Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz

A inibição da expansão celular causada pelo peptídeo AtRALF1 é dependente de etileno

Akemi Lueli Niitsu

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

Piracicaba
2016

Akemi Lueli Niitsu
Bióloga

A inibição da expansão celular causada pelo peptídeo AtRALF1 é dependente de etileno

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2016

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

Niitsu, Akemi Lueli
A inibição da expansão celular causada pelo peptídeo AtRALF1 é dependente de etileno / Akemi Lueli Niitsu. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.
70 p. : il.

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

1. RALF 2. Expansão celular 3. Calose 4. Produção de etileno 5. Alcalinização I. Título

CDD 581.19256
N691a

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

DEDICATÓRIA

Dedico à minha família, amigos e professores
que acompanharam meus estudos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu professor e orientador Daniel Scherer de Moura pela oportunidade, incentivo e ensinamentos que contribuíram com meu crescimento profissional.

Aos professores Helaine Carrer responsável pelo laboratório de Biologia Molecular, Márcio de Castro Silva Filho responsável pelo laboratório de Biologia Molecular de Plantas, Ricardo Alfredo Kluge responsável pelo laboratório de Fisiologia e Bioquímica Pós-colheita pelo fornecimento de materiais e ferramentas para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos meus pais e familiares por todo apoio concedido. Aos amigos que acreditaram nos meus estudos e tiveram tamanha paciência.

Aos professores da graduação e pós-graduação que me acompanharam.

Aos técnicos de laboratório Amaral e Fátima pela constante ajuda e amizade.

Aos amigos do laboratório Andrés, Bianca, Juan, Keini, Lucas, Marina, Paulo, Tábata, Wellington que com calma e atenção me deram suporte desde o início da pesquisa.

Aos amigos Ana, Aparecida, Cindy, Karine, Larissa que caminharam comigo durante esta jornada, e todos os amigos de outros laboratórios pelo auxílio e grande amizade.

Agradeço a CAPES pela bolsa concedida, à FAPESP, CNPq e ESALQ-USP pelo auxílio financeiro e toda estrutura disponibilizada.

Agradeço todos que não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

“Lembre-se que as pessoas podem tirar tudo de você,
menos o seu conhecimento” Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO.....11
ABSTRACT 13
LISTA DE FIGURAS 15
LISTA DE ABREVIATURAS.....17
1 INTRODUÇÃO 19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....21
2.1 Peptídeos RALF 21
2.1.1 Descoberta e estrutura do peptídeo 21
2.1.2 Atividades biológicas.....24
2.1.3 Sinalização e localização 26
2.2 Etileno 27
2.2.1 Via de biossíntese do etileno.....27
2.2.2 Regulação da expansão celular pelo etileno 29
2.3 Peptídeo RALF e sua relação com outros hormônios vegetais.....29
3 MATERIAL E MÉTODOS.....31
3.1 Material vegetal e condições de crescimento.....31
3.2 Produção e purificação do peptídeo AtRALF1 recombinante.....31
3.3 Avaliação do crescimento da raiz primária em meio líquido.....32
3.4.4 Avaliação do crescimento da raiz primáriaem placas verticais contendo meio semi-sólido 33
3.5 Deposição de calose 33
3.6 Produção de etileno 34
3.7 Ensaio de alcalinização de células em suspensão.....34
3.8 Gel indicador de pH.....35
3.9 Análises estatísticas.....35
4 RESULTADOS.....37
4.1 Efeito da aplicação exógena e simultânea do AtRALF1 e do precursor do etileno ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) na inibição da raiz de arabidopsis.. 37
4.2 Efeito do tratamento de ACC em plantas com o gene AtRALF1 parcialmente silenciado 38
4.3 Efeito do AtRALF1 em plantas mutantes da via de biossíntese do etileno 39
4.4 Efeito do inibidor da biossíntese de etileno em plantas tratadas com AtRALF1..40

4.5 Efeito do inibidor da percepção de etileno em plantas tratadas com AtRALF1 .. 41
4.6 Efeito do difenileneiodônio (DPI) nas raízes de plantas tratadas com AtRALF1 43
4.7 Efeito do 3,4-DL-deidroprolina (DP) nas raízes de plantas tratadas com AtRALF1 44
4.8 Efeito da tirosina nas raízes de plantas tratadas com AtRALF1 45
4.9 Indução de calose por tratamento exógeno de AtRALF1 46
4.10 Indução de calose em plantas com *AtRALF1* parcialmente silenciado e plantas que super-expressam *AtRALF1* 47
4.11 Deposição de calose em plantas tratadas com DPI ou DP e AtRALF1 48
4.12 Efeito do AtRALF1 na produção de etileno 49
4.13 Efeito dos inibidores da biossíntese e percepção do etileno na alcalinização induzida por AtRALF1 50
4.14 Placa indicadora de pH 51
5 DISCUSSÃO 53
6 CONCLUSÃO 57
REFERÊNCIAS 59
ANEXOS 67

RESUMO

A inibição da expansão celular causada pelo peptídeo AtRALF1 é dependente de etileno

Peptídeos de sinalização ou hormonais desempenham papéis importantes nas plantas por serem determinantes no crescimento, desenvolvimento e defesa. RALF é um peptídeo ubíquo no reino vegetal e na planta modelo *Arabidopsis thaliana* os peptídeos RALF formam uma família multigênica de 37 membros alguns com expressão gênica tecido-específica e outros com expressão em toda a planta. A isoforma AtRALF1 é a mais estudada e é expressa principalmente na raiz e no hipocótilo. Uma das funções deste peptídeo é a regulação da expansão celular, um processo que também envolve auxina, giberelina, etileno, brassinosteróides e citocininas. O objetivo deste trabalho foi estudar a relação entre o AtRALF1 e o hormônio etileno, principalmente na expansão celular e alcalinização celular que são efeitos característicos do peptídeo. AtRALF1 inibe o crescimento da raiz primária porém plantas de arabidopsis tratadas simultaneamente com o peptídeo e inibidores da biossíntese ou percepção de etileno não tiveram o crescimento de suas raízes inibido. Etileno induz a deposição de calose e plantas selvagens expostas ao AtRALF1 e plantas que super-expressam *AtRALF1* exibiram depósito de calose nas células da ponta da raiz. Curiosamente, quando a alcalinização do meio de células em suspensão induzida por AtRALF1 foi avaliada perante o aumento da produção de etileno ou perante o bloqueio de sua síntese ou percepção, não foi observada alteração na resposta. Os resultados aqui apresentados demonstram que a resposta de inibição da expansão celular ocasionada por AtRALF1 é dependente de etileno e sugere que os efeitos de alcalinização do meio extracelular e da inibição do crescimento da raiz primária estão dissociados.

Palavras-chave: RALF; Expansão celular; Calose; Produção de etileno; Alcalinização

ABSTRACT

The inhibition of root growth caused by AtRALF1 is ethylene-dependent

Peptide hormones or signaling peptides play important roles that determine growth, development and defense in plants. RALF is a ubiquitous peptide in the plant kingdom and in model plant *Arabidopsis thaliana* comprises a multigene family of 37 members, some of them with tissue-specific gene expression and others that are expressed throughout the plant. AtRALF1 isoform is the most studied and is expressed in roots and hypocotyls. One of the peptide functions is the negative regulation of cell expansion, a process also controled by auxin, gibberelin, ethylene, brassinosteroids, cytokinin. The aim of this work was to study ethylene and AtRALF1 peptide relation, mainly in the cell alkalinization and inhibition of cell expansion responses that characteristic of the peptide. AtRALF1 inhibits root growth but simultaneous treatment with both AtRALF1 and inhibitors of the ethylene perception or biosynthesis show no inhibition on root growth. Ethylene increases callose deposition and wild-type plants treated with AtRALF1 or plants overexpressing the AtRALF1 gene show increased callose plate formation on root tips. Curiously, when the extracellular alkalinization induced by AtRALF1 was evaluated against ethylene production or against ethylene inhibitors, no alteration was observed. The data presented here reveal that the cell expansion inhibition caused by AtRALF1 is ethylene dependent and suggest that the extracellular alkalinization response and root growth inhibition are dissociated.

Keywords: RALF; Cell expansion; Callose; Ethylene production; Alkalinization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Árvore de semelhança de estrutura primária dos RALFs encontrados em arabidopsis. 22
Figura 2 - Nível de expressão dos genes que codificam as isoformas de RALF em arabidopsis. 23
Figura 3 - Precursor do peptídeo RALF. 24
Figura 4 - Fenótipo de plantas que super-expressam (35S:AtRALF1) e silenciam parcialmente (irAtRALF1) o gene *AtRALF1*.. 26
Figura 5 - Efeito inibitório do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) e AtRALF1 no crescimento da raiz de arabidopsis. 38
Figura 6 - Efeito do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) no crescimento da raiz em plantas com o gene AtRALF1 parcialmente silenciado (irAtRALF1). 39
Figura 7 - Efeito do tratamento exógeno de AtRALF1 em plantas mutantes da via de biossíntese de etileno. 40
Figura 8 - Efeito do inibidor da biossíntese do etileno, amino-etoxivinilglicina (AVG), na raiz de plantas tratadas com AtRALF1. 41
Figura 9 - Efeito do inibidor da percepção do etileno, 2-5-norbornadieno (NBD), na raiz de plantas tratadas com AtRALF1. 42
Figura 10 - Efeito do composto difenileneiodônio (DPI) na raiz de plantas tratadas com AtRALF1. 44
Figura 11 - Efeito do composto 3,4-DL-deidroprolina (DP) na raiz de plantas tratadas com AtRALF1. 45
Figura 12 - Efeito do aminoácido tirosina na raiz de plantas tratadas com AtRALF1. 46
Figura 13 - Deposição de placa de calose na raiz de arabidopsis tratadas com AtRALF1. 47
Figura 14 - Deposição de placa de calose na raiz de arabidopsis com AtRALF1 parcialmente silenciado e AtRALF1 super-expresso. 48
Figura 15 - Deposição de calose na raiz de arabidopsis tratada com AtRALF1 e DPI ou DP. 49
Figura 16 - Produção de etileno em células de suspensão de arabidopsis. 50
Figura 17 - Alcalinização do meio de células de suspensão de arabidopsis. 51

Figura 18 - Alcalinização da rizosfera de planta mutante insensível ao etileno. 52
Figura 19 - Modelo da esquematização do funcionamento de AtRALF1 induzindo etileno. 58

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC - 1-*aminocyclopropane-1-carboxilic acid*

ACO - *aminocyclopropane-1-carboxylic oxydase*

ACS - *aminocyclopropane-1-carboxylic synthase*

AVG - *Aminoethoxyvinylglycine*

BL - *Brassinolide*

Col-0 - Columbia-0

CTR1 - *CONSTITUTIVE TRIPLE-RESPONSE1*

DP - 3,4-DL-deidroprolina

DPI - *Diphenyleneiodonium*

EBF1 - *EIN3-BINDING F-BOX PROTEIN1*

EBF2 - EIN3-*BINDING F-BOX PROTEIN2*

ERE – ETILENO PRIMÁRIO

EXT - Extensinas

ERF - *ETHYLENE RESPONSE FACTOR*

ein3-1- *ethylene-insensitive3*-1

EIL1 - *ETHYLENE-INSENTITIVE3-LIKE1*

EIN2 - *ETHYLENE-INSENSITIVE2*

EIN3 - *ETHYLENE INSENSITIVE3*

EIN4 - *ETHYLENE-INSENSITIVE4*

GFP - *Green Fluorescent Protein*

SAM - S-adenosyl-L-methionine

ERF1 - *ETHYLENE RESPONSE FACTOR*

ERS1 - *ETHYLENE RESPONSE SENSOR1*

ERS2 - *ETHYLENE RESPONSE SENSOR2*

ETP1 - *EIN2 TARGETING PROTEIN1*

ETP2 - *EIN2 TARGETING PROTEIN2*

ETR1 - *ETHYLENE RESPONSE1*

ETR2 - *ETHYLENE RESPONSE2*

GC - Gas *Chromatography*

GRPs - proteínas arabinogalactanas

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*

HRGPs - Hydroxyproline-rich glycoprotein

IPTG - *Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosidio*

irAtRALF1 - RALF1 parcialmente silenciado

LB - Luria-Bertani

MAPK - *Mitogen-activated protein kinases*

MS - Murashig-skoog

NBD - 2,5-*norbornadiene*

O.D – *Optical Density*

PRPs - Prolina/glicoproteínas ricas em prolina

RALF - *Rapid ALkalinization Factor*

ROS - *Reactive oxygen species*

SALK - *SALK Institute for biological studies*

35S:AtRALF1 - Super-expressão de AtRALF1

wt- *wild-type*

1 INTRODUÇÃO

As plantas recebem estímulos endógenos, hormônios, e exógenos, sinais ambientais, que controlam seu crescimento e desenvolvimento. Peptídeos hormonais são pequenas proteínas que funcionam como moléculas de sinalização celular em diversos processos fisiológicos das plantas. (MOURA; SILVA-FILHO, 2006; MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 2006; FUKUDA; HIGASHIYAMA, 2011; KATSIR et al., 2011; ALBERT, 2013).

O fator de alcalinização rápida, ou RALF do inglês *Rapid ALkalinization Factor,* é um peptídeo que está envolvido na regulação da expansão celular (MATOS et al., 2008; MINGOSSI et al., 2009; HARUTA et al., 2014; BERGONCI et al., 2014). No genoma de arabidopsis os peptídeos RALF constituem uma família multigênica composta por 37 membros que codificam diferentes isoformas do RALF, AtRALFs, podendo estes ter elevada ou baixa expressão, ou ainda, expressão tecido-específica ou ubíqua (MOURA; SILVA-FILHO 2006; LAMESCH et al., 2012; MORATO DO CANTO et al., 2014). O primeiro RALF isolado foi purificado de extratos protéicos de folha de tabaco utilizando-se do ensaio de alcalinização do meio extracelular de suspensões celulares (PEARCE et al., 2001). Atualmente, as atividades biológicas deste peptídeo incluem a inibição do crescimento e alongamento da raiz e hipocótilo, inibição do crescimento do tubo polínico, alcalinização do meio extracelular, mobilização de cálcio e indução de uma quinase ativada por mitógeno (MAPK) (PEARCE, et al., 2001; MATOS, et al., 2008; HARUTA et al., 2008; MINGOSSI et al., 2010; COVEY et al., 2010). A isoforma AtRALF1 apresenta expressão gênica em raiz e hipocótilo, alcaliniza o meio extracelular, inibe a expansão celular e induz genes envolvidos com rearranjo da parede celular (MORATO DO CANTO et al., 2014; BERGONCI et al., 2014).

Ainda pouco se sabe sobre o efeito ou a dependência das atividades biológicas do peptídeo RALF com relação a outros hormônios vegetais. Assim, o objetivo deste trabalho consistiu em investigar a relação entre AtRALF1 com o hormônio etileno, analisando se há dependência entre eles e, principalmente, qual o papel do etileno nas respostas do peptídeo AtRALF1 na expansão celular e alcalinização do meio extracelular.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Peptídeos RALF

2.1.1 Descoberta e estrutura do peptídeo

Para o desenvolvimento de seres multicelulares há vários componentes que se relacionam para coordenar os inúmeros processos envolvidos. Neste sentido, a comunicação intercelular é essencial e desempenha um papel importante em processos básicos como o desenvolvimento, crescimento, defesa e reprodução. Desde sua descoberta em plantas no início da década de 90, os peptídeos de sinalização ou hormonais tem se mostrado cada vez mais importantes na regulação da defesa, reprodução e desenvolvimento vegetais (RYAN et al., 2002; MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 2006; MOURA; SILVA-FILHO, 2006; SUGANO et al., 2010).

Durante uma tentativa de isolar o peptídeo hormonal sistemina de plantas de tabaco, um outro peptídeo que causava uma rápida e forte alcalinização do meio extracelular de suspensões celulares sem, no entanto, induzir uma resposta de defesa, foi isolado (PEARCE et al., 2001). Os peptídeos RALF são ubíquos no reino vegetal, tendo sido encontrados em todas as espécies vegetais em que foi pesquisado incluindo vegetais superiores e inferiores (MOURA; SILVA-FILHO; 2006).

Utilizando-se de homologia de sequência, os 37 membros da família RALF de arabidopsis podem ser organizados em três grupos principais: I, II, III (Figura 1). Baseado em dados de expressão gênica in sílico, essas 37 isoformas apresentam tanto expressão tecido-específica quanto ubíqua (Figura 2). A isoforma originalmente isolada de tabaco, quando utilizada na análise de similaridade de estrutura primária juntamente com as isoformas encontradas em arabidopsis, forma um grupo com nove isoformas compreendendo um sub-grupo da família III (Figura 1) (MORATO DO CANTO et al., 2014).

