

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

**Análise funcional de peptídeos AtRALFs foliares e purificação por afinidade de proteínas que interagem com o AtRALF1 *in planta***

**Bianca Ribeiro**

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

**Piracicaba  
2014**

Bianca Ribeiro  
Bióloga

**Análise funcional de peptídeos AtRALFs foliares e purificação por afinidade de proteínas que interagem com o AtRALF1 *in planta***

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

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

**Piracicaba  
2014**

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

Ribeiro, Bianca

Análise funcional de peptídeos AtRALFs foliares e purificação por afinidade de proteínas que interagem com o AtRALF1 *in planta* / Bianca Ribeiro. - - Piracicaba, 2014.

77 p. : il.

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

1. Desenvolvimento 2. Alongamento 3. Purificação I. Título

CDD 581.19245  
R484a

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

## **DEDICATÓRIA**

**Dedico meu trabalho aos meus pais e avós que sempre me incentivaram a estudar.**



## AGRADECIMENTOS

Ao apoio da FAPESP na forma de concessão da bolsa de estudos pelo processo 2012/21872-3.

Ao professor Daniel Moura por toda paciência, exemplo profissional, ideias, incentivo e apoio ao longo do meu mestrado e também da minha iniciação científica que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao professor Márcio de Castro Silva Filho responsável pelo Laboratório de Biologia Molecular de Plantas e pela professora Helaine Carrer responsável pelo Laboratório de Biologia Molecular que forneceram equipamentos e materiais para o desenvolvimento deste projeto.

Aos meus pais, Antonio Carlos e Christiane, pelo apoio constante e exemplo de caráter. Aos meus avós Antonio, Edméa e Marigleides pelo carinho e preocupação. Aos meus tios Fabiano, Fábio, Fabiane e Érika pela amizade. Aos meus primos Vinícius, Melissa e Guilherme pelo carinho e momentos de descontração. A todos os meus parentes, Vanderlei, Larissa e Júnior que mesmo de longe torceram pelo meu sucesso.

Ao meu namorado, Lucas, pelo companheirismo dentro e fora do laboratório, pelo carinho, pela amizade, pelo amor, pela troca de ensinamentos, pela ajuda nos experimentos e por fazer parte da minha vida.

Às minhas amigas distantes, mas que sempre estão por perto de alguma forma quando preciso: Ana, Nayara, Aline e Laís, por todo carinho, consideração, momentos compartilhados e amizade verdadeira.

Às minhas amigas de dentro e fora do laboratório, Tábata e Marina, por todas as conversas, apoio, risadas e carinho.

Ao técnico do laboratório, Amaral, por todo apoio, ensinamentos e amizade.

Ao meu amigo Fausto Andrés e minha amiga Tábata pela paciência, carinho e ajuda durante a fase mais difícil do meu mestrado.

Aos colegas de laboratório que em muito contribuíram para o meu crescimento profissional e emocional: Amanda, Wellington, Juliano, Akemi, Paulo, Keini, Andrés, Juan, Tábata, Marina e Lucas.

À técnica Fátima pelos ensinamentos e aprendizado, ao André, pelo carinho, ao Guilherme pelos momentos de descontração e a todos do laboratório de Biologia Molecular pelo convívio ao longo do mestrado.

A todos do laboratório de Biologia Molecular de Plantas, Larissa, pelas conversas e bons momentos compartilhados, ao técnico Rafael pelo auxílio, a Thais, Flávia, Poliene, Lucas e Aline pelo convívio e aprendizado.

Aos amigos e colegas, Fred, Mônica, Marcia, Cindy, Augusto, Ariadne, Enéas, Jussara, Roseli, Daniel, Adriana, Lucas, Heitor, Thalles, Pedro, Araxi, Marcela, Eveline, Ninfim, Evandro, Natália, Nathália, Malibu, Wiliane, Larissa e Maria e a todas as pessoas que marcaram a minha vida de alguma forma e assim contribuíram para o meu crescimento.

## EPÍGRAFE

**“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”.**

**(Marcel Proust)**





## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| RESUMO.....  | 11 |
| ABSTRACT .....   | 13 |
| LISTA DE FIGURAS .....   | 15 |
| 1 INTRODUÇÃO.....  | 17 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....  | 19 |
| 2.1 Peptídeo sinal RALF.....   | 19 |
| 2.2 Desenvolvimento.....   | 25 |
| 2.3 Purificação por afinidade <i>in planta</i> .....   | 28 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS.....  | 31 |
| 3.1 Material vegetal e condições de crescimento.....   | 31 |
| 3.2 Obtenção de plantas transgênicas.....  | 31 |
| 3.2.1 Clonagem das sequências <i>AtRALF1</i> , <i>AtRALF19</i> , <i>AtRALF23</i> , <i>AtRALF31</i> ,<br><i>AtRALF33</i> e <i>AtRALF34</i> em vetores apropriados ..... | 31 |
| 3.2.2 Produção de bactérias <i>Escherichia coli</i> e <i>Agrobacterium tumefaciens</i><br>eletrocompetentes.....   | 33 |
| 3.2.3 Extração de DNA plasmidial .....   | 33 |
| 3.2.4 Transformação de plantas.....  | 34 |
| 3.2.5 Análise de expressão.....  | 34 |
| 3.2.5.1 Extração de RNA total .....  | 34 |
| 3.2.5.2 Quantificação de RNA .....   | 35 |
| 3.2.5.3 Síntese de cDNA .....  | 35 |
| 3.2.5.4 RT-PCR.....  | 35 |
| 3.3 Confirmação de mutantes nocautes e <i>knockdowns</i> .....   | 36 |
| 3.4 Visualização de plantas transgênicas no microscópio confocal.....  | 36 |
| 3.5 Análise do crescimento de folhas, rosetas, hipocótilos, raízes, raízes laterais e<br>hastes das inflorescências.....   | 36 |
| 3.6 Análises estatísticas .....  | 37 |
| 3.7 Análise de proteínas das plantas transgênicas 35S:AtRALF1:HPB por intermédio<br>da técnica TAP .....   | 37 |
| 3.7.1 Purificação do complexo proteico .....   | 37 |
| 3.7.2 Espectrometria de massas.....  | 38 |
| 4 RESULTADOS.....  | 41 |

|   |    |
|---|----|
| 4.1 Escolha das isoformas.....  | 41 |
| 4.2 Obtenção de plantas .....   | 41 |
| 4.2.1 Plantas mutantes.....   | 41 |
| 4.2.2 Plantas transgênicas silenciando os genes AtRALFs .....                                 | 43 |
| 4.2.3 Plantas transgênicas superexpressando os genes AtRALFs .....                            | 43 |
| 4.2.4 Promotores fusionados a proteína verde fluorescente .....                               | 44 |
| 4.2.5 Plantas transgênicas superexpressando AtRALF1 fusionado a biotina .....                 | 45 |
| 4.3 Análise fenotípica .....  | 46 |
| 4.3.1 Raiz principal, raízes laterais e hipocótilo .....                                      | 46 |
| 4.3.2 Parte aérea: comprimento de haste, diâmetro da roseta e comprimento de<br>folhas.....   | 48 |
| 4.4 Impressão em tecidos foliares.....  | 50 |
| 4.5 Promotores fusionados a proteína verde fluorescente.....                                  | 53 |
| 4.6 Proteínas que interagem com o peptídeo AtRALF .....                                       | 58 |
| 5 DISCUSSÃO.....  | 61 |
| 5.1 Análise funcional de peptídeos AtRALFs foliares .....                                     | 61 |
| 5.2 Purificação por afinidade de proteínas que interagem com o AtRALF1 <i>in planta</i> ..... | 64 |
| 6 CONCLUSÕES .....  | 65 |
| REFERÊNCIAS .....   | 67 |
| APÊNDICES.....  | 73 |

## RESUMO

### **Análise funcional de peptídeos AtRALFs foliares e purificação por afinidade de proteínas que interagem com o AtRALF1 *in planta***

Peptídeos sinais são moléculas envolvidas no crescimento, desenvolvimento e defesa de plantas. RALF (*Rapid Alkalinization Factor*) é um peptídeo sinal ubíquo no reino vegetal e que está envolvido com a expansão celular. Peptídeos RALF em *Arabidopsis* estão organizados em uma família multigênica de 37 membros, alguns com expressão tecido-específica, outros expressos em toda a planta. Este trabalho se insere dentro de um projeto maior que tem por objetivo esclarecer a função dos peptídeos RALF em plantas e determinar seu mecanismo de ação. Este trabalho teve dois objetivos específicos distintos. O primeiro consistiu em caracterizar as isoformas AtRALF19, AtRALF23, AtRALF31, AtRALF33 e AtRALF34 utilizando-se plantas mutantes, plantas superexpressoras e a análise dos promotores. O segundo objetivo específico foi identificar proteínas que interagem com o peptídeo AtRALF1 com o uso da técnica de purificação por afinidade em tandem (TAP) *in planta*. As análises fenotípicas das plantas transgênicas mostraram que plantas que superexpressam o gene que codifica o AtRALF33 apresentam fenótipo semi-anão, células foliares com área menor e com menor número de lóbulos. As plantas mutantes *atralf33* e *atralf23* apresentaram hastes e folhas maiores e células foliares com área maior. Plantas mutantes *atralf34* não mostraram diferenças significativas quando comparadas com plantas selvagens e a análise do promotor do *AtRALF34* mostrou uma expressão específica em estômatos, hipocótilo e ápice radicular. Com relação a purificação por afinidade, plantas mutantes *mcca* foram transformadas com a construção 35S:AtRALF1:HPB e usadas para obtenção dos extratos proteicos.

Palavras-chave: Desenvolvimento; Alongamento; Purificação



## ABSTRACT

### Functional analysis of leafy AtRALFs peptides and affinity purification *in planta* of proteins that interact with AtRALF1

Peptides signals are molecules involved with growth, development and defense in plants. RALF (*Rapid Alkalinization Factor*) is an ubiquitous peptide in plant kingdom and it is involved with cell expansion. RALF peptides are organized in a multigenic family with 37 members, some are tissue-specific expressed, others are expressed in whole plant. This work is part of a larger project that has the approach to clarify the RALF peptides functions in plants and to determine its mechanism of action. This work has two distinct approaches. The first specific approach was to characterize the isoforms AtRALF19, AtRALF23, AtRALF31, AtRALF33 and AtRALF34 using mutant plants, overexpression plants and promoters analysis. The second specific approach was to identify proteins that interact with AtRALF1 peptide using *in planta* tandem affinity purification (TAP). The phenotype analysis of transgenic plants showed that the overexpression of the gene which codifies AtRALF33 plants presented a semi-dwarf phenotype, smaller leaf cells area and number of lobes. The mutant plants *atralf33* and *atralf23* presented larger stalks and leaf cells. The mutant plants *atralf34* did not show significant differences when compared to wild-type plants. The promoter analysis of *AtRALF34* showed a specific expression in stomata, hypocotyls and root shoot. Regarding the TAP, *mcca* mutant plants were transformed with the construction 35S:AtRALF1:HPB.

Keywords: Development; Elongation; Purification



## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 - Nível de expressão dos genes que codificam as isoformas de RALF de Arabidopsis.....             | 21 |
| Figura 2 - Árvore de semelhanças de estrutura primária dos RALFs encontrados em Arabidopsis.....           | 22 |
| Figura 3 - Estrutura primária do prepropeptídeo NtRALF isolado de tabaco.....                              | 23 |
| Figura 4 - Esquema do vetor com cauda de biotina e epítipo HA.....   | 28 |
| Figura 5 - Análise dos mutantes SALK.....  | 42 |
| Figura 6 - Verificação dos mutantes SALK.....  | 42 |
| Figura 7 - Análise de expressão dos mutantes SALK..  | 43 |
| Figura 8 - Análise de RT-PCR utilizando plantas transgênicas superexpressas.....                           | 44 |
| Figura 9 - Análise de RT-PCR utilizando plantas transgênicas 35S:AtRALF1:HPB.....                          | 46 |
| Figura 10 - Análise e imagem de raízes.....  | 47 |
| Figura 11 - Análise do hipocótilo e raízes laterais.....   | 48 |
| Figura 12 - Análise do comprimento da haste.....   | 49 |
| Figura 13 - Análise do diâmetro da roseta.....   | 49 |
| Figura 14 - Análise fenotípica das folhas..  | 50 |
| Figura 15 - Imagem das células de folhas.....  | 51 |
| Figura 16 - Análise da área celular e número de células/área em folhas.....                                | 52 |
| Figura 17 - Análise do número de lóbulos/célula em folhas.....   | 53 |
| Figura 18 - Análise em microscopia confocal da expressão de pAtRALF34:GFP de plântulas de Arabidopsis..    | 54 |
| Figura 19 - Análise em microscopia confocal da expressão de pAtRALF34:GFP no hipocótilo.....               | 54 |
| Figura 20 - Análise em microscopia confocal da expressão de pAtRALF34:GFP no ápice radicular.....          | 55 |
| Figura 21 - Análise em microscopia confocal da expressão de pAtRALF34:GFP em folhas.....                   | 56 |
| Figura 22 - Análise em microscopia confocal da expressão de pAtRALF34:GFP em inflorescências e sílica..... | 57 |
| Figura 23 - Análise em microscopia confocal da expressão de pAtRALF34:GFP na raiz lateral.....             | 58 |
| Figura 24 - Análise da possível proteína que interage com o peptídeo AtRALF1.....                          | 59 |





## 1 INTRODUÇÃO

A comunicação intercelular controla diversos processos fisiológicos como crescimento, desenvolvimento, defesa e reprodução. Em plantas, a caracterização genética e bioquímica de peptídeos envolvidos com sinalização celular tem contribuído para o melhor entendimento de alguns destes processos (KONDO et al., 2011; MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 2006; MOURA; SILVA-FILHO, 2006; SUGANO et al., 2010; PEARCE et al., 1991; WHITFORD et al., 2012).

RALF (*Rapid Alkalinization Factor*) é um peptídeo sinal de 5 kDa responsável pela comunicação intercelular e com função principal na regulação da expansão celular. O peptídeo RALF foi descoberto inicialmente em extratos proteicos de tabaco em um ensaio de alcalinização do meio extracelular de células em suspensão (PEARCE et al., 2001). Além da alcalinização, outras atividades do peptídeo RALF envolvem mobilização de cálcio, ativação de MAP quinase, inibição de crescimento de raiz e inibição do alongamento do hipocótilo (COVEY et al., 2010; HARUTA et al., 2008; MINGOSSI et al., 2010; MORATO DO CANTO et al., 2014; PEARCE et al., 2001).

Os genes que codificam o peptídeo RALF estão presentes em todo o reino vegetal e podem aparecer em cópia única como no caso de *Nicotiana attenuata*, ou em famílias multigênicas como no caso de *Arabidopsis*, tomate, álamo e arroz (CAO; SHI, 2012; WU et al., 2007). Em *Arabidopsis* são encontradas 37 isoformas do peptídeo sinal RALF, sendo que nove delas são mais próximas filogeneticamente do peptídeo isolado de tabaco (MORATO DO CANTO et al., 2014). Pouco se sabe sobre peptídeos RALF de folhas. Através da análise *in silico* e também de RT-PCR semiquantitativo, sabe-se que dos 37 genes RALF de *Arabidopsis* (AtRALFs), os genes que codificam os peptídeos *AtRALF19*, *23*, *31*, *33* e *34* são expressos em folhas (MORATO DO CANTO et al., 2014).

Este trabalho insere-se dentro de um projeto maior que é o de esclarecer a função dos peptídeos RALF e desvendar seu mecanismo de ação. Os objetivos específicos foram: obter e realizar a análise fenotípica de plantas transgênicas que superexpressam os genes que codificam isoformas de folhas *AtRALF19*, *23*, *31*, *33* e *34*; obter e realizar a análise fenotípica de plantas mutantes para as mesmas isoformas; e obter plantas expressando os promotores destas isoformas fusionados a proteína repórter verde fluorescente (GFP – *Green Fluorescent Protein*). Em

paralelo, buscou-se identificar proteínas que interajam com a isoforma AtRALF1 através da purificação por afinidade em tandem *in planta* (TAP - *Tandem Affinity Purification*).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Peptídeo sinal RALF

A interação entre células é muito importante para a organização multicelular. Enquanto que os peptídeos sinais em animais são bem conhecidos e são os mediadores mais comuns na comunicação intercelular, em plantas estes ainda estão sendo descobertos (KASTIN, 2013). Nos últimos anos, vários estudos genéticos e bioquímicos tem mostrado que peptídeos de sinalização desempenham um papel importante em diversos aspectos da planta como crescimento, reprodução e desenvolvimento (KONDO et al., 2011; MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 2006; MOURA; SILVA-FILHO, 2006; RYAN; PEARCE; SCHEER, 2002; SUGANO et al., 2010; WHITFORD et al., 2012).

O primeiro peptídeo sinal, ou hormonal, encontrado em plantas foi a sistemina, presente em algumas solanáceas como tomate e batata (PEARCE et al., 1991). A sistemina é um peptídeo sinal envolvido com defesa contra herbivoria e seu nome deriva de sua atividade sistêmica na planta. Em relação à atividade, a sistemina é capaz de induzir proteínas de defesa e alcalinizar o meio extracelular de células em suspensão (MEINDL; BOLLER; FELIX, 1998; PEARCE et al., 1991).

O peptídeo sinal RALF, do inglês *Rapid ALkalinization Factor*, foi isolado pela primeira vez de extratos proteicos de tabaco através do ensaio de alcalinização em suspensões celulares e foi capaz de alcalinizar o meio extracelular de forma mais rápida que a sistemina (PEARCE et al., 2001). Além da alcalinização, RALF ativa uma MAP quinase e inibe o crescimento de raízes (PEARCE et al., 2001). O peptídeo isolado possui 49 aminoácidos e é derivado da porção C-terminal de uma preproteína de 115 aminoácidos.

A família de peptídeos RALF já foi identificada em 20 espécies de plantas distribuídas em nove famílias, entre vegetais inferiores e superiores, monocotiledôneas e dicotiledôneas (KASTIN, 2013). Esses peptídeos são codificados por famílias gênicas que apresentam expressão ubíqua nos tecidos vegetais, contudo muitas isoformas são tecido-específicas (CONSTABEL, 2003; GERMAIN et al., 2005; KASTIN, 2013; OLSEN; MUNDY; SKRIVER, 2002) (Figura 1). Segundo a última versão do genoma de *Arabidopsis* existem 37 isoformas do peptídeo RALF nesta planta modelo (Figura 2). As nove isoformas filogeneticamente mais próximas do peptídeo isolado de tabaco, apresentam as características

essenciais para a atividade do peptídeo, sendo estas a conservação de um sítio dibásico (dupla arginina) acima do N-terminal do peptídeo maduro, o motivo YISY e quatro cisteínas que formam duas pontes dissulfeto (PEARCE et al., 2001) (Figura 3).

Pearce et al., (2010) realizaram um estudo de estrutura e atividade com o peptídeo RALF isolado de tomateiro, no qual foram produzidos peptídeos sintéticos truncados e foi possível perceber que a região contendo o motivo YISY é essencial para a atividade de alcalinização. A isoleucina no motivo YISY, quando trocada por uma alanina, comprometeu a alcalinização do meio, mostrando a necessidade de um aminoácido hidrofóbico nessa região. Uma substituição da leucina na posição 11 do peptídeo por uma alanina também prejudicou a atividade do peptídeo.

Em relação à função, quando o peptídeo purificado de tomateiro foi aplicado exogenamente no meio de cultivo de plântulas de tomate e de *Arabidopsis* houve inibição do crescimento de raízes, sugerindo seu envolvimento no desenvolvimento vegetal (PEARCE et al., 2001).

