Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Análise do papel da via miR156/SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like (SPL) na organogênese in vitro a partir de raízes de Arabidopsis thaliana

Gabriel Henrique Braga Rocha

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

Piracicaba 2016 Gabriel Henrique Braga Rocha Bacharel em Biotecnologia

Análise do papel da via miR156/SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like (SPL) na organogênese in vitro a partir de raízes de Arabidopsis thaliana

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador: Prof. Dr. FÁBIO TEBALDI SILVEIRA NOGUEIRA

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

Piracicaba 2016

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

Rocha, Gabriel Henrique Braga

Análise do papel da via miR156/SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like (SPL) na organogênese *in vitro* a partir de raízes de *Arabidopsis thaliana* / Gabriel Henrique Braga Rocha. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.

89 p. : il.

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

1. miR156 2. *SPLs* 3. Auxina e citocinina 4. Regeneração de brotos *in vitro* 5. Explante radicular I. Título

CDD 583.122 R672a

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

AGRADECIMENTOS

À Deus, onipresente e onipotente

À Nossa Senhora Aparecida, por todas as interseções.

Aos meus pais e irmãos, pelo amor e apoio incondicional.

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ) e ao programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, pela oportunidade de realização do Mestrado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fábio Tebaldi Silveira Nogueira. Sou muito grato pela confiança em mim depositada desde o início ao me possibilitar a oportunidade para ser seu aluno, pela paciência e ensinamentos científicos, pela amizade, orientação e por todo o apoio durante todos os momentos.

À Prof^a Dr^a Helaine Carrer pela compreensão e apoio na tomada de minhas decisões no âmbito acadêmico. Pelo profissionalismo, por sempre se mostrar disposta a auxiliar e enriquecer o desenvolvimento do trabalho e pela confiança ao permitir acesso ao seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Lázaro Eustáquio Peres, que no início do meu mestrado soube me encaminhar e me aconselhar a tomar decisões maduras no âmbito acadêmico. Agradeço pelo grande auxílio na condução dos trabalhos, discussões científicas e pela confiança ao abrir as portas de seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Wagner Campos Otoni, por toda a confiança ao permitir a minha ida e permanência em seu laboratório. Sou muito grato pela amizade e aprendizado. Pela atenção e companheirismo. Conte comigo!

À Ana Cláudia Ferreira Cruz, Andréa Koehler, Anyela Rios, Carlos Hernán Barrera Rojas, Diego Batista, Elyabe Monteiro de Matos, Marcos Vinícius Marques Pinheiro, Maria Yumbla Orbes, Sérgio Heitor Sousa Felipe. Obrigado por todo o profissionalismo. Sem vocês esse trabalho não teria acontecido.

Aos membros do Laboratório do prof. Fábio Nogueira (LGMDV – Laboratório de Genética Molecular do Desenvolvimento Vegetal - ESALQ): Airton, Antoine, Carlos, Cristiane, Eder, Geraldo, João, Pollyanna por todo o aprendizado, conselhos e principalmente pela paciência.

Aos membros do Laboratório do Prof. Wagner Otoni (LCTII – Laboratório de Cultura de Tecidos II; BIOAGRO – UFV): Ana Cláudia, Andrea, Anyela, Dani, Denise, Diego, Duanny, Elyabe, Helen, Itainá e Perácio, Kamila, Kellen, Kristhiano, Lili, Lorena, Lú, Ludmila, Maíra, Marcos, Maria, Priscila, Ricardo, Raquel, Samuel, Sérgio, Talita, Tati, Thaís, Vinícius e todos os "agregados" ao lab. Obrigado pela recepção, companheirismo e pela amizade. Vocês todos são inesquecíveis por tudo.

Aos membros do Laboratório do Prof. Lázaro Peres (LCHDV - Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal – ESALQ): Ariadne, Eloísa, Fred, Guilherme, Ignácio, Maísa, Marcela, Mariana, Mateus, Stevan, Jonata, Joni, Lilian. Por toda a atenção e disposição.

À técnica do Laboratório LCHDV, Cássia Regina Figueiredo. Sem a sua ajuda tudo teria sido muito mais difícil.