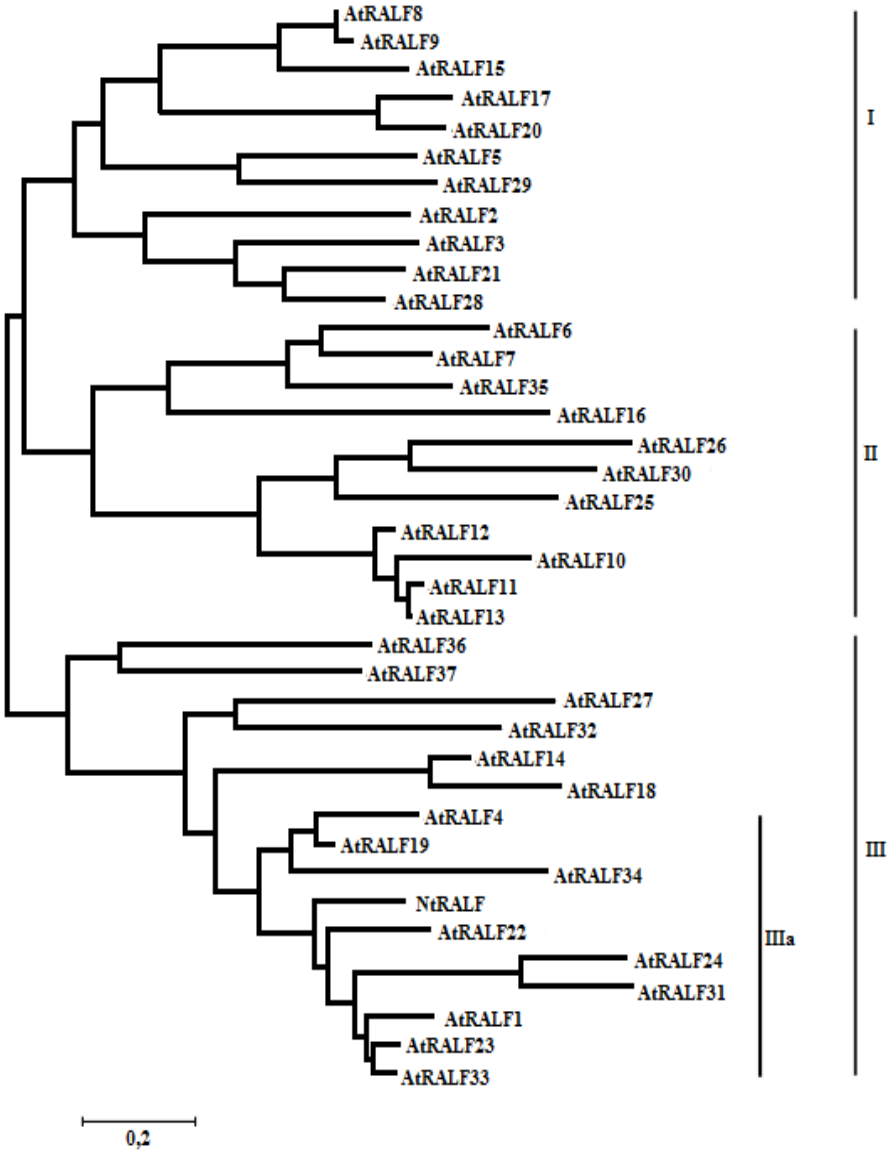


Figura 1 - Árvore de semelhança de estrutura primária dos RALFs encontrados em arabidopsis. O RALF de tabaco foi incluído para comparação (NtRALF). Os peptídeos estão organizados em três grupos I, II, III e o grupo IIIa apresenta os 9 peptídeos de arabidopsis com as características conservadas da isoforma de tabaco. (Fonte: Guerreiro-Abad JC e MOURA DS (Dados não publicados)

O peptídeo RALF isolado primeiramente de tabaco possui 49 aminoácidos e é derivado de um precursor maior. Seu precursor é uma pré-pro-proteína de 115 aminoácidos que pode ser separada em três regiões distintas: uma porção N-terminal que apresenta uma sequência de direcionamento para a via secretória de 23 aminoácidos, uma região intermediária de função desconhecida com 43 aminoácidos e a região da porção C-terminal que compreende o peptídeo biologicamente ativo de 49 aminoácidos (Figura 3A). O peptídeo maduro (49 aminoácidos) apresenta duas características essenciais para a atividade: o motivo -

YISY- e quatro cisteínas que formam duas pontes dissulfeto. Outra característica da estrutura primária do precursor é a presença de um sítio dibásico, dupla arginina, envolvido no reconhecimento da enzima responsável pelo processamento do precursor (PEARCE et al., 2001; MATOS et al., 2008; SRISVASTAVA et al., 2009) (Figura 3B).

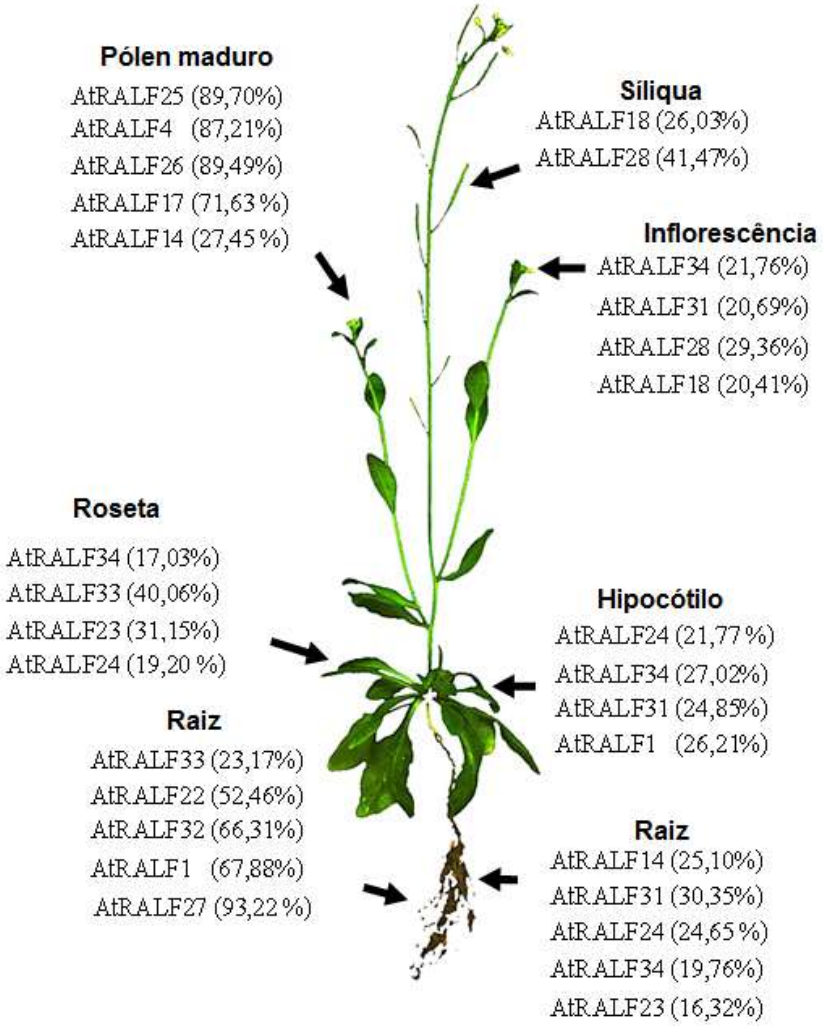
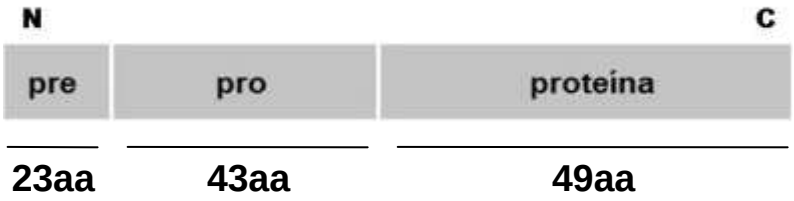


Figura 2 - Nível de expressão dos genes que codificam as isoformas de RALF em arabidopsis. A porcentagem mostrada de expressão dos RALFs em diferentes órgãos é em relação à expressão total
Fonte: Guerreiro-Abad JC e Moura DS (Dados não publicados)

A região contendo o motivo –YISY- é essencial para a atividade de alcalinização. A isoleucina no motivo –YISY-, um aminoácido hidrofóbico, quando trocada por uma alanina, prejudica a alcalinização do meio (PEARCE et al., 2010). Da mesma maneira, quando a leucina da posição 11 do peptídeo é substituída por uma alanina também compromete a atividade do peptídeo.

A



B

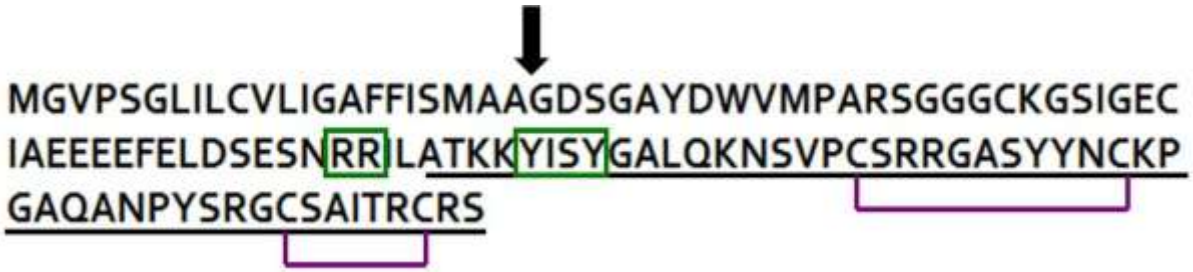


Figura 3 - Precursor do peptídeo RALF. (A) Esquema do precursor pré-pro-proteína do peptídeo RALF. (B) Estrutura primária da pre-pro-proteína precursora do NtRALF indicando o sítio dibásico (dupla arginina), o peptídeo maduro sublinhado mostrando o motivo YISY e as pontes dissulfeto formadas pelas cisteínas

2.1.2 Atividades biológicas

Das atividades biológicas que o peptídeo RALF possui, a alcalinização rápida do meio extracelular de células em suspensão foi a primeira a ser observada e foi a que ocasionou sua descoberta. Além de induzir a alcalinização, o peptídeo RALF causa o aumento de Ca^{2+} no citosol, a ativação de forma rápida de uma quinase ativada por mitógeno (MAPK) e a inibição do crescimento da raiz primária e do hipocótilo (PEARCE et al., 2001; MATOS et al., 2008; HARUTA et al., 2008).

Nove peptídeos RALF de arabidopsis foram obtidos através de expressão heteróloga em *Escherichia coli* e suas atividades biológicas foram investigadas nos ensaios de inibição de raiz, expansão do hipocótilo, alcalinização e mobilização de cálcio (MORATO DO CANTO et al., 2014). Todos os peptídeos produzidos, AtRALF1, 4, 19, 22, 23, 24, 31, 33 e 34, apresentam as características de estrutura primária essenciais para a atividade do peptídeo RALF e somente o AtRALF4 não foi capaz de inibir o crescimento da raiz e hipocótilo, sendo contudo, capaz de inibir o alongamento do tubo polínico (MORATO DO CANTO et al., 2014).

Em estudos com *Nicotiana attenuata,* foi observado um aumento do crescimento de raízes quando a única isoforma do peptídeo existente nessa espécie, NaRALF, foi silenciada (WU et al., 2007). Bergonci et al. (2014), ao silenciar o gene AtRALF1 (irAtRALF1) em arabidopsis, notaram um aumento do comprimento das células de raízes e da planta, tornando-as maiores em comparação às plantas selvagens, enquanto que plantas que super-expressam o *AtRALF1* demonstram um fenótipo semi-anão com severa redução em vários órgãos vegetais quando comparadas a plantas selvagens (Figura 4) (MATOS et al., 2008). O fenótipo semi-anão também foi observado na super-expressão de outras duas isoformas do RALF de arabidopsis, AtRALF8 e AtRALF23 (SRIVASTAVA et al., 2009; ATKINSON et al., 2013).

Em cana-de-açúcar quando o peptídeo é adicionado ao meio de cultivo de micro-callus ocorre a inibição da expansão celular demonstrada pela ausência de células alongadas. Foi observada também a diminuição do crescimento de hipocótilo em plantas crescidas na ausência de luz e na presença de AtRALF1 (MINGOSSI et al., 2010).

Alguns genes envolvidos com rearranjo da parede celular são induzidos por tratamento exógeno de AtRALF1 e também tem expressão elevada em plantas que super-expressam AtRALF1 (BERGONCI et al., 2014). Os genes induzidos por AtRALF1 codificam para: proteínas ricas em prolina, *AtPRP1* e *AtPRP3*, uma glicoproteína rica em hidroxiprolina, *AtHRGP2*, e uma proteína xiloglucana endotransglucosilase, *TCH4*. Estes genes sugerem que a inibição do crescimento da raiz causada pelo peptídeo AtRALF1 poderia ser consequência de rearranjo da parede celular. Uma das hipóteses para a inibição da expansão seria a antecipação do enrijecimento celular normal causado pelo tratamento exógeno com o AtRALF1 (BERGONCI et al., 2014).

Figura 4 - Fenótipo de plantas que super-expressam (35S:AtRALF1) e silenciam parcialmente (irAtRALF1) o gene *AtRALF1.* Uma planta selvagem Col-0 (WT) é mostrada para comparação
Fonte: Bergonci et al. (2014)

2.1.3 Sinalização e localização

Recentemente, através da fosfoproteômica e de plantas de arabidopsis tratadas com AtRALF1, foram identificadas várias proteínas cuja fosforilação é induzida por AtRALF1. Uma das proteínas identificadas foi a FERONIA. FERONIA é uma proteína de membrana com domínio quinase que possui um domínio extracelular denominado de malectina que reconhece AtRALF1. Neste trabalho foi demonstrado que FERONIA é um dos receptores de AtRALF1 e que induz fosforilações que resultam na inativação da bomba de próton-ATPase AHA2, levando a inibição do transporte de prótons para o apoplasto, aumentando o pH do meio extracelular (HARUTA et al., 2014). Segundo estes autores a redução da expansão celular seria consequência da elevação do pH extracelular, contrapondo-

se a acidez necessária para a expansão apregoada pela teoria do crescimento ácido. O mutante com perda de função de FERONIA (*fer4)* exibe maior atividade de próton-ATPase e acidifica o meio extracelular rapidamente. Este mutante é insensível ao efeito inibitório no crescimento de raiz causado por AtRALF1 mas somente quando as plantas foram tratadas com baixas concentrações deste peptídeo. Quando *fer4* foi tratada com concentrações maiores (≥ 2μM), o crescimento da raiz primária foi inibido.

Ensaios de localização do gene repórter GUS quando fusionado ao promotor de *AtRALF1* mostraram acúmulo da proteína β-glucuronidase na zona de diferenciação de raízes e mais tarde no hipocótilo (HARUTA et al., 2008). Estudando transporte de proteínas, o cDNA que codifica o RALF de tabaco quando fusionado a GFP (*Green Fluorescent Protein*) resultou na localização, inicialmente, no retículo endoplasmático, e, em 5 dias de inoculação, foi localizado na parede celular. No 7º dia de inoculação apresentou localização apenas na parede celular (ESCOBAR et al, 2003).

Em *Solanum chacoense*, cinco isoformas (*ScRALF1-5*) foram analisadas de bibliotecas de cDNA de ovário e óvulos fertilizados com expressão diferenciada nos estágios de desenvolvimento e maturação dos frutos. Observou-se que a expressão dos *ScRALF1-5* é menor no período de polinização e fertilização e aumenta durante o período de maturação dos frutos (GERMAIN et al., 2005).

2.2 Etileno

2.2.1 Via de biossíntese do etileno

O etileno (C_2H_4) é um hormônio produzido por todo segmento das plantas superiores sendo que estresses bióticos e abióticos podem ocasionar aumento da produção deste gás (WANG et al., 2002). Este hormônio atua restringindo a expansão celular e tem papel importante na germinação, senescência, abscisão e amadurecimento de fruto (ABELES et al., 1992). A tríplice resposta são três respostas morfológicas características de plântulas crescidas no escuro e expostas ao etileno, o qual ocorre a inibição do alongamento da raiz e do hipocótilo, intumescimento do hipocótilo e aumento exagerado da curvatura do gancho apical em arabidopsis e tomateiro (BLEECKER et al., 1988; GUZMAN; ECKER, 1990).

O precursor do etileno S-adenosil-metionina (SAM) é sintetizado a partir do aminoácido metionina e então é convertido ao ácido 1-amino-ciclopropano 1-carboxílico (ACC), na presença de ar, através da enzima ACC sintase (ACS). O etileno é produzido a partir de ACC pela ação da ACC oxidase (ACO). Essas duas enzimas, ACS e ACO, fazem parte de uma família multigênica cuja expressão de seus membros pode ser alterada por fatores internos ou externos (KENDE; ZEEVAART, 1997).

O etileno se liga aos receptores presentes na membrana do retículo endoplasmático e assim ativa a sinalização celular levando a transcrição de genes específicos e ativação de enzimas culminando nas respostas fisiológicas da planta ao etileno (ARSHAD, FRNAKENBERGER; 2002). Em arabidopsis há 5 receptores de etileno, ETR1 (ETHYLENE RESPONSE1), ETR2, ERS1 (ETHYLENE RESPONSE SENSOR1), ERS2, EIN4 (ETHYLENE-INSENSITIVE4), (CHANG et al., 1993; HUA et al.,1998; KENDRICK; CHANG, 2008 ; CHEN et al., 2002).