Sabe-se que os peptídeos RALFs não estão relacionados com defesa, pois não induzem a síntese de inibidores de proteinases (PEARCE et al., 2001), e também não estão envolvidos com a resposta contra patógenos e ferimentos (HARUTA; CONSTABEL, 2003; OLSEN; MUNDY; SKRIVER, 2002; WU et al., 2007). Apesar disso, em um estudo do transcriptoma de *Arabidopsis* onde as respostas para a combinação de estresses bióticos e abióticos foram avaliadas, os genes *AtRALF8*, *AtRALF23*, *AtRALF33* e *AtRALF34* foram identificados (ATKINSON; LILLEY; URWIN, 2013).

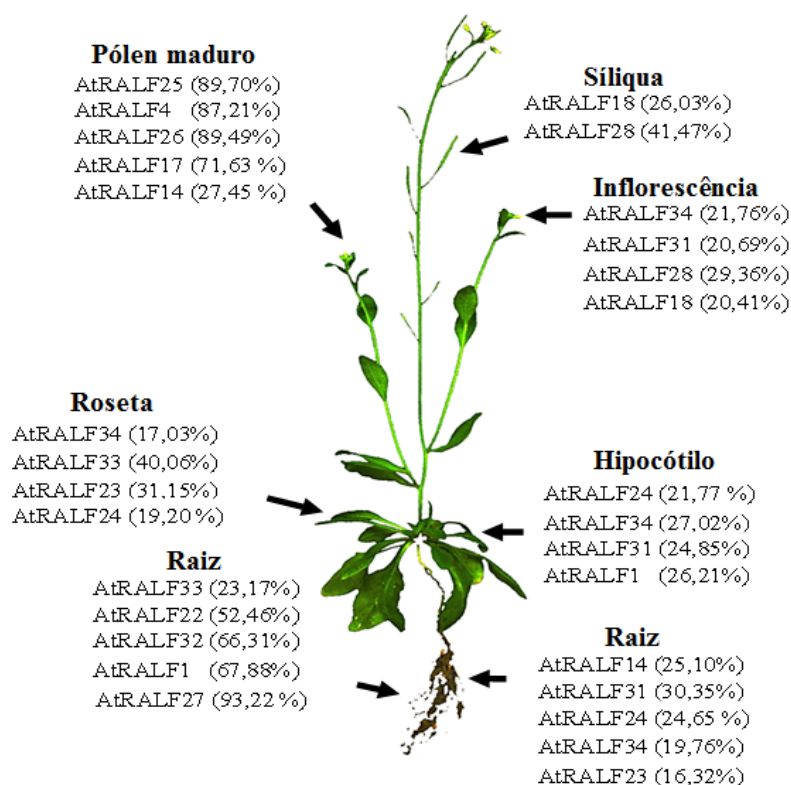


Figura 1 - Nível de expressão dos genes que codificam as isoformas de RALF de Arabidopsis. O banco de dados "Bio-Array Resource for Plant Biology" da Toronto University utiliza experimentos de Birnbaum et al., (2003) e mostra a frequência da expressão total de 16 isoformas em diferentes tecidos (pólen maduro, síliques, hipocótilo, raiz, flor e roseta). A porcentagem de expressão dos RALF é mostrada em diferentes órgãos de Arabidopsis em relação à expressão total. Fonte: Guerrero-Abad JC e Moura DS (dados não publicados)

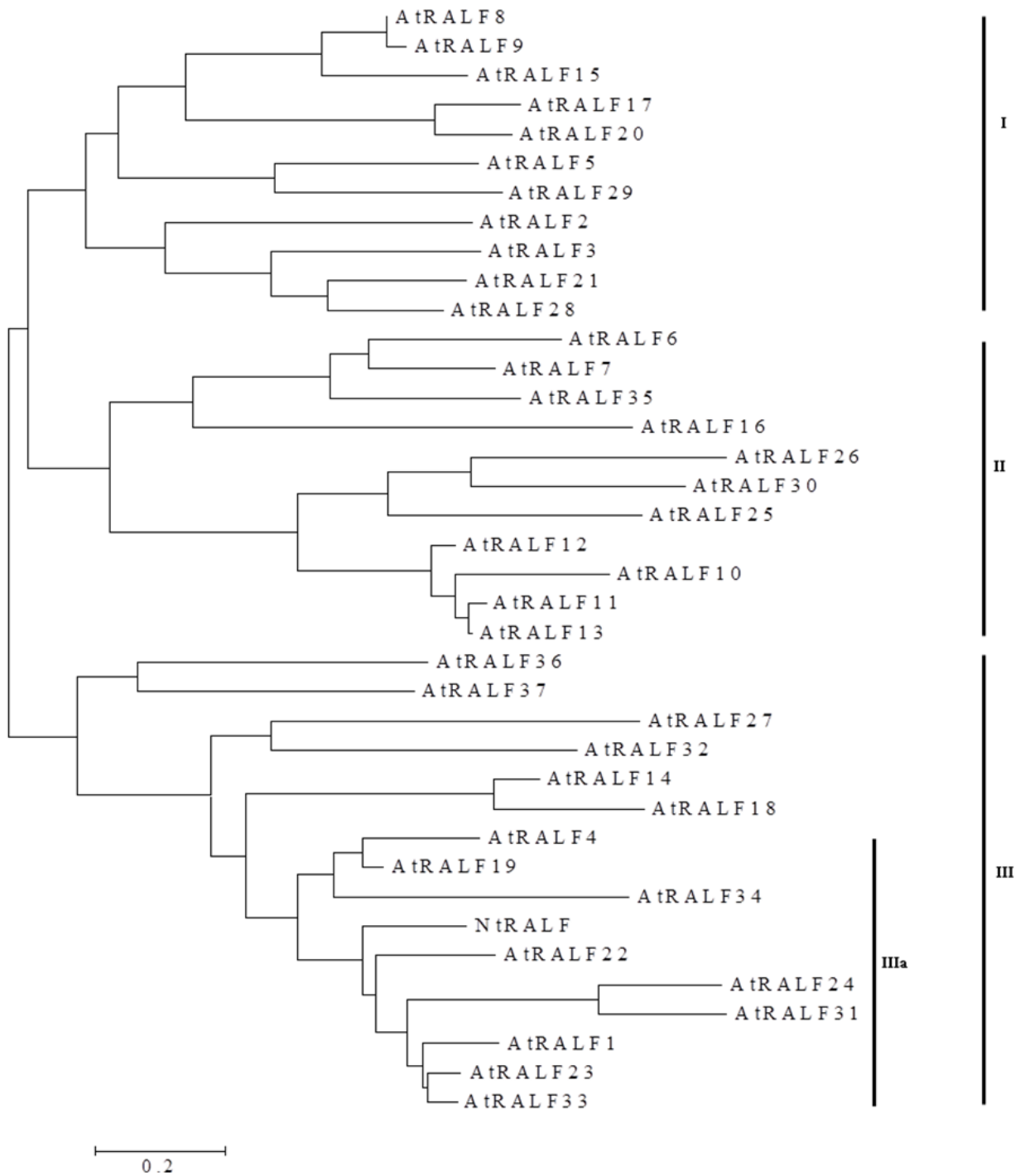


Figura 2 - Árvore de semelhanças de estrutura primária dos RALFs encontrados em Arabidopsis. O RALF originalmente isolado de folhas de tabaco foi incluído para comparação (NtRALF). Os peptídeos estão organizados em três grupos, sendo que o subgrupo IIIa apresenta os 9 peptídeos de Arabidopsis com as principais características conservadas da isoforma de tabaco. Fonte: Guerrero-Abad JC e Moura DS (dados não publicados)

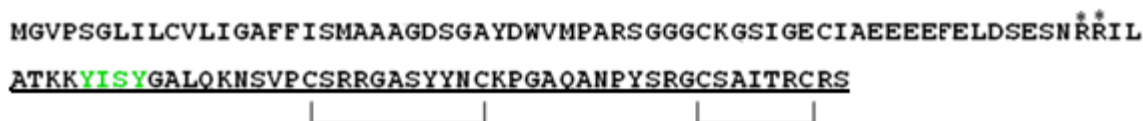


Figura 3 - Estrutura primária do prepeptídeo NtRALF isolado de tabaco. As regiões conservadas são: dupla arginina (asterisco), o motivo YISY (verde) e duas pontes dissulfeto (linhas de conexão). A região sublinhada corresponde ao peptídeo ativo

Matos et al., (2008), superexpressando o gene *AtRALF1* em *Arabidopsis*, obtiveram uma planta com raízes menores que plantas selvagens e que exibem um fenótipo semi-anão. Dados *in silico* indicam que o gene que codifica o *AtRALF1* é expresso exclusivamente em raízes e hipocótilos. Ensaio com o gene repórter GUS sob controle do promotor do *AtRALF1* revelaram um acúmulo da proteína na zona de desenvolvimento radicular de plantas jovens, com grande intensidade nos feixes vasculares, córtex e endoderme (HARUTA et al., 2008). Quando o gene *AtRALF23* foi superexpresso também foram geradas plantas com fenótipo semi-anão e plantas transgênicas com o promotor do *AtRALF23* fusionado a GUS mostraram que este estava presente na ponta da folha e feixes vasculares de folhas cotiledonares (SRIVASTAVA et al., 2009). Dados *in silico* mostram uma expressão gênica do *AtRALF23* uniformemente distribuída em toda planta. Estes dados, em conjunto, sugerem que apesar de apresentarem padrões de expressão distintos, o mecanismo de ação e o efeito destas isoformas são semelhantes.

Em *Nicotiana attenuata* foi identificada uma única isoforma do peptídeo RALF (NaRALF) cujo silenciamento gênico levou a um aumento do crescimento das raízes (WU et al., 2007). Mingossi et al., (2010) estudando peptídeos RALF isolados de cana-de-açúcar demonstraram que os mesmos estão envolvidos na expansão celular, provavelmente regulando o alongamento das células. Estudos de análise de expressão durante o desenvolvimento de flores de brócolis identificaram o gene que codifica o peptídeo RALF nessa espécie. Utilizando o sistema de duplo híbrido com uma proteína quimérica rica em leucina (LEPEX1), Covey et al., (2010) isolaram uma isoforma de RALF de tomate específica de pólen (LeRALF) e que inibe o alongamento do tubo polínico.

Análises de bibliotecas de cDNA de ovário e óvulos fertilizados de tomate mostram a identificação de 5 isoformas (ScRALF1-5) com expressão diferenciada nos estágios de desenvolvimento e maturação dos frutos, sendo esta menor durante a polinização e fertilização e sofrendo aumento considerável durante o processo de



maturação dos frutos (GERMAIN et al., 2005). Chevalier, Loubert-Hudon e Matton (2013), estudando óvulos de *Solanum chacoense*, determinou que ScRALF3 tem um papel na comunicação entre esporófito e gametófito feminino, é expresso no tecido esporofítico do óvulo e participa da arquitetura do saco embrionário. Plantas silenciadas para essa isoforma apresentaram redução de produção de sementes e o desenvolvimento do gametófito feminino foi defeituoso, mostrando ter papel importante no desenvolvimento dos frutos.

Foi realizada a expressão heteróloga dos nove peptídeos AtRALFs mais próximos de tabaco em *Escherichia coli* e avaliação da suas atividades nos ensaios biológicos de crescimento de raiz, expansão do hipocótilo, alcalinização, germinação de pólen e mobilização de cálcio extracelular. Os resultados mostram que apesar da divergência no padrão de expressão gênica dos diferentes AtRALFs, o papel principal do peptídeo RALF na regulação da expansão celular não é alterado (MORATO DO CANTO et al., 2014).

Sobre a possível interação com outros hormônios, foi determinado que a isoforma AtRALF23 tem sua expressão gênica inibida quando as plantas são expostas a brassinolide (BL), além disso, plantas mutantes dominantes para um fator transcricional que regula a produção de brassinoesteróides apresentaram também menor expressão do *AtRALF23* (SRIVASTAVA et al., 2009).

Bergonci et al., (2014) produziram plantas silenciadas para a isoforma AtRALF1 e determinaram que a inibição do crescimento de raiz e hipocótilo é devido a redução do tamanho das células. Também foi observado um maior número de raízes laterais, enquanto que plantas superexpressas apresentaram o efeito contrário. Bergonci et al., (2014) identificaram genes induzidos por AtRALF1: *PRP1* e *PRP3* (proteínas ricas em prolina), *HRPG2* (glicoproteína rica em hidroxiprolina) e *TCH4* (xiloglucana endotransglicosilase), os quais estão relacionados com rearranjo da parede celular. Quando plantas foram simultaneamente tratadas com BL e AtRALF1 foi observada uma redução da expressão dos genes induzidos por AtRALF1; sugerindo que estes poderiam competir por fatores transcricionais compartilhados por ambas as vias de sinalização.

Em um estudo de fosfoproteômica, plantas tratadas com AtRALF1 tiveram suas proteínas de membrana purificadas e foi possível identificar as seguintes proteínas fosforiladas: o receptor quinase FERONIA e a próton-ATPase AHA2. No mesmo estudo, mutantes *feronia* mostraram ter maior atividade da próton-ATPase e

capacidade de acidificar o meio extracelular mais rapidamente do que plantas selvagens. Propuseram então que AtRALF1 é capaz de se ligar ao receptor quinase de membrana, FERONIA, e assim iniciar uma cascata de fosforilação que inibe a atividade de uma bomba de prótons na membrana, aumentando o pH do apoplasto e reduzindo assim o alongamento celular (HARUTA et al., 2014).

## 2.2 Desenvolvimento

A morfogênese de uma planta em desenvolvimento depende de divisões celulares ordenadas e expansões celulares orientadas corretamente (ALBERTS, 2011; WANG; LI, 2008; WENGIER; BERGMANN, 2013).

A parede celular apresenta 0,1-1  $\mu\text{m}$  e é formada por duas camadas, uma mais fina que pode apresentar crescimento em área, a parede primária, e outra mais espessa, a parede secundária. A parede celular apresenta microfibrilas de celulose embebidas em uma matriz complexa de polissacarídeos, divididos em duas classes; as pectinas e as hemiceluloses, sendo importantes para a porosidade, espessura fina da parede e por formarem a lamela média. Apesar de ser fina, a parede celular forma uma forte rede que funciona moldando o protoplasto (CASTRO; KLUGE; PERES, 2005; COSGROVE, 2005).

A teoria do crescimento ácido, embora não completamente elucidada, explica a expansão celular através da acidificação do apoplasto por intermédio da ativação de próton-ATPases presentes na membrana. O pH do apoplasto de uma célula em crescimento é de 4,5 a 6. As proteínas chamadas expansinas participam desse processo, pois tem ação dependente de pH para promover o afrouxamento da parede celular. Outros exemplos de respostas relacionadas com o pH da parede celular são crescimento induzido por hormônios, expansão da folha por estímulo luminoso, surgimento de pelos radiculares e inibição de células germinativas (COSGROVE, 2005).

As folhas se desenvolvem a partir de um gradiente base-para-ponta, com divisões celulares na base da folha e diferenciação ocorrendo na ponta (LAU; BERGMANN, 2012). O desenvolvimento das folhas apresenta três processos principais, a iniciação do primórdio foliar, seu estabelecimento dorso ventral e o desenvolvimento de um meristema marginal. Pela filotaxia de Arabidopsis ser espiral, é observado um crescimento assimétrico em espiral da lâmina foliar. A parte

basal do primórdio foliar tem células grandes e polarizadas arranjadas paralelamente à parte proximal, já a parte apical do primórdio foliar apresenta células pequenas não polarizadas (TSUKAYA, 2013).

Os lóbulos e indentações encontrados nas células das folhas formam um desenho que muito se assemelha a um quebra-cabeça. Xu et al., (2010) determinaram que a via de sinalização de auxina apresenta papel na formação das interdigitações em células pavimentosas de folhas de *Arabidopsis*. Neste estudo, a auxina foi capaz de ativar duas Rho GTPases, ROP2 e ROP6, as quais são importantes para a formação de lóbulos e indentações, respectivamente.

As folhas desempenham um papel importante na troca de gases entre a planta e a atmosfera a partir de estruturas chamadas estômatos. A estrutura do estômato consiste em duas células, chamadas de células-guarda que envolvem um orifício chamado de ostíolo e ao redor das células-guarda existem células subsidiárias que delimitam as fronteiras do estômato (LARKIN; BROWN; SCHIEFELBEIN, 2003; LAU; BERGMANN, 2012). O desenvolvimento do estômato necessita de especificação do destino celular, comunicação entre células, divisões assimétricas e polaridade (LAU; BERGMANN, 2012; WENGIER; BERGMANN, 2013). A linhagem estomatal consiste em cinco principais tipos de células; células mãe meristemóides (MMC), meristemóides, linhagem de células de estômato fundamentais (SLGC), células-guarda maternas (GMC), e células-guarda (GC). MMCs se dividem assimetricamente para produzir meristemóides e SLGCs. Os meristemóides podem se dividir assimetricamente, regenerar o meristemóide e criar outro SLGC, além disso, podem se diferenciar em GMC, os quais sofrem divisões simétricas para formar GCs (LAU; BERGMANN, 2012).

O início da linhagem estomatal depende da expressão estável do fator *SPEECHLESS* (*SPCH*), enquanto que a expressão do parálogo *MUTE* em meristemóides é necessária para a transição de divisões celulares para a aquisição de identidade das GMCs. Muitos fatores participam do controle da divisão celular, como o peptídeo *STOMAGEN*, um fator de regulação positiva e os repressores *EPF1* e *EPF2* da família *EPFL* (*Epidermal-Patterning Factor Like*), sendo que *EPF2* inibe o início da linhagem estomatal, e *EPF1* previne a falta de padrão estomatal (WENGIER; BERGMANN, 2013).

A transição entre a parte aérea e radicular é estabelecida pelo hipocótilo. Em plantas dicotiledôneas este é definido como células embrionárias do meristema que

formam uma conexão entre a radícula e as folhas cotiledonares (VANDENBUSSCHE; VERBELEN; VAN DER STRAETEN, 2005). O padrão de desenvolvimento do hipocótilo em *Arabidopsis* não envolve divisões celulares da epiderme ou córtex, mas sim, endoreduplicações, as quais são caracterizadas pela modificação do ciclo mitótico com a duplicação do DNA sem a divisão celular, provocando assim a expansão celular (GENDREAU et al., 1997; OCHATT, 2006). A epiderme do hipocótilo apresenta células proeminentes e não proeminentes, sendo que essas últimas podem se diferenciar em estômatos (VANDENBUSSCHE; VERBELEN; VAN DER STRAETEN, 2005).

O hipocótilo é um órgão considerado plástico que é influenciado pela luz, gravidade, temperatura e hormônios como auxinas, giberelinas, etileno e brassinoesteróides (VANDENBUSSCHE; VERBELEN; VAN DER STRAETEN, 2005). Existem também diversas moléculas relacionadas com o desenvolvimento do hipocótilo, entre elas os fotoreceptores fitocromo A, fitocromo B e criptocromo. Sabe-se que na presença de luz o alongamento das células é contínuo durante todo o período de crescimento e são observadas endoreduplicações pela presença de núcleos  $4n$  a  $8n$ , enquanto que no escuro o hipocótilo se alonga a partir de um gradiente temporal abrupto com sistemias acropétala, sendo observadas endoreduplicações com a presença de núcleos  $16n$  (GENDREAU et al., 1997).

