas das folhas mais velhas. Células produzidas pelo meristema são deslocadas da base da folha como um resultado da produção celular contínua e expansão das células nas localizações mais basais da folha. A medida que as células se distanciam da base, ocorre a expansão e diferenciação. Esses processos resultam na formação de um gradiente espacial típico do aumento do tamanho das células da epiderme conforme se afastam da base da folha (SCHÄUFELE; SCHNYDER, 2000). Como em outras gramíneas, o limbo da folha de cana-de-açúcar alonga primeiro seguido pela bainha foliar e depois pelo internó (Figura 1A e B) (MOORE, 1987).

A **B**

Estágio de desenvolvimento	Comprimento dos tecidos					
	POJ 2878 internó	bainha	limbo	Ghana I internó	bainha	limbo
-8	--	--	--	--	--	3
-7	--	--	--	--	0.1	12
-6	--	--	--	--	0.2	33
-5	--	--	6	--	0.3	56
-4	--	0.1	32	--	0.4	85
-3	--	0.2	71	--	0.5	112
-2	--	0.5	104	--	1.1	136
-1	0.1	1.4	132	0.2	2.9	158
0	0.4	10.1	157	0.4	17.6	170
+1	1.4	31.0	157	0.9	28.6	170
+2	5.7	32.4	157	2.0	29.5	170
+3	14.9	33.0	157	5.8	29.5	170
+4	18.1	33.0	157	11.7	29.5	170
+5	18.1	33.0	157	12.7	29.5	170

Figura 1 – A, Sistema de numeração das folhas a partir da última folha com a lígula visível, designada folha +1. B, Comprimento do limbo, bainha e internó em duas variedades, POJ 2878 e Ghana I, de cana-de-açúcar. As medidas são dadas em centímetros (modificado de MOORE, 1987)

Similar as folhas, as raízes também apresentam um crescimento unidirecional, o tecido meristemático produz fileiras paralelas de células, a célula dentro de uma fileira é

deslocada da zona de divisão como resultado da produção e crescimento longitudinal de células mais jovens. Simultâneo ao deslocamento da base, as células crescem e diferenciam-se. Então a distância entre a célula e sua origem ontogenética é função de sua idade e do seu estágio de desenvolvimento (SCHNYDER; NELSON, 1987).

A ponta da raiz é dividida em três regiões bem definidas: zona meristemática, de alongação e de diferenciação (MOORE, 1987), facilitando o estudo de análise da expressão de genes relacionados ao desenvolvimento. A divisão celular nas zonas de crescimento é espacialmente limitada ao meristema, grupo relativamente pequeno de células dividindo-se ativamente, com um tamanho aproximadamente constante. Esta homeostase de tamanho é mantida porque as células recentemente formadas fluem continuamente para a zona adjacente de expansão e, subsequentemente, para a zona de diferenciação (FIORANI; BEEMSTER, 2006).

Muitos estudos para identificar genes relacionados com o desenvolvimento celular vêm sendo realizados através de intervenções químicas dos processos de divisão e alongação celular. Latrunculina-B é uma toxina marinha altamente específica isolada da esponja *Latrunculia magnífica* que despolimeriza eficientemente filamentos de actina, geralmente actina-F, em células eucariotas (BALUŠKA et al., 2001). Actina-F é essencial para a alongação celular de plantas (BALUŠKA et al., 2001), consequentemente, Latrunculina-B pode ser utilizado com um poderoso inibidor da alongação celular. Quando Latrunculina-B foi adicionada durante a germinação de sementes de *Arabidopsis* e centeio, estas se desenvolveram morfolologicamente normais, mas estavam atrofiadas devido à ausência de alongação celular (BALUŠKA et al., 2001).

Alto nível de sincronização tem sido obtido pelo bloqueio de células no início da fase de síntese (S) do ciclo celular, pelo tratamento das células com a droga Afidicolina, o qual inibe a atividade da DNA polimerase (FIORANI; BEEMSTER, 2006). Estes procedimentos de sincronização podem ser usados para análises de expressão gênica e atividade protéica (MENGES; MURRAY, 2002). Afidicolina é um eficiente inibidor da divisão celular e foi utilizado em culturas de suspensão celular de *Arabidopsis* para análise da atividade gênica no ciclo celular. Os resultados mostraram que três classes de genes CDK (CDKA, CDKB1 e CDKB2) tiveram expressão em diferentes tempos e

que os três genes inibidores de CDK tiveram padrões diferentes de expressão durante a re-entrada do ciclo celular (MENGES; MURRAY, 2002).

2.4 Análise da expressão gênica

O estudo dos padrões de expressão gênica é um dos objetivos da biologia molecular moderna. Análises da expressão gênica têm auxiliado na elucidação dos processos biológicos complexos, aumentando o entendimento de caminhos metabólicos e de sinalização, que são base para as respostas ambientais e do desenvolvimento (EXPÓSITO-RODRÍGUEZ et al., 2008). A reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real tem tornado-se um dos métodos mais amplamente utilizados na quantificação gênica porque ele apresenta uma ampla diversidade de utilização, alta sensibilidade, pode ser altamente específico, e não necessita de manipulação pós-amplificação (WONG; MEDRANO, 2005). Durante a PCR em tempo real, o acúmulo dos produtos de PCR é mensurado após a fase de extensão de cada ciclo através da fluorescência emitida pelo fluorocromo incorporado ao produto de PCR recentemente sintetizado (GACHON; MINGAM; CHARRIER, 2004).

Na PCR em tempo real a normalização apropriada é fundamental para obter uma quantificação precisa e confiável, especialmente quando se avalia diferenças pequenas de expressão ou quando se trabalha com tecidos de origem histológica diferente (JIAN et al., 2008). A finalidade da normalização é corrigir a variabilidade associada com as várias etapas do procedimento experimental, tais como diferenças na quantidade de amostra inicial, integridade do RNA, eficiência da síntese de cDNA, e diferenças na atividade transcricional total dos tecidos ou células analisadas. Entre os numerosos métodos de normalização, o uso de controles interno ou genes de referência são os mais escolhidos, e o sucesso da normalização é altamente dependente da escolha apropriada destes genes: seu nível de expressão deve ser relativamente constante nos tecidos e células testados, e não deve ser significativamente alterado sob diferentes condições experimentais (BARSALOBRES-CAVALLARI et al., 2009). A seleção de controles endógenos eficientes para estudos de RT-PCR quantitativo revelou que os genes CAC, TIP41, “Expressed” e SAND forneceram a normalização de transcritos

superior durante o processo de desenvolvimento do tomate (EXPÓSITO-RODRÍGUEZ et al., 2008).

A PCR em tempo real tem sido muito utilizada nos estudos do perfil da expressão de genes envolvidos com processos celulares básicos. Ali-Benali e colaboradores (2005) utilizaram esta técnica para quantificar as mudanças relativas na expressão de cinco genes *Lea* em sementes em desenvolvimento de trigo e em sementes jovens em resposta a vários estresses abióticos. Os transcritos dos genes Td29b, Td16 e Td27e acumularam tardiamente na embriogênese, como esperado para genes *Lea*, os transcritos do gene Td11 estavam presentes durante todo o desenvolvimento da semente enquanto transcritos do gene Td25a não foram detectados em sementes. Os cinco genes exibiram diferenças significativas na expressão em resposta a desidratação, baixa temperatura, salinidade e ácido abscísico. Os resultados indicaram uma especialização funcional para as diferentes proteínas LEA ("Late Embryogenesis Abundant").

Análises sobre a abundância de transcritos mitocondrial, cloroplastidial e nuclear foram realizados durante as fases de desenvolvimento da folha de milho. De acordo com os dados de microarranjo, pelo menos 51 genes plastidiais e 121 genes nucleares estavam duas vezes mais expressos no ápice da folha e, 25 genes mitocondriais e 177 transcritos nucleares estavam duas vezes mais expressos na base da folha. A quantificação independente com PCR em tempo real confirmou os resultados obtidos pelo microarranjo. As distribuições dos transcritos revelaram que os RNAs relacionados com fotossíntese estavam mais abundantes no ápice da folha e que os genes relacionados com a obtenção de energia estavam mais expressos na base da folha. Transcritos cujos produtos são usados na tradução plastidial constituíram o maior grupo e estavam presentes igualmente nas regiões analisadas (CAHOON et al., 2008).

O controle da expressão de alguns genes é regulado pela sua sequência promotora através da interação com fatores de transcrição específicos, permitindo ao gene responder a vários estímulos, incluindo localização tecidual e fatores ambientais, dependendo do gene em questão (INABA et al, 2007). Promotores são frequentemente testados pela mensuração da expressão de genes repórteres, tais como *uidA*, que codifica a enzima β -glucuronidase (GUS) facilmente mensurada utilizando o substrato

5-bromo-4-chloroindoylglucuronide (x-gluc) que produz uma coloração azul em análise histoquímica e o substrato 4-methylumbelliferyl-glucuronide (MUG) que produz um composto fluorescente sensível a análise quantitativa *in vitro* (INABA et al., 2007).

O GUS tem sido utilizado com sucesso como gene repórter em inúmeras espécies de plantas pela facilidade na análise da expressão gênica (BASU; KAUSCH; CHANDLEE, 2004). Análises da atividade promotora do gene da metalotioneína (MT) de arroz utilizando o gene repórter GUS revelaram que o promotor é responsável pelos mecanismos de regulação transcricional que operam a expressão específica temporal e espacial e pelas respostas de estresse do gene MT de arroz (LÜ et al., 2007). Experimentos de expressão do gene repórter GUS dirigido pelo promotor ASA2 (antralinato sintetase) de tabaco identificaram expressão histoquímica de GUS em vários tecidos específicos em culturas de tecido e plantas de soja (INABA et al., 2007).

Para caracterizar funcionalmente a região promotora de *thi1* (gene envolvido com a biossíntese da tiamina), uma série de deleções do promotor *thi1* foi fusionada com o gene repórter GUS. Os resultados mostraram que a expressão derivada do promotor estava detectada precocemente durante o desenvolvimento e continuava por todo o ciclo de vida da planta. Níveis altos de expressão de GUS foram observados na raiz e parte aérea durante o crescimento vegetativo embora, na raiz, a expressão estava restrita ao sistema vascular. O menor fragmento (designado Pthi322) possuiu todo o sinal essencial para especificidade do tecido, e também responde para as condições de estresse tais como falta de açúcar, baixa salinidade e hipóxia (RIBEIRO et al., 2005).