Na ausência do etileno os receptores estão ativos, reprimindo as respostas do etileno através da interação/ativação da proteína CTR1 (CONSTITUTIVE TRIPLE-RESPONSE1) a qual age como um regulador negativo na via de sinalização de etileno. CTR1 atua na transdução de vários sinais externos de regulação, nas rotas de sinalização de desenvolvimento e fosforila o domínio C-terminal da proteína EIN2 (ETHYLENE-INSENSITIVE2) (ALONSO et al., 1999; GAO et al., 2003; KIEBER et al., 1993; JU et al., 2012). Mutantes de CTR1 exibem fenótipo de resposta constitutiva ao etileno porque na presença do etileno os receptores param de reprimir essas respostas desativando a CTR1 (KIEBER et al., 1993). CTR1 inativa EIN2 fosforilando o C-terminal desta. O nível de EIN2 é negativamente regulado por duas proteínas F-box ETP1/ETP2 (*EIN2 TARGETING PROTEIN1/2)* via proteassomo 26S. O etileno inibe a degradação de EIN2 (QIAO et al., 2009) assim, EIN2 aciona a família EIN3/EIL1 (ETHYLENE INSENSITIVE3 / ETHYLENE-INSENTITIVE3-LIKE1) presentes no núcleo celular que normalmente são marcados para degradação por outras proteínas F-box EBF1/2 (EIN3-BINDING F-BOX PROTEIN1/2) (CHAO et al., 1997). Mutações na proteína F-box EBF2 levam ao acúmulo de proteína EIN3 aumentando a resposta ao etileno (WANG et al., 2009). EIN3/EIL1 se ligam ao elemento de resposta ao etileno primário (ERE) levando a indução de ERF1 (ETHYLENE RESPONSE FACTOR) que faz a transcrição de genes responsivos ao etileno (SOLANO et al., 1998).

2.2.2 Regulação da expansão celular pelo etileno

Em poucos minutos de exposição ao etileno ou ao ACC, há um bloqueio na expansão celular da raiz de arabidopsis consequência da falta de expansão celular (LE et al., 2001). O excessivo acúmulo de espécies reativa de oxigênio (ROS) no apoplasto de plantas tratadas com ACC resulta no aumento da atividade de enzimas como peroxidases e NADPH oxidases, envolvidas na produção de ROS que é crucial para limitar o alongamento celular (BOLWELL et al., 2002; FOREMAN et al., 2003).

A produção de ROS no apoplasto também pode causar o *crosslink* de proteínas da parede celular tais como as glicoproteínas ricas em hidroxiprolinas (HRGPs) que também estão relacionadas ao mecanismo da restrição do alongamento celular (BRISSON et al., 1994; IIYAMA et al., 1994; KNOX, 1995).
O termo HRGPs é usado para identificar 4 grupos majoritários de proteínas que compõem a parede celular: extensinas (EXT), lectinas solanáceas e proteínas arabinogalactanas (GRPs), proteínas ricas em prolina (PRPs) (SHOWALTER, 1993).

Além das modificações da parede, alterações no transporte simplástico foram consideradas importantes no controle do alongamento da raiz (ROBERTS; OPARKA, 2003). Deposição de calose (1→3)-β-glucan no plasmodesmo é um dos meios de inibição do transporte simplástico em trigo (*Triticum aestivum*) (SIVAGURU et al., 2000). Cnodder et al. (2005) descreve uma forte deposição de calose em plantas mutantes de *eto2* (*ETHYLENE-OVERPRODUCER2*) que produz etileno em excesso.

2.3 Peptídeo RALF e sua relação com outros hormônios vegetais

Pouco se sabe sobre o peptídeo RALF e sua relação com outros hormônios vegetais. Em 2003, Haruta e Constabel reportaram que células em suspensão de álamo (*Populustrichocarpa x Populusdeltoides*) têm os genes de RALF inibidos quando tratadas com metil jasmonato enquanto que o tratamento com os hormônios belziladenina e ácido naftaleno acético não causaram efeito significativo na expressão de genes *RALF*.

Em arabidopsis, plantas tratadas com Brassinolide (BL) diminuem a expressão do gene *AtRALF23* e plantas que super-expressam o *AtRALF23*

adquirem insensibilidade ao tratamento com BL, não apresentando hipocótilo alongado como esperado (SRIVASTAVA et al., 2009). Em estudos semelhantes foi demonstrado que o gene *AtRALF1* não é reprimido pelo tratamento com BL, porém plantas que super-expressam *AtRALF1* são insensíveis a BL, não apresentando as respostas típicas ao tratamento com este hormônio (BERGONCI et al., 2014). Além disso, genes da via de biossíntese de brassinosteróide que são reprimidos por BL foram induzidos por AtRALF1 (BERGONCI et al., 2014; HATURA et al., 2014).

Haruta et al. (2014) demonstraram que em arabidopsis o AtRALF1 altera o perfil de genes envolvidos na via de auxina, giberelina e etileno. AtRALF1 induz os genes *ERF6, 13* (*ETHYLENE RESPONSE FACTOR*) que codifica para um fator de transcrição na via de transdução de sinal do etileno e esta isoforma também induz *ACS6, 11*. Mutantes *ein3-1* (*ETHYLENE-INSENSITIVE3*) apresentam maior nível de expressão do gene *AtRALF8*, sendo totalmente insensíveis ao etileno (ATKINSON et al., 2013). SUN et al (2015) demonstraram que *AtRALF23*, *31* e *33* são induzidos por etileno.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e condições de crescimento

Plantas selvagens (wt) de *Arabidopsis thaliana* ecótipo Columbia (Col-0) foram crescidas sob 16h de luz (200µmol/m^2s) e 8h de escuro a 22ºC e 18ºC, respectivamente, em câmaras Conviron ATC26. Sementes de arabidopsis foram cultivadas em placas de Petri plásticas estéreis contendo meio de cultura MS 0,5X (MURASHIGE; SKOOG, 1962) pH 5,7, sem sacarose e sem vitaminas (2,165g/L M524 *Basal Salt Mixture PhytoTechnology Laboratories*) como descrito previamente (PEARCE et al., 2001). Alternativamente, as plantas também foram crescidas em casa de vegetação sob regime de 14h de luz e 10h de escuro a 28ºC e 20ºC respectivamente. As sementes foram colocadas em vasos contendo uma mistura de substrato e vermiculita (2:1), que foram regados diariamente com solução diluída dos fertilizantes Casa Verde Foliar Dimy (3,25mL/L) e Casa Verdes Raiz Dimy (3,25mL/L).

Os mutantes da via de etileno *ein2, ers1, etr1, etr2* foram adquiridos através do Instituto SALK (*SALK Institute for biological studies*). Plantas transgênicas que super-expressam *AtRALF1* (35S:AtRALF1) foram geradas por Matos et al. (2008) e plantas transgênicas que silenciam parcialmente *AtRALF1* foram geradas por Bergonci et al. (2014).

3.2 Produção e purificação do peptídeo AtRALF1 recombinante

Para a produção do peptídeo AtRALF1 recombinante a região codante que corresponde à sequência do peptídeo ativo (aminoácidos 72 a 120), foi amplificada por PCR convencional a partir do DNA genômico e clonado no vetor de expressão pET-28b (Matos et al., 2008). O peptídeo foi fusionado a uma sequência de histidinas no N-terminal para facilitar a purificação em cromatografia de afinidade utilizando resina de níquel.

Colônias contendo o vetor de interesse foram cultivadas em meio LB, triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 10g/L e pH 7,5, estéril a 37ºC por 16h, sob agitação de 200rpm na presença do antibiótico canamicina (50µg/mL). Após este período de pré-inoculação, as culturas foram transferidas para 500mL do mesmo

meio e foram mantidas sob as mesmas condições até atingir a O.D. (densidade ótica) de 0,6. Atingida esta O.D., as culturas foram induzidas a produzir o peptídeo recombinante por 4h através da adição ao meio de 1mM do indutor Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosidio (IPTG). Após o período de indução as células bacterianas foram coletadas por centrifugação em temperatura ambiente, 5000rpm por 8min e o precipitado congelado -20ºC. Posteriormente, para a purificação da proteína de interesse, as bactérias foram ressuspendidas em tampão de lise (100mM NaH_2PO4, 10mM, Tris-HCL, 8M ureia, pH8) e deixadas em agitação por 40min. A lise foi feita sob pressão de 1500psi em bomba de ruptura celular por pressão de gás nitrogênio (*Parr Instrument Co*., IL, USA), seguido de centrifugação a 22ºC, 10.500rpm por 40min. O sobrenadante foi aplicado em coluna de cromatografia de afinidade com resina de níquel (Ni-NTA Qiagen®) contendo o tampão de ligação (100mM NaH_2PO4, 20mM, Tris-HCl, 8M uréia, pH8). A coluna foi lavada com 5vol de tampão de lavagem (100mM NaH_2PO4, 10mM, Tris-HCl, 8M ureia, pH 6,3) e a proteína de interesse foi eluída em 3mL de tampão de eluição (100mM NaH_2PO4, 10mM, Tris-HCl, 8M ureia, pH 3,3). Para a retirada da uréia foi feita diálise contra 16L de 0,2% (v/v) de ácido fórmico divididos em quatro etapas de 24h em 4ºC sob leve agitação. Após a diálise a amostra foi liofilizada e quantificada em HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*).

3.3 Avaliação do crescimento da raiz primária de plantas em meio líquido

Para ensaio de inibição do crescimento da raiz primária, sementes de arabidopsis foram esterilizadas superficialmente com hipoclorito de sódio 50%, lavadas 4 vezes com água Milli-Q esterilizada e mantidas a 4ºC. Após 4d, as sementes foram colocadas em placas contendo 1mL de meio MS 0,5X líquido sob agitação suave em sala de crescimento sob 16h de luz ($150\mu E.m^{-2}.s^{-1}$) e 8h de escuro a 22ºC e 18ºC, respectivamente, durante 48h. Em seguida, foi adicionado o peptídeo recombinante AtRALF1 e/ou precursores e inibidores conforme descrito em cada experimento. Para AtRALF1 usou-se a concentração de 2µM e para o ácido 1-amino-ciclopropano 1-carboxílico (ACC) foi usado uma concentração de 10µM. O inibidor da biossíntese do etileno que bloqueia a conversão de SAM a ACC, amino-etoxivinilglicina (AVG), foi utilizado na concentração de 50µM (ARMHEIN; WENKER, 1979; BANGERTH, 1978; ADAMS; YANG, 1977) e o antagonista 2,5-norbornadieno

(NBD) foi utilizado na concentração de 10µM (SISLER; PIAN, 1973, BLEECKER; ESTELLE; KENDE, 1987). Para o registro fotográfico, as plantas foram retiradas da placa e foram colocadas em placa contendo ágar bacteriológico. As imagens foram registradas com a máquina fotográfica Sony DSC H300 e para medição do tamanho da raiz usou-se o programa ImageJ (*National Institutes of Health*, *USA*).

Mutantes da via de biossíntese do etileno foram tratados nas mesmas condições com AtRALF1 em concentrações de 2µM e 5µM. Nos experimentos com o inibidor da NADPH-oxidase, o difenileneiodônio (DPI), as plantas (48h) foram primeiramente tratadas com 2µM de AtRALF1 e, após 3d foram expostas por 3h ao tratamento com 2µM e 4µM de DPI. O mesmo procedimento foi adotado para experimentos com o inibidor das modificações da parede celular, o 3,4-DL-deidroprolina (DP) e o aminoácido tirosina, ambos utilizados na concentração final de 500µM. O experimento foi repetido e foram obtidos resultados semelhantes.

3.4 Avaliação do crescimento da raiz primária em placas verticais contendo meio semi-sólido

Sementes de arabidopsis foram esterilizadas superficialmente com hipoclorito de sódio 50%, lavadas 4 vezes com água Milli-Q esterilizada e foram mantidas em 4ºC por 4d. Plantas foram crescidas em placas posicionadas na vertical contendo meio MS0,5X, pH 5,7 e 8g/L de *Phytagel*® (Sigma). As placas foram mantidas durante 7 dias sob 16h de luz (150µE.m^{-2}.s^{-1}) e 8h de escuro a 22ºC e 18ºC respectivamente. O experimento foi repetido e foram obtidos resultados semelhantes.

3. 5 Deposição de calose

Para análise da deposição de calose, plantas de arabidopsis foram crescidas em placas posicionadas verticalmente contendo meio MS 0,5X. Passados 5d, as plantas foram transferidas para novas placas contendo meio MS 0,5X líquido acrescido de AtRALF1 nas concentrações de 0,5µM ou 1µM durante 3h. As plantas foram visualizadas sob luz UV (ultravioleta) em microscópio confocal (Olympus FV1000), 405nm de excitação e 725nm de emissão, após serem coradas com azul de anilina 0,1% e 1M de glicina (2:3) em água milli-Q estéril por 5min. Plantas

tratadas simultaneamente com 2µM de DPI ou 500µM de DP e 1µM de AtRALF1 também foram analisadas sob as mesmas condições (DESPREZ et al., 2002; CNODDER et al., 2005; CHEN et al., 2009). O experimento foi repetido e foram obtidos resultados semelhantes.

3.6 Produção de etileno

Para a análise da produção de etileno, foram usadas células em suspensão de arabidopsis MM1 (MENGES; MURRAY, 2002) mantidas em meio de cultura MS com vitaminas sob luz constante, a 25ºC e sob agitação a 120rpm. As culturas foram mantidas por transferências semanais de 8mL de células para 80mL de meio de cultura.

Dois mililitros da suspensão celular no quinto dia após a transferência foram colocados em frascos tipo penicilina de 20mL com tampa de borracha para isolamento do ar do frasco e posterior retirada do gás interno por meio de agulha e seringa. Logo após serem transferidas para os frascos, as células foram tratadas com 2µM ou 5µM de AtRALF1 e/ou 10µM ACC, 50µM AVG ou 10µM NBD conforme indicado. Os frascos contendo as células em suspensão foram mantidos sob agitação de (120rpm) em luz constante a 25ºC decorridas 24h, o conteúdo gasoso dentro do frasco foi retirado e analisado por cromatografia gasosa (GC). O experimento foi repetido e foram obtidos resultados semelhantes.

3.7 Ensaio de alcalinização de células em suspensão

As células em suspensão de arabidopsis MM1 (MENGES; MURRAY, 2002) foram mantidas conforme descrito anteriormente. Para os ensaios de alcalinização 1mL da suspensão (5d após a transferência) foi distribuído em placas de 24 poços (1mL/poço). Antes do ensaio as células foram deixadas na placa por 1h sob agitação em 120rpm para estabilizar o pH do meio. Após este tempo foram adicionados 2µM ou 5µM de AtRALF1 e/ou 10µM ACC, 50µM AVG ou 10µM NBD. O pH do meio das suspensões celulares foi medido 15min após os tratamentos utilizando-se o pHmetro modelo Orion 350 com uma sonda de pH semi-micro Orion. O experimento foi repetido e foram obtidos resultados semelhantes.

3.8 Gel indicador de pH

Placas com gel indicador de pH foram feitas para análise do pH da rizosfera. As plantas de arabidopsis foram crescidas por 10d em placa posicionada verticalmente contendo meio MS 0,5X sem vitaminas e sem sacarose a pH 5,7 porém para evitar danos na hora da retirada das plantas usou-se 12g/L de *Phytagel* ®. Decorridos os 10d, as plantas foram transferidas para placa de gel indicador de pH contendo 0,006% de púrpura de bromocresol, $CaSO_4$ (1mM), 2,3g/L *Phytagel* ® em água destilada com pH final de 5,7 (WU et al., 2007). Aproximadamente 25 plantas foram tratadas com o peptídeo AtRALF1 na concentração de 5µM durante 15min. Após o tratamento, as plantas foram retiradas do meio, colocadas em papel absorvente para retirada do excesso de solução e transferidas para a placa de gel indicador de pH. Após 30min de contato com o meio indicador de pH foi feito o registro fotográfico com a máquina Sony DSC H300. O experimento foi repetido e foram obtidos resultados semelhantes.

3.9 Análises estatísticas

Para as análises estatísticas foi usado o programa *Infostat Statistics Base package* (version 2012e, Córdoba, Argentina). O teste de Tukey foi usado para comparação de médias, juntamente com a análise de variância. O teste *t* também foi utilizado para comparação de médias (STEEL et al., 1996).

4 RESULTADOS

4.1 Efeito da aplicação exógena e simultânea do AtRALF1 e do precursor do etileno ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) na inibição da raiz de arabidopsis

O tratamento exógeno com etileno causa inibição da expansão das células da raiz e esta inibição está associada a indução de ligações cruzadas entre proteínas da parede celular, produção de espécies reativas de oxigênio e deposição de calose provavelmente levando a um enrijecimento precoce da parede celular (CNODDER, et al., 2005). De maneira semelhante, o peptídeo AtRALF1 inibe a expansão celular em raízes de arabidopsis envolvendo genes de rearranjo da parede celular (PEARCE et al., 2001; HARUTA et al., 2008; BERGONCI et al. 2014). Com o intuito de investigar o envolvimento do etileno nas respostas do peptídeo AtRALF1, plantas de arabidopsis foram tratadas com o precursor do etileno ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) isoladamente ou em conjunto com o peptídeo (Figura 5).