Abaixo da base do hipocótilo está presente a raiz, a qual apresenta as funções principais de promover sustentação para a planta e também de captação de nutrientes inorgânicos e água do solo. A partir do meristema apical radicular se origina a coifa, esta apresenta uma estrutura composta por dois tipos de células, a columela na posição central e envolta desta a coifa lateral da raiz. A columela é formada por dois tipos de célula, os estatocistos, localizados no interior e células secretórias constituindo a parte externa da columela. O número de células da coifa varia entre espécies, sendo que em *Arabidopsis* são encontradas de 180 a 260 células (ARNAULD et al., 2010). Vários fatores transcricionais e hormonais têm mostrado ter um papel importante no desenvolvimento da coifa. O hormônio auxina apresenta distribuição controlada pela localização e atividade do transportador de auxina (PIN). Na raiz, há um gradiente ápice-base da quantidade de auxina, apresentando maior concentração na camada da columela, a qual é fundamental para identidade de células da coifa. Uma menor quantidade de auxina na coifa induz o surgimento de camadas adicionais de columela (FRIML et al., 2002).

### 2.3 Purificação por afinidade *in planta*

A purificação por afinidade em tandem *in planta* (TAP) é uma forma de realizar a purificação de complexos proteicos utilizando condições fisiológicas, difíceis de serem obtidas por técnicas *in vitro*. Nesta técnica a proteína de interesse utilizada como isca é modificada de forma a conter uma cauda com sequências conhecidas e re-introduzida por transgenia no organismo de interesse. A cauda para a TAP original consistia em um domínio para a primeira purificação contendo uma proteína A, um sítio da protease do vírus de tabaco para clivagem e um domínio para ligação com calmodulina para a segunda purificação (RIGAUT et al., 1999). Vários estudos realizados recentemente utilizando TAP têm auxiliado a determinar diferentes interações proteicas (GULLY et al., 2003; GREGAN et al., 2007; KNUESEL et al., 2003). Sepúlveda-García e Rocha-Sosa (2012) utilizando uma cauda contendo uma proteína A, um sítio da protease do vírus de tabaco para clivagem e seis repetições de histidina, estabeleceram que a proteína F-box AtFBS1 interage com proteínas 14-3-3.

As interações entre biotina e estreptavidina são as mais fortes ligações biológicas não covalentes conhecidas. Em mamíferos, complexos proteicos foram sequestrados utilizando uma interação entre biotina e estreptavidina, com apenas um passo de purificação (WANG et al., 2006). Qi e Katagiri (2009) marcaram cinco proteínas de *Arabidopsis* com uma cauda denominada de HPB, a qual consiste em um epítipo HA, sítio de clivagem e domínio de biotina (Figura 4).



Figura 4 - Esquema do vetor com cauda de biotina e epítipo HA. RB, right border; 2x35S, dois sítios do promotor para expressão constitutiva 35S CaMV (Cauliflower mosaic virus); Gene, gene de interesse a ser estudado; HPB, epítipo HA, sítio de clivagem pela protease do vírus de tabaco e cauda de biotina; Nos T, região terminadora; Hyg<sup>r</sup>, sítio que confere resistência ao antibiótico higromicina; LB, left border

Para obtenção dos extratos proteicos foram utilizadas plantas mutantes para o gene *mcca* (3-metilcrotonil CoA carboxilase). Esses mutantes apresentam uma

baixa quantidade de proteínas endógenas biotiniladas, o que permitiu uma maior especificidade de ligação na resina de estreptavidina pelas proteínas de interesse, dificultando a contaminação por proteínas endógenas. O processo de purificação utilizando apenas o passo de interação entre biotina e estreptavidina foi suficiente para identificar complexos proteicos de membrana plasmática, mostrando ser um método eficiente para a purificação de complexos proteicos de membrana, mesmo em situações de baixa concentração e acúmulo dessas proteínas (QI; KATAGUIRI, 2009).



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material vegetal e condições de crescimento

Plantas de *Arabidopsis thaliana* ecótipo Columbia-0 foram crescidas em regime com 16h de luz (200  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) e 8h de escuro, a 22°C e 18°C, respectivamente em câmaras Conviron ATC26. As sementes das plantas foram cultivadas em placas de plástico contendo  $\frac{1}{2}$  MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) sem sacarose e sem vitaminas.

Plantas de *Arabidopsis* também foram crescidas em casa de vegetação em regime com 14h de luz e 10h escuro, a 28°C e 20°C respectivamente. As sementes foram colocadas em vasos de plástico contendo substrato e vermiculita (2:1). As plantas foram aguadas ao final de todo dia com solução 3,25mL/L de fertilizante de raiz (Dimy).

#### 3.2 Obtenção de plantas transgênicas

##### 3.2.1 Clonagem das sequências *AtRALF1*, *AtRALF19*, *AtRALF23*, *AtRALF31*, *AtRALF33* e *AtRALF34* em vetores apropriados

Uma vez que os genes que codificam os peptídeos de interesse não possuem introns, os DNA genômicos correspondentes aos genes *AtRALF1*, *AtRALF19*, *AtRALF23*, *AtRALF31*, *AtRALF33* e *AtRALF34* foram utilizados em reações convencionais de PCR para amplificação. O DNA genômico foi extraído de folhas de *Arabidopsis* a partir da maceração deste em nitrogênio líquido, adição de 500 $\mu\text{L}$  de DNAzol (Invitrogen), centrifugação por 10min a 12000rpm em temperatura ambiente, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionou-se 400 $\mu\text{L}$  de etanol 100%, foi feita centrifugação por 5min a 10000rpm em temperatura ambiente, o sobrenadante foi retirado, o pellet foi lavado com etanol 70%, o tubo foi centrifugado por 2min (esse passo foi repetido duas vezes), seco em temperatura ambiente, ressuspenso em 20 $\mu\text{L}$  de água e mantido a -20°C. Os iniciadores utilizados na amplificação contêm em sua extremidade 5' a sequência de bases CACC que permite a clonagem no vetor de entrada do sistema Gateway, pENTER/D-TOPO® (Invitrogen) na orientação correta. As sequências dos iniciadores utilizados estão no Apêndice 1.



A clonagem foi realizada incubando-se o produto da amplificação com o vetor de entrada por 15min a temperatura ambiente, em seguida foi realizada eletroporação (Gene Pulse, BioRad) em células eletrocompetentes de *Escherichia coli*, cepa TOP 10 (Invitrogen) e crescidas em meio SOC (20g/L de triptona, 10g/L de extrato de levedura, 0,5g/L de NaCl, 180µL de glicose 20%, pH 7,0) sob agitação a 220rpm por 1h a 37°C. O meio contendo as bactérias foram plaqueados em meio LB (Luria-Bertani) semi-sólido (10g/L de triptona, 5g/L de extrato de levedura, 10g/L NaCl e 12g/L de ágar, pH 7,5) contendo 50mg/L de canamicina e colocadas a 37°C por 18h.

Colônias resistentes ao antibiótico foram selecionadas e tiveram seu DNA plasmidial extraído por meio de lise alcalina. Todas as clonagens foram verificadas por PCR e sequenciamento do DNA plasmidial.

Após confirmada a clonagem, as sequências foram transferidas do vetor de entrada para os vetores de destino apropriados por meio de recombinação utilizando a mistura enzimática LR-Clonase II. As sequências do prepropeptídeo foram recombinadas no vetor de destino pk7WG2 (KARIMI; INZÉ; DEPICKER, 2002) gerando a construção para a superexpressão sob a regulação do promotor 35S. As sequências do prepropeptídeo *AtRALF31* e *AtRALF19* também foram recombinadas no vetor de silenciamento pK7WIWG2 (KARIMI; INZÉ; DEPICKER, 2002). Para os promotores foi utilizado o vetor de destino pKGWFS7 (KARIMI; INZÉ; DEPICKER, 2002) e para clonagem do *AtRALF1* foi utilizado o vetor de destino pMDC32-HPB (QI; KATAGUIRI, 2009) que fusiona ao prepropeptídeo uma cauda de biotina.

Os vetores recombinados foram novamente inseridos em *Escherichia coli*, e as bactérias foram espalhadas em placas com meio contendo espectinomicina (Sigma) 50mg/L para os vetores pk7WG2, pK7WIWG2 e pKGWFS7 ou higromicina (Sigma) 50mg/L para o vetor pMDC32-HPB. Em seguida, a recombinação foi confirmada por PCR com os iniciadores do vetor e posterior sequenciamento.

Finalmente os vetores foram inseridos na linhagem de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 eletrocompetentes.

### 3.2.2 Produção de bactérias *Escherichia coli* e *Agrobacterium tumefaciens* eletrocompetentes

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

Em seguida foi feito o pré-inóculo em 10mL de meio LB líquido utilizando as colônias das placas estriadas, estes foram mantidos nas condições de crescimento acima a 180rpm. Após o tempo de 18 ou 48h, 5mL do pré-inóculo foi adicionado a 500mL de meio líquido e mantidos nas condições de crescimento até atingir a OD<sub>600</sub> de 0,5 - 0,8.

Posteriormente as células foram centrifugadas (10min, 5000rpm a 4°C) e realizaram-se três lavagens com água ultrapura autoclavada gelada, as células foram ressuspensas em 3mL de glicerol 10% filtro-esterilizado, foram feitas alíquotas de 70µL e armazenamento a -80°C.

### 3.2.3 Extração de DNA plasmidial

Colônias resistentes aos antibióticos das placas com meio LB semi-sólido, tanto da clonagem quanto para a recombinação, foram crescidas em 5mL de meio LB líquido com os antibióticos adequados a 180rpm, 37°C por 18h. Foram coletados 1mL e centrifugou-se (12000rpm, 45s a temperatura ambiente), o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 75µL de tampão TE (10mM Tris-HCl pH 7,6 e 1mM EDTA), adicionou-se 300µL de TENS (10mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA; 0,1M NaOH e 0,5% SDS) e incubou-se a temperatura ambiente por 5min. Posteriormente foram adicionados 150µL de acetato de potássio 3M (pH 5,2) e centrifugou-se (12000rpm, 15min a temperatura ambiente), em seguida coletou-se o sobrenadante, adicionou-se 1µL de RNase (10U/µL) sendo incubado a 37°C por 20min. Após o tempo de incubação foi feita a centrifugação (12000rpm, 5min a temperatura ambiente), o sobrenadante foi coletado e os plasmídeos foram precipitados adicionando 800µL de etanol 100% (-20°C) seguido de centrifugação (12000rpm, 15min a temperatura ambiente). O precipitado foi lavado com 500µL de álcool 70% (-20°C) e centrifugado (12000rpm, 5min a temperatura ambiente). O

sobrenadante foi descartado e o DNA plasmidial foi eluído em 20µL de água ultrapura. As amostras foram armazenadas em freezer a temperatura de -20°C.

### 3.2.4 Transformação de plantas

Plantas de *Arabidopsis* transgênicas foram geradas de acordo com o método da imersão das inflorescências (floral-dip) em solução contendo *Agrobacterium tumefaciens* (CLOUGH; BENT, 1998). Plantas de 30 a 45d tiveram suas flores abertas e siliquis retiradas, para que a inoculação fosse realizada apenas nos botões florais fechados.

O pré-inóculo de *Agrobacterium* GV3101 carregando os vetores de escolha foi crescido em 10mL de meio LB por 24h a 28°C e 180rpm. Em seguida o pré-inóculo foi adicionado a 500mL de meio LB que também foi mantido a 28°C a 180rpm, após 48h foi adicionado ao meio LB contendo as bactérias 125g de sacarose e 70µL de Silwet-77.

As inflorescências foram mergulhadas nesta solução e as plantas transformadas foram colocadas em bandeja cobertas por plástico e deixadas no escuro por 24h, posteriormente as plantas voltaram à casa de vegetação. Sementes de plantas transformadas foram esterilizadas superficialmente (50% etanol, 0,5% Triton X-100 por 3min, seguidos de uma breve lavagem com 95% etanol), espalhadas em ½ MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) sem vitaminas e sem sacarose contendo 6g/L de Phytagar (Gibco) e 100mg/L de canamicina (Sigma) para os vetores pk7WG2, pK7WIWG2 e pKGWFS7 e 30mg/L de higromicina (Sigma) para o vetor pMDC32-HPB. A avaliação do nível de expressão dos genes foi realizada através de RT-PCR.

### 3.2.5 Análise de expressão

#### 3.2.5.1 Extração de RNA total

O RNA de folhas foi extraído utilizando Trizol® (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. Folhas de *Arabidopsis* foram maceradas em nitrogênio líquido dentro de tubos de 1,5mL e adicionou-se 1mL do reagente Trizol® (Invitrogen), o tubo foi agitado e incubou-se por 10min em temperatura ambiente, em seguida adicionou-se 200µL de clorofórmio agitou-se invertendo o tubo por 15s,

incubou-se por 3min em temperatura ambiente e foi posteriormente centrifugado (12000rpm, 15min a 4°C). Coletou-se a fase aquosa em um novo tubo onde foi adicionado 500µL de isopropanol, incubou-se em temperatura ambiente por 10min e foi posteriormente centrifugado (12000rpm, 10min a 4°C). O sobrenadante foi descartado e o RNA precipitado foi lavado com 1mL de etanol 75% e centrifugado (7500rpm, 5min a 4°C). O RNA precipitado foi seco ao ar por 10min, eluído em 20µL de água ultrapura e incubado a 60°C por 5min. As amostras foram armazenadas em freezer a temperatura de -20°C.

#### 3.2.5.2 Quantificação de RNA

O RNA total foi quantificado em NanoDrop® (Thermo Scientific). Alíquotas de 1µL do RNA foram aplicadas no equipamento e realizaram-se leituras da absorbância a 260 e 280nm. As leituras obtidas foram utilizadas para calcular a concentração do RNA e também verificar a qualidade do mesmo por meio da razão 260/280nm.

#### 3.2.5.3 Síntese de cDNA

Para a produção do cDNA foi utilizado 1µg de RNA e a enzima Improm II Reverse Transcriptase (Promega) seguindo as recomendação do fabricante. Foi adicionado 2µL de oligodT 50µM a 1µg de RNA, a solução foi incubada por 5min a 70°C, em seguida colocada no gelo por 5m e posteriormente foi adicionada a solução tampão contendo Buffer Improm II IX, MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, dNTP 10mM e 1U da enzima Reverse Transcriptase e incubou-se por 5min a 25°C, 60min a 42°C e 15min a 70°C.

#### 3.2.5.4 RT-PCR

O RT-PCR foi realizado com 2µL de cDNA e a reação de PCR foi conduzida de 20 até 35 ciclos de amplificação. As sequências dos iniciadores utilizados estão no Apêndice 2.

Para normalização dos genes de interesse foi utilizada a amplificação do gene *GAPDH* (*Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase*) ou do gene *Tubulina*.

### 3.3 Confirmação de mutantes nocautes e *knockdowns*

Linhagens mutantes por inserção de T-DNA para os genes *AtRALF19*, *AtRALF23*, *AtRALF31*, *AtRALF33* e *AtRALF34* foram obtidas através do Arabidopsis Biological Resource Center - ABRC (LAMESCH et al., 2011).

A presença de T-DNA e ausência de segregação (plantas homozigotas) foram confirmadas por PCR feito a partir de DNA genômico. O iniciador LBb1.3 (ATTTTGCCGATTTTCGGAAC), que anela no T-DNA, foi usado juntamente com o iniciador gene específico para confirmação da inserção. Também foi realizada PCR com iniciadores que flanqueiam a região de inserção para confirmação da homozigose. Por fim, análise de expressão (RT-PCR) nas linhagens homozigotas foi realizada para verificar ausência de expressão do gene.

### 3.4 Visualização de plantas transgênicas no microscópio confocal

Plantas transgênicas resistentes a canamicina e contendo o vetor para expressão do promotor do gene *AtRALF34* fusionados a GFP crescidas 30d em casa de vegetação tiveram folhas, inflorescências, siliquis e raízes analisadas no microscópio confocal (Olympus FV1000) para localização da fluorescência da GFP.

Sementes das plantas transgênicas foram colocadas em meio líquido contendo sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) (0,5x) sem vitaminas e sem sacarose e mantidas sob agitação de 130rpm e luz constante por 32h. Após este período foram levadas ao microscópio confocal para análise da localização da proteína.

### 3.5 Análise do crescimento de folhas, rosetas, hipocótilos, raízes, raízes laterais e hastes das inflorescências

Para análise do crescimento de raiz, sementes foram adicionadas em placas contendo meio de cultura semi-sólido  $\frac{1}{2}$  MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). As placas foram mantidas verticalmente em câmaras Conviron. Após 10d as raízes foram avaliadas e as raízes laterais emergidas foram contadas. Para o estudo de crescimento de hipocótilo, sementes foram distribuídas em placas de 24 poços contendo  $\frac{1}{2}$  MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) líquido, colocadas na luz por 1h,

envoltas com papel alumínio, e depois mantidas no escuro em câmaras Conviron. Após 6d o hipocótilo foi mensurado.

As análises de crescimento de folha, roseta e haste foram realizadas em plantas de 30d crescidas em casa de vegetação.

Todas as plantas foram fotografadas com câmera digital (Nikon) e as medições foram feitas com o uso do programa ImageJ seguindo as instruções de Weigel e Glazebrook (2002).

Para a quantificação da área de células epidérmicas e do número de estômatos foi utilizada a técnica de *imprints* (POOLE et al., 1996). Os *imprints* das superfícies de folhas foram obtidos usando as resinas Speedez Light Body e Speedex Universal Activator (Vigodent), que, quando misturadas, formam um polímero que é capaz de retirar uma impressão das superfícies as quais estão em contato. Após a polimerização, os *imprints* foram retirados das folhas e foi adicionada uma fina camada de esmalte incolor a esses. Essa camada de esmalte foi analisada utilizando microscópio confocal. Para a quantificação da área celular e da quantidade de estômatos foi usado o programa ImageJ.

### 3.6 Análises estatísticas

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

### 3.7 Análise de proteínas das plantas transgênicas 35S:AtRALF1:HPB por intermédio da técnica TAP

#### 3.7.1 Purificação do complexo proteico

Aproximadamente 30 plantas mutantes *mcca* superexpressando AtRALF1 foram crescidas em casa de vegetação e após 30d da germinação foram utilizadas para a obtenção de extratos proteicos.

As plantas tiveram todos os seus tecidos macerados com tampão de maceração (50mM HEPES-KOH pH 7,5, 10mM EDTA, 330mM sacarose, 0,6% polivinilpirrolidona, 1mM DTT, 1mM PMSF, 1gM/mL pepstatina, 1mM/mL PMSF, 1µM/mL de leupeptina e 1µg/mL de E-64). O extrato homogeneizado foi filtrado através de duas camadas de Miracloth (Calbiochem). A fração filtrada foi

centrifugada a 18000g por 10min e o sobrenadante foi centrifugado a 100000g por 1h. A porção microsomal foi ressuspendida em tampão de ressuspensão (20mM HEPES-KOH pH 7,5, 1mM EDTA, 330mM sacarose, 1mM PMSF, 1 $\mu$ M/mL de leupeptina, 1 $\mu$ M/mL de pepstatina e 1 $\mu$ g/mL de E-64) até um volume total de 6mL. Adicionou-se DSP a suspensão microsomal para uma concentração final de 1mM e a suspensão foi incubada em um rotor por 30min.