À secretária do Programa de Pós Graduação em Fisiologia e Bioquímica de plantas, Maria Solizete G. Silva por toda sua dedicação, disponibilidade e auxílio.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

E a todos aqueles que não foram citados, mas influenciaram diretamente o indiretamente no desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

| RES | SUMO | 7 |
|-------------|--|----|
| ABS | STRACT | 9 |
| LIS | TA DE FIGURAS | 11 |
| 1 I | NTRODUÇÃO | 13 |
| 2 [| DESENVOLVIMENTO | 17 |
| 2.1 | Revisão Bibliográfica | 17 |
| 2.1. | 1 Arquitetura radicular | 17 |
| 2.1. | 2 Formação da raiz principal em Arabidopsis thaliana | 18 |
| 2.1. | 3 Formação de raiz lateral em Arabidopsis thaliana | 19 |
| 2.1. | 4 Regulação hormonal no desenvolvimento da raiz lateral | 21 |
| 2.1. | 5 MicroRNAs | 25 |
| 2.1. des | 6 Raizes laterais e brotos organogênicos compartilham as mesmas vias de envolvimento | 30 |
| 3 N | MATERIAL E MÉTODOS | 37 |
| 3.1 | Material Vegetal | 37 |
| 3.2 | Assepsia de sementes e condições de crescimento | 38 |
| 3.3 | Organogênese indireta de brotos in vitro a partir da raiz principal | 39 |
| 3.4 | Microscopia de luz e caracterização histoquímica | 40 |
| 3.5 | Microscopia Eletrônica de Varredura | 41 |
| 3.6 | Avaliação da expressão gênica via RT-PCR | 41 |
| 3.7 | Isolamento, tratamento com DNAsel e quantificação do RNA total | 41 |
| 3.8 | Síntese de cDNA via pulsed stem-loop RT-PCR | 42 |
| 3.9 | Avaliação do acúmulo dos transcritos por RT-qPCR | 43 |
| 4 F | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 45 |
| 4.1 gen | Análise quantitativa da regeneração de brotos <i>in vitro</i> em plantas com a via ética miR156/SPL alterada | 45 |
| 4.2 | Aspectos morfológicos dos brotos regenerados in vitro | 48 |
| 4.3 | Análise histológica e histoquímica | 53 |
| 4.4 | Análise de expressão gênica via RT-PCR e RT-qPCR | 59 |
| 4.5 | Análise da distribuição de auxina e citocinina | 65 |
| 5 (| CONCLUSÕES | 71 |
| REF | REFERÊNCIAS | |

RESUMO

Análise do papel da via miR156/SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like (SPL) na organogênese in vitro a partir de raízes de Arabidopsis thaliana

Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs endógenos não codantes de 21-24 nucleotídeos (nt) que regulam a expressão gênica de genes-alvos. Eles estão envolvidos em diversos aspectos de desenvolvimento da planta, tanto na parte aérea, quanto no sistema radicular. Entre os miRNAs, o miRNA156 (miR156) regula a família de fatores de transcrição SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like (SPL) afetando diferentes processos do desenvolvimento vegetal. Estudos recentes mostram que a via gênica miR156/SPL apresenta efeito positivo tanto no aumento da formação de raízes laterais, guanto no aumento de regeneração de brotos in vitro a partir de folhas e hipocótilos em Arabidopsis thaliana. Devido ao fato de que a origem da formação de raiz lateral e a regeneração in vitro de brotos a partir de raiz principal compartilham semelhanças anatômicas e moleculares, avaliou-se no presente estudo se a via miR156/SPL. da mesma forma que a partir de explantes aéreos, também é capaz de influenciar na regeneração de brotos in vitro a partir de explantes radiculares. Para tanto foram comparados taxa de regeneração, padrão de distribuição de auxina e citocinina, análises histológicas e histoguímicas das estruturas regeneradas em plantas com via miR156/SPL alterada, incluindo planta mutante hyl1, na qual a produção desse miRNA é severamente reduzida. Além disso, foi avaliado o padrão de expressão do miR156 e específicos genes SPL durante a regeneração de brotos in vitro a partir da raiz principal de Arabidopsis thaliana. No presente trabalho observou-se que a alteração da via gênica miR156/SPL é capaz de modular a capacidade de regeneração de brotos in vitro a partir de raiz principal de Arabidopsis thaliana e a distribuição de auxina e citocinina presente nas células e tecidos envolvidos no processo de regeneração. Plantas superexpressando o miR156 apresentaram redução no número de brotos regenerados, além de ter o plastochron reduzido quando comparado com plantas controle. Adicionalmente, plantas contento o gene SPL9 resistente à clivagem pelo miR156 (rSPL9) apresentaram severa redução na quantidade de brotos, além de terem o plastochron alongado. Interessantemente, plantas mutantes hyl1-2 e plantas rSPL10 não apresentaram regeneração de brotos ao longo da raiz principal, mas sim intensa formação de raízes laterais e protuberâncias, respectivamente, tendo essa última apresentado indícios de diferenciação celular precoce. Tomados em conjunto os dados sugerem que o miR156 apresenta importante papel no controle do processo de regeneração de brotos in vitro. Entretanto, esse efeito é mais complexo em regeneração in vitro a partir de raízes do que a partir de cotilédones ou hipocótilos.