Raízes de plantas selvagens quando tratadas com o peptídeo AtRALF1 cresceram aproximadamente 35% menos que as raízes de plantas tratadas com água (controle). O precursor do etileno ACC inibiu 55% do crescimento da raiz e a adição conjunta do ACC e AtRALF1 não teve efeito superior ao da aplicação do ACC isoladamente. O resultado sugere um efeito não aditivo na inibição causada por AtRALF1 e ACC.

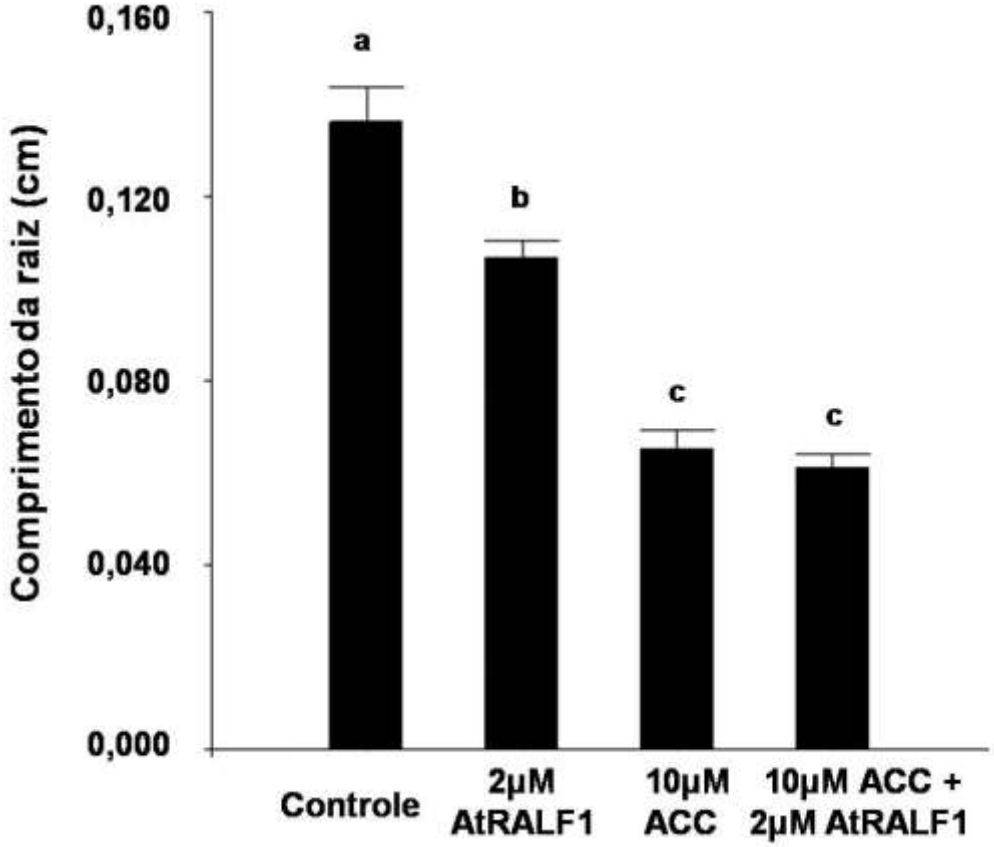


Figura 5 - Efeito inibitório do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) e AtRALF1 no crescimento da raiz de arabidopsis. Sementes de plantas selvagens foram germinadas em MS 0,5X líquido, após dois dias, 2µM de AtRALF1 e 10µM de ACC foram adicionados ao meio e o crescimento da raiz foi medido no 3º dia da exposição ao tratamento. Os valores são as médias do Desvio Padrão de pelo menos 30 plântulas. As medidas com a mesma letra não são significativamente diferentes entre si (teste de Tukey, $P<0,05$).

4.2 Efeito do tratamento de ACC em plantas com o gene AtRALF1 parcialmente silenciado

Plantas de arabidopsis com o gene AtRALF1 parcialmente silenciado (irAtRALF1) exibem raízes maiores que plantas selvagens (BERGONCI et al., 2014). Para avaliar o efeito do etileno nesta resposta, as plantas parcialmente silenciadas foram tratadas com ACC e o crescimento da raiz foi mensurado.

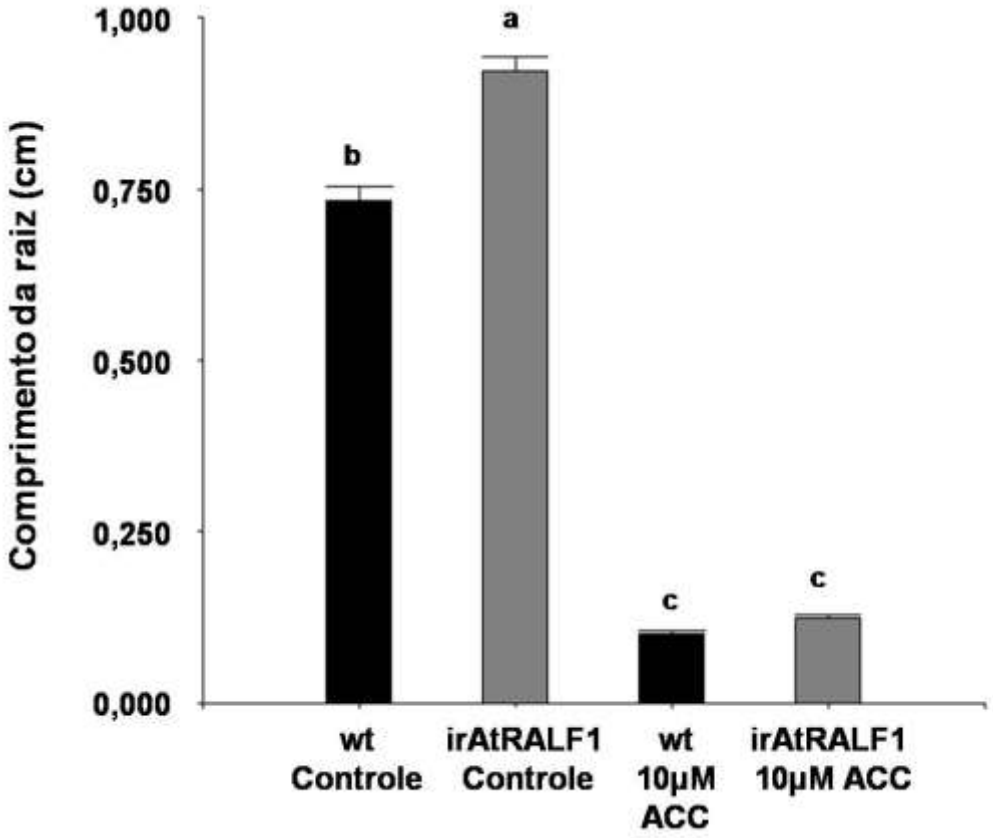


Figura 6 - Efeito do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) no crescimento da raiz em plantas com o gene AtRALF1 parcialmente silenciado (irAtRALF1). Sementes de arabidopsis foram germinadas em meio MS 0,5X semi-sólido contendo 10µM de ACC ou sem ACC para controle. Os valores são as médias do Desvio Padrão de pelo menos 30 plântulas. As medidas com a mesma letra não são significativamente diferentes entre si (teste de Tukey, $P<0,05$)

Plantas irAtRALF1 submetidas ao tratamento com ACC, em meio MS 0,5X contendo fitagel, exibiram raízes menores que as plantas controle mas sem diferenças com relação as plantas selvagens tratadas da mesma forma (Figura 6). Os resultados demonstram que a inibição causada por etileno é independente da presença do AtRALF1 e que o etileno, na via de sinalização em resposta ao AtRALF1, atua depois do peptídeo.

4.3 Efeito do AtRALF1 em plantas mutantes da via de biossíntese do etileno

O etileno é percebido pelas proteínas receptoras ETR1, ERS1, ETR2, ERS2, EIN4, que se ligam ao etileno com alta afinidade. Os receptores são reguladores negativos da sinalização do etileno. Mutantes *ein2, etr1, etr2* e *ers1,* que conferem insensibilidade ao etileno, foram expostos a diferentes concentrações do AtRALF1 para observar o efeito deste peptídeo na inibição das raízes primárias.

AtRALF1 nas concentrações de 2µM ou 5µM não inibiu as raízes dos mutantes insensíveis ao etileno avaliados (Figura 7). Esse resultado demonstra que para o efeito de inibição das raízes primárias induzido por AtRALF1 a percepção do etileno e a presença de sua via de transdução de sinais intacta são necessárias.

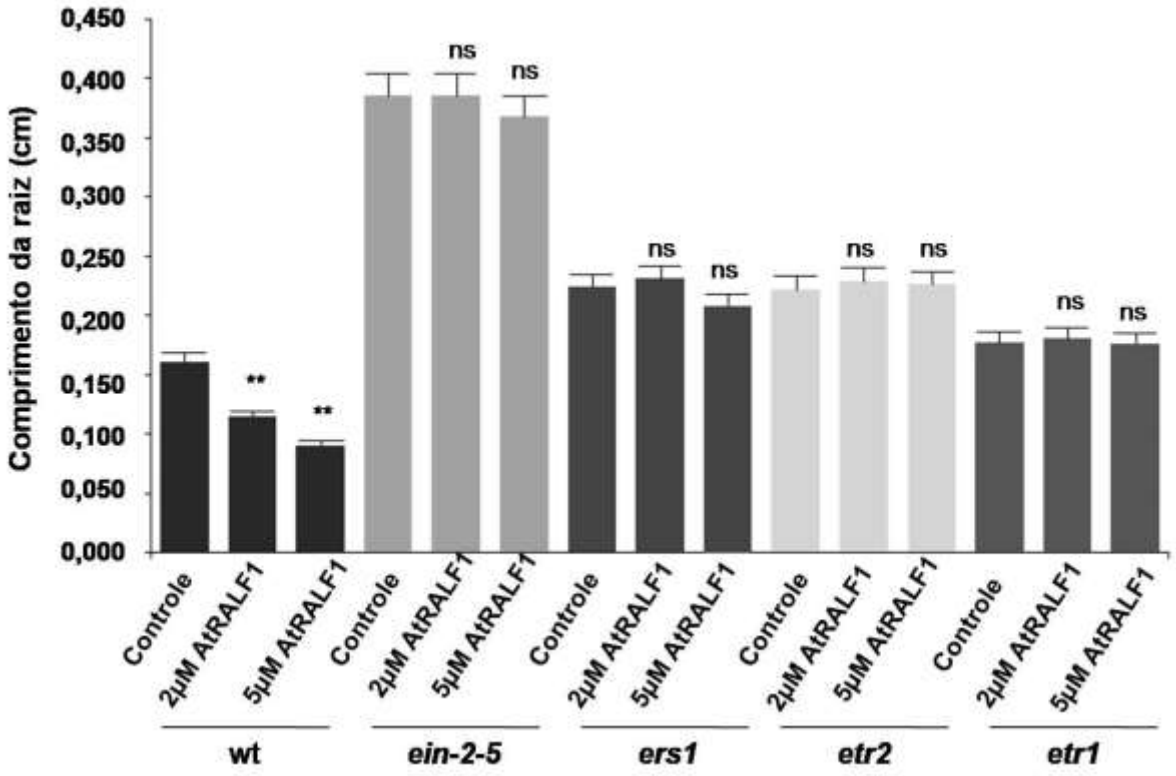


Figura 7 - Efeito do tratamento exógeno de AtRALF1 em plantas mutantes da via de biossíntese de etileno.
Sementes de plantas selvagens e mutantes da via de biossíntese do etileno foram germinadas em MS 0,5X líquido, após dois dias, 2µM e 5µM de AtRALF1 foram adicionados ao meio e o crescimento da raiz foi medido no 3º dia da exposição ao tratamento. Os valores são as médias do Desvio Padrão de pelo menos 30 plântulas. Os valores com asteriscos duplos representam P<0,05 (teste *t*,); ns não significativo

4.4 Efeito do inibidor da biossíntese de etileno em plantas tratadas com AtRALF1

O composto amino-etoxivinilglicina (AVG) interrompe a ação do hormônio etileno na planta por inibir a sua biossíntese. Este inibidor da biossíntese de etileno foi aplicado isolado ou simultaneamente ao tratamento com o peptídeo AtRALF1 após dois dias da germinação. O efeito dos tratamentos foi avaliado por meio da

inibição do crescimento da raiz primária no 3º dia após iniciados os tratamentos (Figura 8).

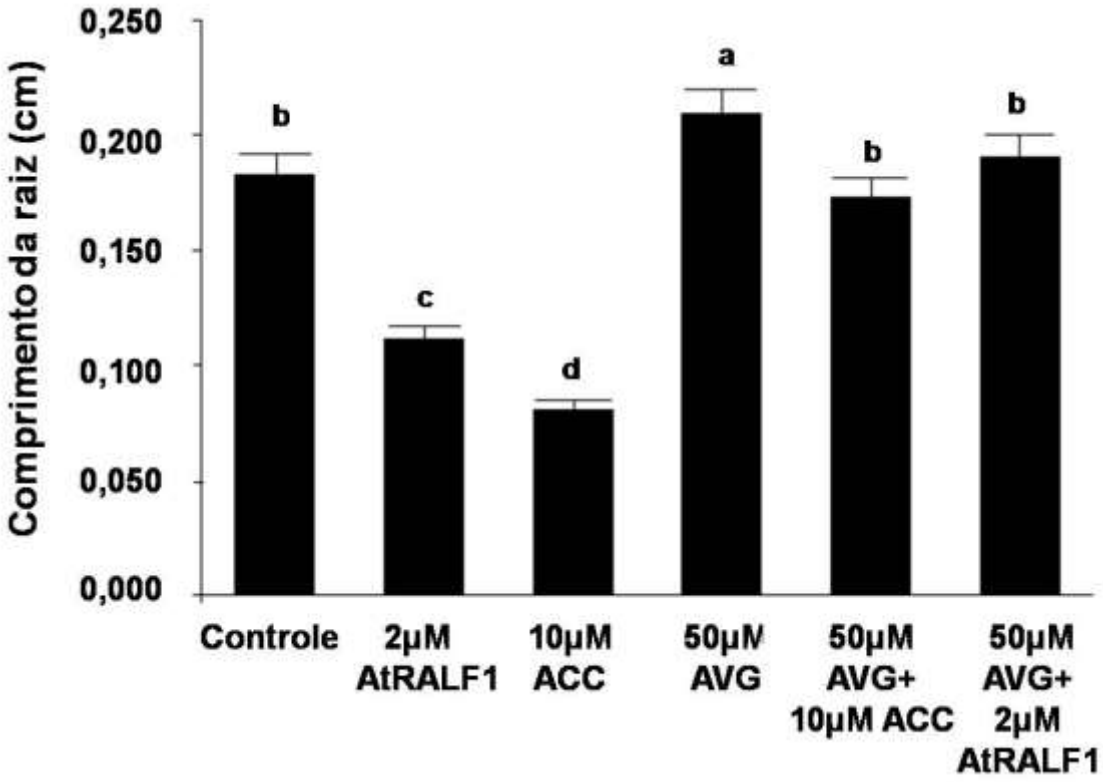


Figura 8 - Efeito do inibidor da biossíntese do etileno, amino-etoxivinilglicina (AVG), na raiz de plantas tratadas com AtRALF1. Sementes de arabidopsis col-0 foram germinadas em meio MS 0,5X líquido. Após 24h 2µM de AtRALF1e 50µM AVG foi adicionado ao meio de cultura. O crescimento da raiz foi medido após o 3º dia de tratamento. Os valores são as médias do Desvio Padrão de pelo menos 30 plântulas. As medidas com a mesma letra não são significativamente diferentes entre si (teste de Tukey, P<0,05).

O tratamento simultâneo com AVG e o peptídeo não causou inibição do crescimento da raiz primária normalmente induzido por AtRALF1. A adição isolada do AVG provocou um crescimento maior da raiz primária e a adição simultânea do AVG com ACC não teve efeito quando comparado ao tratamento com água (controle). Os resultados com o inibidor AVG reforçam a dependência do AtRALF1 quanto a presença/síntese do etileno.

4.5 Efeito do inibidor da percepção de etileno em plantas tratadas com AtRALF1

O inibidor da percepção de etileno 2-5-norbornadieno (NBD) atua como um antagonista do etileno ligando-se aos receptores, não permitindo a ligação do

hormônio. Este inibidor da percepção de etileno foi aplicado isolado ou simultaneamente ao tratamento com o peptídeo AtRALF1 após dois dias da germinação. O efeito dos tratamentos foi avaliado por meio da inibição do crescimento da raiz primária no 3º dia após iniciados os tratamentos (Figura 9).