A reação de ligação cruzada foi reprimida pela adição de 1M Tris/HCL (pH 7,5) até uma concentração final de 50mM e incubada em um rotor por 30min. Os microsomos foram coletados por centrifugação a 100000g por 30min e ressuspendidos em tampão de ressuspensão até um volume final de 6mL. As proteínas foram solubilizadas dos microsomos adicionando 10% deoxicolato de sódio até uma concentração final de 0,5%, incubadas no rotor por 30min e então centrifugadas a 100000g por 30min. A resina contendo estreptativina (Pierce) foi lavadas 3 vezes com o tampão RIPA 1 (50mM Tris/HCl, pH 7,4, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% NP-40, 0,5% deoxicolato de sódio, 1mM PMSF, 1 $\mu$ M/mL leupeptina, 1 $\mu$ M/mL pepstatina e 1 $\mu$ M/mL E-64) e três vezes com o tampão RIPA 2 (igual ao RIPA 1, exceto pela concentração de NaCl ser trocada para 150 mM). As proteínas obtidas a partir da ligação cruzada foram eluídas em 120 $\mu$ L de tampão (1xSDS e 5% 2-mercaptoetanol) e fervidas por 10min. A amostra foi colocada em gel SDS-Page 12%, as proteínas foram cortadas do gel e posteriormente tripsinizadas.

### 3.7.2 Espectrometria de massas

A tripsinização dos AtRALFs foi feita após a separação dos peptídeos em gel SDS-PAGE. As bandas de interesse foram recortadas do gel com auxílio de uma lâmina de bisturi e coletadas em tubos Eppendorf de 1,5mL. As bandas foram picotadas em fragmentos menores e incubadas com solução 75 mM de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  em 40% etanol, por 60min a temperatura ambiente. O processo foi repetido até o gel ficar completamente descorado. Em seguida, as proteínas foram reduzidas com a adição de 5mM ditioneitol (DTT) em 25mM de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  por 30min a 60°C, seguida de uma reação de alquilação com 55mM de iodoacetamida em 25mM de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  por 30min a temperatura ambiente no escuro. Ao término da alquilação, os fragmentos de géis foram lavados uma vez com  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25mM e uma vez com acetonitrila. Os fragmentos de géis foram desidratados com acetonitrila por 3

incubações de 10m cada e secos à vácuo. Após, os géis foram reidratados em uma solução contendo 40 µg/mL de tripsina em 50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  por 45min no gelo, seguido de incubação a 30°C por 16h. Os fragmentos das proteínas digeridas foram extraídos do gel com a adição de 50µL de 50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , incubação por 10min em banho de ultra-som e adição de 50µL de acetonitrila. Este procedimento foi repetido por 3 vezes. Os peptídeos extraídos foram secos à vácuo e enviados para a Central Analítica do Instituto de Química da USP para serem analisados utilizando o método MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight). A análise dos fragmentos trípticos foi realizada com o auxílio do programa MASCOT.





## 4 RESULTADOS

### 4.1 Escolha das isoformas

Para o estudo de caracterização das isoformas de RALF expressas em folhas de *Arabidopsis* foram analisados dados *in silico* e de RT-PCR semiquantitativo. Guerrero-Abad e Moura (dados não publicados) utilizando a ferramenta eFPBrowser (WINTER et al., 2007) determinaram que os genes que codificam as isoformas AtRALF23, 31, 33 e AtRALF34 são expressos em praticamente todos os tecidos vegetais, sendo que AtRALF23 e AtRALF33 são mais expressos em tecidos foliares e AtRALF31 e AtRALF34 são muito expressos em folhas e também inflorescências. Não existem dados *in silico* disponíveis para a isoforma AtRALF19, porém resultados de RT-PCR semiquantitativo dos genes que codificam os peptídeos AtRALF19, 23, 31, 33 e 34 mostram que todos são expressos em folhas (MORATO DO CANTO et al., 2014).

### 4.2 Obtenção de plantas

#### 4.2.1 Plantas mutantes

Realizou-se inicialmente a busca por mutantes com inserção de DNA de transferência (T-DNA) para determinar o fenótipo da planta na ausência desses peptídeos. Utilizando ferramentas de busca disponíveis no TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>), foi possível encontrar mutantes. Foram encontrados mutantes para todos os genes que codificam as isoformas de interesse: SALK\_125065, com inserção de T-DNA na região 3'UTR (*Untranslated region*) para o *AtRALF19*, SALK\_064994 na região 3'UTR para o *AtRALF31*, SALK\_064994 com inserção de T-DNA na região éxon do *AtRALF23*, SALK\_127096 na região promotora do *AtRALF33* e SALK\_102494 que apresenta a inserção de um T-DNA na região 5'UTR do *AtRALF34* (Figura 5).

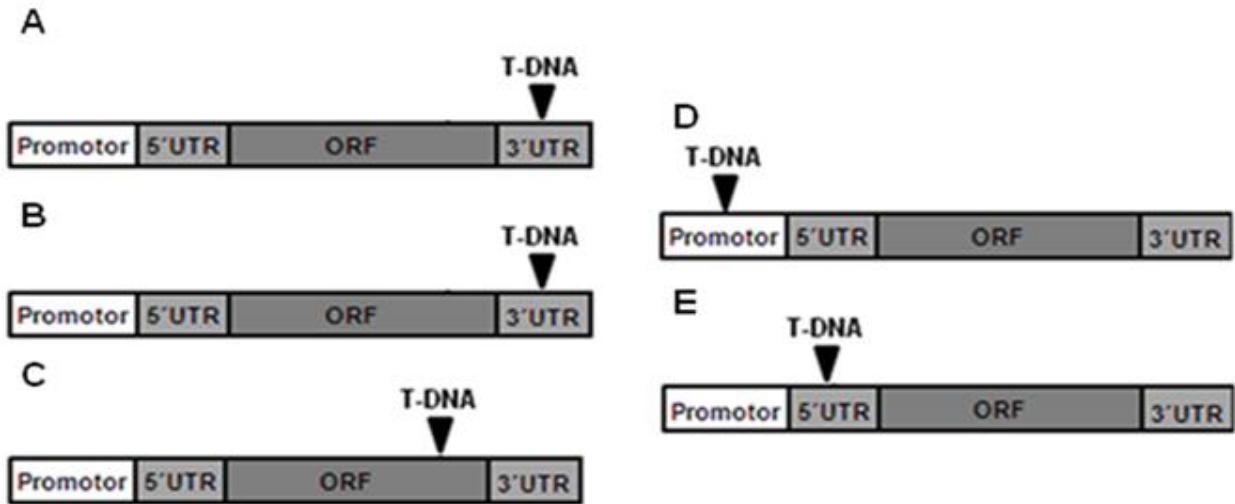


Figura 5 - Análise dos mutantes SALK. A-E. Diagramas da localização da inserção do T-DNA dos mutantes *atralf19* (A), 31 (B), 23 (C), 33 (D) e 34 (E). UTR, região não traduzida. ORF, fase de leitura aberta

#### 4.2.2 Confirmação das plantas mutantes

Os mutantes foram confirmados com o uso do primer LBB1.3, o qual é utilizado para genotipagem de mutantes por ser complementar a região da extremidade do T-DNA. Após a PCR e confirmação de uma banda do tamanho esperado de 450 pb (150 pb da região do T-DNA e 300 pb da região flanqueadora), realizou-se a análise do genótipo das plantas com primers flanqueando a região do T-DNA e nenhuma banda foi encontrada, indicando que se tratavam de plantas mutantes em homozigose, pois as duas cópias do genoma apresentavam a inserção de um T-DNA. (Figura 6).

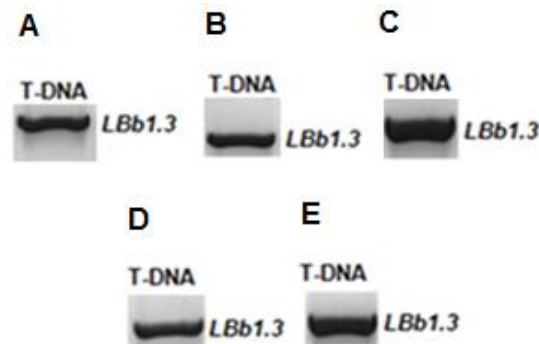


Figura 6 - Verificação dos mutantes SALK. A-E. Confirmação da inserção de T-DNA por PCR dos mutantes de *AtRALF19* (A), 31 (B), 23 (C), 33 (D) e 34 (E). Os géis apresentam reações de PCR utilizando o primer LBB1.3 e um específico localizado abaixo da inserção predita

Realizou-se então a análise de expressão para determinar se os mutantes silenciavam os genes por completo (*knockout*) ou parcialmente (*knockdown*). Os

genes *AtRALF19* e *AtRALF31* apresentavam a inserção de T-DNA na região 3'UTR, o que não proporcionou o silenciamento gênico quando foi feita a análise de expressão comparada com plantas selvagens. Já os mutantes para os genes *AtRALF33* e *AtRALF34* se tratavam de *knockdowns*, com a inserção do T-DNA bloqueando parcialmente a expressão do gene, pois a inserção de T-DNA estava na região promotora e na região não traduzida 5'UTR, respectivamente. O mutante para *AtRALF23* se tratava de um *knockout*, apresentando o bloqueio total da expressão do gene com a inserção de T-DNA na região codificadora do gene (éxon) (Figura 7).

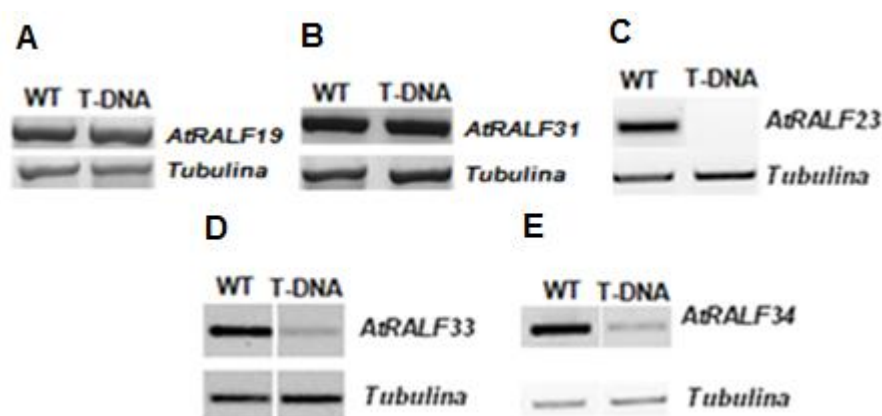


Figura 7 - Análise de expressão dos mutantes SALK. A-E. Análise da expressão gênica dos genes *AtRALF19* (A), *31* (B), *23* (C), *33* (D) e *34* (E) por RT-PCR. O gene que codifica a proteína tubulina foi utilizado como controle. O RNA total foi extraído de folhas da roseta de *Arabidopsis* de plantas com inserção de T-DNA e de plantas selvagens (WT)

#### 4.2.2 Plantas transgênicas silenciando os genes *AtRALFs*

Os mutantes dos genes *AtRALF19* e *AtRALF31* não apresentaram baixa expressão quando comparados com plantas selvagens (Figura 7). Alternativamente foram produzidas plantas transgênicas superexpressando uma construção com repetições invertidas para obter o silenciamento dos genes (*irAtRALF19* e *irAtRALF31*). No total, foram selecionadas 15 linhagens de plantas transgênicas para o *AtRALF19* e 8 linhagens para o *AtRALF31*. A análise de expressão destas plantas será realizada futuramente.

#### 4.2.3 Plantas transgênicas superexpressando os genes *AtRALFs*

Plantas que superexpressam os genes que codificam as isoformas de folhas *AtRALF19*, *AtRALF23*, *AtRALF31*, *AtRALF33* e *AtRALF34* foram obtidas. No total foi produzida 1 linhagem de planta transgênica para a isoforma *AtRALF23*, 7 linhagens para o *AtRALF31*, 10 linhagens para o *AtRALF33* e 5 linhagens para o *AtRALF34*. Em homozigose, foram encontradas 4 linhagens de superexpressão do *AtRALF33* e apenas 1 linhagem de superexpressão do *AtRALF34*. Após a análise de expressão, confirmou-se que as plantas transgênicas apresentaram nível de expressão maior do que plantas selvagens (Figura 8)

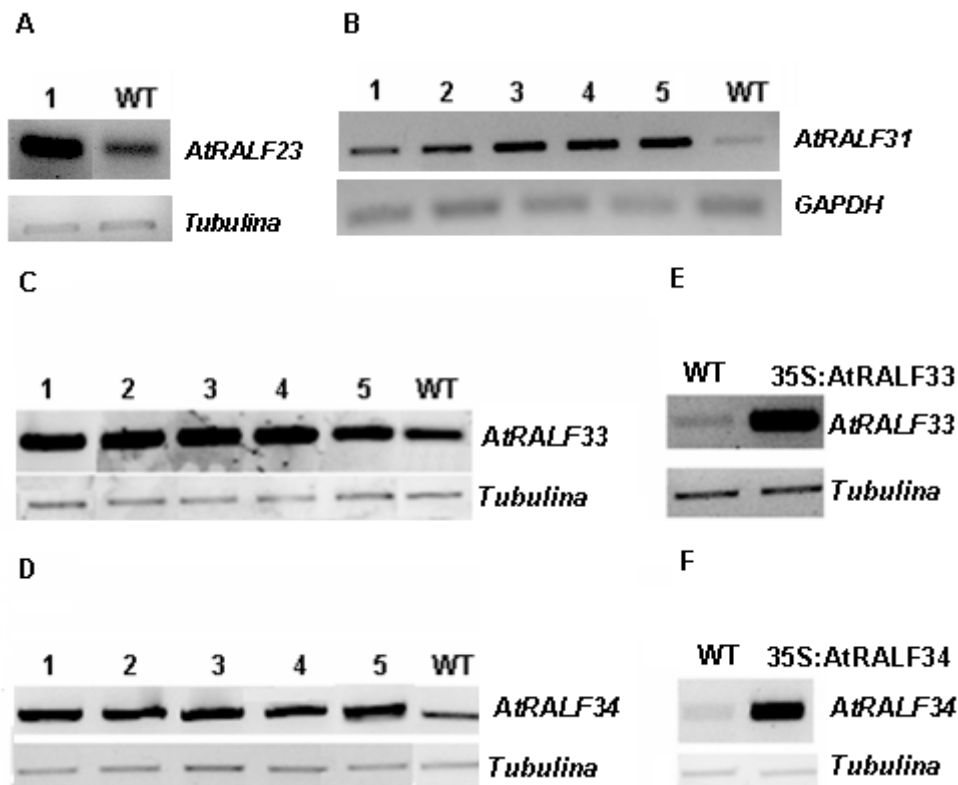


Figura 8 - Análise de RT-PCR utilizando plantas transgênicas superexpressas. A. *AtRALF23*. B. *AtRALF31*. C. *AtRALF33*. D. *AtRALF34*. E. Linhagem em homozigose superexpressando o *AtRALF33*. F. Linhagem em homozigose superexpressando o *AtRALF34*. Os genes *tubulina* e *GAPDH* foram utilizados como controle. O RNA total foi extraído de folhas da roseta de *Arabidopsis* das plantas transgênicas e da planta selvagem (WT)

#### 4.2.4 Promotores fusionados a proteína verde fluorescente

Para determinar em que tecidos da planta os peptídeos estudados são expressos realizou-se a fusão dos promotores dos genes *AtRALF31*, *AtRALF33* e *AtRALF34* com GFP. As clonagens dos promotores de *AtRALF31*, *AtRALF33* e *AtRALF34* foram obtidas com sucesso, enquanto que a clonagem dos promotores

dos genes *AtRALF19* e *AtRALF23* não foram realizadas por dificuldades encontradas na metodologia, como por exemplo, o fato desses promotores serem maiores do que os já clonados, com aproximadamente 2000 pb, enquanto que os clonados apresentam aproximadamente 700 pb.

No total foram obtidas 6 linhagens que expressam GFP a partir do promotor do peptídeo *AtRALF34* e as análises em microscopia confocal de diferentes tecidos da planta foram realizadas. Para o estudo dos promotores dos genes *AtRALF31* e *AtRALF33*, foram obtidas 6 e 10 linhagens, respectivamente, de plantas. Não foi possível realizar a análise destas plantas por microscopia confocal por problemas técnicos no microscópio que vinha sendo utilizado nas análises prévias.

#### 4.2.5 Plantas transgênicas superexpressando *AtRALF1* fusionado a biotina

Com o objetivo de identificar potenciais proteínas que interajam com o peptídeo *AtRALF1* adotou-se a estratégia da purificação por afinidade em tandem *in planta*, também chamada de TAP (*Tandem Affinity Purification*). Foram obtidas 9 linhagens de plantas mutantes *mcca* superexpressando a isoforma *AtRALF1* fusionada a cauda de biotina (Figura 9A). As plantas mutantes *mcca* foram utilizadas com o intuito de conferir maior facilidade de ligação a proteína de interesse biotinilada durante a purificação, pois a planta mutante apresenta baixo nível de proteínas endógenas biotiniladas que poderiam competir com o *AtRALF1* biotinilado. As plantas transgênicas homozigotas foram utilizadas para a obtenção de extratos proteicos, purificação e análise (Figura 9B).

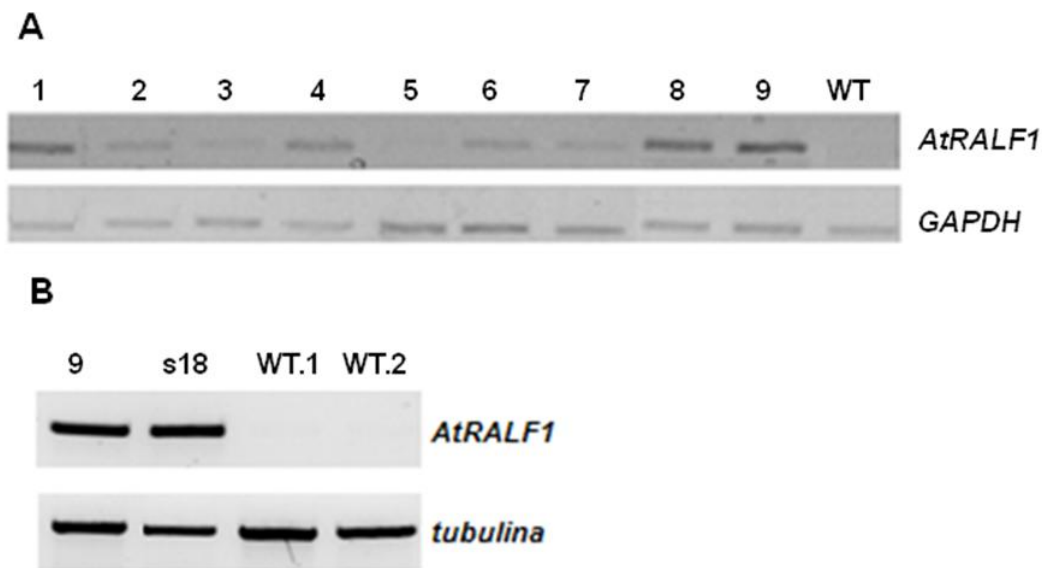


Figura 9 - Análise de RT-PCR utilizando plantas transgênicas 35S:AtRALF1:HPB. A. Nível de expressão de AtRALF1-HPB em diferentes linhagens de plantas transgênicas obtidas na primeira geração (1 a 9) comparadas com uma planta selvagem (WT). B. Análise da linhagem 9 homocigota, da linhagem s18 a qual superexpressa o gene AtRALF1 e de plantas selvagens (WT.1 e WT.2). Resultado de reações de RT-PCR com 30 ciclos. Os genes *GAPDH* e *tubulina* foram usados como controle

### 4.3 Análise fenotípica

Após a obtenção de linhagens de *Arabidopsis knockout* ou *knockdown* e superexpressando cada uma das isoformas RALF de folhas selecionadas, iniciou-se a análise fenotípica das plantas.