Estudos do controle da expressão de promotores são importantes para o entendimento de onde e quando os genes específicos são expressos e permitem a elucidação de suas funções.

A caracterização molecular de genes envolvidos com o desenvolvimento celular pode ser realizada através de PCR em tempo real e fusões com o gene repórter GUS. Experimentos de expressão gênica realizados em algodão revelaram que o gene GhTUA9 estava predominantemente expresso nas fibras em desenvolvimento, e ensaios histoquímicos demonstraram que o gene GhTUA9:GUS estava especificamente expresso nas fibras em alongação. A super-expressão de GhTUA9 em leveduras

promoveu um crescimento longitudinal atípico das células, indicando seu envolvimento na elongação celular (LI et al., 2007).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Microtoletes de cana-de-açúcar com uma gema (*Saccharum officinarum* x *Saccharum spontaneum*, cv. SP80-3280) foram plantados em copos plásticos de 200 mL contendo substrato (Plantmax, Eucatex) e crescidos nas instalações do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Piracicaba, SP. Após estabelecidas, as plantas foram transportadas para a casa-de-vegetação do Departamento de Genética, ESALQ-USP, sob condições naturais, sem suplementação artificial e temperatura entre 18°C (noite) e 34°C (dia), onde foram mantidas até o final dos experimentos. As folhas destas plantas utilizadas para a análise da expressão foram cortadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para posterior transporte ao laboratório para processamento ou armazenamento a -80°C. Plantas de até 35 dias tiveram suas folhas +3, +2, +1, 0 e -1 (considerar a folha +1 como a última com a lígula/estípula visível) cortadas e separadas em bainha e limbo (Figura 2).

Figura 2 – Planta de cana-de-açúcar (± 30 dias) utilizada nesse estudo. A, As folhas foram numeradas da mais velha (+3) até a mais jovem (-1). B, Depois de identificadas, as folhas foram cortadas na junção entre o limbo e a bainha, conhecida por lígula, e as duas partes foram avaliadas separadamente. As folhas 0 e -1 ainda não iniciaram o processo de expansão da bainha foliar

Posteriormente, selecionou-se a folha de maior expressão das isoformas RALF que apresentava lígula visível, folha +1, para uma análise detalhada da expressão gênica dentro da folha. A folha +1 foi dividida em bainha e limbo e essas foram ainda divididas em terço proximal, medial e distal.

Em seguida, foi utilizada uma folha mais jovem para análise. O limbo da folha zero foi cortado em 3 partes de tamanhos iguais: apical, medial e basal. No momento

da coleta do tecido, a folha zero tinha metade do limbo exposto à luz e a outra metade coberta pelas bainhas das folhas mais velhas.

As suspensões celulares de cana-de-açúcar foram obtidas através do subcultivo de calos embriogênicos em meio líquido (MINGOSSI et al., manuscrito em preparação). Os calos foram induzidos a partir de secções transversais de folhas jovens enroladas e cortadas em pequenos discos de 2 mm de altura por 1 cm de diâmetro (FALCO et al., 1996). A variedade utilizada como fonte de explantes foi a SP83-2847. As suspensões celulares foram mantidas sob agitação (120 rpm) no escuro à temperatura constante ($28\pm 1^{\circ}\text{C}$), em um regime de subcultivo a cada 5 dias. No subcultivo foram adicionados 5 mL de uma cultura de 5 dias a um novo frasco contendo 50 mL de meio fresco. O meio de cultivo utilizado contém 4,43 g/L de MS sais e vitaminas (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 3 mg/L de 2,4-D, 30 g/L de sacarose, 50 mL/L de água de coco (industrializada), 2 g/L de caseína hidrolisada e pH ajustado para 5,8 com KOH.

Primeiramente foi avaliada a expressão gênica das quatro isoformas do RALF de cana-de-açúcar durante um período de 24 horas. Para estabelecer o melhor tempo de amostragem das suspensões celulares e evitar problemas de amostragem, após 5 dias de subcultivo, foram tomadas amostras das suspensões celulares as 8, 12, 16 e 20 horas. Com base nos resultados obtidos durante o período de 24 horas, foi estabelecido o horário de coleta de amostras para a análise da expressão gênica durante uma semana de cultivo das suspensões celulares.

Após o estabelecimento do padrão de expressão normal das isoformas de RALF de cana-de-açúcar, foi feita a intervenção química dos processos de divisão e alongação celular. As intervenções foram feitas para avaliar o efeito das mesmas na expressão gênica dos genes precursores do RALF. Para isso, foi utilizada a toxina fúngica Afidicolina (Sigma), inibidor da DNA polimerase e do inibidor da alongação celular Latrunculina-B (Calbiochem). Culturas de suspensão celular, 5 dias após o subcultivo, foram tratadas com 1 μM de Latrunculina-B. Foram retiradas alíquotas com 0, 2, 4, 6 e 8 horas de tratamento. O mesmo procedimento foi realizado com culturas sem tratamento para serem utilizadas como controle.

Da mesma forma, culturas de suspensão celular foram tratadas com 10 $\mu\text{g/L}$ de Afidicolina diluída em dimetilsulfóxido (DMSO). Foram retiradas alíquotas com 0, 8, 16,

24 e 32 horas de tratamento. Como controle foi utilizado culturas tratadas apenas com DMSO. Posteriormente, os tempos de tratamentos foram alterados. No experimento com Latrunculina-B, as amostragens foram feitas a cada 12 horas, durante 3 dias. E no experimento com Afidicolina, as amostragens foram coletadas a cada 24 horas, durante 4 dias.

Sementes de *Arabidopsis thaliana*, ecótipo Columbia, foram semeadas em vasos plásticos contendo iguais proporções de sustrato organomineral (Plantamax) e vermiculita e mantidas em câmara de crescimento (Conviron ATC26) sob condições controladas de fotoperíodo (16 horas claro e 8 horas escuro), aproximadamente 300 μ E de intensidade luminosa e temperatura constante ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). As plantas foram irrigadas a cada três dias, com solução nutritiva ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 5 mM, KNO_3 5 mM, MgSO_4 2 mM, KH_2PO_4 1 mM, FeEDTA e micronutrientes) e água.

3.2 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real

3.2.1 Genes que codificam preproRALFs em cana-de-açúcar (SacRALFs)

As sequências protéicas deduzidas dos genes At1g02900 e At5g67070 de *Arabidopsis* foram utilizadas na busca de homólogos ao RALF em cana-de-açúcar. O programa utilizado para as buscas foi o tblastn disponível no SUCEST (<http://sucest.lad.ic.unicamp.br/en/Services/services.html>). Uma busca idêntica foi realizada nos bancos de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As sequências obtidas foram alinhadas utilizando-se o programa "ClustalX" (Thompson et al., 1997). Os clones do SUCEST correspondentes as sequências identificadas foram solicitados ao Centro Brasileiro de Estocagem de Genes (BCCC) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, UNESP. Estes clones foram ressequenciados através dos serviços de sequenciamento do Centro de Estudos do Genoma Humano, USP/FAPESP.

3.2.2 Extração de RNA total e síntese de cDNA

Os tecidos congelados de cana-de-açúcar foram macerados e a extração de RNA total foi realizada utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen), seguindo instruções do fabricante. As amostras foram tratadas com 1 unidade de DNase (Fermentas, EN0521),

para remoção do ácido desoxirribonucléico, por 20 minutos a 37°C, e o RNA total re-extraído com Trizol para remover traços de DNA e DNase. O RNA total foi quantificado por leitura no espectrofotômetro a 260 nm e a integridade checada através de gel de agarose. Para cada experimento foram utilizadas 5 plantas por repetição. Os experimentos foram repetidos duas vezes (amostras biológicas independentes).

Alíquotas de 2 mL de cultura de suspensão celular de cana-de-açúcar foram centrifugadas (13000 x g, temperatura ambiente, 2 minutos), congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C. As células foram maceradas e o RNA total extraído utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. As amostras foram tratadas com 1 unidade de DNase (Fermentas, EN0521) por 20 minutos a 37°C, e o RNA total re-extraído com Trizol. O RNA total foi quantificado por leitura no espectrofotômetro a 260 nm e a integridade checada através de gel de agarose.

A síntese de cDNAs de primeira fita foi feita em um volume de 20 µL, contendo 2 µg de RNA total, 2,5 µM de poly-(dT) primer e 1 µL de transcriptase reversa seguindo as instruções do fabricante (Impron-II™ Reverse Transcriptase, Promega, Madison, WI).

3.2.3 PCR em tempo real

Iniciadores específicos para cada isoforma identificada foram desenhados utilizando-se o programa *OligoPerfect Designer* (Invitrogen, <http://www.invitrogen.com>). Os seguintes parâmetros foram utilizados: tamanho do iniciador, 20 pares de bases; temperatura de anelamento, 60°C; percentual de guanina e citosina (GC%) entre 40 e 60%; tamanho do produto amplificado de 100 a 300 pares de bases e concentração salina, 50 mM. A especificidade dos iniciadores foi confirmada pela reação de PCR utilizando-se a transcrição reversa do RNA total de colmo de cana-de-açúcar como molde e a enzima Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) seguindo instruções do fornecedor. As curvas de desnaturação dos fragmentos amplificados confirmaram a existência de um único fragmento (figura 3).

A **B**

Figura 3 – Curvas de desnaturação dos diferentes produtos de amplificação em reações de PCR em tempo real. A, curva de desnaturação do produto de amplificação da isoforma SacRALF1. B, curva de desnaturação dos produtos de amplificação das isoformas SacRALF 2, 3, 4 e do gene de referência GAPDH

A identidade dos fragmentos amplificados também foi verificada através da clonagem dos produtos de PCR no vetor pCR[®]2.1-TOPO (Invitrogen), e sequenciamento seguido de checagem por Blastx (ALTSCHUL et al., 1997). As sequências dos iniciadores usados para PCR em tempo real encontram-se no APÊNDICE 1 e as sequências dos fragmentos amplificados estão no APÊNDICE 2.