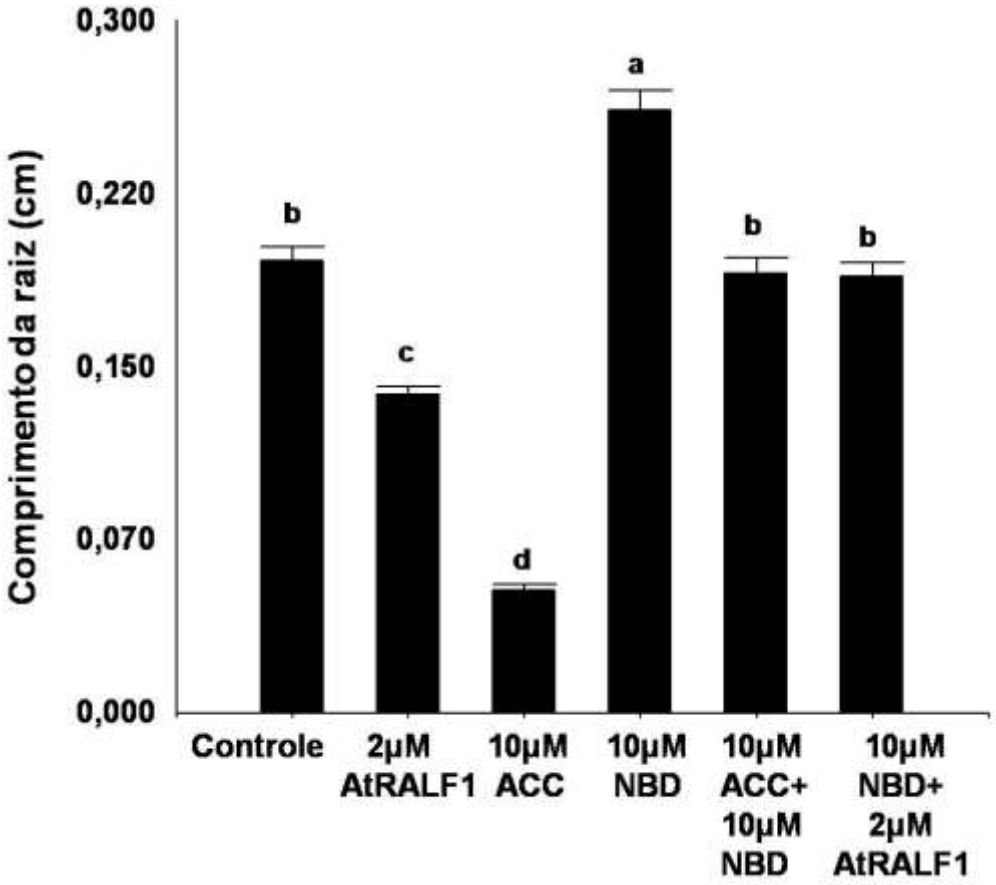


Figura 9 - Efeito do inibidor da percepção do etileno, 2-5-norbornadieno (NBD), na raiz de plantas tratadas com AtRALF1. Sementes de arabidopsis col-0 foram germinadas em meio MS 0,5X líquido. Após 24 h 2µM de AtRALF1e 10µM NBD foi adicionado ao meio de cultura. O crescimento da raiz foi medido após o 3º dia de tratamento. Os valores são as médias do Desvio Padrão de pelo menos 30 plântulas. As medidas com a mesma letra não são significativamente diferentes entre si (teste de Tukey, P<0,05).

O tratamento simultâneo com NBD e o peptídeo não causou inibição do crescimento da raiz primária normalmente induzido por AtRALF1. A adição isolada do NBD provocou um crescimento maior da raiz primária e a adição simultânea do NBD com ACC não teve efeito quando comparado ao tratamento com água (controle). O resultado reforça as observações anteriores de que AtRALF1 depende de etileno para a inibição do crescimento das raízes primárias.

4.6 Efeito do difenileneiodônio (DPI) nas raízes de plantas tratadas com AtRALF1

Em arabidopsis, a NADPH oxidase controla o desenvolvimento da raiz por intermédio da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que regula a expansão celular através da ativação de canais de Ca2+ (FOREMAN et al., 2003). Tratamento com ACC aumenta a expressão da NADPH oxidase que tem papel na geração de ROS em raízes (YAMAUCHI et al., 2014). Bestwick et al. (1997) e Foreman et al. (2003) descrevem um inibidor específico da NADPH oxidase, difenileneiodônio (DPI), o qual aumenta o tamanho da raiz de plantas tratadas com ACC (CNODDER et al., 2005). DPI é um inibidor específico do complexo da NADPH oxidase de mamífero frequentemente utilizado para confirmar origem enzimática de ROS em plantas.

Seguindo o padrão dos experimentos anteriores, o peptídeo AtRALF1 foi aplicado após dois dias da germinação e, após o 3º dia de exposição ao peptídeo, o DPI foi aplicado por 3h e assim avaliado (Figura 10).

No tratamento simultâneo com AtRALF1 e DPI, o DPI aumentou o tamanho da raiz primária em plantas tratadas com AtRALF1. Estes resultados sugerem que NADPH oxidase é crucial para limitar o alongamento celular e a inibição dessa enzima permite a célula recuperar o seu tamanho.

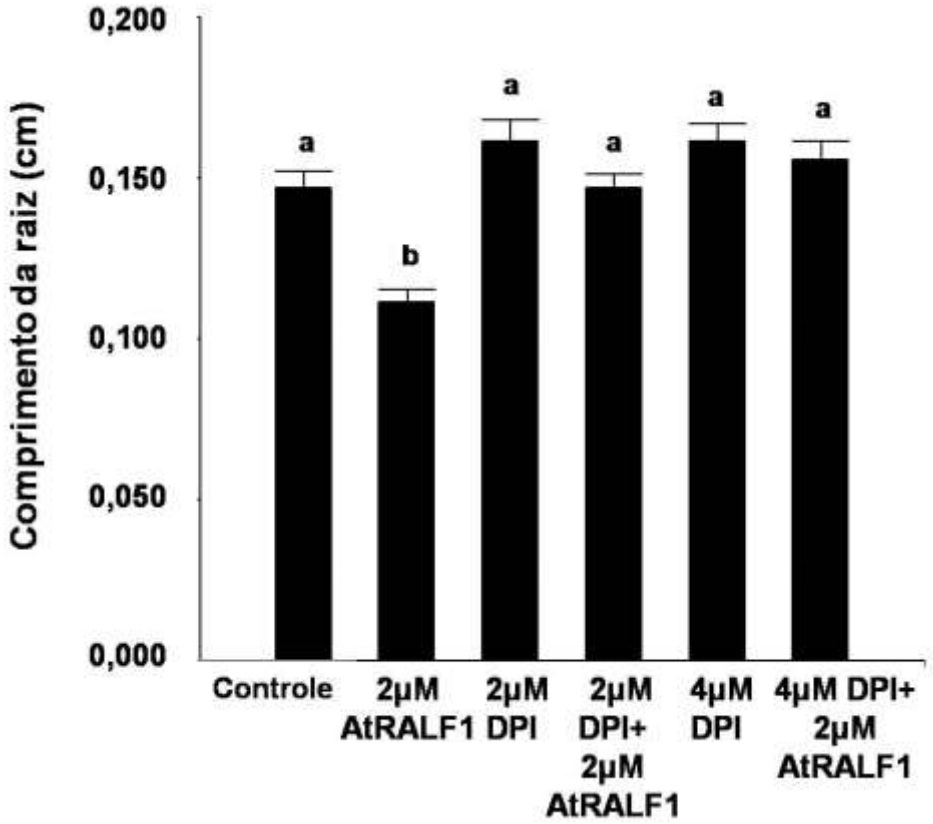


Figura 10 - Efeito do composto difenileneiodônio (DPI) na raiz de plantas tratadas com AtRALF1. Sementes de arabidopsis col-0 foram germinadas em meio MS 0,5X líquido. Após 24 h 2µM de AtRALF1 foi adicionado ao meio de cultura. Após o 3º dia de tratamento adicionou-se 2µM e 4µM DPI ao meio de cultura e permaneceu por 3h até a medição das raízes. Os valores são as médias do Desvio Padrão (DP) de pelo menos 30 plântulas. As medidas com a mesma letra não são significativamente diferentes entre si (teste de Tukey, P<0,05).

4.7 Efeito do 3,4-DL-deidroprolina (DP) nas raízes de plantas tratadas com AtRALF1

Modificações na parede celular que envolve glicoproteínas ricas em hidroxiprolinas (HRGPs) podem ser desfeitas por 3,4-DL-deidroprolina (DP), um inibidor da peptidil-prolil-4-hidroxilase que catalisa a hidroxilação de prolinas (TULIO et al., 1999). A exposição de plantas tratadas com ACC a DP, por somente 3h, estimula o alongamento celular e reverte o efeito do ACC. Esta reversão sugere o envolvimento de HRGPs na inibição da expansão celular causada por etileno.

No ensaio de crescimento da raiz primária, o peptídeo AtRALF1 foi aplicado após dois dias da germinação. O DP foi utilizado como um composto de resposta rápida porque sua aplicação em dias próximos da germinação poderia modificar o ciclo celular (TULIO et al., 1999). Após o 3º dia de exposição ao peptídeo, o DP foi

adicionado ao meio e após 3h a avaliação do tamanho das raízes foi feita (Figura 11).

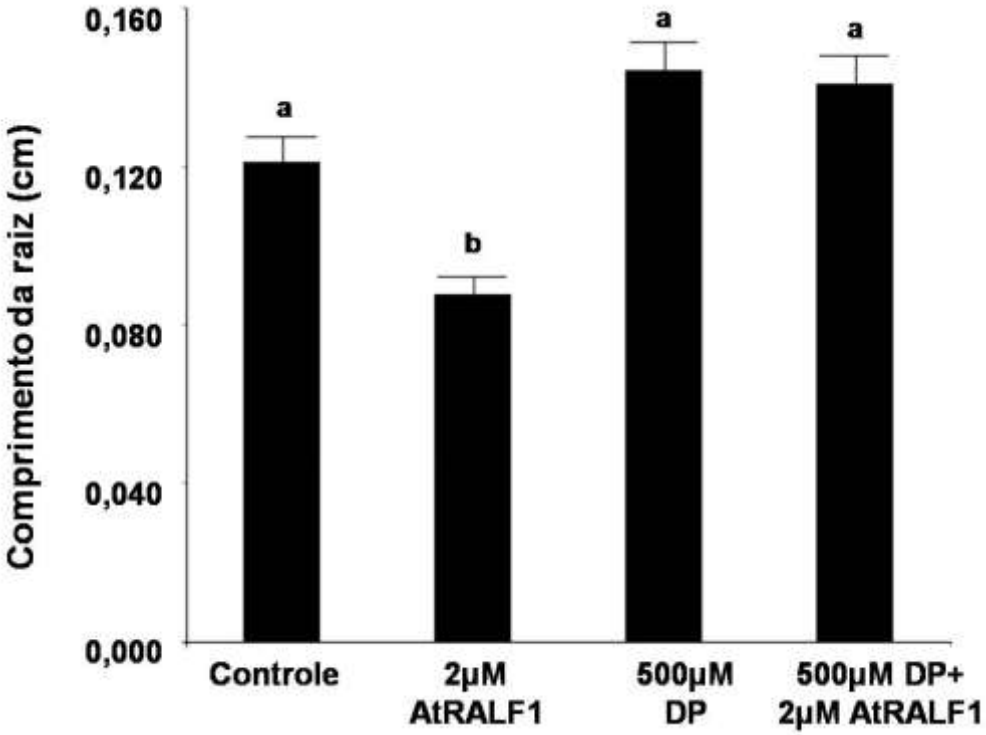


Figura 11 - Efeito do composto 3,4-DL-deidroprolina (DP) na raiz de plantas tratadas com AtRALF1. Sementes de arabidopsis col-0 foram germinadas em meio MS 0,5X líquido. Após 24 h 2µM de AtRALF1 foi adicionado ao meio de cultura. Após o 3º dia de tratamento adicionou-se 500µM de DP ao meio de cultura e permaneceu por 3h até a medição das raízes. Os valores são as médias do Desvio Padrão de pelo menos 30 plântulas. As medidas com a mesma letra não são significativamente diferentes entre si (teste de Tukey, P<0,05).

Em tratamento simultâneo com AtRALF1, o DP estimulou o crescimento das raízes sugerindo assim que HRGPs também podem estar envolvidas na inibição do crescimento das raízes induzida por AtRALF1.

4.8 Efeito da tirosina nas raízes de plantas tratadas com AtRALF1

A competição da tirosina exógena pelas tirosinas de proteínas da parede celular reduz o efeito inibitório do ACC no alongamento celular da raiz de arabidopsis através da redução do peróxido de hidrogênio induzido por ACC (BRADY; FRY, 1997). Com a finalidade de testar o efeito da tirosina exógena na inibição do crescimento de raiz induzido por AtRALF1, plantas de arabidopsis foram expostas ao peptídeo e ao tratamento simultâneo com o peptídeo e 500µM de

tirosina. A base lógica para tal experimento é que se o AtRALF1 aumenta a produção de etileno e o efeito na inibição do crescimento de raiz está relacionado com a produção de peróxido de hidrogênio e a consequente formação de isoditirosina, a adição simultânea de tirosina aliviaria o efeito inibitório do AtRALF1. A adição conjunta do AtRALF1 e da tirosina de fato atenuou o efeito inibitório do AtRALF1 nas raízes primárias (Figura 12).

Este resultado sugere que a produção de peróxido de hidrogênio e a formação de isoditirosina e di-isoditirosina estão envolvidas na inibição do crescimento de raízes induzida por AtRALF1.

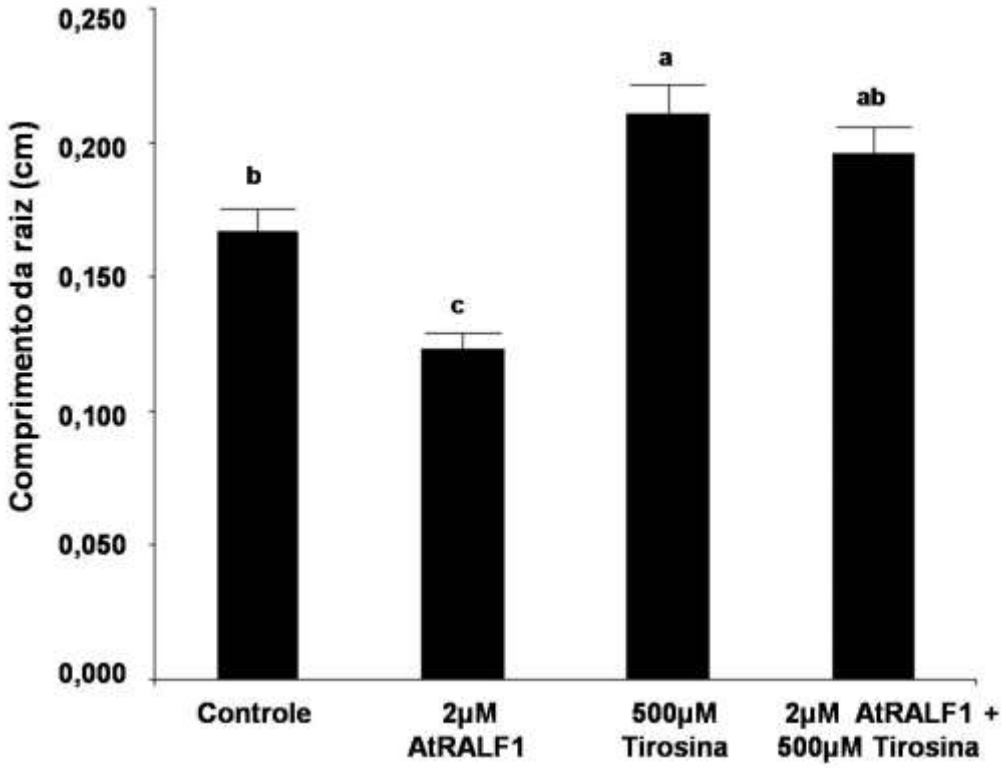


Figura 12 - Efeito do aminoácido tirosina na raiz de plantas tratadas com AtRALF1. Sementes de plantas selvagens foram germinadas em MS 0,5X líquido, após dois dias, 2µM de AtRALF1 e 500µM de tirosina foram adicionados ao meio e o crescimento da raiz foi medido no 3º dia da exposição ao tratamento. Os valores são as médias do Desvio Padrão (DP) de pelo menos 30 plântulas. As medidas com a mesma letra não são significativamente diferentes entre si (teste de Tukey, $P<0,05$).

4.9 Indução de calose por tratamento exógeno de AtRALF1

A deposição de calose ocorre em células das raízes e bloqueia o alongamento celular. Plantas que super produzem o etileno, como por exemplo o

mutante *eto2,* depositam calose nas células do meristema e nas células da zona de alongamento (CNODDER et al., 2005). Com a finalidade de investigar o envolvimento da deposição de calose na inibição induzida por AtRALF1, plantas foram tratadas com o peptídeo e coradas com azul de anilina para a identificação da calose.

Plantas tratadas com AtRALF1 por 3h foram analisadas em microscópio confocal após a incubação em azul de anilina por 5min (Figura 13). A deposição de calose e a formação de placas foram observadas em pontas de raízes de plantas expostas ao AtRALF1. A maior deposição de calose foi constatada na maior concentração de AtRALF1 utilizada, 1µM (Figura 13).