#### 4.3.1 Análise da raiz principal, raízes laterais e hipocótilo

Os efeitos de ganho e perda de função para cada um dos genes foram avaliados através de medições do comprimento da raiz principal, do número de raízes laterais emergidas e do comprimento do hipocótilo (Figuras 10 e 11).

As análises de comprimento de raiz principal realizadas 10d após a germinação, determinaram que plantas 35S:AtRALF33 e plantas 35S:AtRALF34 apresentavam comprimento 30% e 10% inferiores ao comprimento de plantas selvagens respectivamente, sendo diferentes entre si e em relação a selvagens. As plantas mutantes apresentaram raízes com um aumento de aproximadamente 20%

para *atralf23* e *atralf33* quando comparadas às plantas selvagens, porém, *atralf34* mostrou o mesmo tamanho que as selvagens (Figura 10).

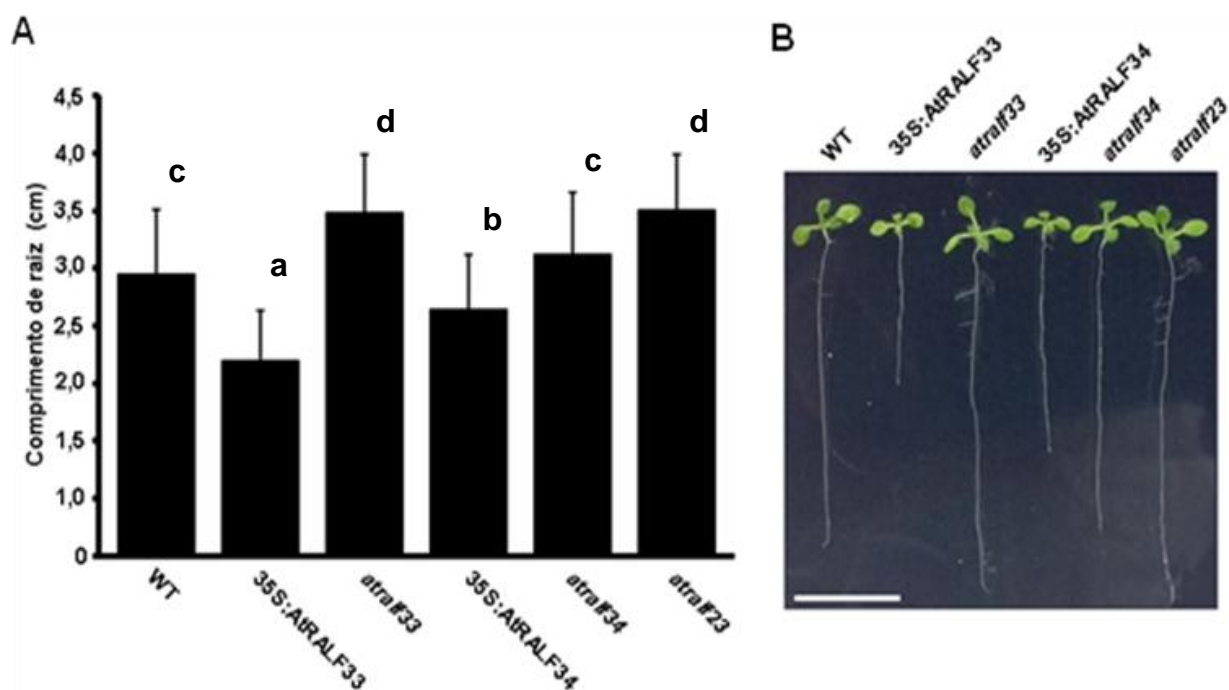


Figura 10 - Análise e imagem de raízes. A. Comprimento da raiz. B. Dado qualitativo. Barra = 1 cm. Avaliaram-se as plantas após 10d da germinação para a análise do comprimento de raiz e obtenção da imagem. Plantas selvagens (WT) foram utilizadas como controle. As barras de erro indicam o desvio padrão. As colunas seguidas pela mesma letra não são estatisticamente diferentes (valor- $p < 0,005$ ). N=40

Realizaram-se análises do alongamento de hipocótilo com as plantas transgênicas 6d após a germinação. Plantas 35S:AtRALF33 e plantas selvagens apresentaram valor de alongamento de hipocótilo iguais, as 35S:AtRALF34 apresentaram valor próximo ao de plantas selvagens, enquanto que plantas *atralf23*, *atralf33* e *atralf34* apresentaram hipocótilos 15% maiores do que plantas selvagens (Figura 11A).

O número de raízes laterais emergidas foi avaliado e observou-se que plantas 35S:AtRALF33 e 35S:AtRALF34 apresentaram uma redução de 70% do número de raízes laterais comparando-se com plantas selvagens. Plantas mutantes *atralf33* e *atralf23* apresentaram aumento de aproximadamente 60% da quantidade de raízes laterais, sendo que *atralf33* apresentou valores com maior proximidade das selvagens do que o *atralf23*, e o *atralf34* não apresentou diferença significativa quando comparado com plantas selvagens (Figura 11B).



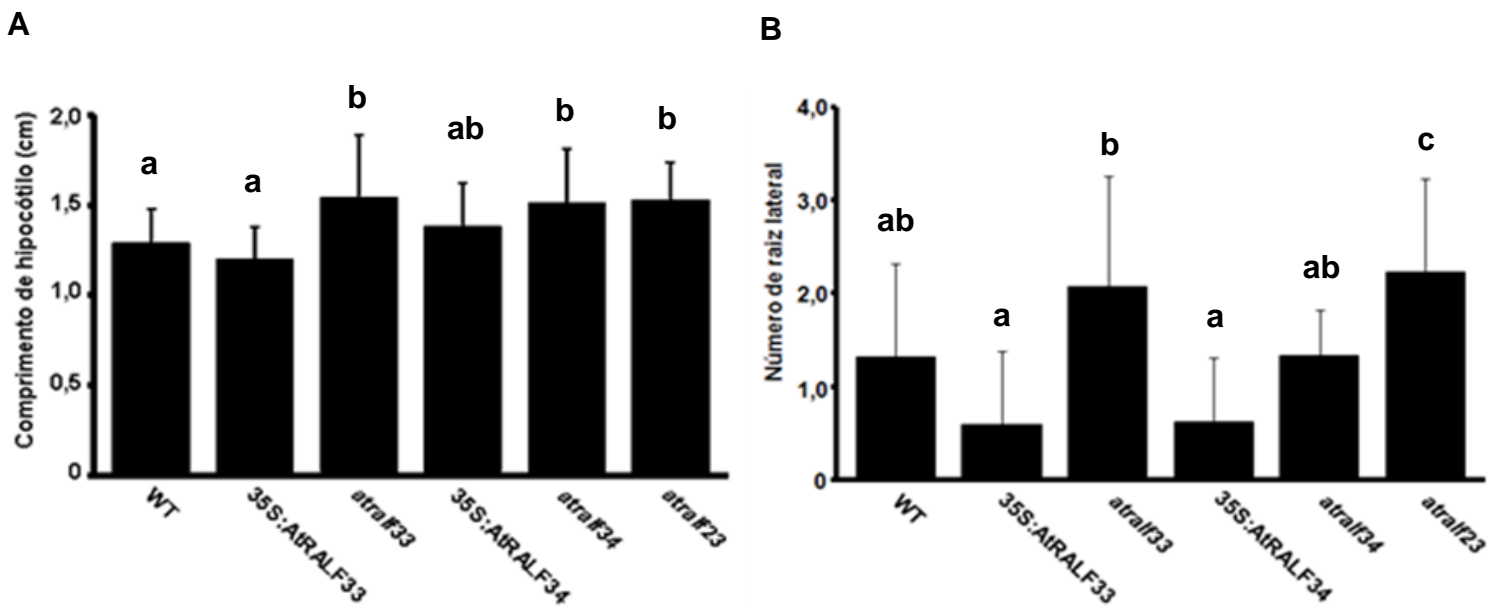


Figura 11 - Análise do hipocótilo e raízes laterais. A. Comprimento de hipocótilo. B. Número de raízes laterais. Avaliaram-se as plantas após 6d da germinação para alongamento de hipocótilo e 10d para a análise do número de raízes laterais. Plantas selvagens (WT) foram utilizadas como controle. As barras de erro indicam o desvio padrão. As colunas seguidas pela mesma letra não são estatisticamente diferentes (valor- $p < 0,005$ ). N=40

#### 4.3.2 Análises da parte aérea: comprimento de haste, diâmetro da roseta e comprimento de folhas

Em análises da parte aérea da planta, foi possível avaliar o comprimento da haste. Plantas 35S:AtRALF33 apresentaram um fenótipo semi-anão, logo, houve uma redução acentuada de crescimento, sendo 55% menor do que plantas selvagens, enquanto que plantas 35S:AtRALF34 mostraram uma redução de 25%. As plantas mutantes *atralf33* e *atralf23* apresentaram um aumento de aproximadamente 20%, sendo que o mutante *atralf23* apresenta uma maior diferença quando comparado com plantas selvagens. O mutante *atralf34* não mostrou diferenças significativas quando comparado com plantas selvagens (Figura 12).

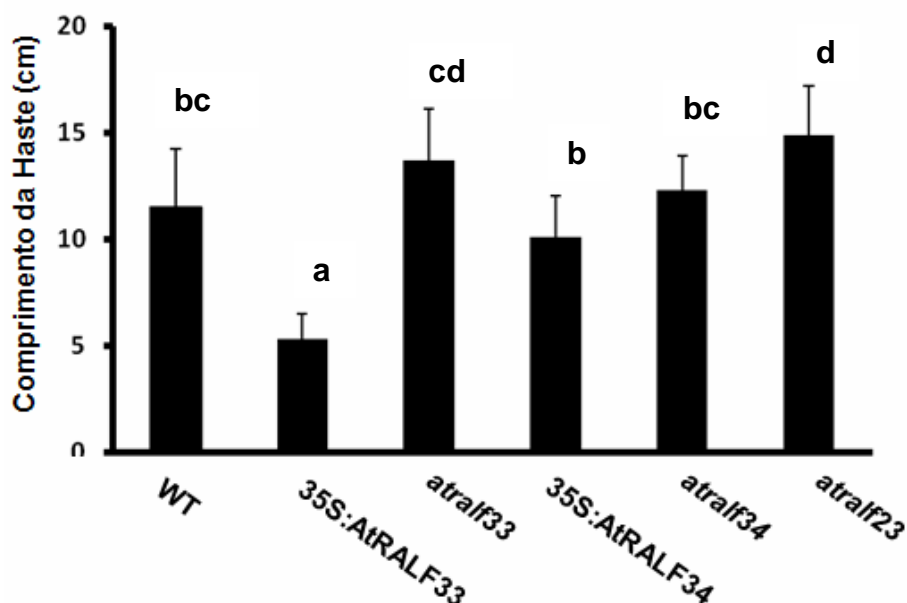


Figura 12 - Análise do comprimento da haste. Avaliaram-se as plantas mantidas em casa de vegetação após 30d da germinação. Plantas selvagens (WT) foram utilizadas como controle. As barras de erro indicam o desvio padrão. As colunas seguidas pela mesma letra não são estatisticamente diferentes (valor- $p < 0,005$ ). N=30

Analisou-se também o diâmetro da roseta das plantas transgênicas. As plantas 35S:AtRALF33 exibiram uma redução de 60%, as mutantes *atralf33* e *atralf23* um aumento de aproximadamente 35% e plantas 35S:AtRALF34 e *atralf34* não mostraram diferenças quando comparadas com plantas selvagens (Figura 13).

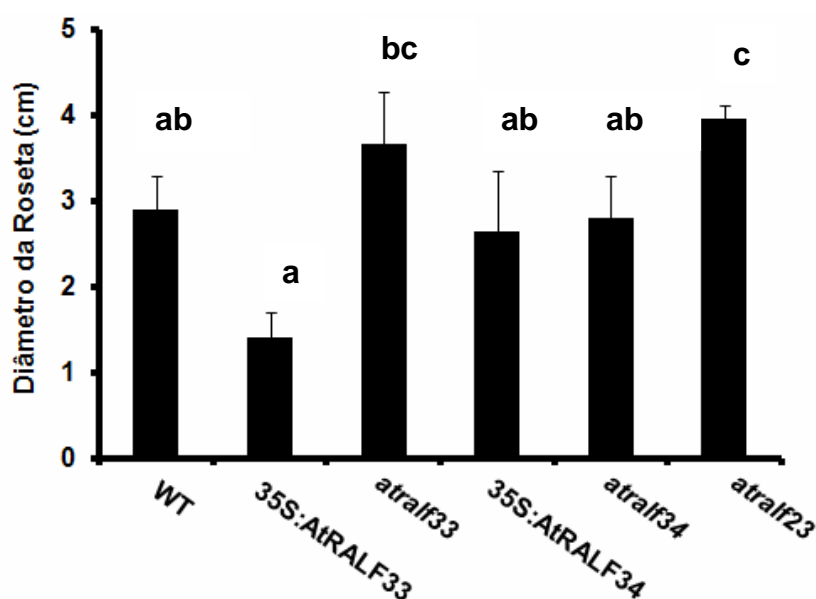


Figura 13 - Análise do diâmetro da roseta. Avaliaram-se as plantas mantidas em casa de vegetação após 30d de germinação. Plantas selvagens (WT) foram utilizadas como controle. As

barras de erro indicam o desvio padrão. As colunas seguidas pela mesma letra não são estatisticamente diferentes (valor- $p < 0,005$ ). N=30

Avaliou-se também o comprimento das folhas 5, 6 e 7 da roseta de plantas transgênicas e selvagens. Plantas 35S:AtRALF33 apresentaram comprimento de folhas cerca de 44% menor do que plantas selvagens, enquanto que 35S:AtRAFL34 mostraram uma redução de 20%. As plantas mutantes *atralf33*, *atralf23* e *atralf34* apresentaram um aumento aproximado de 16%, 52% e 0%, respectivamente, comparando-se com plantas selvagens (Figura 14).

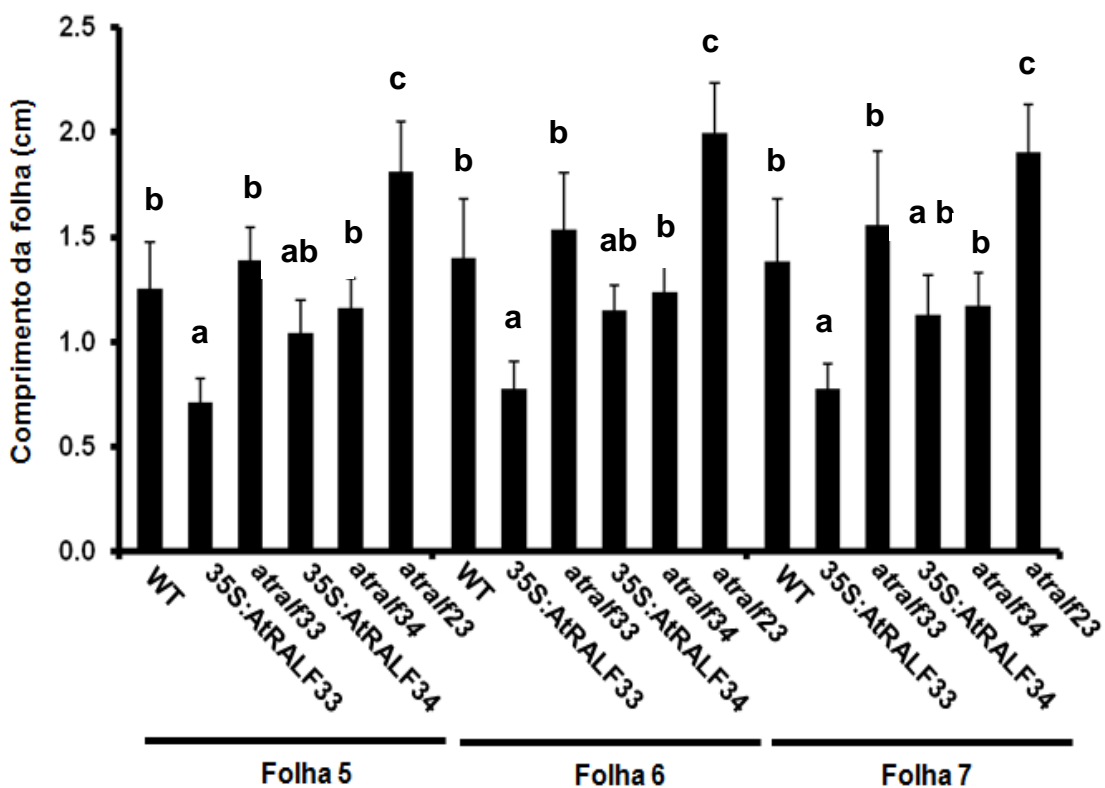


Figura 14 - Análise fenotípica das folhas. Comprimento das folhas 5, 6 e 7. Avaliaram-se as plantas mantidas em casa de vegetação após 30d da germinação. Plantas selvagens (WT) foram utilizadas como controle. As barras de erro indicam o desvio padrão. As colunas seguidas pela mesma letra não são estatisticamente diferentes (valor- $p < 0,005$ ). N=30

#### 4.4 Impressão em tecidos foliares

Para tentar desvendar a razão pela qual as folhas de plantas superexpressando as isoformas de folha apresentam tamanho inferior e as plantas silenciadas apresentam tamanho superior às plantas selvagens, utilizou-se como

ferramenta DIC (*Differential Interference Contrast*) e a técnica chamada *imprinting* para a análise de células das plantas.

Para determinar se as células de folhas superexpressando e silenciando os genes que codificam isoformas de RALFs de folhas apresentavam alterações no tamanho ou número de células, utilizou-se a técnica *imprinting* (Figura 15). Foi possível observar que em folhas de plantas 35S:AtRALF33 e 35S:AtRALF34 houve um aumento do número de células por área, cerca de 52% e 4% respectivamente, e diminuição da área celular, redução de 25% e 15% respectivamente quando comparadas com plantas selvagens (Figura 16). O número de lóbulos diminuiu em plantas 35S:AtRALF33 cerca de 80% e em plantas 35S:AtRALF34 não houve diferenças (Figura 17).