As reações de PCR em tempo real foram efetuadas no termociclador Rotor Gene 3000 (Corbett Life Science, Sydney, Australia), localizado nas dependências do Laboratório de Melhoramento de Plantas, situado no Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CENA/USP, sob responsabilidade do Prof. Dr. Antônio Vargas de Oliveira Figueira. Para as reações utilizou-se a pré-mistura Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) seguindo instruções do fornecedor. A reação de PCR continha 4 µL do cDNA, 10 µL Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), 5,2 µL de água destilada e 0,2 µM de cada iniciador em um volume final de 20 µL. Reações controle sem molde foram feitas com 4 µL de água. As condições da PCR foram as seguintes: 50°C por 2 minutos, 95°C por 2 minutos, e 35 ciclos de 95°C por 15 segundos e 62°C por 30 segundos. O sinal de fluorescência foi gravado no final de cada ciclo e a análise da curva de desnaturação foi feita de 72 a 99°C. As curvas-padrão foram geradas com as seguintes diluições do cDNA de colmo: 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 e 1/100000. Todas as reações foram realizadas em triplicatas e os experimentos foram repetidos duas vezes.

O cálculo das eficiências de amplificação e também da expressão relativa dos transcritos foi feito através do programa *Relative Expression Software Tool* – 384 (REST-384© - version 1) (PFAFFL, 2001), (<http://rest.gene-quantification.info/>). Como gene de referência foi utilizado o gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

3.3 Ensaio do crescimento de microcalli

Alíquotas de culturas de suspensão celular de 3 dias (100 µL) foram plaqueadas em 1 mL de meio sólido [4,43 g/L de MS sais e vitaminas (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 3 mg/L de 2,4-D, 30 g/L de sacarose, 50 mL/L de água de coco (industrializada), 2 g/L de caseína hidrolisada, 7 g/L de phytoagar e pH ajustado para 5,8 com KOH]. O experimento foi conduzido em placas de 12 poços. O peptídeo foi adicionado aos meios quando estes atingiram a temperatura de 50°C nas concentrações de 10, 5, 1 e 0,1 µM. Para os experimentos foram utilizados tanto o peptídeo SacRALF1, purificado de folhas de cana-de-açúcar, quanto o peptídeo AtRALF1, obtido através de sistema de expressão heteróloga em *Escherichia coli*. Ambos peptídeos mostraram igual atividade

nos ensaios de inibição do crescimento de raízes e no ensaio de alcalinização (dados não mostrados). Água foi usada como controle. Depois que o meio das suspensões celulares foi absorvido pelo meio, as placas foram incubadas no escuro a 30°C. O crescimento dos microcalli foi analisado a cada 24 horas pela visualização no estereoscópio (microNAL). A visualização e os registros depois de 6 dias foram realizados utilizando a máquina Cyber-shot DSC-W30 (Sony) acoplada ao microscópio óptico (Olympus BX50).

3.4 Análise da expressão gênica com GUS

3.4.1 Extração de DNA genômico

Folhas da roseta de *Arabidopsis thaliana*, com sessenta dias de cultivo, foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C, até o momento da utilização das mesmas para a extração de DNA. A extração do DNA genômico foi realizada com o reagente Plant DNAzol® (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante.

3.4.2 Amplificação das regiões promotoras

As sequências dos genes de *Arabidopsis thaliana* das isoformas At1g02900 e At5g67070 foram obtidas com o auxílio do banco de dados TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) e então utilizadas para a confecção de iniciadores específicos. Nas extremidades 5' dos iniciadores foram adicionados sítios para enzimas de restrição (EcoRI e NcoI).

Os iniciadores específicos para as regiões promotoras das isoformas At1g02900 e At5g67070 foram desenhados utilizando-se o programa *OligoPerfect Designer* (Invitrogen). As sequências dos iniciadores encontram-se no APÊNDICE 3. A amplificação das regiões promotoras foi realizada por PCR, para estas reações utilizou-se a enzima Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) seguindo instruções do fornecedor. A reação de PCR continha 5 µL de tampão para PCR 10X, 1 µL de dNTPs 10 mM, 2 µL de MgCl₂ 50 mM, 1 µL de cada iniciador (10 µM cada), aproximadamente 50 ng de DNA genômico, 0,2 µL de Platinum® Taq DNA Polymerase e água miliQ até completar o volume final de 50 µL. As condições da PCR foram as seguintes: 95°C por

3 minutos, 95°C por 30 segundos, 52 e 58°C por 30 segundos (At1g02900 e At5g67070, respectivamente), 72°C por 1 minuto, repetir 35 vezes os passos anteriores (exceto a primeira desnaturação), 72°C por 8 minutos e 8°C até retirar as amostras. As reações de PCR foram checadas pela eletroforese em gel de agarose.

3.4.3 Clonagem no vetor pCR[®]2.1-TOPO

Produtos da amplificação de PCR foram utilizados para clonagem no vetor pCR[®]2.1-TOPO (Invitrogen). A reação foi realizada com o TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen) e continha: 4 µL da reação de PCR, 1 µL de solução salina diluída 1:4 e 1 µL do vetor pCR[®]2.1-TOPO (Invitrogen). Depois de incubada por 30 minutos a temperatura ambiente (25°C), 2 µL da reação foram usados para transformar 70 µL de células de *Escherichia coli* DH5α eletrocompetentes. Para transformação utilizou-se o eletroporador Genepulser (BioRad) com a corrente elétrica de 2,5 V, capacitância de 2,5 F e resistência de 200 Ω.

Para o crescimento e seleção das bactérias transformadas, estas foram incubadas a 37°C por 1 hora em meio SOC, e depois plaqueadas em LB sólido contendo 50 µg/mL de canamicina, X-gal e IPTG e incubadas 16 horas a 37°C. Em seguida, as cepas recombinantes e transformadas foram selecionadas e transferidas para o meio LB líquido contendo 50 µg/mL de canamicina, e incubadas 16 horas a 37°C sob agitação (200 rpm). A extração do DNA plasmidial foi realizada com o Plasmid Mini Kit (QIAGEN). A confirmação das transformações foi feita através de PCR, utilizando os iniciadores específicos das regiões promotoras e por digestão com a enzima EcoRI.

3.4.4 Clonagem no vetor binário

Após confirmadas as clonagens no vetor pCR[®]2.1-TOPO, iniciou-se o processo de clonagem no vetor binário pCAMBIA 1305.1 (Figura 4).

Figura 4 – Esquema do vetor pCAMBIA 1305.1 (adaptado de <http://www.cambia.org>)

Primeiramente, o vetor foi digerido com as enzimas de restrição EcoRI e NcoI, por 1 hora a 37°C, para remover a região promotora CaMV35S. Os plasmídeos também foram digeridos com as mesmas enzimas para obter as regiões promotoras dos genes At1g02900 e At5g67070, e assim formarem extremidades coesivas. Posteriormente, foi realizada a ligação com o Rapid DNA Ligation Kit (Fermentas), conforme instruções do fabricante. As reações foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. Após este período, 2 µL das reações de ligação foram usados para transformar 70 µL de células eletrocompetentes DH5α. As bactérias transformadas foram incubadas a 37°C por 1 hora em meio SOC e, em seguida, plaqueadas em LB sólido contendo 50 µg/mL de canamicina, X-gal e IPTG e incubadas 16 horas a 37°C. As cepas recombinantes e transformadas foram selecionadas e transferidas para o meio LB líquido contendo 50 µg/mL de canamicina, e incubadas 16 horas a 37°C sob agitação (200 rpm). A extração do DNA plasmidial foi realizada com o Plasmid Mini Kit (QIAGEN). Novamente, a confirmação das transformações foi feita através de PCR, utilizando os iniciadores

específicos da região GUSPlus (APÊNDICE 3), por digestão com as enzimas EcoRI e NcoI, e sequenciamento seguido de checagem por Blastx (ALTSCHUL et al., 1997).

Posteriormente, foi realizada a transformação de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 por eletroporação. Após 4 horas incubadas a 28°C em meio SOC, as bactérias transformadas foram plaqueadas em LB sólido contendo 50 µg/mL de canamicina, 50 µg/mL de rifampicina, 50 µg/mL de gentamicina e incubadas 48 horas a 28°C. Em seguida, as cepas recombinantes e transformadas foram selecionadas e transferidas para o meio LB líquido contendo 50 µg/mL de canamicina, 50 µg/mL de rifampicina, 50 µg/mL de gentamicina e incubadas 48 horas a 28°C sob agitação (200 rpm). A extração do DNA plasmidial de *Agrobacterium* foi realizado segundo o protocolo descrito por Paul Ebert (Institute of Biological Chemistry, Washington State University, Pullman, USA) (http://www.arabidopsis.org/comguide/chap_3_dna_techniques/11_agro_plasmid_miniprep.html). As transformações foram confirmadas por PCR.

Uma construção gênica com apenas o vetor pCAMBIA sem o promotor CaMV35S foi feita para ser utilizada como controle negativo, seguindo os mesmos métodos de transformação descritos acima. Como controle positivo foi utilizado o vetor pCAMBIA 1305.1.

3.4.5 Transformação de plantas

A transformação de Arabidopsis foi realizada pelo método Floral Dip (CLOUGH; BENT, 1998), repetido duas vezes em um intervalo de 1 semana. Após 30 dias, as sementes foram coletadas, esterilizadas e plaqueadas em meio sólido contendo 2,165 g/L de MS sais e vitaminas (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 8 g/L de phytoagar, 30 mg/L de higromicina e pH ajustado para 5,8 com KOH. Depois de 15 dias, as plantas resistentes foram transferidas para vasos de plástico contendo iguais proporções de substrato organomineral (Plantamax) e vermiculita, até atingirem o tamanho desejado para a análise histoquímica.