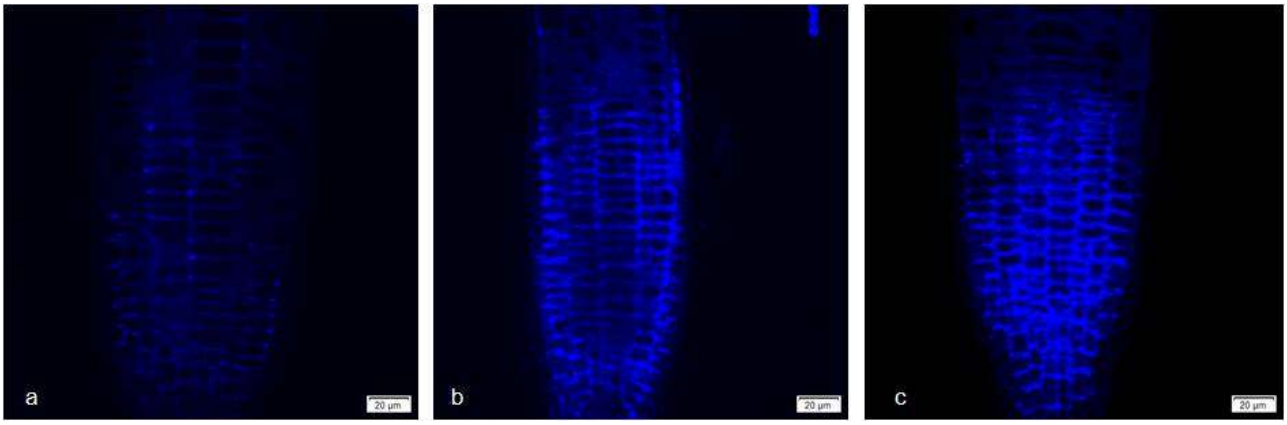


Figura 13 - Deposição de placa de calose na raiz de arabidopsis tratadas com AtRALF1. Sementes foram germinadas em meio de cultura MS 0,5X semi-sólido. As plantas foram transferidas após 5 dias para um meio de cultura MS 0,5X líquido. As plantas foram expostas ao peptídeo por 3h e coradas com azul de anilina 0,1% e glicina 1M por 5min. (A) wt- planta selvagem controle sem tratamento com AtRALF1 (B) tratamento com 0,5µM de AtRALF1 (C) tratamento com 1µM de AtRALF1. Foi utilizado o laser de excitação 405nm e o filtro de emissão de 725nm (DAPI).

Este resultado indica o envolvimento da calose na inibição do crescimento da raiz de arabidopsis induzida pelo peptídeo AtRALF1.

4.10 Indução de calose em plantas com *AtRALF1* parcialmente silenciado e em plantas que super-expressam *AtRALF1*

Plantas com o gene *AtRALF1* parcialmente silenciado (irAtRALF1) e plantas que super-expressam *AtRALF1* (35S:AtRALF1) foram coradas com azul de anilina e analisadas em microscópio confocal com o objetivo de avaliar o efeito da baixa ou alta expressão do gene *AtRALF1* na deposição de calose. Plantas irAtRALF1

exibiram um padrão de deposição de placas de calose na ponta de raiz igual a das plantas controle (wt) (Figura 14A-B). Uma deposição maior de calose foi observada em plantas 35S:AtRALF1, onde notou-se a formação de placas de calose na ponta da raiz semelhantes as observadas em plantas mutantes *eto2* que produzem um excesso de etileno (CNODDER et al., 2005). (Figura 14C).

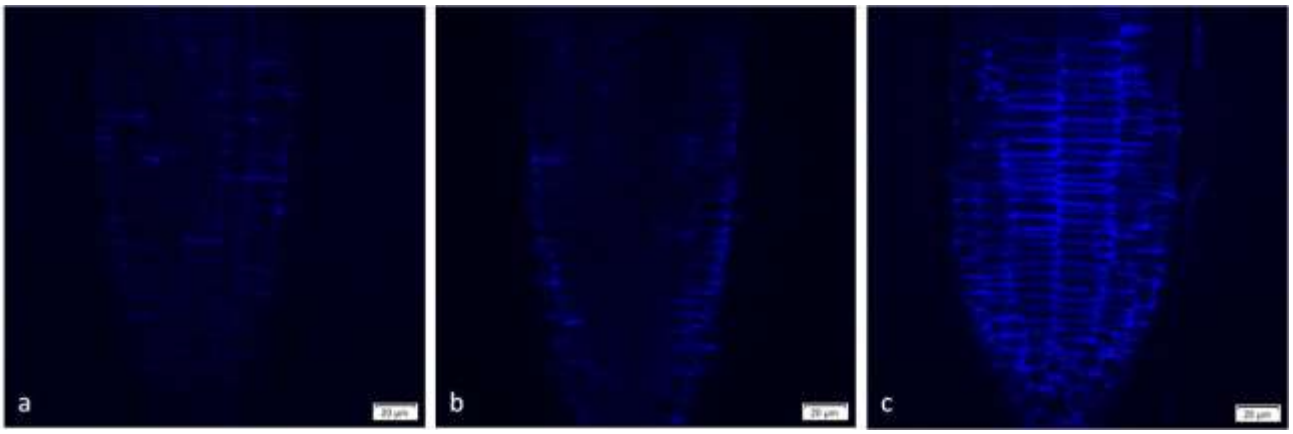


Figura 14 - Deposição de placa de calose na raiz de arabidopsis com AtRALF1 parcialmente silenciado e AtRALF1 super-expresso. Sementes foram germinadas em meio de cultura MS 0,5X semi-sólido. As plantas foram coradas com azul de anilina 0,1% e glicina 1M por 5min. (A)wt- planta selvagem controle (B) irAtRALF1 - gene de AtRALF1 parcialmente silenciado (C) 35S:AtRALF1 - AtRALF1 super-expresso. Foi utilizado o laser de excitação 405nm e o filtro de emissão de725nm (DAPI).

4.11 Deposição de calose em plantas tratadas com DPI ou DP e AtRALF1

Plantas tratadas com 1µM AtRALF1 e 2µM de DPI ou 500µM de DP por 3h foram analisadas em microscópio confocal para avaliar a deposição de calose. Tanto o tratamento com DPI quanto o com DP inibiram a deposição de calose induzida por AtRALF1 (Figura 15 A-D). Os resultados com a detecção da calose confirmam o observado anteriormente sugerindo o envolvimento da NADPH oxidase e das HRGPs regulando a expansão celular (CNODDER et al., 2005).

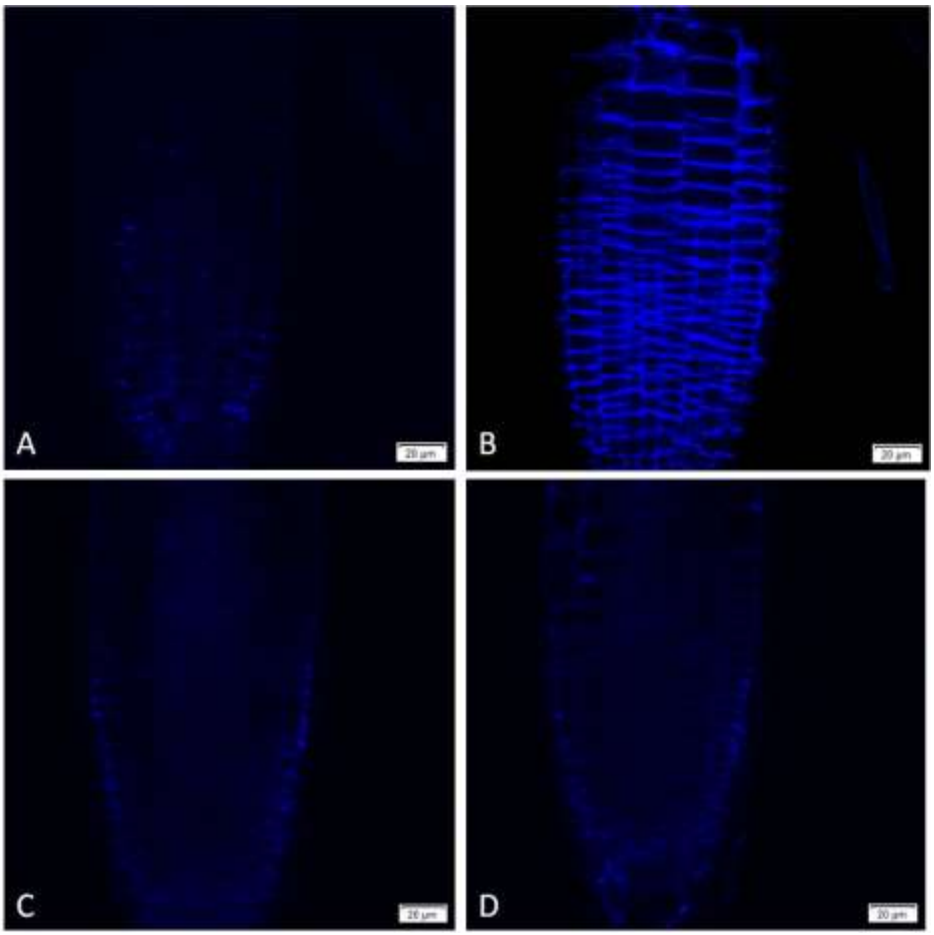


Figura 15 - Deposição de calose na raiz de arabidopsis tratada com AtRALF1 e DPI ou DP. Sementes foram germinadas em meio de cultura MS 0,5X semi-sólido. As plantas foram transferidas após 5 dias para um meio de cultura MS 0,5X líquido. As plantas foram expostas concomitantemente ao peptídeo (1µM) e DPI 2µM ou DP 500µM por 3h e coradas com azul de anilina 0,1% e glicina 1M por 5min. (A) wt- planta selvagem, controle sem tratamento (B) planta tratada com 1µM de AtRALF1 (C) planta tratada com 1µM de AtRALF1 e 2µM de DPI (D) tratamento com 1µM de AtRALF1e 500µMde DP. Foi utilizado o laser de excitação 405nm e o filtro de emissão de 725nm (DAPI).

4.12 Efeito do AtRALF1 na produção de etileno

A produção de etileno foi medida por cromatografia gasosa e a análise foi feita utilizando-se suspensões celulares. Dois mililitros de células foram tratadas com AtRALF1 e ACC ou AVG ou NBD em frascos distintos de 20mL e permaneceram fechados por 24h. A produção de etileno foi maior em células tratadas com ACC em comparação às células controle e em células tratadas com AtRALF1. Células tratadas com AVG, o inibidor da biossíntese de etileno, diminuíram a produção de etileno e, quando o mesmo inibidor foi utilizado em células tratadas com AtRALF1, houve também uma diminuição da produção de etileno. Conforme esperado, em

células tratadas com NBD, um inibidor da percepção do etileno, não houve redução na produção de etileno (Figura 16).

Os resultados obtidos mostram que AtRALF1 induz a formação de etileno e que o inibidor da biossíntese do etileno AVG foi eficiente na inibição da indução causada por AtRALF1.

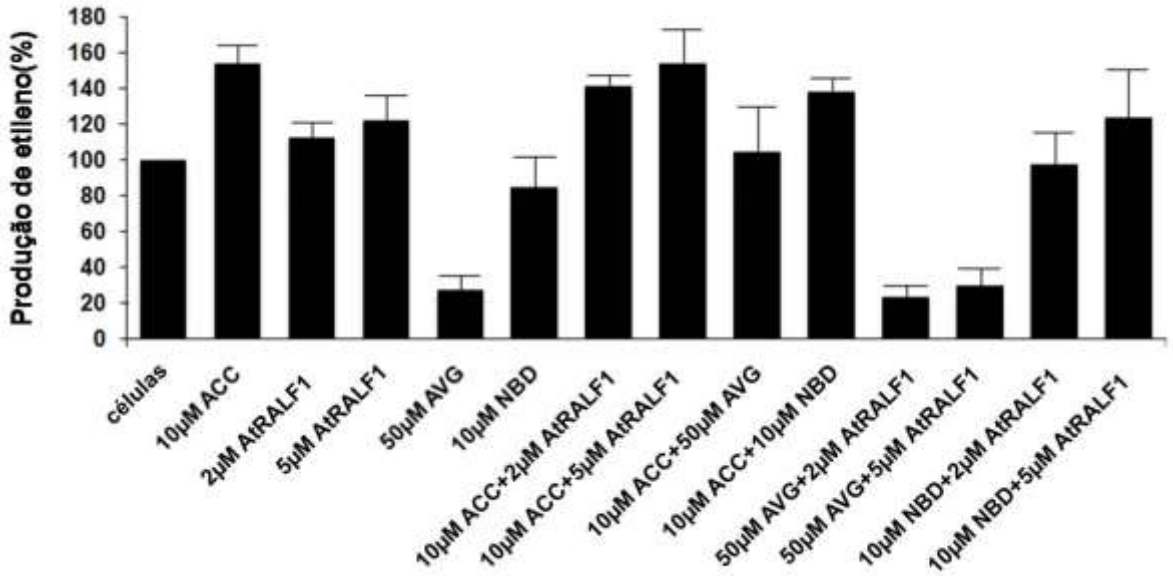


Figura 16 - Produção de etileno em células de suspensão de arabidopsis. Dois mililitros de células, colocados em frascos fechados de 20mL foram tratadas com AtRALF1 e ACC ou AVG ou NBD durante 24h. Após este período a produção de etileno foi medida em cromatógrafo gasoso.

4.13 Efeito dos inibidores da biossíntese e percepção do etileno na alcalinização induzida por AtRALF1

O peptídeo AtRALF1 alcaliniza o meio extracelular de células em suspensão de arabidopsis (PEARCE et al., 2001). Com o intuito de analisar se o etileno causa alcalinização do meio extracelular, suspensões celulares foram tratadas com ACC e inibidores da biossíntese e percepção do etileno. Nenhum desses reagentes mostrou alcalinizar o meio extracelular, apenas quando foram feitos tratamentos simultâneos com AtRALF1 que houve a alcalinização do meio extracelular (Figura 17). Os resultados demonstram que a alcalinização induzida por AtRALF1 não é dependente da produção de etileno e sugerem uma dissociação entre os efeitos de inibição do crescimento da raiz e da rápida alcalinização do meio extracelular.

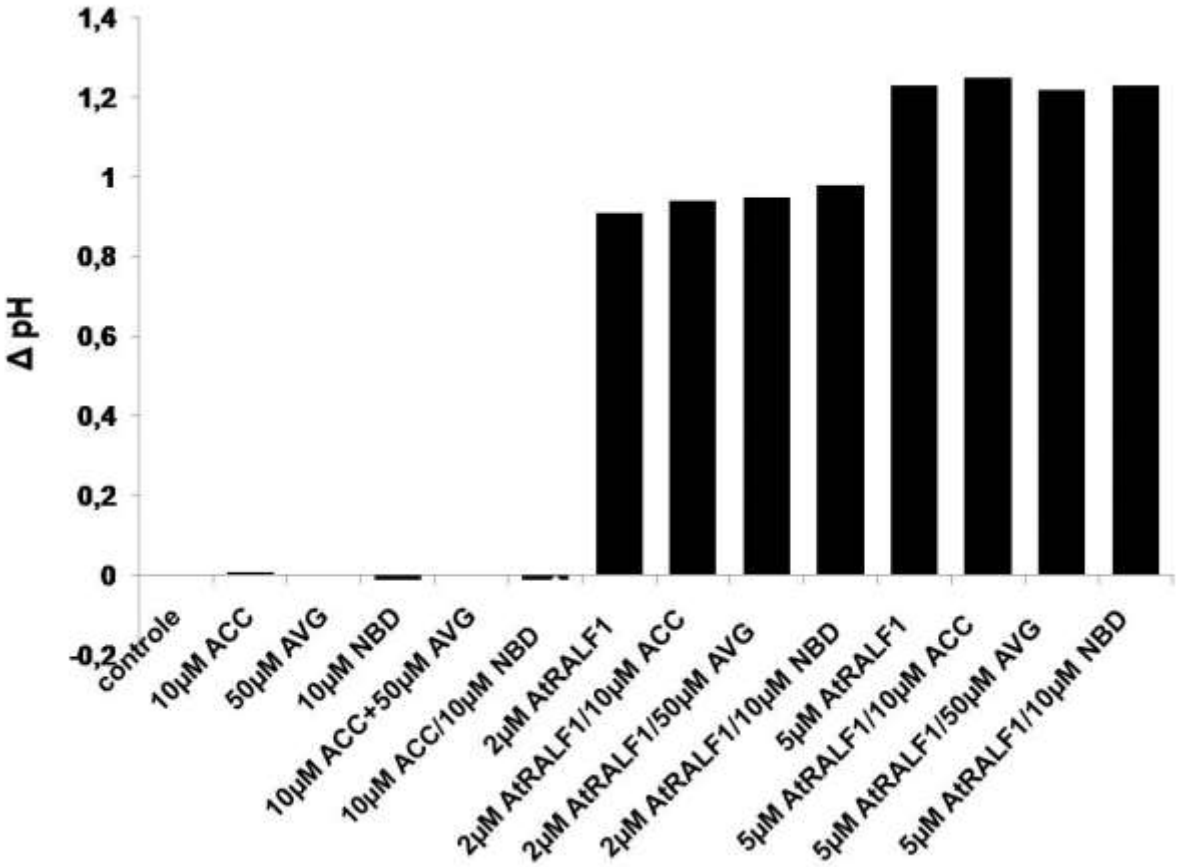


Figura 17 - Alcalinização do meio de células de suspensão de arabidopsis. Células em suspensão (1mL/poço) foram colocadas em placas de 24 poços, deixadas sob agitação e tratadas com AtRALF1 e ACC ou AVG ou NBD por 15min. Após este período o pH foi mensurado

4.14 Placa indicadora de pH

Com a finalidade de avaliar a dependência da resposta de alcalinização ao etileno, plantas insensíveis ao etileno, mutantes *ein2-5,* foram crescidas em placas na vertical, tratadas com AtRALF1 e transferidas para placa indicadora de pH contendo púrpura de bromocresol (Figura 18).