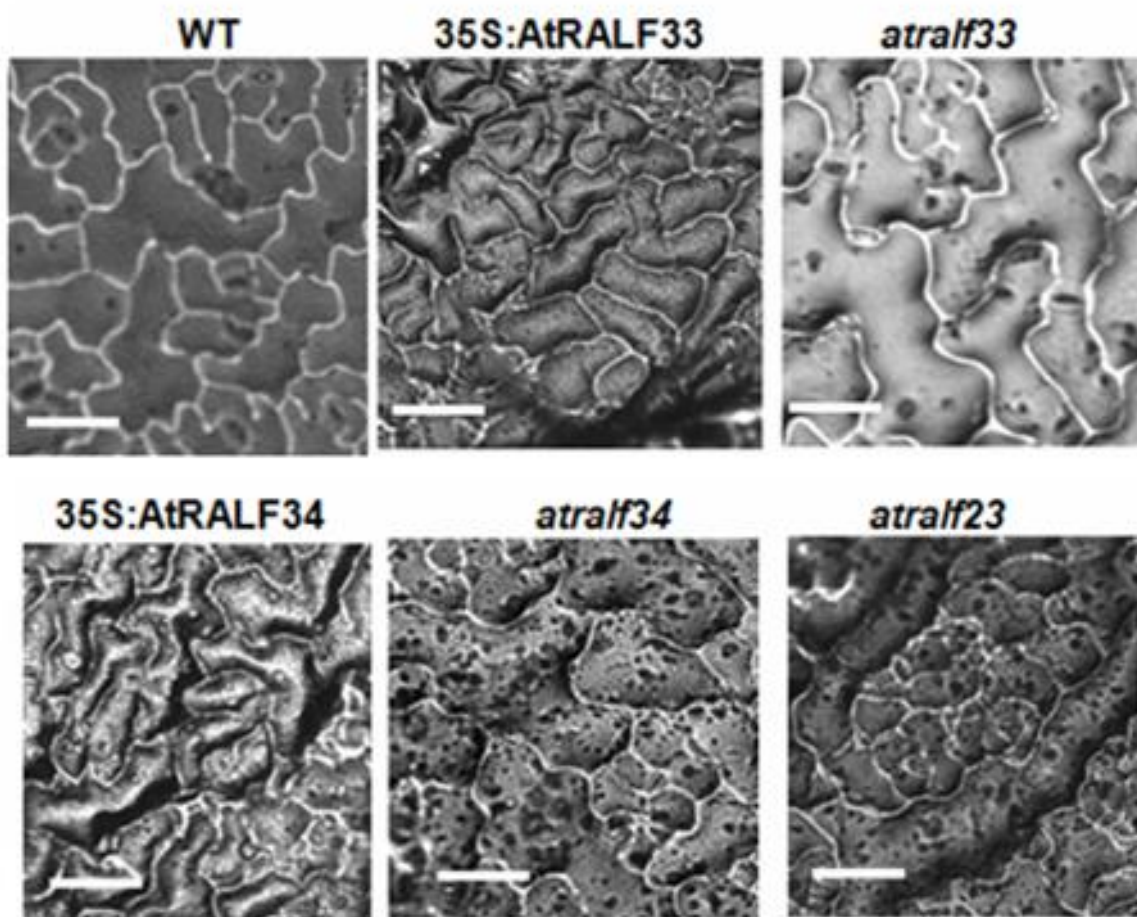


Figura 15 - Imagem das células de folhas. Barra da escala = 0,06 mm. Avaliaram-se as plantas mantidas em casa de vegetação após 30d de germinação em microscópio confocal. Plantas selvagens (WT) foram utilizadas como controle

Para os mutantes, foi observado novamente um aspecto inverso ao de plantas superexpressando as isoformas em estudo. Plantas mutantes *atralf33*,

*atralf34* e *atralf23* apresentaram número de células 35%, 20% e 50% respectivamente inferiores quando comparados a plantas selvagens (Figura 16B); e área celular aproximadamente 25%, 0% e 37% respectivamente superiores do que plantas selvagens (16A). O número de lóbulos não apresentou um aumento significativo nas plantas *atralf33* e *atralf34* quando comparado com plantas selvagens (Figura17).

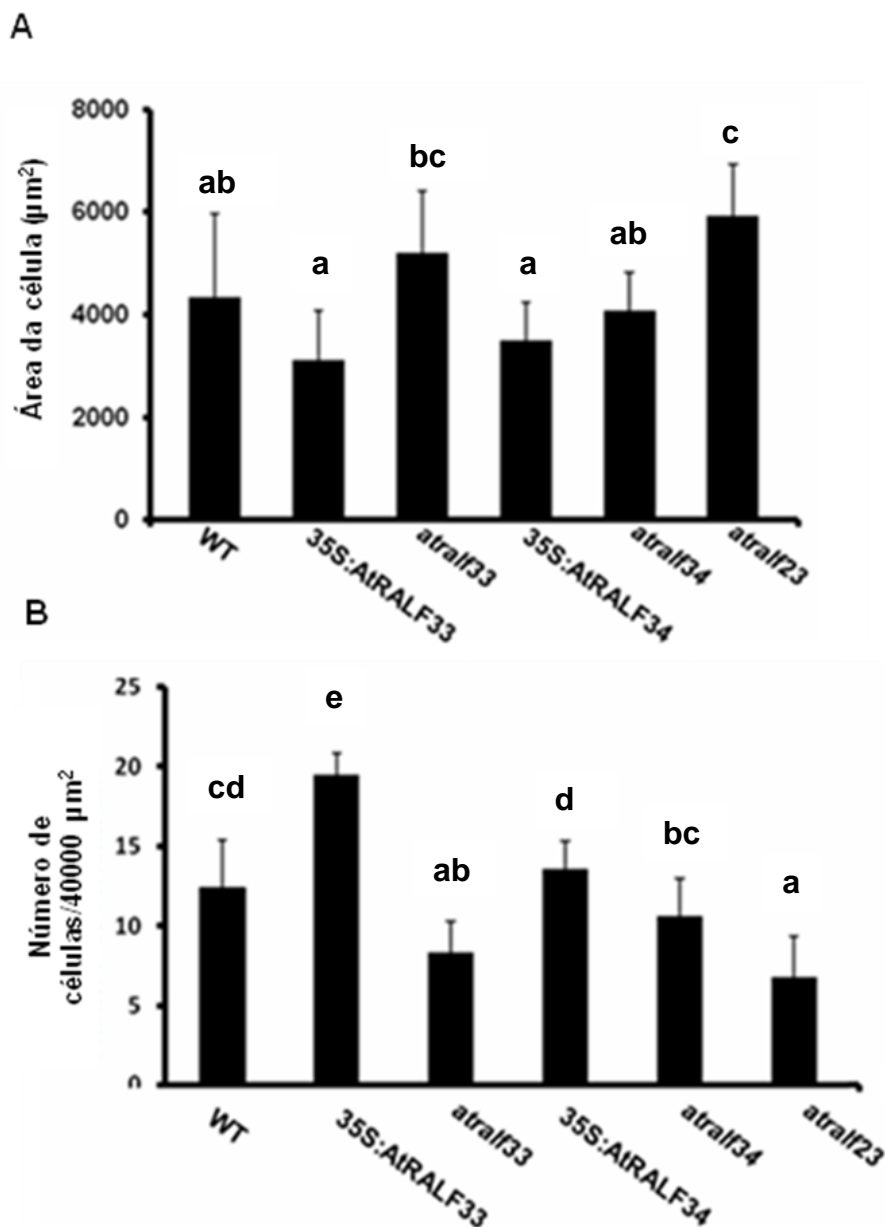


Figura 16 - Análise da área celular e número de células/área em folhas. A. Área da célula (μm<sup>2</sup>). Analisaram-se 15 plantas com n de 15 células por planta. B. Número de células/40000 μm<sup>2</sup>. Avaliaram-se as plantas mantidas em casa de vegetação após 30d de germinação em microscopia confocal. Plantas selvagens (WT) foram utilizadas como controle. As barras de erro indicam o desvio padrão. As colunas seguidas pela mesma letra não são estatisticamente diferentes (valor-p<0,005)

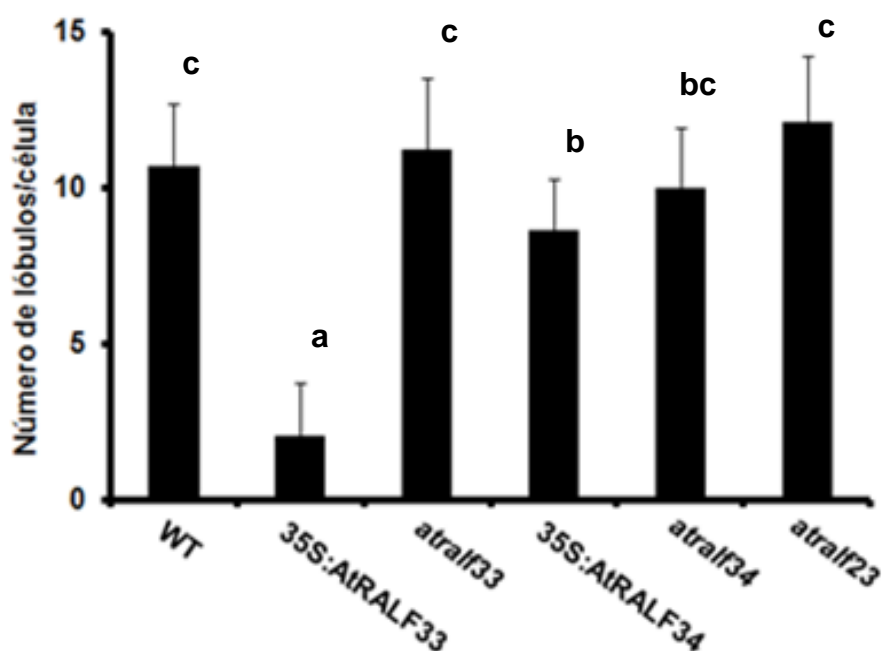


Figura 17 - Análise do número de lóbulos/célula em folhas. Avaliaram-se as plantas mantidas em casa de vegetação após 30d da germinação em microscopia confocal. Plantas selvagens (WT) foram utilizadas como controle. Analisaram-se 15 plantas com n de 15 células por planta. As barras de erro indicam o desvio padrão. As colunas seguidas pela mesma letra não são estatisticamente diferentes (valor- $p < 0,005$ )

#### 4.5 Análise de promotores fusionados a proteína verde fluorescente

Para o estudo dos promotores, foi realizada análise em microscópio confocal de plantas transgênicas apresentando o promotor do *AtRALF34* fusionado a GFP (pAtRALF34:GFP). Plântulas mostraram fluorescência no ápice da raiz (possivelmente coifa), hipocótilo e na região da base das folhas cotiledonares (Figura18). Detalhes do hipocótilo e ápice radicular podem ser observados nas figuras 19 e 20 respectivamente.

Plantas adultas tiveram suas folhas, siliques e inflorescências observadas. Foi possível visualizar fluorescência nos estômatos das folhas (Figura 21), nas flores (pétalas, sépalas, gineceu e androceu) (Figura 22A), nas siliques (Figura 22B) e nos ápices das raízes laterais (Figura 23).

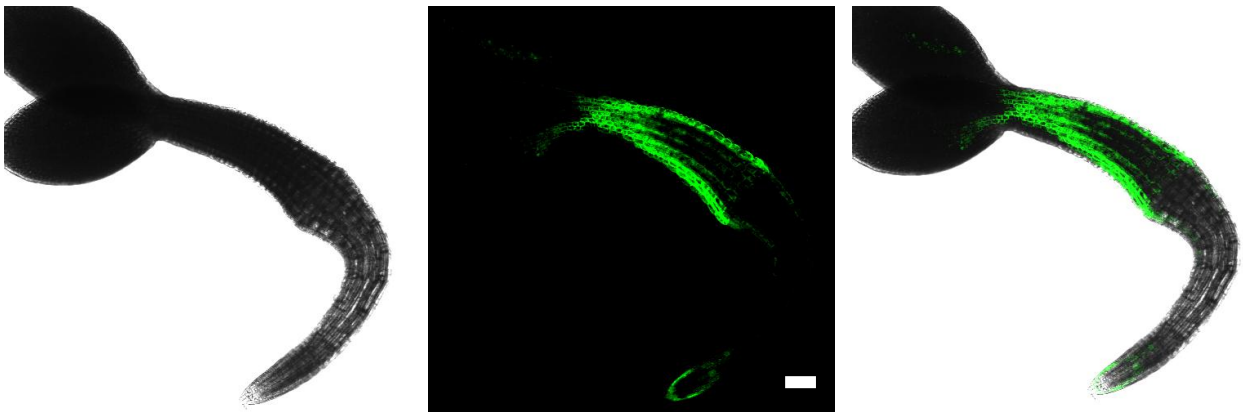


Figura 18 - Análise em microscopia confocal da expressão de pAtRALF34:GFP de plântulas de Arabidopsis. Plântulas de 3d foram analisadas. Painel à esquerda, DIC. Ao centro, imagem de microscopia de fluorescência. Painel à direita, sobreposição de imagens de DIC e fluorescência. Barra de escala = 0,1 mm. Foram utilizados os lasers de excitação 635nm e 488nm e filtros de emissão entre 500nm e 530nm para GFP (verde)

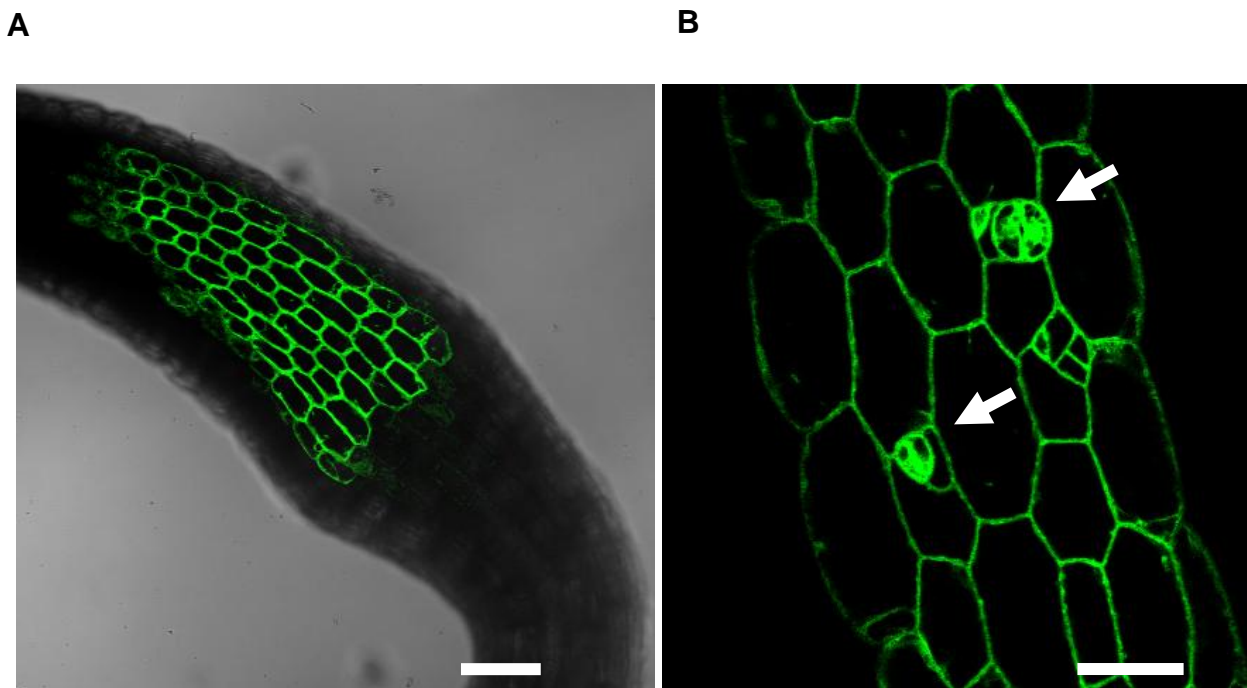


Figura 19 - Análise em microscopia confocal da expressão de pAtRALF34:GFP no hipocótilo (3 d). Plântulas de 3d foram analisadas. Painel à esquerda, região de transição entre hipocótilo e raiz, sobreposição de imagens de DIC e fluorescência Barra = 0,08 mm. Painel à direita, detalhe do hipocótilo onde é possível observar estômatos (setas), imagem de fluorescência. Barra de escala = 0,03 mm. Foram utilizados os lasers de excitação 635nm e 488nm e filtros de emissão entre 500nm e 530nm para GFP (verde)

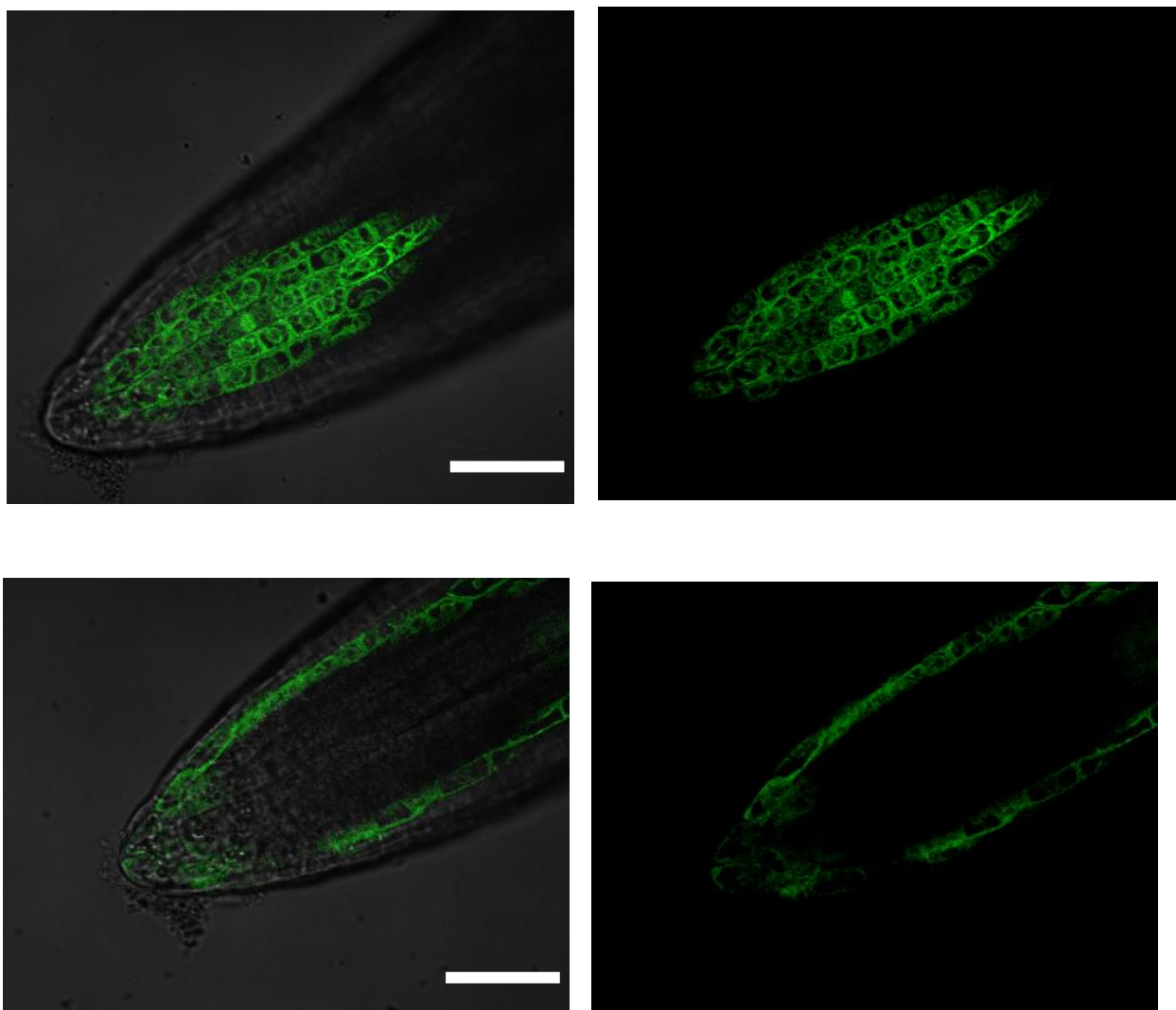
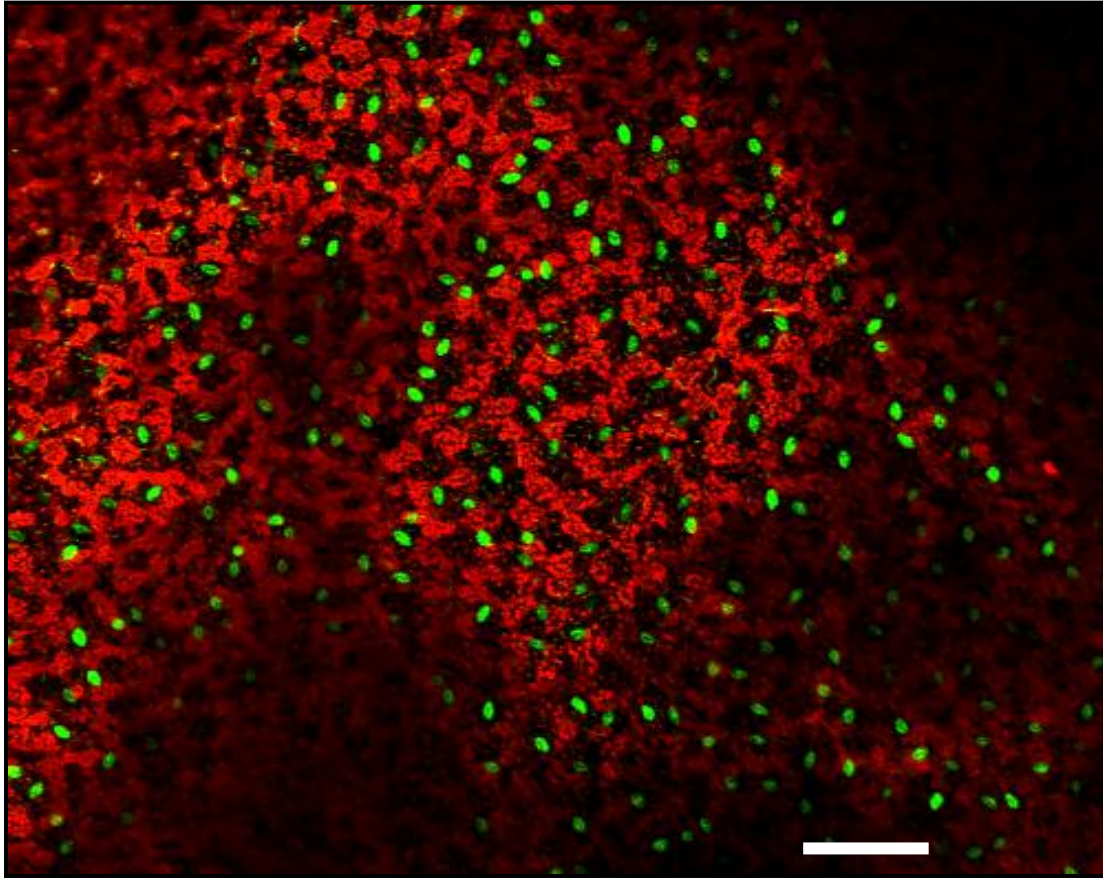