4 RESULTADOS

4.1 Isoformas de SacRALF identificadas em cana-de-açúcar

Buscas no banco de dados do SUCEST revelaram a presença de quatro isoformas do precursor do RALF em cana-de-açúcar (Figura 5). A consulta ao banco de dados do NCBI revelou resultados idênticos. As sequências protéicas deduzidas dos cDNAs dos preproRALFs de cana-de-açúcar apresentam a mesma estrutura observada para os demais precursores já identificados em outros bancos de dados: uma sequência líder direcional para a via secretória, uma região entre a sequência líder e o peptídeo ativo que é pouco conservada, e a sequência do peptídeo RALF que é altamente conservada. Para cada isoforma foram solicitados dois clones do SUCEST ao Centro Brasileiro de Estocagem de Genes (BCCC) que foram ressequenciados (ambas fitas) para garantia da sequência obtida. Estas sequências foram utilizadas para a seleção de iniciadores específicos para uso no PCR em tempo real e em reações de RT-PCR (“reverse transcriptase-PCR”). Os iniciadores específicos foram testados e confirmados através da análise em gel de agarose, sequenciamento dos fragmentos e curvas de desnaturação.

```

SCRFST3145F12.g 1 MARLALALLLLLAVAASSASAAGSHLDLDLDLGFLLSSGGRRRECRGTVTECLAEASES
SCRURT2010D09.g 1 MARPARALLLPPLMLLAALAR-----ASSGDVPAASLIGWDLGVVGAGED
SCSBST3094C03.g 1 MAVSVAALSAPVSAAGGVAGDLAHLAG-----AVVIRRGGRTCRGVGECEMEYFGADAE
SCRFAM2128E05.g 1 MPETTKLLLSRAWAAASLTLTLLLVH-----GRGHGICLGME
AT1G02900 1 -MDKSFTLFLTLTLVVFLLSSPPVQAG-----FANDLGGVAWATIGDNGSGCHGSIAE

SCRFST3145F12.g 61 EEEGLDLVSSAESERRALYGG-GYISYGALRRDNVPCSRRGASYYNCRPGGQANPYHARGC
SCRURT2010D09.g 50 EEFGLFLPGTGDSVARRVLOGG-GYISYGALRRDNVPCSVRGASYYNCRPGGQANPYSRGC
SCSBST3094C03.g 56 GEADVAGMATGGSKRRVLOGGSGYIGYDALRRDNVPCSVRGASYYNCRPGGQANPYSRGC
SCRFAM2128E05.g 41 AELEMDSEAHRRLLWEATTGQ-RYISYALRGELVPCSRITGVFYNNCRISTTANPYTRGC
AT1G02900 54 CIGAEEMEEMSEINRRILLATT-KYISYQSLKRNSVPCSRRGASYYNCRNGAQANPYSRGC

SCRFST3145F12.g 120 SRITRCRG---
SCRURT2010D09.g 109 SAITRWRG---
SCSBST3094C03.g 116 SAITRCRG---
SCRFAM2128E05.g 100 ESITRCRDADP
AT1G02900 113 SKIARCRS---
```

Figura 5 – Alinhamento das sequências protéicas deduzidas das isoformas do precursor do RALF encontradas em cana-de-açúcar. A isoforma At1g02900 de *Arabidopsis* foi incluída para comparação

4.2 Expressão gênica em plantas de cana-de-açúcar

4.2.1 Expressão gênica dos SacRALFs em raiz

Pontas de raiz são caracteristicamente divididas em zona meristemática, de elongação e de diferenciação. Para o propósito deste estudo, foram avaliadas duas regiões de ponta de raiz: a zona meristemática, composta pelos primeiros 4 mm da ponta da raiz (ponta-4 mm); e zona de elongação, tecido após os 4 mm (>4 mm). O final da zona de elongação foi estabelecido pela presença de pelos radiculares (MOORE, 1987). O gene SacRALF1 mostrou um nível alto de transcritos na zona de elongação (>4 mm). A expressão de SacRALF1 na zona de elongação foi 20 vezes maior do que o nível encontrado na zona meristemática (Figura 6A). SacRALF3 seguiu a mesma tendência (Figura 6B) e SacRALF4 (Figura 6C) mostrou diferenças menores de expressão na ponta de raiz. Transcritos de SacRALF2 não foram detectados nas zonas avaliadas.

Figura 6 – Análise de PCR quantitativo em tempo real da abundância de transcritos dos genes SacRALF em raiz. A, SacRALF1. B, SacRALF3. C, SacRALF4. Os valores são a média de 3 replicatas, normalizados pela expressão do gene GAPDH. O valor de 1 foi atribuído a PONTA-4mm

4.2.2 Expressão gênica dos SacRALFs no limbo e bainha foliar

Similar a raízes, folhas de gramíneas são apropriadas para estudos do processo de desenvolvimento pelo seu crescimento unidirecional. A maturação das células da folha ocorre de forma basipetal, limitando a elongação para a região basal da folha (DICKINSON, 2000). Como em outras gramíneas, o limbo da folha de cana-de-açúcar alonga primeiro seguido pela bainha foliar (MOORE, 1987).

Este crescimento celular foi vantajoso para realização de análises de expressão gênica em várias folhas de diferentes idades. As folhas foram numeradas da mais velha até a mais jovem, +3 a -1, conforme Moore (1987). As folhas foram destacadas e seccionadas na junção do limbo e da bainha, e estes foram avaliados separadamente.

SacRALF1 mostrou níveis muito baixos de expressão nos limbos de folhas mais velhas tais como +3, +2 e +1 e uma expressão aumentada nas folhas mais jovens, 0 e -1 (Figura 7A). O limbo da folha mais jovem (-1) mostrou um nível de transcritos SacRALF1 24 vezes maior que o nível encontrado na folha mais velha (+3).

Uma tendência similar foi observada nas bainhas foliares, uma expressão gênica alta nas bainhas de folhas jovens e uma expressão baixa nas folhas velhas. A folha +1 que mostra um limbo completamente expandido e uma bainha foliar em expansão, o nível de transcritos SacRALF1 foi quase 30 vezes mais alto na bainha foliar. O mesmo perfil de expressão gênica foi visto para SacRALF2, 3 e 4 (Figura 7).

Figura 7 – Análise de PCR quantitativo em tempo real da abundância de transcritos dos genes SacRALF em diferentes folhas de plantas jovens de cana-de-açúcar. A, SacRALF1. B, SacRALF2. C, SacRALF3. D, SacRALF4. Os valores são a média de 3 replicatas, normalizados pela expressão do gene GAPDH. O valor de 1 para cada gene SacRALF foi arbitrariamente atribuído ao nível de expressão encontrado em +3B (A, D) e +2B (B, C). B: limbo e S: bainha

4.2.3 Expressão gênica dos SacRALFs em diferentes partes da folha

A investigação do comportamento das diferentes isoformas de RALF em tecidos vegetais que apresentam diferentes níveis de amadurecimento celular pode levar a elucidação do envolvimento dos genes RALF com processos básicos da biologia celular. Com este objetivo, a folha +1 foi dividida em bainha e limbo e essas foram ainda divididas em terço proximal, medial e distal. O gene SacRALF1 mostrou altos níveis de expressão na bainha foliar, particularmente na bainha medial, e níveis quase nulos no limbo da folha, que já está totalmente expandido. Apesar de bem menos expressos, os genes SacRALF 2, 3 e 4 seguiram a mesma tendência, sendo mais expressos na bainha foliar, particularmente na bainha proximal, e menos expressos no limbo foliar (Figura 8).

Figura 8 – Análise de PCR quantitativo em tempo real da abundância de transcritos dos genes SacRALF em diferentes partes da folha +1 de plantas jovens de cana-de-açúcar. A quantificação relativa de mRNA foi desenvolvida com correção de eficiência e GAPDH como gene de referência. O valor de 1 foi atribuído ao limbo distal. Os valores são a média de 3 replicatas. A, SacRALF1. B, SacRALF2. C, SacRALF3. D, SacRALF4. BP: bainha proximal, BM: bainha medial, BD: bainha distal, LP: limbo proximal, LM: limbo medial e LD: limbo distal

Posteriormente, o limbo da folha zero foi cortado em 3 partes de tamanhos iguais: basal, medial e apical. No momento da coleta, o limbo da folha 0 estava em expansão e sua bainha ainda não havia iniciado o processo de alongação. A bainha da folha zero não foi analisada devido ao seu pequeno tamanho. Na figura 9 está o resultado das análises de expressão relativa dos genes SacRALF no limbo da folha zero.

O gene SacRALF1 mostrou uma alta expressão na base da folha, sendo 5 vezes maior que na região intermediária e 50 vezes maior que no ápice da folha. SacRALF3 também mostrou diferenças significativas da base para o ápice da folha em expansão: 10 vezes o nível encontrado na porção medial e 22 vezes o nível encontrado na porção apical. Ambos genes SacRALF2 e 4 seguiram a mesma tendência.

Figura 9 – Análise de PCR em tempo real dos níveis de mRNA de SacRALF na folha zero. A folha foi separada em 3 partes iguais: basal, medial e apical. Os valores são a média de 3 replicatas, normalizados pela expressão do gene GAPDH. O valor de 1 foi atribuído a porção apical. A, SacRALF1. B, SacRALF2. C, SacRALF3. D, SacRALF4

4.3 Expressão gênica em culturas de suspensão celular de cana-de-açúcar

4.3.1 Expressão gênica dos SacRALFs em condições normais de cultivo

A expressão gênica dos SacRALFs foi avaliada em culturas de suspensão celular de cana-de-açúcar em intervalos de quatro horas durante um dia (Figura 10), e também diariamente durante um período de sete dias (Figura 11). Nenhuma variação significativa da expressão dos genes SacRALFs foi observada nestes experimentos.