Plantas selvagens tratadas com AtRALF1 desenvolveram uma coloração arroxeada na rizosfera indicativa de alcalinização. Mutantes *ein2-5*, da mesma forma que as plantas selvagens, desenvolveram a coloração arroxeada na rizosfera quando tratadas com AtRALF1 indicando alcalinização. Estes resultados confirmam os dados obtidos com o ensaio de alcalinização, sugerem, diferentemente da inibição de raízes, que a alcalinização é independente do etileno e indicam a dissociação dos efeitos induzidos por AtRALF1.

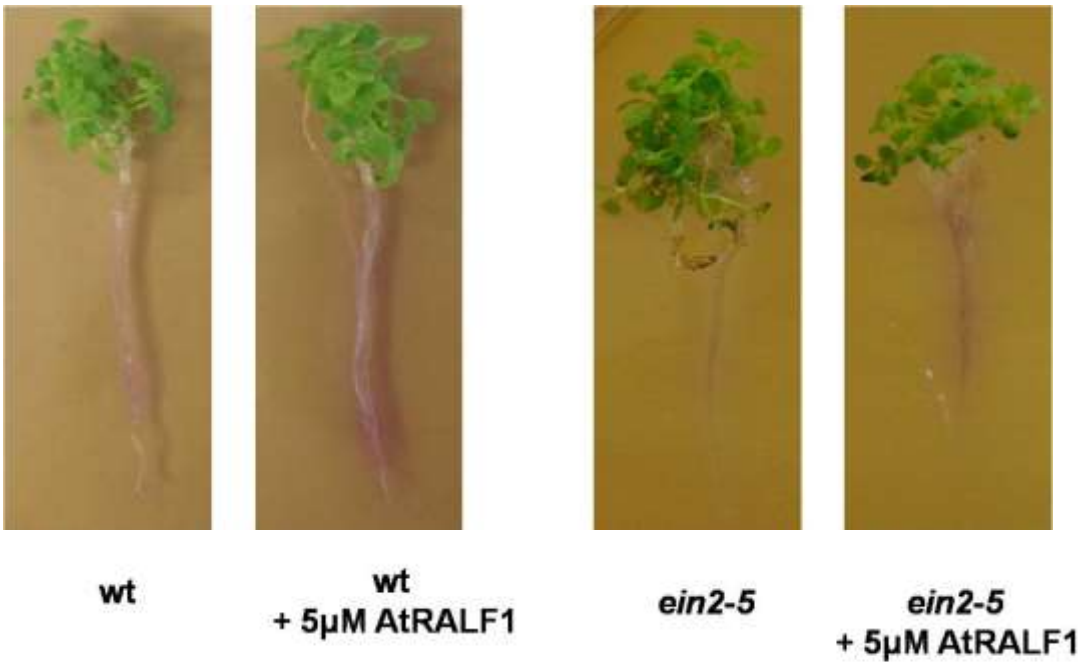


Figura 18 - Alcalinização da rizosfera de planta mutante insensível ao etileno. Plantas mutantes *ein2-5* foram crescidas em meio MS 0,5X semi-sólido durante 10d. As plantas passaram por tratamento com AtRALF1 por 15min e foram transferidas para a placa indicadora de pH. Após 30min as imagens foram registradas.

5 DISCUSSÃO

O desenvolvimento e crescimento vegetal envolvem a interação de vários sinais para determinar a formação da planta e os hormônios são reguladores neste processo. A expansão celular é parte deste processo e é sensível a diversos fatores tais como o etileno e o peptídeo AtRALF1 que contribuem para a sua regulação negativa (LE et al., 2001; CNODDER et al., 2005; MATOS et al., 2008; BERGONCI et al., 2014). Neste trabalho objetivou-se estudar a interdependência entre os hormônios etileno e AtRALF1. Os resultados proporcionaram um melhor entendimento do mecanismo de ação do peptídeo na regulação da expansão celular de raízes de arabidopsis e da relação da alcalinização do meio extracelular com a inibição da expansão.

Os experimentos com mutantes na percepção do etileno e com antagonistas deste hormônio gasoso demonstram que a resposta de inibição do crescimento de raiz primária induzida por AtRALF1 é dependente de etileno (Figuras 6 - 9). Vários são os peptídeos hormonais que coordenam as respostas fisiológicas das plantas juntamente com os demais hormônios vegetais (ALBERT, 2013; MURPHY et al., 2012). Um destes peptídeos, também encontrado por meio de ensaios biológicos, é a sistemina que possui 18 aminoácidos e está envolvida com a defesa vegetal (PEARCE et al., 1993). O peptídeo sistemina aumenta a síntese de ácido jasmônico (JA) que leva a indução de proteínas de defesa contra herbívoros (SCHILMILLER; HOWE, 2005). Sistemina também causa a modulação do fluxo iônico e a biossíntese de etileno pelo aumento da atividade da ACC sintase (FELIX; BOLLER, 1995). Neste sentido, a análise da expressão de genes da via de biossíntese de etileno e dos genes induzidos por AtRALF1 em resposta ao etileno e AtRALF1poderá ajudar a entender mais a extensão da relação entre estes dois hormônios. Na resposta ao ferimento, mediada por sistemina, o etileno e o JA influenciam o nível um do outro atuando na regulação da expressão de genes de resposta ao ferimento (O'DONNELL et al., 1996).

O experimento com plantas tratadas com o peptídeo e posteriormente tratadas com o inibidor de NADPH oxidase sugere que a inibição do crescimento da raiz primária é mediada por espécies reativas de oxigênio (ROS) (Figura 10 e 15). ROS abrange um grupo de formas reativas de oxigênio que incluem peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido (O_2^-) e oxigênio singleto ($^1O_2$) (HALLIWELL, 2006). O

acúmulo excessivo de ROS no apoplasto pode resultar de um aumento da atividade das enzimas produtoras de ROS, tais como as peroxidases (BOLLWELL et al., 2002) e também NADPH oxidases (Foreman et al., 2003). A atividade da NADPH oxidase é um dos fatores que limita o alongamento celular e é induzida pelo aumento da produção de etileno (CNODDER et al., 2005). A produção de ROS no apoplasto pode causar a ligação cruzada de componentes de parede celular tais como as HRGPs. Sabe-se que em raiz de arabidopsis, AtRALF1 também induz a expressão de HRGPs podendo ser esta uma causa do rearranjo da parede celular (BERGONCI et al., 2014). ROS e a ligação cruzada de proteínas estruturais da parede tem sido propostos como um mecanismo para restringir o crescimento celular (BRISSONET al., 1994; IIYAMAET al., 1994; KNOX, 1995).

O composto tirosina compete com as tirosinas de proteínas da parede celular pelas espécies reativas de oxigênio geradas pelo tratamento com ACC, cancelando o efeito inibitório do ACC no alongamento celular (BRADY; FRY, 1997). De modo semelhante, a tirosina não permitiu o efeito inibitório causado por AtRALF1 na raiz primária, confirmando a existência de um mecanismo comum ao etileno e ao AtRALF1 na inibição da expansão celular, mecanismo este que provavelmente envolve ROS e o consequente aumento de isoditirosina e di-isoditirosina (Figura 12).

A deposição de calose na ponta da raiz em plantas tratadas com o peptídeo AtRALF1 e em plantas que superexpressam o AtRALF1 sugerem a mediação do etileno na inibição da expansão celular induzida por AtRALF1 (Figuras 13-15). Calose é um componente estrutural do plasmodesma o qual regula a comunicação intercelular de moléculas incluindo pequenos íons, peptídeos, hormônios e ácidos nucléicos. Modificações no transporte simplástico tem sido consideradas regulatórias do alongamento de raízes (ROBERT, OPARKA; 2003) e fatores que controlam o tamanho das moléculas que passam pelo plasmodesmas podem ser importantes para controlar o mecanismo do alongamento celular. Assim, o etileno impõe um bloqueio no crescimento da raiz que envolve o crosslink com HRGPs na parede celular, dirigido por ROS no apoplasto devido a atividade de NADPH oxidase e provavelmente interferindo no transporte celular pela deposição de calose fazendo com que a célula não se expanda (LE et al., 2001, CNODDER et al., 2005).

A produção de etileno devido ao AtRALF1 foi comprovada em células em suspensão (Figura 16). Essa produção de etileno causada pelo peptídeo AtRALF1 pode ser inibida pelo inibidor da biossíntese de etileno (Figura 8 e 16) e o efeito da

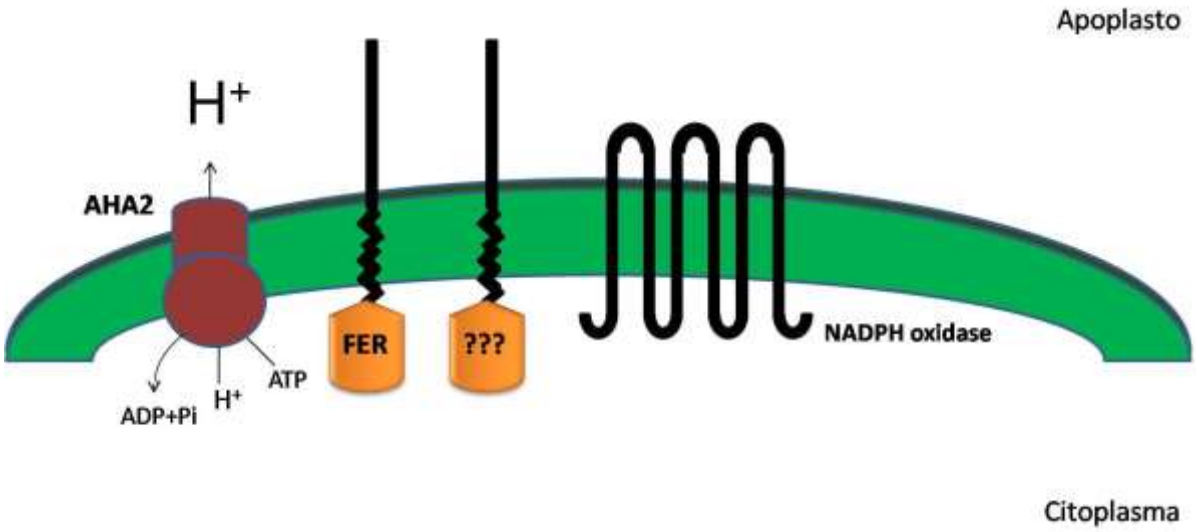
produção do etileno pode também ser bloqueado pelo inibidor da percepção de etileno NBD em raiz (Figura 9). Interessante que mesmo em células onde o efeito do etileno foi bloqueado, as mesmas apresentaram uma alcalinização induzida por AtRALF1 normal (Figura 17-18). Esta aparente dissociação entre os dois efeitos do AtRALF1 necessita ser mais investigada mas sugere a existência de duas vias diferentes, uma para a alcalinização do meio extracelular e outra para a inibição do crescimento da raiz.

Haruta et al. (2014) encontraram cinco proteínas que são fosforiladas em resposta ao tratamento com AtRALF1, uma delas é a proteína FERONIA (FER). O peptídeo AtRALF1 é reconhecido por FER. Mutantes da perda de função para FERONIA apresentam altos níveis de S-adenosil metionina sintase (SAM) e etileno nos seus tecidos foliares. FER interage com SAM regulando a produção de SAM e a biossíntesede etileno (MAO et al., 2015). O peptídeo AtRALF1 se liga ao receptor FER e inativa a bomba de próton ATPase AHA2, alcalinizando o meio extracelular por inibir o efluxo de prótons (H^+). Entretanto, mutante Fer4 é insensível a AtRALF1 somente quando em baixas concentrações mas sensível em concentrações acima de 1µM (HARUTA et al., 2014). Esta insensibilidade condicional a concentração e o fato de FER ser responsável por somente 40% da ligação de AtRALF1 a membranas também sugere a existência de mais de uma proteína receptora.

A partir dos resultados deste trabalho e das informações presentes na literatura pode-se esquematizar um modelo de funcionamento de AtRALF1 com a indução de etileno (Figura 19). De acordo com o modelo, o peptídeo AtRALF1 liga-se ao receptor FER e a um outro receptor de membrana ainda desconhecido (???). Ao ligar-se a FER, ocorre a fosforilação do domínio quinase de FER e também da proteína de membrana AHA2, uma bomba H^+-ATPase que ao ser fosforilada é inibida levando a alcalinização do meio extracelular. A outra proteína receptora ao ligar-se ao AtRALF1 provavelmente também por fosforilações de um provável domínio quinase intracelular, levaria ao aumento da produção de etileno. Concomitantemente, o aumento da produção de etileno leva a indução da atividade da NADPH oxidase gerando um aumento de ROS no apoplasto. ROS causa as ligações cruzadas entre HRGPs na parede celular. De forma paralela, o etileno induz a deposição de calose. Todos esses fatores proporcionam um enrijecimento precoce da parede celular, inibindo a expansão celular. De acordo com este modelo, a alcalinização mediada por FER e AHA2 estaria dissociada do efeito de inibição da

expansão celular. Uma questão a ser respondida no futuro é qual o papel da alcalinização na resposta ao AtRALF1 se, como sugerem os resultados deste trabalho, ela está dissociada do efeito de inibição da expansão celular.

A



B

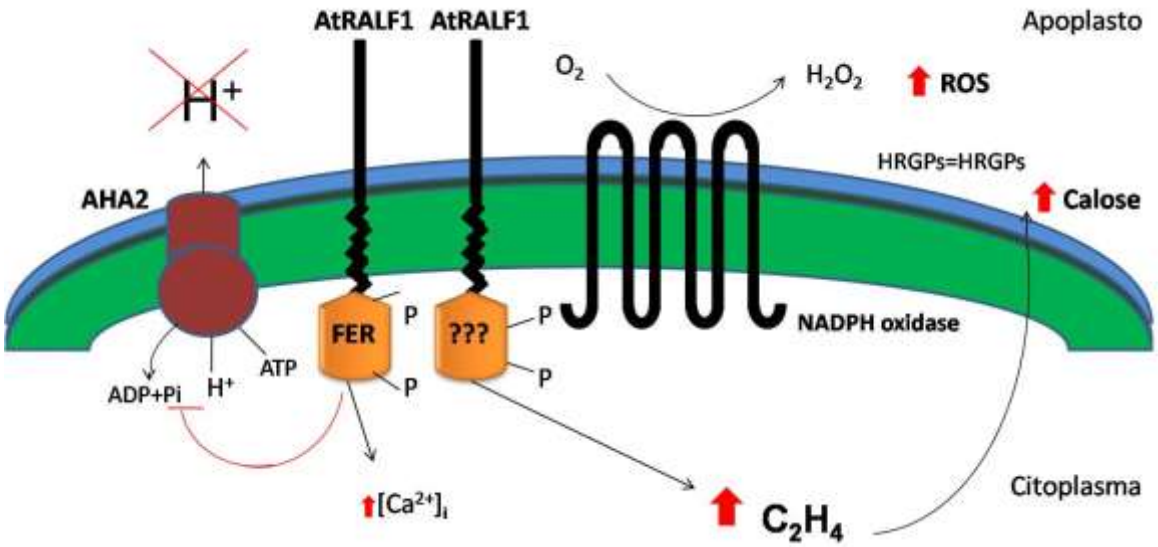


Figura 19 - Modelo da esquematização do funcionamento de AtRALF1 induzindo etileno

(A) Modelo na ausência de AtRALF1 (B) Na presença de AtRALF1, o peptídeo se liga a uma via de identidade desconhecida, e aumenta a produção de etileno intracelular ocasionando a indução da atividade de NADPH oxidase e peróxido de hidrogênio. O acúmulo de ROS gera ligações cruzadas entre HRGPs na parede celular e o etileno também induz a deposição de calose impedindo a comunicação celular. AtRALF1 se liga a FER e inativa a bomba de próton-ATPase AHA2 alcalinizando o meio extracelular por inibir o efluxo de prótons (H^+) e aumenta a concentração de cálcio (Ca^{2+}) no citoplasma.

6 CONCLUSÕES

A inibição do crescimento da raiz primária induzida por AtRALF1 é dependente de etileno.