Figura 20 - Análise em microscopia confocal da expressão de pAtRALF34:GFP no ápice radicular. Plântulas de 3d foram analisadas. Imagens do ápice caulinar de raiz. À esquerda, sobreposição de imagens de DIC e fluorescência. A direita, imagens de fluorescência. Barra de escala = 0,05 mm. Foram utilizados os lasers de excitação 635nm e 488nm e filtros de emissão entre 500nm e 530nm para GFP (verde)



A



B

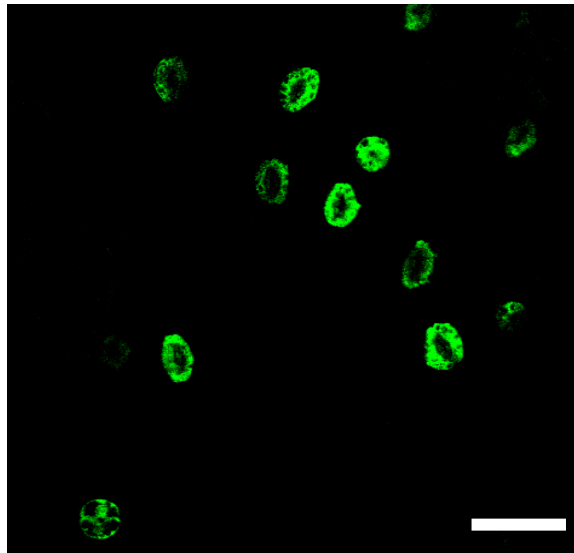


Figura 21 - Análise em microscopia confocal da expressão de pAtRALF34:GFP em folhas. Plantas de 30d foram analisadas. A. Folha. Barra de escala = 0,12 mm. B. Estômatos presentes nas folhas. Barra = 0,035 mm. Foram utilizados os lasers de excitação 635nm e 488nm e filtros de emissão entre 650nm e 750nm e entre 500nm e 530nm para clorofila (vermelho) e para GFP (verde) respectivamente

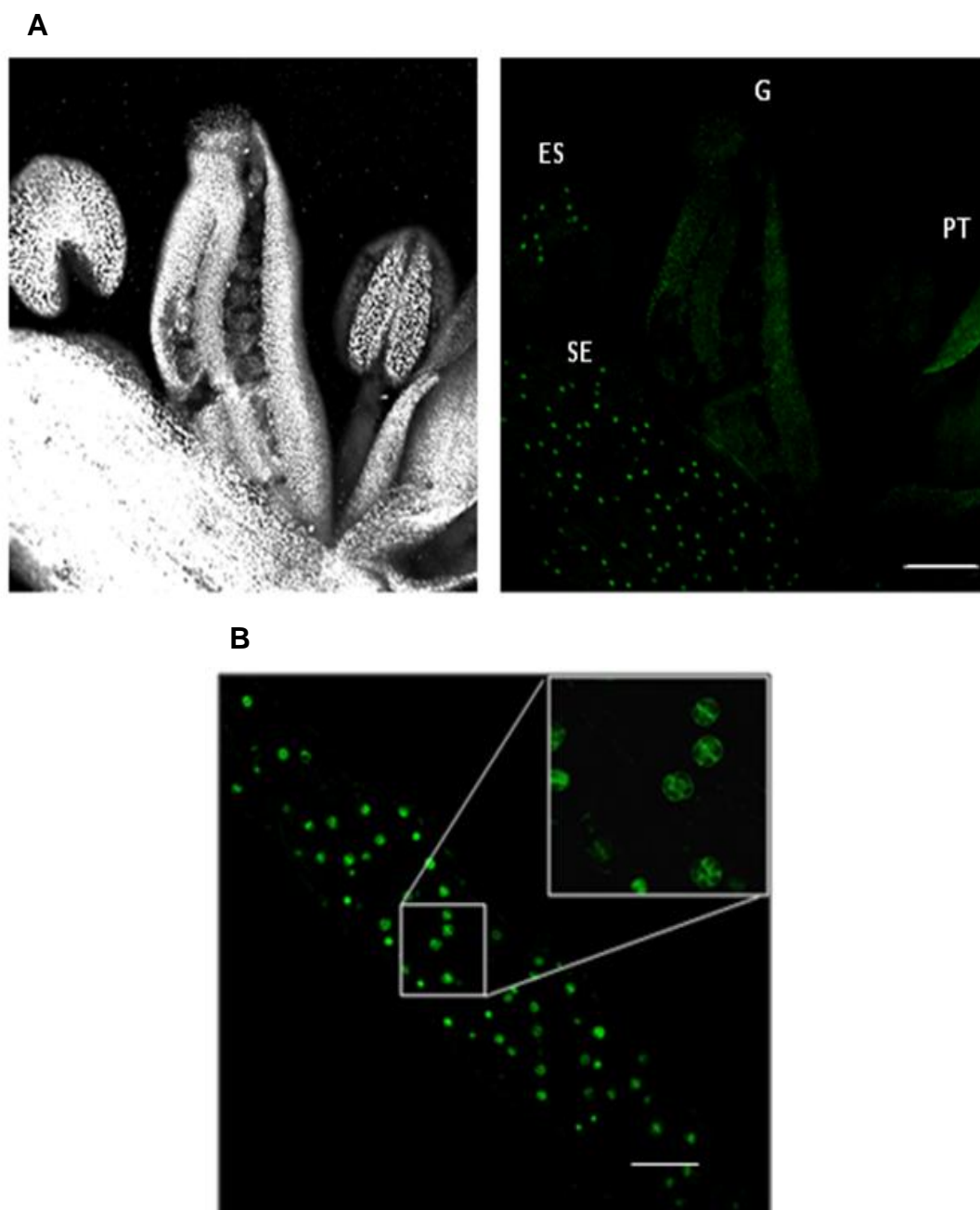


Figura 22 - Análise em microscopia confocal da expressão de pAtRALF34:GFP em inflorescências e sílica. Plantas de 3d foram analisadas (A) Inflorescência. ES, estames; G, gineceu; SE, sépala; PT, pétala. Painel à esquerda, imagem de DIC. Painel à direita, imagem de microscopia de fluorescência. Barra de escala = 0,2 mm (B) Sílica apresentando fluorescência nos estômatos, no detalhe é possível identificar os estômatos. Barra = 0,07 mm. Foram utilizados os lasers de excitação 635nm e 488nm e filtros de emissão entre 500nm e 530nm para GFP (verde)

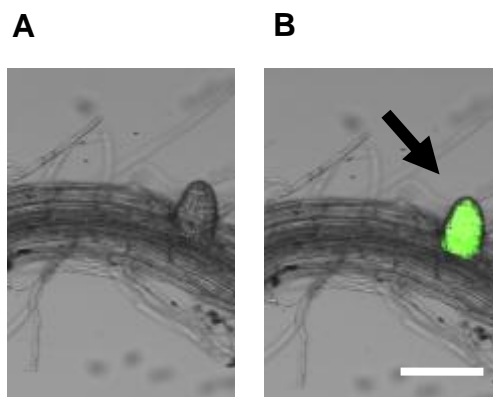


Figura 23 - Análise em microscopia confocal da expressão de pAtRALF34:GFP na raiz lateral. Plantas de 30d foram analisadas. Setas indicam o surgimento de raízes laterais. À esquerda, imagem de DIC. À direita, sobreposição de imagens de microscopia DIC e fluorescência. Barra de escala = 0,07 mm. Foram utilizados os lasers de excitação 635nm e 488nm e filtros de emissão entre 500nm e 530nm para GFP (verde)

#### 4.6 Análise de proteínas que interagem com o peptídeo AtRALF

Após a obtenção da linhagem de maior expressão em homozigose de plantas 35S:AtRALF1:HPB foi realizada a extração do complexo proteico, purificação utilizando resina de estreptavidina, análise em gel SDS/PAGE, tripsinização, análise em espectrometria de massas e utilização do programa MASCOT.

Uma proteína de membrana de cerca de 70 kDa foi encontrada e após análise em massa foi possível identificar os seguintes aminoácidos: VENMVKIK. Utilizando o website BLAST determinou-se que a sequência de aminoácidos correspondia ao gene AT1G12430 que codifica uma proteína PAK semelhante à cinetina (*kinesin-like protein PAK*) (Figura 24A-B).

Uma proteína mais abundante de aproximadamente 15 kDa foi visualizada no gel SDS/PAGE e será analisada futuramente (Figura 24A).

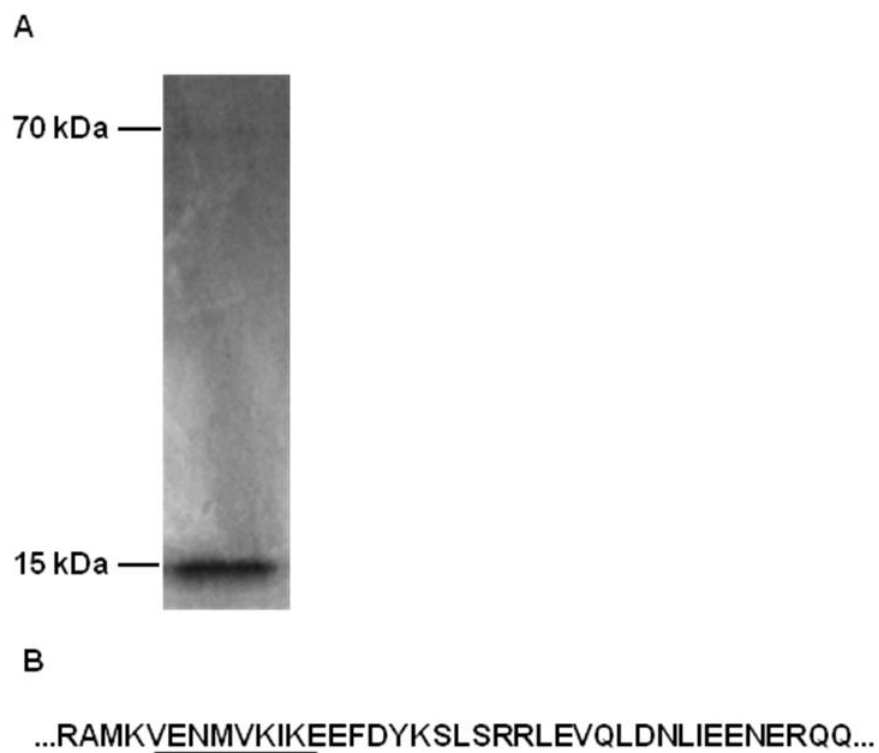


Figura 24 - Análise da possível proteína que interage com o peptídeo AtRALF1. A. Gel 12% SDS/PAGE com uma proteína de 15 kDa e outra de 70 kDa. B. Parte da sequência da proteína PAK semelhante à cinetina. A região sublinhada indicam os aminoácidos encontrados a partir da espectrometria de massa



## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Análise funcional de peptídeos AtRALFs foliares

O peptídeo RALF está intimamente relacionado com desenvolvimento, mais especificamente com a expansão celular. As plantas transgênicas superexpressando a isoforma *AtRALF33* obtidas nesse trabalho apresentaram um fenótipo semi-anão e arbustivo semelhante ao mostrado por Matos et al., (2008), Srivastava et al., (2009) e Atkinson, Lilley e Urwin (2013) quando superexpressaram os genes *AtRALF1*, *AtRALF23* e *AtRALF8* respectivamente. Esses dados indicam que mesmo algumas isoformas sendo bem mais distantes filogeneticamente entre si do que outras, como o *AtRALF8* e *AtRALF33*, apresentam papel semelhante no desenvolvimento vegetal.

Os mutantes *atralf23*, *atralf33* e *atralf34* apresentaram características contrárias ao de plantas superexpressas, como comprimento de raiz e de folhas maiores do que plantas selvagens. Wu et al., 2008 quando produziu plantas silenciadas para a única isoforma de tabaco obteve um fenótipo semelhante, com raízes maiores que de plantas selvagens, mostrando que apesar da espécie estudada ser diferente, o peptídeo RALF continua apresentando função no controle da expansão celular.

Na análise de comprimento de raiz, as variações encontradas entre plantas mutantes ou silenciadas, plantas superexpressas e selvagens não apresentaram contrastes tão significativos quanto o estudo com a isoforma *AtRALF1*, que mostrou uma redução de aproximadamente 42% na transgênica 35S:*AtRALF1* e as isoformas *AtRALF1* silenciadas apresentaram um aumento de comprimento de raiz mais contrastante, com cerca de 40% (BERGONCI et al., 2014), enquanto que a máxima variação é de 30% em relação a plantas 35S:*AtRALF33* e selvagens (Figura 10).

Bergonci et al., (2014) mostraram que plantas 35S:*AtRALF1* apresentaram redução de aproximadamente 30% no comprimento do hipocótilo e *irAtRALF1* apresentou aumento de 30% em relação a plantas selvagens, enquanto que nesse trabalho não houve grandes variações das plantas superexpressas com plantas selvagens, já os mutantes apresentaram aumento de 15% (Figura 11A).

A isoforma *AtRALF1* é caracterizada por ser expressa especificamente nos tecidos da raiz e hipocótilo. Dados *in silico* e de RT-PCR indicam que das 9 isoformas mais próximas a isolada de tabaco, *AtRALF1* é a que apresenta maior nível de expressão em raízes e hipocótilo (MORATO DO CANTO et al., 2014;

WINTER et al., 2007). Isso poderia explicar o maior contraste no comprimento de raízes e hipocótilo entre plantas superexpressas e silenciadas para o gene *AtRALF1* quando comparado com as transgênicas para os genes *AtRALF33*, *AtRALF34* e *AtRALF23* obtidas nesse trabalho.

A redução do comprimento de raiz em plantas superexpressando *AtRALFs*, a inibição do crescimento de raízes quando aplicado RALF exógeno (MOURA et al., 2006; MORATO DO CANTO et al., 2014) e também o papel de alcalinização do meio extracelular de células em suspensão estão relacionados com a regulação negativa de uma bomba de prótons. Srivastava et al., (2009) verificaram que enquanto plantas selvagens acidificam o meio extracelular durante seu crescimento, plantas 35S:*AtRALF23* retardaram a acidificação do meio. Atkinson et al., (2013) sugeriram que *AtRALF8* pode ter papel importante na modificação de parede celular, pois mostrou ser coexpresso com pectinesterases de parede celular, as quais são ativadas por variações de pH e sua função pode ser modulada por alcalinização. Estudos recentes determinaram que *AtRALF1* é capaz de se ligar a um receptor quinase de membrana, FERONIA, e assim inicia uma cascata de fosforilação que inibe a atividade de uma bomba de prótons na membrana, aumentando o pH do apoplasto e reduzindo o alongamento celular (HARUTA et al., 2014).

Atkinson, Lilley e Urwin (2013) estudando o gene *AtRALF8* superexpresso, obteve uma redução de cerca de 20% do diâmetro da roseta quando comparou com plantas selvagens, enquanto que nesse trabalho a isoforma 35S:*AtRALF33* apresentou uma redução mais acentuada, 60% (Figura 13).

O fato do comprimento de raízes, hipocótilo, haste e roseta de plantas mutantes não apresentarem grandes variações em relação a plantas selvagens pode ser explicado pelas isoformas *atralf33* e *atralf34* se tratarem de *knockdowns*, o que implica na baixa expressão dos genes, mas não no seu total bloqueio. Além disso, existem 37 isoformas de RALFs em *Arabidopsis* que podem causar uma redundância gênica, fazendo com que outras isoformas desempenhem o papel da que foi silenciada, como foi mostrado por Bergonci et al., (2014). Neste estudo, foi avaliada a expressão dos genes que codificam as isoformas do peptídeo RALF de *Arabidopsis* mais próximas filogeneticamente do peptídeo RALF isolado de tabaco em plantas transgênicas *irAtRALF1* e selvagens. Foi possível verificar que plantas *irAtRALF1* não apresentaram expressão gênica de genes que codificam outras isoformas do peptídeo RALF alterada quando comparadas com plantas selvagens,

indicando que várias isoformas do peptídeo RALF estavam atuando enquanto apenas o gene que codifica a isoforma *AtRALF1* estava sendo silenciado.

A alteração na área celular e na quantidade de células nas plantas transgênicas indica o papel do RALF no desenvolvimento a partir da expansão celular. Em raízes, Bergonci et al. (2014) e Haruta et al. (2014) verificaram que plantas superexpressando o gene *AtRALF1* e plantas silenciadas e mutantes para essa isoforma apresentaram tamanho das células da zona de diferenciação de raízes e também células do hipocótilo alterados quando comparados com plantas selvagens, indicando novamente o papel do peptídeo RALF na expansão celular (Apêndice 3).