Figura 10 – Análise de PCR quantitativo em tempo real da abundância de transcritos dos genes SacRALF em culturas de suspensão celular de cana-de-açúcar. As células foram coletadas para extração de RNA no intervalo de 4 horas durante um dia. A quantificação relativa de mRNA foi desenvolvida com correção de eficiência e GAPDH como gene de referência. O valor de 1 foi atribuído a amostragem realizada as 8 horas. Os valores são a média de 3 replicatas. A, SacRALF1. B, SacRALF2. C, SacRALF3. D, SacRALF4

Figura 11 – Análise de PCR quantitativo em tempo real da abundância de transcritos dos genes SacRALF em culturas de suspensão celular de cana-de-açúcar. As células foram coletadas diariamente para extração de RNA durante uma semana. A, SacRALF1. B, SacRALF2. C, SacRALF3. D, SacRALF4. Os valores são a média de 3 replicatas, normalizados pela expressão do gene GAPDH. O valor de 1 para cada gene SacRALF foi arbitrariamente atribuído ao nível de expressão encontrado no primeiro dia

4.3.2 Efeito da Latrunculina e Afidicolina na expressão gênica dos SacRALFs

A partir da avaliação em condições normais e observação do comportamento estável, foi possível iniciar o estudo da expressão gênica com diferentes tratamentos. Primeiramente foi avaliado o efeito do inibidor da elongação celular, Latrunculina-B, em um intervalo de duas horas, durante um dia, e posteriormente a cada dozes horas, durante três dias. Em ambos os experimentos, os genes SacRALF apresentaram uma expressão gênica constante (Figura 12 e 13).

Figura 12 – Análise de PCR quantitativo em tempo real da abundância de transcritos dos genes SacRALF em culturas de suspensão celular de cana-de-açúcar tratadas com Latrunculina-B. As células foram coletadas a cada duas horas para extração de RNA. A, SacRALF1. B, SacRALF2. C, SacRALF3. D, SacRALF4. Os valores são a média de 3 replicatas, normalizados pela expressão do gene GAPDH. O valor de 1 para cada gene SacRALF foi arbitrariamente atribuído ao nível de expressão encontrado na zero hora. C: controle, L: Latrunculina-B

Figura 13 – Análise de PCR quantitativo em tempo real da abundância de transcritos dos genes SacRALF em culturas de suspensão celular de cana-de-açúcar tratadas com Latrunculina-B. As células foram coletadas a cada doze horas para extração do RNA total. A, SacRALF1. B, SacRALF2. C, SacRALF3. D, SacRALF4. Os valores são a média de 3 replicatas, normalizados pela expressão do gene GAPDH. O valor de 1 para cada gene SacRALF foi arbitrariamente atribuído ao nível de expressão encontrado na zero hora. C: controle, L: Latrunculina-B

Os experimentos com Afidicolina mostraram resultados semelhantes. Nos diferentes tempos de tratamento, a expressão dos genes SacRALF manteve-se

praticamente constante (Figura 14 e 15). Uma redução da expressão dos genes SacRALF pode ser observada nos últimos tempos de avaliação dos experimentos (32 horas e 4º dia).

Figura 14 – Análise de PCR quantitativo em tempo real da abundância de transcritos dos genes SacRALF em culturas de suspensão celular de cana-de-açúcar tratadas com Afidicolina. As células foram coletadas a cada oito horas para extração do RNA total. A quantificação relativa de mRNA foi desenvolvida com correção de eficiência e GAPDH como gene de referência. Os valores são a média de 3 replicatas. A, SacRALF1. B, SacRALF2. C, SacRALF3. D, SacRALF4. C: controle, A: Afidicolina

Figura 15 – Análise de PCR quantitativo em tempo real da abundância de transcritos dos genes SacRALF em culturas de suspensão celular de cana-de-açúcar tratadas com Afidicolina. As células foram coletadas diariamente por 4 dias para extração do RNA total. A quantificação relativa de mRNA foi desenvolvida com correção de eficiência e GAPDH como gene de referência. O valor de 1 foi atribuído ao primeiro dia. Os valores são a média de 3 replicatas. A, SacRALF1. B, SacRALF2. C, SacRALF3. D, SacRALF4. C: controle, A: Afidicolina

4.4 Efeito do RALF no crescimento de microcalli

O peptídeo RALF foi adicionado ao meio de crescimento a fim de investigar seu efeito no desenvolvimento de microcalli derivado de culturas de suspensão celular de cana-de-açúcar. Na figura 16A estão os resultados do crescimento de microcalli em meios contendo diferentes concentrações do peptídeo. Concentrações de 10, 5, 1 e 0,1 μM foram eficazes na interrupção do crescimento de microcalli. Microcalli após 5 dias expostos ao peptídeo foram examinados no microscópio e um número reduzido de células alongadas foi observado (Figura 16B). Quando comparado aos controles não tratados, RALF induziu a formação de células menores nos microcalli. Depois de 5 dias em meio contendo o peptídeo, os microcalli foram transferidos ao meio controle e estes retomaram o crescimento.

Para quantificar o efeito do peptídeo quanto ao número de microcallus apresentando células alongadas, foi feita uma contagem de tais microcallus em células tratadas com 10 e 5 μM de RALF após 6 e 7 dias (Tabela 1). Ambos tratamentos mostraram-se significativamente diferentes do controle após uma semana de exposição ao peptídeo. Aos 6 dias, somente o tratamento com 10 μM apresentou diferenças significativas. O número de microcalli apresentando células alongadas foi obtido para 15 repetições e a análise estatística ANOVA ($P < 0,005$) foi conduzida para comparação das médias.

Figura 16 – Microcalli derivados do ensaio de crescimento de culturas de suspensão celular de cana-de-açúcar. A, Análise no dia zero e 5 dias após o início do experimento e em diferentes concentrações (10, 5, 1 e 0,1 μM) do peptídeo visualizadas no estereoscópio (aumento de 10X). B, Depois de 5 dias, o meio controle e o meio contendo o SacRALF1 foram visualizados no microscópio óptico (aumento de 400X). As setas indicam células alongadas

Tabela 1 – Efeito do peptídeo RALF no crescimento de microcalli derivados de culturas de suspensão celular de cana-de-açúcar

Tratamentos	Nº total de microcalli	Nº de microcalli com células alongadas ^{&, #}	
		Dia 6	Dia 7
Controle	50	17,73±3,71 (a)	26,80±2,39 (a)
5 µM	50	15,40±1,88 (a)	12,66±2,23 (b)
10 µM	50	6,53±1,92 (b)	7,20±1,47 (c)

[&] média de 15 repetições

[#] médias seguidas de mesma letra não são estatisticamente diferentes com $\alpha=0,05$

4.5 Expressão gênica com GUS

4.5.1 Clonagens

Com a finalidade de complementar os estudos da análise da expressão gênica com PCR em tempo real realizadas em plantas de cana-de-açúcar, escolheu-se o modelo vegetal *Arabidopsis thaliana* para estudos dos promotores fusionados a proteína repórter GUS. Duas isoformas do RALF foram escolhidas: At1g02900 e At5g67070. Essas duas isoformas são a de maior e menor similaridade com as isoformas de cana-de-açúcar, respectivamente. O modelo *Arabidopsis* foi escolhido pelas facilidades na geração de plantas transgênicas. Todas as clonagens foram confirmadas com PCR, digestão e sequenciamento seguido de checagem por Blastx (ALTSCHUL et al., 1997). As sequências das regiões promotoras At1g02900 e At5g67070 estão apresentadas na figura 17.

A

TTCTATTAATTTTTATGTGTCTTACATACCAATTATCTTTTTATGATATCCAAGATCTC
 GATTTACTTAGATTGGTTTGCTATGTACTCTATTAATGTCGTCATGTTTTTATGAGAC
 GACTCATCCGTGGTTCTAAACAATACGAAGGCCGGTGAGAGTGAGAAACGCGTTTT
 GATTCCGGTGAGACTAAGAAAATTAGGGTTCGCTTTTTAGAAAGTATCTATTATTTAAAA
 CATGATTTTCGATTATTGTAGTTAAGGAAGGATTAGGTTTTATTTTCTTTGTTTTATTG
 GGATAACGATGGCCCACTCTTTTCAATTTTTCATGGTCGTTGGAAGAGAAGATGAA
 GCATAGCTTTTCGTTGTTTCAGAATATGTATTTAATTAAAAAATTGAACTATGATAATA
 TATTTTTGAGTATTTGTTATTCAGTAGTTTAAAAGTTGGTACCAAACGTAATTTGCAA
 TGAATAATATTGATTTTCAGATATCGAAATCCATAAAATGACTTTTAAAATACCTTACA
 GAAAAGTGATTAAAACTTACTATATCCTAGATTAAGGAACAAGTCAATTATAAATTC
 ATAATGTCATCTAGATTCAGTGCTTTCAGATCATAAAACATGATAGTGTTGATTTTAA
 AAATTCAAATGGATAATGAGAAAAGGCTTGACCCCTCCAATATTCCAATCGTTTTG
 GTTCAATTTCTGTGCGCTCTAACAAATATTCAACCACTCCCAACAATTCTCCAATTAA
 TAATAATTAATAATTTGCATAATCATTTTTTTTCATTTCACTGTCAAGTGGCATTCT
 GTTAATACCGAAATAACACAAGTAAAATTTCGAACTATAATGTAAGTTCAAAAAATT
 CTATTGTAACCTACAGAAATCAAAAATTCTAAACAGAAGCTCGTTAAATTTTCAAAATT
 TTAATATAACAAAGAGAAAAATGTTACTAGTATTCGAATCAACAAGTTATTGTCATGCT
 ATGTCTCATATTCTTCTAAATAAATACTGAACTTTTAATAAAAACACAAAATAGAATT
 TGAAAAACAAAACAAAAAAGAGAAAAAATCTTCAACAACTACAAAATTAAAAAA
 TCGAGTCCACGCACTCACCATGTATATATAAACATTAAGCAATAATAACCAA
ACAAAAGAACCCAAAGAAAGGCAAGAAAA

(continuação)

Figura 17 – Sequência das regiões promotoras, sublinhado encontra-se o sítio de anelamento dos iniciadores. A, Região promotora de At1g02900 – tamanho do fragmento amplificado: 1189 pares de bases. B, Região promotora de At5g67070 – tamanho do fragmento amplificado: 879 pares de bases