Etileno e AtRALF1 provavelmente compartilham componentes da transdução de sinais e o etileno está localizado abaixo do AtRALF1 na via de sinalização.

A inibição do crescimento de raiz primária causada por AtRALF1 é mediada por NADPH oxidase, ROS, ligações cruzadas de HRGPs e deposição de calose.

A inibição da raiz primária induzida por AtRALF1 através do hormônio etileno está dissociada da alcalinização do meio extracelular também induzida por AtRALF1.

REFERÊNCIAS

ABELES, F.B.; MORGAN, P.W.; SALTVEIT, M.E. Jr. **Ethylene in plant biology**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1992. 414 p.

ADAMS, D.O.; YANG, S.F. Methionine metabolism in apple tissue: implication of S-Adenosylmethionine as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. **Plant Physiology,** Davis, v. 60, p. 892-896, 1977.

ALBERT, M. Peptides as triggers of plant defense. **Journal of Experimental Botany**, Tübingen, v. 64, p. 5269-5279, 2013.

ALONSO, J.M.; HIRAYAMA, T.; ROMAN, G.; NOURIZADEH, S.; ECKER, J. R. EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. **Science**, Philadelphia,v. 284, p. 2148-2152, 1999.

ARMHEIN, N.; WENKER, D. Novel inhibitor of ethylene action in higher plants. **Plant Physiology**, Bochum, v. 20, p. 268-271, 1979.

ARSHAD, M.; FRANKENBERGER, W.T. **Ethylene:** agricultural sources and applications. New York: Kluwer Academic; Plenum, 2002. 342 p.

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.

BANGERTH, F. The effect of a substituted amino acid on ethylene biosynthesis, respiration, ripening and pre harvest drop of apple fruits. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 103, n. 3, p. 401-404, 1978.

BERGONCI, T.; SILVA-FILHO, M.C.; MOURA, D.S. Antagonistic relationship between AtRALF1 and brassinosteroid regulates cell-expansion-related genes. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v. 10, p. e976146, 2014.

BERGONCI, T.; RIBEIRO, B.; CECILIATO, P.H.O.; GUERRERO-ABAD, J.C.; SILVA-FILHO, M.C.; MOURA, D.S. Arabidopsis thaliana RALF1 opposes brassinosteroid effects on root cell elongation and lateral root formation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, p. 2219-2230, 2014.

BESTWICK, C.S.; BROWN, I.R.; BENNETT, M.H.R.; MANSFIELD, J.W. Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringaepv. phaeolicola.* **The Plant Cell**, Ashford, v. 9, p. 209-221, 1997.

BLEECKER, A.B.; ROSE-JOHN, S.; KENDE, H. An evaluation of 2,5-norbornadiene as a reversible inhibitor of ethylene action in deep water rice. **Plant Physiology**, East Lansing, v. 84, p. 395-398, 1987.

BLEECKER, A.B.; ESTELLE, M.A.; SOMERVILLE, C.; KENDE, H. Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. **Science**, New York, v. 241, p. 1086-1089, 1988.

BOLWELL, G.P.; BINDSCHEDLER, L.V.; BLEE, K.A.; BUTT, V.S.; DAVIES, D.R.; GARDNER, S.L.; GERRISH, C.; MINIBAYEVA, F. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. **Journal of Experimental Botany**, Surrey, v. 53, p. 1367-1376, 2002.

BRADY, D.J.; FRY, S.C. Di-isodityrosine, a novel tetrameric derivative of tyrosine in plant cell wall proteins: a new potential cross-links. **Journal of Biochemistry**, Edinburgh, v. 315, p. 323-327, 1997.

BRISSON, L.F.; TENHAKEN, R.; LAMB, C. Function of oxidative cross-links. **Journal of Biochemistry**, San Diego, v. 315, p. 323-327, 1994.

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.

CHANG, C.; KWOK, S.F.; BLEECKER, A.B.; MEYEROWITZ, E.M. Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. **Science**, New York, v. 262, p. 539-544, 1993.

CHEN, Q.G.; BLECCKER, A.B. Analysis of ethylene signal-transduction kinetics associated with seedling-growth response and citinase induction in wild-type and mutant Arabidopsis. **Plant Physiology**, Wisconsin Dells, v. 108, p. 597-607, 1995.

CHEN, Y-F.; RANDLETT, M.D.; FINDELL, J.L.; SCHALLER, G.E. Localization of the Ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. **The Journal of Biological Chemistry**, Durham, v. 277, p. 19861-19866, 2002.

CHEN, X-Y.; LIU, L.; LEE, E.; HAN, X.; RIM, Y.; CHU, H.; KIM, S-W.; SACK, F.; KIM, J-Y. The Arabidopsis callose synthase gene *GSL8* is requires for cytokinesis and cell patterning. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 150, p. 105-113, 2009.

CNODDER, T. de; VISSENBERG, K; VAN DER STRAETEN, D.; VERBELEN, J-P. Regulation of cell length in the *Arabidopsis thaliana* root by the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-a-carboxylic acid: a metter of apoplastic reactions. **New Phytologist**, Antwerp, v. 168, p. 541-550, 2005.

COSGROVE, D.J. Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. **The Plant Cell**, State College, v. 9, p. 1031-1041, 1997.

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 pellon tube elongation. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 2, p. 703-715, 2010.

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

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

FOREMAN, J.; DEMIDCHIK, V.; BOTHWELL, J.H.F.; MYLONA, P.; MIEDEMA, H.; TORRES, M.A.; LINSTEAD, P.; COSTA, S.; BROWNLEE, C.; JONES, J.D.G.; DAVIES, J.M. DOLAN, L. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. **Nature**, Norwick, v. 422, p. 442-446, 2003.

FUKUDA, H.; HIGASHIYAMA, T. Diverse functions of plant peptides: entering a new phase. **Plant cell Physiology**, Tokyo, v. 52, p. 1-4, 2011.

GAO, Z.; CHEN, Y.F.; RANDLETT, M.D.; ZHAO, X.C.; FINDELL, J.L., KIEBER, J.J.; SCHALLER, G.E. Localization of the raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* through participation in ethylene receptor signaling complexes. **The Journal of Biological Chemistry**, Durham, v. 278, p. 34725-34732, 2003.

GERMAIN, H.; CHEVALIER, E.; CARON, S.; MATTON, D.P. Characterization of five Ralf-like genes from *Solanum chacoense* provides support for a developmental role in plants. **Planta**, Berlin, v. 200, p. 447-454, 2005.

GUZMÁN, P.; ECKER, J.R. Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. **The Plant Cell**, Philadelphia, v. 2, p. 513-523, 1990.

HALLIWELL, B. Reative species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, Singapure, v. 141, p. 312-322.

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

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

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.

HUA, J.; CHANG, C.; SUN, Q.; MEYEROWITZ, E. M. Ethylene insensitivity conferred by *Arabidopsis ERS* gene. **Science**, New York, v. 259, p. 1712-1714, 1995.

HUA, J.; SAKAI, S.; NOURIZADEH, S.; CHEN, Q. C.; BLEECKER, A. B.; ECKER, J. R.; MEYEROWITZ, E.M. EIN4 and ERS2 are members of the putative ethylene receptor gene family in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Pesadena, v. 10, p. 1321-1332, 1998.

IIYAMA, K.; LAM, T.B.T.; STONE, B.A. Covalent cross-link is in the cell wall. **Plant Physiology**, Melbourne, v. 104, p. 315-320, 1994.

JU, C.; YOON, G.M.; SHEMANSKY, J.M.; LIN, D.Y.; YING, Z.I.; CHANG, J.; GARRETT, W.M.; KESSENBROCK, M.; GROTH, G.; TUCKER, M.L.; COOPER, B.; KIEBER, J.J.; CHANG, C. CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA,** Prince George's, v. 09, p. 19486-19491, 2012.

KATSIR, L.; DAVIES, K.A.; BERGMANN, D.C.; LAUX, T. Peptide signaling in plant development. **Current Biology**, Freiburg, v. 21, p. 356-364, 2011.

KENDE, H.; ZEEVAART, J.A.D. The five "classical" plant hormones. **The Plant Cell**, East Lasing, v. 9, p. 1197-1210, 1997.

KENDRICK, M.D.; CHANG, C. Ethylene signaling: new levels of complexity and regulation. **Current Opinion in Plant Biology**, Prince George's, v. 11, p. 479-485, 2008.

KIEBER, J.J.; ROTHENBERG, M.; ROMAN, G.; FELDMANN, K.A.; ECKER, J.R. CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein kinases. **Cell**, Philadelphia, v. 72, p. 427-441, 1993.

KNOX, J.P. The extracellular matrix in higher plants: developmentally regulated proteoglycans and glycoproteins of the plant cell surface. **FASEB Journal**, Leeds, v. 9, p. 1004-1012, 1995.

LAMESCH, P.; BERARDINI, T.Z.; LI, D.; SWARBRECK, D.; WILKS, C.; SASIDHARAN, R.; KARTHIKEYAN, A.S.; LEE, C.H.; NELSON, W.D.; PLOETZ, L.; SINGH, S.; WENSEL, A.; HUALA, E. The Arabidopsis information resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 40, p. 1202-1210, 2012.

LE, J.; VANDENBUSSCHE, F.; VAN DER STRAETEN, D.; VERBELEN, J.P. In the early response of *Arabidopsis* roots to ethylene, cell elongation is up- and down-regulated and uncoupled from differentiation. **Plant Physiology**, Antwerp, v. 125, p. 519-522, 2001.

MAO, D.; YU, F.; LI, J.; POEL, B.V.; TAN, D.; LI, J. ; LIU, Y.; LI, X.; DONG, M. ; CHEN, L.; LI, D. ; LUAN, S. FERONIA Receptor Kinase Interacts with *S*-adenosylmethionine Synthetase and Suppresses *S*-adenosylmethionine Production and Ethylene Biosynthesis in *Arabidopsis1.* **Plant Cell Enviroment**, Jiangsu, 10.1111/pce.12570, 2015.

MATOS, J.L.; FIORI, C.S.; SLVA-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.

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

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

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

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

MURASHIGE, J.L.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Riverside, v. 15, p. 473-479, 1962.

MURPHY, E.; SMITH, S.; SMETA, I.D. Small signaling peptides in Arabidopsis development: how cells communicate over a short distance. **The Plant Cell**, Rockville, v. 24, p. 3198-3217, 2012.

O'DONNEL, P.J.; ATZORN, C.C.R.; WASTERNACK, C.; LEYSER, H.M.O.; BOWLES, D.J. Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. **Science**, York, v. 274, p. 1914-1917, 1996.

PEARCE, G., JOHNSON, S.; RYAN, C.A. Structure-activity of deleted and substituted systemin, an 18-amino acid polypeptide inducer of plant defensive genes. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.268, p. 212-216, 1993.

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

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

QIAO, H.; CHANG, K.N.; YAKAZI, J.; ECKER, J.R. Interplay between ethylene, etp1, etp2, F-box proteins, and degradation of EIN2 triggers ethylene responses in *Arabidopsis*. **Genes and Development**, La Jolla, v. 23, p. 512-521, 2009.

ROMAN, G.; LUBARSKY, B.; KIEBER, J.; ROTHENBERG, M.; ECKER, J. Genetic analysis of ethylene signal transduction in Arabidopsis thaliana: five novel mutant loci integrated into a stress response pathway. **Genetics**, Philadelphia, v. 139, p. 1393-1409, 1995.

ROBERTS, A.G.; OPARKA, K.J. Plasmodesmata and the control of symplastic transport. **Plant, Cell and Environment**, Dundee, v. 26, p. 103-124, 2003.

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

SAKAI, H.; HUA, J.; CHEN, G.Q.; CHANG, C.; BLEECKER, A.B.; MEYEROWITZ, E.M. *ERT2* is an *ETR1*-like gene involved in ethylene signal transduction in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA,** Washington, v. 95, p. 5812-5817, 1998.

SCHEER, J.M.; PEARCE. G.; RYAN, C.A. LeRALF, a plant peptide that regulates root grown and development, specifically binds to 25 and 120kDa cells surface membrane proteins os Lycopersicon peruvianium. **Planta,** Pullman, v. 221, p. 667-674, 2005.

SCHILMILLER, A.L.; HOWE, G.A. Systemic signaling in the wound response. **Current Opinion in Plant Biology**, Pullman, v. 8, 369-377, 2005.

SHOWALTER, A.M. Structure and function of plant cell wall proteins. **The Plant Cell**, Rockville, v. 5, p. 9-23, 1993.

SISLER, E.C.; PIAN, A. Effect of ethylene and cyclic olefins on tobacco leaves. **Science**, New York, v. 17, p. 68-72, 1973.

SIVAGURU, M.; FUJIWARA, T.; SAMAJ, J.; BALUSKA, F.; YANG, Z.; OSAWA, H.; MAEDA, T.; MORI, T.; VOLKMANND.; MATSUMOTO, H. Aluminium-induced 1-3- β-D-glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodemata: a new mechanism of aluminium toxicity in plants. **Plant Physiology**, Kurashiki, v. 124, p. 991-1005, 2000.

SOLANO, R.; STEPANOVA, A.; CHAO, Q.; ECKER, J. R. Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ethylene-insensitive3 and ethylene-response-factor1. **Genes and Development,** Philadelphia, v. 12, p. 3703-3714, 1998.

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

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

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

SUN, J.; MA, Q.; MAO, T. Ethylene regulates the Arabidopsis microtube-associated protein wave-dampened2-like5 in etiolated hypocotyls elongation. **Plant Physiology**, Haidian, v. 169, p. 325-337, 2015.

TULIO.; M.C.de; PACIOLLA,C.; VECCHIA, F.D; RASCIO, N.; D'EMERICO, S.; GARA, L.de.; LISO, R.; ARRIGONI, O. Changes in onion root development induced by the inhibition of peptidyl-prolyl hydroxylase and influence of the ascorbate system on cell division and elongation. **Planta**, Bari, v. 209, p. 424-424, 1999.

WANG, K.L-C.; LI, H.; ECKER, J.R. Ethylene biosynthesis and signaling networks. **The Plant Cell**, La Jolla, v. 14, p. 131-151, 2002.

WANG, X.; KONG, H.; MA, H. F-box proteins regulate ethylene signaling and more. **Genes & Development**, Shanghai, v. 23, p. 391-396, 2009.

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 attenuate*, is required for root hair development and plant growth in native soils. **The Plant Journal**, Oxford, v. 52, p. 877-890, 2007.

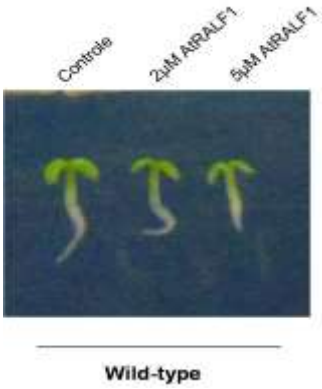
YAMAUCHI, T.; WATANABE, K.; FUKAZAWA, A.; MORI, H.; ABE, F.; KAWAGUCHI, K.; OYANAGI, A.; NAKAZONO, M. Ethylene and reactive oxygen species are involved in root aerenchyma formation and adaptation of wheat seedling to oxygen-deficient conditions. **Journal of Experimental Botany**, Chikusa, v. 65, p. 261-273, 2014.

YU, Y.B.; YANG, S.F. Auxin-induced ethylene production and its inhibition byamino ethoxyvinyl glycine and cobalt ion. **Plant Physiology**, Davis, v. 64, p. 1074-1077, 1979.

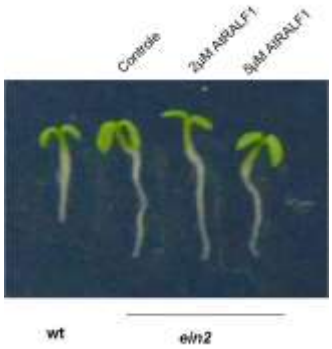
YU, Y.B.; ADAMS, D.O.; YANG, S.F. 1-aminocyclopropane carboxylate synthase, a key enzyme in ethylene biosynthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Davis, v. 198, p. 280-286, 1979.

ANEXOS

Anexo A - Plantas col-0 tratadas com AtRALF1

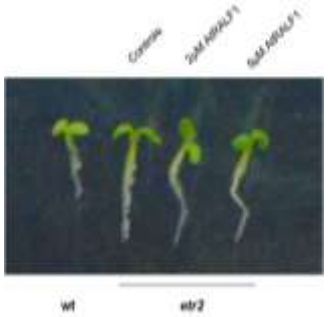
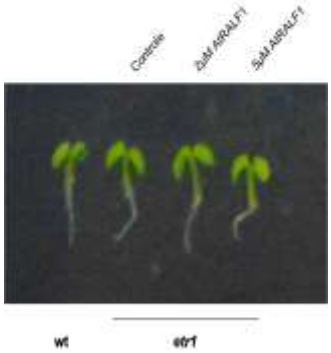


Anexo B - Planta mutante *ein2* tratadas com AtRALF1



Anexo C - Planta mutante *ers1* tratadas com AtRALF1

Anexo D - Planta mutante *etr2* tratadas com AtRALF1



Anexo E - Planta mutante *etr1 tratadas com AtRALF1*