As alterações no número de lóbulos por célula (Figura 17) em plantas transgênicas e a modificação da arquitetura celular (Figuras 15 e 16) podem estar relacionados com Rho GTPases. As proteínas ROP2 e ROP6 são Rho GTPases que participam da via de auxina e são importantes para a formação de lóbulos e indentações celulares, participando assim do controle da morfologia da célula (XU et al., 2010). A relação entre o peptídeo sinal RALF e a via de auxina já foi proposta em estudos realizados com a isoforma *AtRALF8* e *AtRALF23*, a partir de alterações de valores de pH observados na superfície de raízes de plantas superexpressas (ATKINSON; LILLEY; URWIN, 2013 e SRIVASTAVA et al., 2009) e também na isoforma *ScRALF3* encontrada em batata, relacionada com o desenvolvimento de frutos e sementes, a qual mostrou ser regulada positivamente por auxina (CHEVALIER; LOUBERT-HUDON; MATTON, 2013). Análises de expressão de genes que codificam *AtRALFs* de folha em plantas duplo-mutantes para ROP2/ROP6, mutantes ABP1 e mutantes PIN estão sendo realizadas para determinar o papel do peptídeo RALF no controle do desenvolvimento de células.

Na análise de expressão do *pAtRALF34:GFP* em microscopia confocal foi possível determinar os tecidos em que o gene *AtRALF34* é expresso. As plantas transgênicas mostraram fluorescência no hipocótilo (Figura 19), na ponta da raiz principal (provavelmente na coifa) (Figura 20), nos estômatos da parte aérea da planta, incluindo folhas (Figura 21), flores (Figura 22A) e siliqua (Figura 22B) e na extremidade de raízes laterais (Figura 23).

Estudos realizados com o *pAtRALF1:GFP* (GUERRERO-ABAD; MOURA, 2014) mostraram que este é expresso na região de diferenciação da raiz e



hipocótilo, mostrando ter uma possível complementaridade de função com a isoforma AtRALF34 na raiz.

O AtRALF34 mostrou ter atuação em regiões dos tecidos que apresentam crescimento determinado, estômatos e coifa, enquanto que a isoforma AtRALF1, a isoforma mais distante filogeneticamente do AtRALF34 entre as 9 isoformas mais próximas de tabaco, atua na região da raiz de crescimento indeterminado, mostrando um contraste entre as duas isoformas.

## **5.2 Purificação por afinidade de proteínas que interagem com o AtRALF1 *in planta***

Neste trabalho, utilizando a técnica TAP, buscou-se encontrar proteínas de membrana que estariam interagindo com o peptídeo RALF. Apesar de ter sido identificada a proteína PAK de 70 kDa, apenas um fragmento idêntico a essa proteína foi encontrado em espectrometria de massa e as repetições ainda estão sendo avaliadas (Figura 24). Alterações na metodologia como maior tempo de incubação com o reagente para ligação cruzada estão sendo realizadas. Uma das proteínas que poderiam ser capturadas é o receptor FERONIA, com aproximadamente 90 kDa. Estudos de fosfoproteômica determinaram que AtRALF1 é capaz de se ligar a este receptor quinase de membrana e assim iniciar uma cascata de fosforilação que inibe a atividade de uma bomba de prótons na membrana, aumentando o pH do apoplasto e reduzindo o alongamento celular (HARUTA et al., 2014).

## 6 CONCLUSÕES

O gene que codifica AtRALF33 quando superexpresso produz plantas semi-anãs, e quando silenciado produz plantas maiores do que plantas selvagens, assim como a isoforma AtRALF23, o que permite inferir que ambas as isoformas atuam no alongamento celular.

A isoforma AtRALF33 e AtRALF23 apresentaram papéis na expansão de células de folha e assim no controle do seu desenvolvimento.

O promotor do AtRALF34 apresentou expressão em estômatos e hipocótilo, provavelmente agindo como um fator regulatório nesses tecidos.



## REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, MARTIN.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula.**, New York: Artmed. 2009. p. 116
- ARNAULD, C.; BONNOT, C.; DESNOS, T.; NUSSAUME, L. The root cap at the forefront. **Comptes Rendus Biologies**, Paris. v. 333, p. 335-343. 2010.
- ATKINSON, N.J.; LILLEY, C.J.; URWIN, P.E. Identification of genes involved in the response of Arabidopsis to simultaneous biotic and abiotic stresses. **Plant physiology**, Lancaster, v. 162, p. 2028-2041, 2013.
- BERGONCI, T.; RIBEIRO, B.; CECILIATO, P.H.O.; GUERRERO-ABAD, J.C.; SILVA-FILHO, M.C.; MOURA, D.S. AtRALF1 opposes brassinosteroid effects on roots inhibiting brassinolide-induced cell elongation and lateral root formation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, 2014. Artigo não publicado.
- 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**, New York, v. 302, p. 1956-1960, 2003.
- CAO, J.; SHI, F. Evolution of the RALF gene family in plants: Gene duplication and selection patterns. **Evolutionary bioinformatics**, Auckland, v. 8, p. 271-292, 2012.
- CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A.; PERES, L.E.P. **Manual de fisiologia vegetal.** Piracicaba: Agronômica ceres, 2005. p. 32
- CHEVALIER, E.; LOUBERT-HUDON, A.; MATTON, DP. ScRALF3, a secreted RALF-like peptide involved in cell-cell communication between the sporophyte and the female gametophyte in a solanaceous species. **The Plant journal**, Oxford, v. 73, p. 1019-1933, 2013.
- 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.
- COSGROVE, D.J. Growth of the plant cell wall. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Londres, v. 11, p. 850-86, 2005.
- COVEY, P.A.; SUBBAIAH, C.C.; PARSONS, R.L.; PEARCE, G.; LAY, F.T.; ANDERSON, M.A.; RYAN, C.A.; BEDINGER, P.A. A pollen-specific RALF from tomato that regulates pollen tube elongation. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 2, p. 703-715, 2010.
- FRIML J.; WISNIEWSKA J.; BENKOVÁ, E.; MENDGEN, K; PALME, K. Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. **Nature**. Londres, v. 415, p. 806-809. 2002.

- GENDREAU, E.; TRAAS, J.; DESNOS, T.; GRANDJEAN, O.; CABOCHE, M.; HOFTE, H. Cellular basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**. Lancaster, v. 114, p. 295-305. 1997.
- GERMAIN, H.; CHEVALIER, E.; CARON, S.; MATTON, DP. Characterization of five Ralf-like genes from *Solanum chacoense* provides support for a developmental role in plants. **Planta**, Berlin, v. 200, p. 447-454, 2005.
- GREGAN, J.; RIEDEL, C.G.; PETRONCZKI, M.; CIPAK, L.; POSER, L.; BUCHHOLZ, F.; MECHTLER, K.; NASMYTH, K. Tandem affinity purification of functional TAP-tagged proteins from cells. **Nature Protocols**. Londres, v. 5, p. 1145-1151. 2007.
- GULLY, D.; MOINIER, D.; LOISEAU, L., BOUVERET, E. New partners of acyl carrier protein detected in *Escherichia coli* by tandem affinity purification. **FEBS Letters**. Amsterdam, v. 31, p. 90-96. 2003.
- HARUTA, M.; MONSHAUSEN, G.; GILROY, S.; SUSSMAN, M.R. A cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> functional assay for identifying and purifying endogenous cell signaling peptides in *Arabidopsis* seedlings: identification of AtRALF1 peptide. **Biochemistry**, Washington, v. 47, p. 6311-6321, 2008.
- HARUTA, M.; CONSTABEL, C.P. Rapid alkalization factor in poplar cell cultures: peptide isolation, cDNA cloning, and differential expression in leaves and methyl jasmonate treated cells. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 131, p. 814-823, 2003.
- HARUTA, M.; SABAT, G.; STECKER, K.; MINKOFF, B.B.; SUSSMAN, M.R. A Peptide hormone and its receptor protein kinase regulate plant cell expansion. **Science**, New York, v. 343, p. 408-411, 2014.
- KARIMI, M.; INZÉ, D.; DEPICKER, A. GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. **Trends in Plant Science**, Killington, v. 7, p. 193-195, 2002.
- KASTIN, A.J. **The Handbook Biologically Active Peptides**. San Diego: Academic Press, 2013. p. 1595
- KNUESEL, M.; WAN, Y.; XIAO, Z.; HOLINGER, E.; LOWE, N.; WANG, W.; LIU, X. Identification of novel protein-protein interactions using a versatile mammalian tandem affinity purification expression system. **Molecular Cell Proteomics**. Bethesda, v. 11, p. 1225-1233. 2003.
- KONDO, Y.; HIRAKAWA, Y.; KIEBER, J.J.; FUKUDA, H. CLE peptides can negatively regulate protoxylem vessel formation via cytokinin signaling. **Plant and cell physiology**, Oxford, v. 52, p. 37-48, 2011.
- LAMESCH, P.; BERARDINI, T.Z.; LI, D.; SWARBRECK, D.; WILKS, C.; SASIDHARAN, R.; MULLER, R.; DREHER, K.; ALEXANDER, D.L.; GARCIA HERNANDEZ, M.; KARTHIKEYAN, A.S.; LEE, C.H.; NELSON, W.D.; PLOETZ, L.; SINGH, S.; WENSEL, A.; HUALA, E. The *Arabidopsis* information resource (TAIR):

improved gene annotation and new tools. **Nucleic Acids Research**, Londres, v. 40, p. 1202-1210, 2011.

LARKIN, J.C.; BROWN, M.L.; SCHIEFELBEIN, J. How do cells know what they want to be when they grow up? Lessons from epidermal patterning in Arabidopsis. **Annual Review of Plant Biology**. Palo Alto, v. 54, p. 403-430. 2003.

LAU, O.S.; BERGMANN, D.C. Stomatal development: a plant's perspective on cell polarity, cell fate transitions and intercellular communication. **Development**, Cambridge, v. 20, p. 3683-3692, 2012.

MATOS, J.L.; FIORI, C.S.; SILVA-FILHO, M.C.; MOURA, D.S. A conserved dibasic site is essential for correct processing of the peptide hormone AtRALF1 in *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 582, p. 3343-3347, 2008.

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

MEINDL, T.; BOLLER, T.; FELIX, G. The plant wound hormone systemin binds with the N-terminal part to its receptor but needs the C-terminal part to activate it. **Plant cell**, Rockville, v. 10, p. 1561-1570, 1998.

MINGOSSI, F.B.; MATOS, J.L.; RIZZATO, A.P.; MEDEIROS, A.H.; FALCO, M.C.; SILVAFILHO, M.C.; MOURA, D.S. SacRALF1, a peptide signal from the grass sugarcane (*Saccharum spp.*), is potentially involved in the regulation of tissue expansion. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 73, p. 271-281, 2010.

MORATO DO CANTO, A.; CECILIATO, P.H.O.; RIBEIRO, B.; ORTIZ-MOREA, F.A.; GARCIA, A.A.F.; SILVA-FILHO, M.C.; MOURA, D.S. Biological activity of nine recombinant AtRALF peptides: Implications for their perception and function in Arabidopsis. **Plant physiology and biochemistry**, Paris, v. 75, p. 45-54, 2014.

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

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, 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**, Göttingen, v. 2, p. 441-451, 2002.

OCHATT, S.J. Flow cytometry in plant breeding. **Cytometry Part A**. Hoboken. v. 73, p. 581-598. 2008.

QI, Y.; KATAGIRI, F. Purification of low-abundance Arabidopsis plasma-membrane protein complexes and identification of candidate components. **The Plant Journal**, Oxford, v. 57, p. 932-944, 2009.

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

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

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

RIGAULT, G.; SHEVCHENKO, A.; RUTZ, B.; WILM, M.; MANN, M.; SÉRAPHIN, B. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. **Nature Biotechnology**. Nova York, v. 17, p. 1030-1032. 1999.

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

SEPÚLVEDA-GARCIA, E.; ROCHA-SOSA, M. The *Arabidopsis* F-box protein AtFBS1 interacts with 14-3-3 proteins. **Plant Science**. Shannon, v. 195, p. 36-47. 2012.

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

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

TSUKAYA, H. **The Arabidopsis Book**. Rockville: Humana Press, 2013. p. 55-73..

VANDENBUSSCHE, F.; VERBELEN, J.P.; VAN DER STRAETEN, D. Of light and length: regulation of hypocotyl growth in Arabidopsis. **Bioassays**. Cambridge, v. 27, p. 275-284. 2005.

WANG, J.; RAO, S.; CHU, J.; SHEN, X.; LEVASSEUR, D.N.; THEUNISSEN, T.W.; ORKIN, S.H. A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. **Nature**, Londres, v. 444, p. 364-368, 2006.

WEIGEL, D.; GLAZEBROOK J. **Arabidopsis a Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 2002. p. 15-24.

WENGIER, D.L.; BERGMANN, D.C. On fate and flexibility in stomatal development. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**. New York, v. 77, p. 53-63. 2013.

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

WINTER, D.; VINEGAR, B.; NAHAL, H.; AMMAR, R.; WILSON, G.V., PROVART, N.J. An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. **PloS one**, São Francisco, v. 2, p. e718, 2007.

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.

XU, T.; WEN, M.; NAGAWA, S.; FU, Y.; CHEN, J.G.; WU, M.J.; PERROT-RECHENMANN, C.; FRIML, J.; JONES, A.M.; YANG, Z. Cell surface- and rho GTPase-based auxin signaling controls cellular interdigitation in Arabidopsis. **Cell**, Cambridge, v. 143, p. 99-110, 2010.





## APÊNDICES



## Apêndice A - Sequência dos iniciadores utilizados na clonagem.

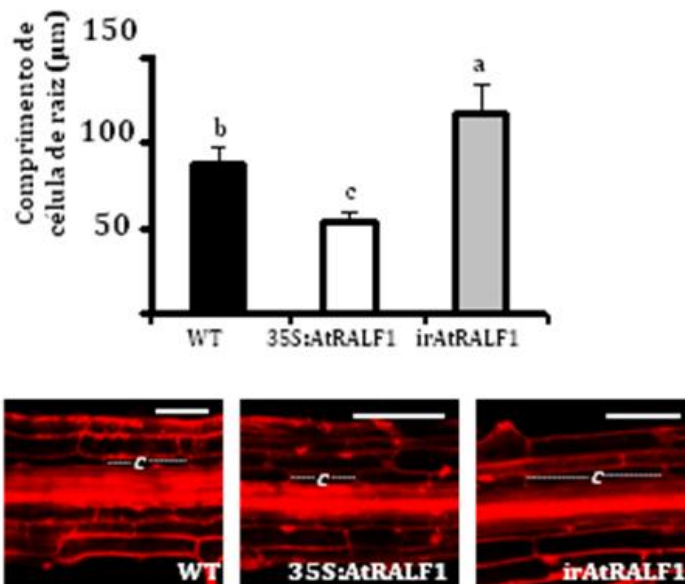
| Gene/Plasmídeo           | Sequência de iniciadores   |
|--------------------------|--|
| <i>AtRALF1</i>           | F: 5' CACCATGGACAAGTCCTTTACTCTGT 3'<br>R: 5' ACTCCTGCAACGAGCAATTT 3'   |
| <i>AtRALF19</i>          | F: 5' CACCATGGGTATCAAGAT<br>R: 5' CCCTCGAGTTAAGAAGTTTGCCTGTAGCA 3'<br>R: 5' AGAAGTTTGCCTGTAGCAG 3'                 |
| <i>AtRALF23</i>          | F: 5' CACCATGAGAGGACTCTCAGAAA<br>R: 5' TCATGAGCGCCGGCAGCGGTGAT 3'  |
| <i>AtRALF31</i>          | F: 5' CACCATGTTTAACTCTACAGCGTT 3'<br>R: 5' AACTCGAGTCATGTGTTGATGTCGTTTGT 3'<br>R: 5' TGTGTTGATGTCGTTTGTGTCTCTA 3'  |
| <i>AtRALF33</i>          | F: 5' CACCTGATATGTCAACAAGT 3'<br>R: 5' GGAGGTTTCAAAAAGT 3'   |
| <i>AtRALF34</i>          | F: 5' CACCATGGCAGCTTCGTCTTCA 3'<br>R: 5' TCTCCGGCATCGAGTGAT 3'   |
| promotor <i>AtRALF31</i> | F: 5' CACCTGTTTATGTTGCTAGAGAATACA 3'<br>R: 5' TCGATGTTGGAAATTGCAGAT 3'   |
| promotor <i>AtRALF33</i> | F: 5' CACCTTGATATGTCAACAAGTTGATACAGA 3'<br>R: 5' TGTTTCTTTCTTCTTCTTTCTCTGA 3'                                      |
| promotor <i>AtRALF34</i> | F: 5' CACCTATCAGGCTTGTGTTCAATTT 3'<br>R: 5' ATGGCGATTGTTGGGGGAAACTAGAG 3'  |
| pENTR/D-TOPO             | M13F: 5' GAAAAACGACGGCCAGT 3'<br>M13R: 5' CAGGAAACAGCTATGACC 3'  |
| pK7WG2                   | F: 35SPromotor: 5' ATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCTCTA 3'<br>R: 35STerminador: 5' TGCCTGCAGGTCAGTGGATTTTGGTTTTAGGAA 3' |
| pK7WIWG2                 | F: Intron I: 5' TTAGCATTTAACGTGTTTGCAGGTCAGCTT 3'<br>R: Intron II: 5' AACTTACAGTGAAGACACAGAAAGCCGTAA 3'            |
| pK7GWFS7                 | GFP-R: 5' TGGTGCAGATGAACTTCAGGGT 3'<br>R: 35STerminador: 5' TGCCTGCAGGTCAGTGGATTTTGGTTTTAGGAA 3'                   |

## Apêndice B - Sequência de iniciadores utilizados na análise de expressão

| <b>Gene</b>     | <b>Sequência de iniciadores</b>  |
|-----------------|--|
| <i>AtRALF1</i>  | F: 5' TTCATATGGCGACCACAAAATACATAAGCT 3'<br>R: 5' TTCTCGAGTGCACTCCTGCAACGAGCAATT 3' |
| <i>AtRAL19</i>  | F: 5' CACCGCCGCGAGGCGCAGCTACATCAGTTAC 3'<br>R: 5' CCCTCGAGTTAAGAAGTTTGCCTGTAGCA 3' |
| <i>AtRALF23</i> | F: 5' CACCGCTACGAGGAGGTACATC 3'<br>R: 5' AAAAGCTTTCATGAGCGCCGGCAGCGAGTATC 3'       |
| <i>AtRALF31</i> | F: 5' CACCGCGCAGAAACGGTACATC 3'<br>R: 5' AACTCGAGTCATGTGTTGATGTCGTTTTGT 3'         |
| <i>AtRALF33</i> | F: 5' GGGAATTCCGCAACAACGAAGTATATA 3'<br>R: 5' AAAAGCTTTTATCGCCTGCAACGAGT 3'        |
| <i>AtRALF34</i> | F: 5' TTCATATGTA CTGGCGGAGGACGAAGTA 3'<br>R: 5' TAAGCTTCTAGCGGCGGCAGCGGGTGATCG 3'  |

Apêndice C - Comprimento celular de raiz e hipocótilo de plantas transgênicas 35S:AtRALF1 e irAtRALF1. (A) Comprimento de raiz de plantas 35S:AtRALF1 (colunas brancas) e irAtRALF1 (colunas cinzas). Painéis abaixo do gráfico são imagens de confocal da zona de diferenciação de raiz. Células da endoderme de plântulas de 10 d foram medidas (n=30 células/raiz). B. Comprimento de células de hipocótilo de plantas 35S:AtRALF1 (colunas brancas) e irAtRALF1 (colunas cinzas). Painéis abaixo do gráfico são imagens de confocal da base do hipocótilo. A epiderme do hipocótilo de plântulas de 10 d foram medidas (n=6 células/hipocótilo). Barras de erro indicam o desvio padrão. As colunas seguidas pela mesma letra não são estatisticamente diferentes ( $valor-p < 0.01$ ). Barras de escala= 100  $\mu\text{m}$ . O comprimento de células representativas está indicado (c= comprimento). O experimento foi repetido pelo menos três vezes

**A**



**B**