B

CTTTCAGCTATCAGGCTTGTGTTCATTTTTTATTTGTCTAAAACTAAATGCTGTTTT
 CAACATGCAAATATCTATACTTTTTCTTAAATTAATAATTTCAAAATTTGAG
 TTTATACTCTTATACTTGTATACAGATTTGAGAATATGACTAACCAAAAAGTCCACGA
 TTATTTATTTTCAATTGTTAATGTCTAATCTGATGGATTTGAGGAAGAAATTAACATCT
 TCATTAAATGATCAGTAATTTCAAAGCATTAAACAATAAAAATTATTTTTCACTTAAAA
 CAAATCTTACAAGAAATTTGGTCTATAGAATAATTTCATTAAGATGCTATTAAATATT
 CAACTGGGCCTTTGCTTTTGTGTAACAGTCTCAGGATTGGTCTTTTTCTCATTGTTTA
 CACAATTAGTAGTCTTTTATGTTATCAGCTATATTATTCAGGACCCAAAAACAACCTGG
 ACCCATCCGAATCTTTTTAAAAACACAACCTAGCTATCACAAAGGCTGTTTTGATGA
 AGCCCAAAAAGACCTACTCGTATACCAAAAAAACCAACGAAAGCCTGGCCCATTA
 ATCTCTCATCAAATCAGGCCAACAATCCAAGGGCTCACAACCAATCATTTCCTCTTC
 TCTTATCCTACACCGTGTCCCACCAGATCACTCATCGTCACACTAACACACTCACCA
 AAAAAAAAAACTCAAAGCACAAAGCTCGAGGAGGTCCATAAATGGCGCATTTAATTA
 GAACCCCCAAAATCTCTTCACAACCTGTAAACCCCAATCACCTCTTTACATGTGACT
 TCCTTATTACTCTCTTCTTCTTATTTTCCTCCTCTTCTTCTTCGCTCTAGTTTCCCCCA
ACAATCGCCAT

(conclusão)

Figura 17 – Sequência das regiões promotoras, sublinhado encontra-se o sítio de anelamento dos iniciadores. A, Região promotora de At1g02900 – tamanho do fragmento amplificado: 1189 pares de bases. B, Região promotora de At5g67070 – tamanho do fragmento amplificado: 879 pares de bases

As plantas transgênicas foram verificadas quanto à resistência ao antibiótico higromicina e também para a presença do transgene através de PCR. As confirmações da presença do gene GUSPlus nas plantas transformadas foram realizadas através de PCR utilizando-se iniciadores específicos da região do gene repórter GUSPlus. O tamanho do produto amplificado foi de aproximadamente 250 pares de bases (Figura 18).

Figura 18 – Eletroforese em gel de agarose 1%. Canaletas 1 e 9: marcador molecular de 1 kb, canaletas 2 e 3: promotor At1g02900 clonado no vetor pCambia 1305.1 (sem o promotor CaMV35S), canaletas 4, 5 e 6: promotor At5g67070 clonado no vetor pCambia 1305.1 (sem o promotor CaMV35S), canaletas 7, 10 e 11: vetor pCambia 1305.1, canaletas 12 e 13: vetor pCambia 1305.1 sem o promotor CaMV35S e canaletas 8 e 14: controle positivo

Para confirmar se as regiões promotoras dos genes At1g02900 e At5g67070 estavam corretamente inseridas no vetor pCambia 1305.1, foi realizado um PCR utilizando os iniciadores At1g02900 e At5g67070, e o iniciador GUSPlus reverso. O tamanho dos produtos amplificados foi de 1650 e de 1350 pares de bases para as construções At1g02900 e At5g67070, respectivamente. Como era esperado, o DNA genômico das plantas transformadas apenas com o vetor pCambia e com o vetor pCambia sem a região promotora CaMV35S não apresentaram produto de amplificação (Figura 19). As plantas serão posteriormente avaliadas por ensaios histoquímicos.

Figura 19 – Eletroforese em gel de agarose 1%. Canaletas 1 e 9: marcador molecular de 1 kb, canaletas: 2 e 3: promotor At1g02900 clonado no vetor pCambia 1305.1 (DNA plasmidial), 4 e 5: promotor At1g02900 clonado no vetor pCambia 1305.1 (DNA genômico de plantas transformadas), canaletas 6 e 12: vetor pCambia 1305.1 sem o promotor CaMV35S, canaletas 7 e 15: vetor pCambia, canaletas 8 e 16: controle negativo, canaletas 10, 11: promotor At5g67070 clonado no vetor pCambia 1305.1 (DNA plasmidial), canaletas 13 e 14: promotor At5g67070 clonado no vetor pCambia 1305.1 (DNA genômico de plantas transformadas)

5 DISCUSSÃO

Buscas no banco de dados do SUCEST revelaram a presença de quatro isoformas do precursor do RALF em cana-de-açúcar (Figura 5). Em *Arabidopsis* identificou-se um número maior, 9 isoformas (RYAN et al., 2002), em *Solanum chacoense* (GERMAIN et al., 2005) e em álamo foram identificadas 5 isoformas (HARUTA; CONSTABEL, 2003) e em *Nicotiana attenuata* apenas uma única isoforma (WU et al., 2007). Adicionalmente, as análises de expressão gênica mostraram que somente um único transcrito, SacRALF1, era dominante. Considerando que plantas de cana-de-açúcar são poliplóides complexos (GRIVET; ARRUDA, 2002), os outros três genes SacRALFs que mostraram níveis muito baixos de expressão poderiam ser cópias gênicas de SacRALF1 ou mesmo formas alélicas que teriam um papel similar. Neste caso, plantas de cana-de-açúcar parecem ser similares a *Nicotiana attenuata*, que tem apenas um gene RALF (WU et al., 2007), e não seguem a planta modelo *Arabidopsis*, ou os híbridos do álamo, ou *S. chacoense* que apresentaram mais que uma cópia do gene RALF em seus genomas (RYAN et al., 2002; HARUTA; CONSTABEL, 2003; GERMAIN et al., 2005).

A análise dos transcritos de SacRALF em raízes mostrou uma menor expressão na zona meristemática do que na zona de alongação (Figura 6). Raízes de cana-de-açúcar apresentam zonas de divisão, alongação e de maturação características (MOORE, 1987). Esses resultados não suportam um papel dos genes SacRALF na divisão celular. Fosse esse o caso, esperaria-se um nível alto de expressão restrito a zona meristemática, como por exemplo os genes quinase dependente de ciclina, CDK (ADACHI; UCHIMIYA; UMEDA, 2006), ou ainda os genes inibidores de CDK, ICK1 (WANG et al, 2000).

Os resultados mostraram que os genes SacRALF estão expressos na zona de alongação de raízes, sugerindo um papel na alongação celular. Resultados semelhantes foram encontrados para os genes da expansina, principal proteína que afeta a expansão celular em plantas. Em uma análise de expressão gênica em soja, foi identificado o primeiro gene de expansina específico de raiz, GmEXP1. Os transcritos de GmEXP1 estavam mais abundantes na região da ponta da raiz, onde a alongação celular ocorre, porém escassos na região de maturação, onde a alongação cessou,

implicando que sua expressão está intimamente relacionada ao processo de desenvolvimento da raiz (LEE, et al., 2003). Estudos em folha de milho identificaram 3 expansinas (ZmEXPA4, ZmEXPA9 e ZmEXPB2) mais altamente expressas na zona de alongação, e esta expressão declina conforme se afasta da base da folha (MULLER et al., 2007).

Folhas de cana-de-açúcar expandem de maneira unidirecional, assim em um determinado tempo, durante o crescimento vegetativo, a última folha com a lígula visível (folha +1) tem o limbo completamente expandido e a bainha em alongação. A folha +2 (mais velha que +1) tem limbo e bainha completamente alongados, e a folha zero (mais jovem que +1) têm ambos em processo de alongação (MOORE, 1987). As análises dos transcritos de SacRALF em folhas de diferentes idades (+3, +2, +1, 0 e -1) mostraram um alto nível de transcritos no limbo e bainha de folhas jovens e em expansão (Figura 7). A expressão gênica de RALF em híbridos de álamo também mostrou uma expressão alta em pecíolos e folhas jovens quando comparados a pecíolos e folhas velhas (HARUTA; CONSTABEL, 2003). Análises da expressão gênica de RALF em tecidos reprodutivos de *Solanum chacoense* também mostraram que a expressão dos genes ScRALF declinam com a maturação do fruto (GERMAIN et al., 2005).

A expansão celular unidirecional em folhas de gramíneas é vantajosa para a avaliação da expressão gênica de SacRALF. Levando-se em consideração que a mobilidade de um peptídeo de aproximadamente 5 kDa é bastante restrita, a hipótese testada é a de que se os genes SacRALF estão envolvidos na alongação celular, sua expressão gênica deveria estar limitada a zonas de alongação. A expressão também deveria estar quase ausente em regiões da planta tais como, o ápice de uma folha de gramínea, onde as células são diferenciadas e cessaram o processo de expansão. Os dados mostraram que os transcritos de SacRALF são principalmente encontrados em células jovens em alongação e estão quase ausentes em células diferenciadas (Figura 8). É improvável que os genes SacRALF estão envolvidos na divisão celular porque os resultados revelaram transcritos SacRALF além da zona meristemática, não somente em folhas mas também em raízes. Os genes SacRALF parecem estar envolvidos no início da alongação celular, pois eles não estavam expressos em células maduras e mostraram uma expressão diminuída nas porções medial e apical de folhas.

Análises da expressão gênica das isoformas de RALF em raízes de *Arabidopsis* revelaram que a isoforma At1g02900, que inibe o crescimento de raízes (MATOS ET AL 2008), foi identificada somente na zona de alongação, diferente da isoforma At5g67070, que foi encontrada na zona meristemática e não na zona de alongação, sugerindo funções específicas ou talvez até antagônicas dentro da família RALF. O mesmo já foi observado e comprovado para diferentes genes da família CLAVATA, onde a super-expressão dos genes CLE e CLV3 resultou na inibição ou estimulação do crescimento de raízes. Plantas anãs resultaram da super-expressão de 5 genes CLE. Adicionalmente, fenótipos com a super-expressão de vários membros da família CLE indicaram um papel na regulação do tamanho do órgão, domínio apical, e no crescimento de raízes (STRABALA et al., 2006).

Se os peptídeos SacRALF estão envolvidos na alongação celular, a expressão gênica de SacRALF em culturas de suspensão celular embriogênica não mostrariam variação significativa desde que estas células não tivessem iniciado o processo de diferenciação. Num determinado tempo, culturas de suspensão celular embriogênica tem células alongadas e, como consequência, os genes SacRALF deveriam ser quase constitutivos. Culturas de suspensão celular embriogênica de cana-de-açúcar mostraram um nível quase constitutivo de transcritos de genes SacRALF (Figura 10 e 11). Uma expressão constitutiva de genes RALF de álamo também foi reportada em culturas de células de álamo (HARUTA; CONSTABEL, 2003). A ausência de efeito significativo dos tratamentos com Afidicolina e Latrunculina, drogas de inibição da divisão e alongação celulares, respectivamente, indica que a regulação da expressão gênica do RALF não está sob controle direto destes dois processos celulares. A falta de efeito do tratamento com Latrunculina foi inesperada. Uma possibilidade é não ter-se atingido a concentração ótima para o efeito da droga, ou ainda, não se ter conhecimento da sensibilidade (ou insensibilidade) de células de cana-de-açúcar a essa toxina. Outros reagentes, por exemplo Citocalasina D, em diferentes concentrações, serão testados para melhor avaliar a alongação celular na expressão dos genes SacRALF.

O peptídeo SacRALF1 foi usado para avaliar os efeitos no desenvolvimento de microcalli derivados de culturas de suspensão celular. RALF inibiu o crescimento e

desenvolvimento de raízes de tomate e *Arabidopsis* (PEARCE et al., 2001). Recentemente, Wu e colaboradores (2007) também mostraram que o gene NaRALF, um homólogo de *Nicotiana attenuata*, é essencial para a formação do pelo radicular. Como as células de folha não são favoráveis para o tratamento com o peptídeo, foi testado o efeito de peptídeo SacRALF1 em culturas de suspensão celular. Os microcalli em meio contendo diferentes concentrações do peptídeo SacRALF1 tiveram inibição do crescimento que foi realçado com o aumento das concentrações do peptídeo (Figura 16). Depois de 5 dias, células controle mostraram um crescimento notável enquanto células tratadas com SacRALF1 não apresentaram esse comportamento. A inibição do crescimento foi observada até nas concentrações de 10^{-7} M. Com a visualização no microscópio foi possível observar que a elongação celular foi cessada ou retardada (Figura 16B). Células tratadas com o peptídeo SacRALF1 parecem atrasar a entrada nas fases de expansão e elongação, característica da fase estacionária precoce de culturas de suspensão celular. Um efeito similar foi observado quando plantas de *Arabidopsis* foram expostas ao peptídeo exógeno RALF (PEARCE et al., 2001). Plantas transgênicas de *N. attenuata* silenciadas para o gene NaRALF apresentaram raízes mais longas. Uma zona de elongação significativamente mais longa foi também observada nestas plantas transgênicas, sugerindo que o peptídeo NaRALF pode ter um papel na regulação da elongação celular em tabacos nativos. Plantas de *N. attenuata* com o gene NaRALF silenciado tiveram também uma alta taxa de expansão das células. Curiosamente, *N. attenuata* tem somente um homólogo de RALF e as plantas silenciadas mostraram partes aéreas normais. Uma possível explicação para este evento é que os níveis residuais de mRNA de NaRALF em plantas silenciadas, em torno de 10%, poderiam ser suficientes para gerar partes aéreas normais (WU et al., 2007).

O papel dos peptídeos RALF no desenvolvimento tem sido sugerido desde sua descoberta (PEARCE et al., 2001), e vários outros autores têm fornecido evidências que suportam esta hipótese (HARUTA; CONSTABEL, 2003; OLSEN; MUNDY; SKRIVER, 2002; GERMAIN et al., 2005; WU et al., 2007). A inibição do crescimento e desenvolvimento de raízes e o reduzido número de células alongadas causados pela super-expressão ou tratamento com 10 μ M do RALF respectivamente, associados a

expressão predominante em zonas de alongação, sugerem um papel regulatório da alongação celular. A super-expressão e o tratamento com o peptídeo exógeno estariam exacerbando os efeitos do RALF, em concentrações fisiológicas, o peptídeo manteria o processo de alongação sob regulação nas zonas de alongação até o “engessamento” típico das paredes celulares de células maduras. Os resultados, tomados em conjunto, indicam que os genes *SacRALF* estão envolvidos na alongação celular em raízes e folhas de plantas de cana-de-açúcar.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quatro isoformas de RALF (SacRALF 1, 2, 3 e 4) foram identificadas em cana-de-açúcar e foi identificado que a isoforma SacRALF1 é a mais expressa. Análises da expressão revelaram que os genes SacRALFs estavam predominantemente expressos em folhas jovens e nas zonas de elongação de raízes. Os transcritos destes genes são praticamente imperceptíveis nos tecidos maduros, onde as células se encontram diferenciadas. A avaliação do efeito do peptídeo SacRALF1 no crescimento de microcalli derivado de culturas de suspensão celular revelou uma inibição do crescimento, com um número menor de células alongadas. Todos esses resultados sugerem um papel dos genes SacRALFs no desenvolvimento celular, particularmente na elongação celular.

REFERÊNCIAS

ADACHI, S.; UCHIMIYA, H.; UMEDA, M. Expression of B2-type cyclin-dependent kinase is controlled by protein degradation in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 47, p. 1683-1686, 2006.

ALI-BENALI, M.A.; ALARY, R.; JOUDRIER P.; GAUTIER, M.F. Comparative expression of five *Lea* genes during wheat seed development and in response to abiotic stresses by real-time quantitative RT-PCR. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1730, p. 56-65, 2005.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

BALUŠKA, F.; JASIK, J.; EDELMANN, H.G.; SALAJOVÁ, T.; VOLKMANN, D. Latrunculin B-induced plant dwarfism: plant cell elongation is F-actin-dependent. **Developmental Biology**, Sunderland, v. 231, p. 113-124, 2001.

BARSALOBRES-CAVALLARI, C.F.; SEVERINO, F.E.; MALUF, M.P.; MAIA, I.J. Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. **BMC Molecular Biology**, London, v. 10, p. 1-11, 2009.

BASU, C.; KAUSCH, A.P.; CHANDLEE, J.M. Use of β -glucuronidase reporter gene for gene expression analysis in turfgrasses. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 320, p. 7-10, 2004.

BIRNBAUM, K.; SHASHA, D.E.; WANG, J.Y.; JUNG, J.W.; LAMBERT, G.M.; GALBRAITH, D.W.; BENFEY, P.N. A gene expression map of the *Arabidopsis* root. **Science**, Washington, v. 302, p. 1956-1960, 2003.

CAHOON, A.B.; TAKACS, E.M.; SHARPE, R.M.; STERN, D.B. Nuclear, chloroplast, and mitochondrial transcript abundance along a maize leaf development gradient. **Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 66, p. 33-46, 2008.

CLOUGH, S.J.; BENT, A.F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 16, p. 735-743, 1998.

COMBIER, J.P.; KÜSTER, H.; JOURNET, E.P.; HOHNJEC, N.; GAMAS, P.; NIEBEL, A. Evidence for the involvement in nodulation of the two small putative regulatory peptide-encoding genes MtRALF1 and MtDVL1. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 21, p. 1118-1127, 2008.

DICKINSON, W. C. **Integrative plant anatomy**. San Diego: Academic Press, 2000. 533 p.

ESCOBAR, N.M.; HAUPT, S.; THOW, G.; BOEVINK, P.; CHAPMAN, S.; OPARKA, K. High-throughput viral expression of cdna–green fluorescent protein fusions reveals novel subcellular addresses and identifies unique proteins that interact with plasmodesmata. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, p. 1507-1523, 2003.

EXPÓSITO-RODRÍGUEZ, M.; BORGES, A.A.; BORGES-PÉREZ, A.; PÉREZ, J.A. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. **BMC Plant Biology**, London, v. 8, p. 131-143, 2008.

FALCO, M.C.; TULMANN NETO, A.; MENDES, B.M.J.; ZAPATA-ARIAS, F.J. Isolation and cultivation of sugarcane protoplasts. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 8, p. 175-179, 1996.

FELIX, G.; BOLLER, T. Systemin induces rapid ion fluxes and ethylene biosynthesis in *Lycopersicon peruvianum* cells. **The Plant Journal**, Oxford, v. 7, p. 381-389, 1995.

FIORANI, F.; BEEMSTER, T.S. Quantitative analyses of cell division in plants. **Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 60, p. 963-979, 2006.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p. 1445-1454, 2004.

GERMAIN, H.; CHEVALIER, É.; CARON, S.; MATTON, D.P. Characterization of five RALF-like genes from *Solanum chacoense* provides support for a developmental role in plants. **Planta**, Berlin, v.220, p. 447-454, 2005.

GRIVET, L.; ARRUDA, P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, p. 122-127, 2002.

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

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

HUFFAKER, A.; PEARCE, G.; RYAN, C.A. An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.103, p. 10098-10103, 2006.

HUFFAKER, A.; RYAN, C.A. Endogenous peptide defense signals in *Arabidopsis* differentially amplify signaling for the innate immune response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, p. 10732-10736, 2007.

INABA, Y.; ZHONG, W.Q.; ZHANG, X.H.; WIDHOLM, J.M. Specificity of expression of the GUS reporter gene (*uidA*) driven by the tobacco ASA2 promoter in soybean plants and tissue cultures. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 164, p. 824-834, 2007.

ITO, Y.; NAKANOMYO, I.; MOTOSE, H.; IWAMOTO, K.; SAWA, S.; DOHMAE, N.; FUKUDA, H. Dodeca-CLE peptides as suppressors of plant stem cell differentiation. **Science**, Washington, v. 313, p. 842-845, 2006.

JIAN, B.; LIU, B.; BI, Y.; HOU, W.; WU, C.; HAN, T. Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, London, v. 9, p. 59-73, 2008.

KONDO, T.; SAWA, S.; KINOSHITA, A.; MIZUNO, S.; KAKIMOTO, T.; FUKUDA, H.; SAKAGAMI, Y. A plant peptide encoded by CLV3 identified by *in situ* MALDI -TOF MS analysis. **Science**, Washington, v. 313, p. 845-848, 2006.

LEE, D.K.; AHN, J.H.; SONG, S.K.; CHOI, Y.D.; LEE, J.S. Expression of an expansin gene is correlated with root elongation in soybean. **Plant Physiology**, Rockville, v. 131, p. 985-997, 2003.

LI, L.; WANG, X.L.; HUANG, G.Q.; LI, X.B. Molecular characterization of cotton GhTUA9 gene specifically expressed in fibre and involved in cell elongation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, p. 3227-3238, 2007.

LÜ, S.; GU, H.; YUAN, X.; WANG, X.; WU, A.M.; QU, L.; LIU, J.Y. The GUS reporter-aided analysis of the promoter activities of a rice metallothionein gene reveals different regulatory regions responsible for tissue-specific and inducible expression in transgenic *Arabidopsis*. **Transgenic Research**, London, v. 26, p. 177-191, 2007.

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 Letter**, Amsterdam, v. 582, p. 3343-3347, 2008.

MATSUBAYASHI, Y.; SAKAGAMI, Y. Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, p. 7623-7627, 1996.

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

MENDES, M.; MURRAY, A.H. Synchronous *Arabidopsis* suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. **The Plant Journal**, Oxford, v. 30, p. 203-212, 2002.

MINGOSSO, F.B.; MATOS, J.L.; RIZZATO, A.P.; MEDEIROS, A.H.; FALCO, M.C.; SILVA-FILHO, M.C.; MOURA, D.S. SacRALF1, a peptide signal from the grass sugarcane (*Saccharum* spp.), is involved in tissue expansion. (manuscrito em preparação).

MOORE, P.H. Anatomy and morphology. In: HEINZ, D.J. (Ed.), **Sugarcane Improvement Through Breeding**. New York: Elsevier, 1987. p. 85-143.

MOURA, D.S.; PEARCE, G.; RYAN, C.A. RALF peptides. In: KASTIN, A.J. (Ed.), **The Handbook of Biologically Active Peptides**. San Diego: Academic Press, 2006. p. 33-36.

MOURA, D.S.; SILVA-FILHO, M.C.S. 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. (Ed.), **Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issue**. London: Global Science Books, 2006. p. 203-209.

MULLER, B.; BOURDAIS, G.; REIDY, B.; BENCIVENNI, C.; MASSONNEAU, A.; CONDAMINE, P.; ROLLAND, G.; CONÉJÉRO, G.; ROGOWSKY, P.; TARDIEU, F. Association of specific expansins with growth in maize leaves is maintained under environmental, genetic, and developmental sources of variation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 143, p. 278-290, 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 15, p.473-497, 1962.

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

PEARCE, G.; STRYDOM, D.; JOHNSON, S.; RYAN, C.A. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. **Science**, Washington, v. 253, p. 895-898, 1991.

PEARCE, G.; MOURA, D.S.; STRATMANN, J.; RYAN, C.A. Production of multiple plant hormones from a single polyprotein precursor. **Nature**, London, v. 411, p. 817-820, 2001a.

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 United States of America**, Washington, v. 98, p. 12843-12847, 2001b.

PEARCE, G.; RYAN, C.A. Sistemic signaling in tomato plants against herbivores. Isolation and characterization of three novel defense-signaling glycopeptide hormones coded in a single precursor gene. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, p. 30044-30050, 2003.

PEARCE, G.; YAMAGUCHI, Y.; MUNSKE, G.; RYAN, C.A. Structure-activity studies of AtPep1, a plant peptide signal involved in the innate immune response. **Peptides**, New York, v. 29, p. 2083-2089, 2008.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 29, p. 2001-2007, 2001.

RYAN, C.A.; PEARCE, G. Polypeptide hormones. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, p. 65-68, 2001.

RYAN, C.A.; PEARCE, G.; SCHEER, J.; MOURA, D.S. Polypeptide hormones. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. S251-S264, 2002.

RYAN, C.A.; PEARCE, G. Systemins: A functionally defined family of peptide signals that regulate defensive genes in *Solanaceae* species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, p. 14577-14580, 2003.

RIBEIRO, D.T.; FARIAS, L.P.; ALMEIDA, J.D.; KASHIWABARA, P.M.; RIBEIRO, A.F.C.; SILVA-FILHO, M.C.; MENCK, C.F.M.; SLUYS, M.A.V. Functional characterization of the *thi1* promoter region from *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, p. 1797-1804, 2005.

SCHALLER, A.; OECKING, C. Modulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, p. 263-272, 1999.

SCHÄUFELE, R.; SCHNYDER, H. Cell growth analyses during steady and non-steady growth in leaves of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) subject to defoliation. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.23, p. 185-194, 2000.

SCHNYDER, H.; NELSON, C.J. Grow rates and carbohydrate fluxes within the elongation zone of tall fescue leaf blades. **Plant Physiology**, Rockville, v. 85, p. 548-553, 1987.

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

STRABALA, T.J.; O'DONNELL, P.J.; SMIT, A.M.; AMPOMAH-DWAMENA, C.; MARTIN, E.J.; NETZLER, N.; NIEUWENHUIZEN, N.J.; QUINN, B.D.; FOOTE, H.C.; HUDSON, K.R. Gain-of-function phenotypes of many CLAVATA3/ESR genes, including four new family members, correlate with tandem variations in the conserved CLAVATA3/ESR domain. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, p. 1331-1344, 2006.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

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.

WANG, H.; ZHOU, Y.; GILMER, S.; WHITWILL, S.; FOWKE, L.C. Expression of the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology. **The Plant Journal**, Oxford, v.24, p. 613-623, 2000.

WONG, M.W.; MEDRANO, F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **BioTechniques**, London, v.39, p. 75-85, 2005.

YAMAGUCHI, Y.; PEARCE, G.; RYAN, C.A. The cell surface leucine-rich repeat receptor for AtPep1, an endogenous peptide elicitor in *Arabidopsis*, is functional in transgenic tobacco cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, p. 10104-10109, 2006.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Sequências de iniciadores usados no PCR em tempo real

	Iniciador	Iniciador reverso
SacRALF1	5' ATCGGTTGCTGTGCTAGCTT 3'	5' CCACTGCACCACAATAATCG 3'
SacRALF2	5' CAGCAAAGATCCAGTGCAG 3'	5' AGCAAGATCAGCTTCGTGGT 3'
SacRALF3	5' TCCACCGAGAGGAAGAGAAG 3'	5' ACCACCACCAATCATTCTCG 3'
SacRALF4	5'TTCTTCTGCCTACCGCTACC 3'	5' GAATCCATCCATCTCCCCTAA 3'
GAPDH	5'TTTGAATGGCAAGCTCACTG 3'	5' GGTGGAAACCAAATCCTCCT 3'

APÊNDICE 2 – Sequência dos fragmentos amplificados por PCR em tempo real, sublinhado encontra-se o sítio de anelamento dos iniciadores

SacRALF1 – tamanho do fragmento amplificado: 147 pares de bases

ATCGGTTGCTGTGCTAGCTTCATGGTGATTTTCTTTTTGGGTCTTTAATTTGAGACTT
 CATGGAGGTCGTCTGTCTTTGCTGTGCTAGCTAGCCTTTGTCCAGCTGAGGCATCC
 ATGACTGGTCCATCGATTATTGTGGTGCAGTGG

SacRALF2 – tamanho do fragmento amplificado: 187 pares de bases

CAACGCAAGGTGTTGCTAAATGCTAATGAAATGTAATATTTTGTGTTATATCTCTTTT
 CTTGGTCCTTCCTCCTTTGCTGGAATATTAGTAAGTGTAAGGAAGGACTAATGG
 ATGAATTTTCATGTTTGAGGTGCTCTAGACTTCTATTACCTTGAGATCTTTTGCTGTTG
GCAGTGCAAGATGT

SacRALF3 – tamanho do fragmento amplificado: 200 pares de bases

TCCACCGAGAGGAAGAGAAGACGAGGTTTCATATCCGTTAATTCATCCCACGCCGTT
 GTTGATTGTTGATTTGAGACAAAAAAAACAAAAAATCGTTCATCTCCTTCCCTGC
 CCCTTTAATCGATTATTAGTACCTGTATGTTATGATTGCTTATATTTCTCTTGTCGTTT
 GATTTTAACGAGAATGATTGGTGGTGGT

SacRALF4 – tamanho do fragmento amplificado: 130 pares de bases

TTCTTCTGCCTACCGCTACCGCTACCGCCGCTGCTGTTTACAAGTACTAGAGCTAT
 GGATTTCAATTGTTGTGTGGATTTGTTTGTCAAATCTGTGTTGTTGTAAAGTTATTAGG
GGAGATGGATGGATTC

GAPDH – tamanho do fragmento amplificado: 184 pares de bases

TTTGAATGGCAAGCTCACTGGTATGTTCTTCCGGGTCCCACCGTGGATGTGTCCG
 TTGTTGACCTCACTGTCAGAATTGAGAAGGGTGCCTCCTATGAGGAAATCAAGAAA
 GCTATTAAGGCTGCTTCTGAGGGCCCACTCAAGGGTATCATGGGCTACGTGGAGG
AGGATTTGGTTTCCACC

APÊNDICE 3 – Sequências de iniciadores utilizados nas clonagens e na confirmação das clonagens

	Iniciador	Iniciador reverso
At1g02900	5' <u>CCGAATTCTTCTATTAATTT</u> TTATGTGTCTTACATACCAAT 3'	5' <u>TTCCATGGCCATTTTCTTGC</u> CTTTCTTTGGGTTCTTTTGTT 3'
At5g67070	5' <u>CCGAATTCGCTTTCAGCTAT</u> CAGGCTTGTGTTTCATT 3'	5' <u>TTCCATGGTCATGGCGATTG</u> TTGGGGGAACTAGAGC 3'
GUSPlus	5' CTGTACCCGATCAACACCGA GACCCGTGGCGTC 3'	5' CTGATCCTTCAGATAGGCCG GCACCGTGAAGTC 3'