Palavras-chave: miR156; *SPLs*; Auxina e citocinina; Regeneração de brotos *in vitro*; Explante radicular

ABSTRACT

Role of the miR156/SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like (SPL) pathway in the *in vitro* shoot regeneration from root of Arabidopsis thaliana

MicroRNAs (miRNAs) are endogenous small non-coding RNAs of 21-24 nucleotides (nt) in length that regulate target gene expression. They are involved in many aspects of plant development, both in the shoot and in the root systems. Among miRNAs, miRNA156 (miR156) regulates SQUAMOSA Promoter Binding-Like (SPL) transcription factor family affecting different plant development processes. Recent studies have shown that the miR156/SPL pathway has a positive effect both in the increase of lateral root formation and regeneration of shoots from leaves and hypocotyls in Arabidopsis thaliana. Because the origin of lateral root formation and in vitro shoot regeneration from primary root share similar anatomical and molecular features, in the present study was evaluated whether the miR156/SPL pathway, in the same manner that from aerial explants, is also able to influence the in vitro shoot regeneration from root explants. For this, it was compared regeneration rates, distribution pattern of auxin and cytokinin, histological and histochemical analyses of the structures regenerated in plants in with the miR156/SPL pathway is modified, including the mutant hyl1-1, in which the biosynthesis of this miRNA is severely reduced. Besides that, it was evaluated the expression pattern of miR156 and specific SPL target genes during in vitro shoot regeneration from primary roots of Arabidopsis it was observed that the alteration on the miR156/SPL pathway is capable to modulate in vitro shoot regeneration from the primary root of Arabidopsis and the distribution of auxin and cytokinin at the tissues and cells involved in the regeneration process. Plants overexpressing the miR156a have shown reduction in the number of regenerated shoots, and displayed a reduction in plastochron when compared with wild type plants. Additionally, plants expressing cleavage-resistant form of SPL9 (rSPL9) presented severe reduction in the amount of shoots, and extended plastochron. Interestingly, mutant hyl1-2 and plants rSPL10 did not show any shoot regeneration along the root, but high formation of lateral roots and protuberances, respectively, having rSPL10 presented evidence of precocious cell differentiation. Taken together, these data suggest that de miR156 and SPLs have an important role in the control the *in vitro* shoot regeneration process. However, its effect is somehow more complex in roots than in cotyledons or hypocotyls.

Keywords: mir156, SPLs; Auxin and cytokinin; *in vitro* shoot regeneration; Root explants

LISTA DE FIGURAS

| Figura 1 - Caracterização da raiz principal de Arabidopsis thaliana19 |
|---|
| Figura 2 - Microscopia eletrônica de transmissão comparando células do polo do |
| protoxilema com células pericíclicas do polo do protofloema20 |
| Figura 3 - Processo de formação da raiz lateral23 |
| Figura 4 - Biogênese dos miRNAs em plantas27 |
| Figura 5 - Esquema do <i>pulsed stem-loop</i> RT-PCR42 |
| Figura 6 - Média de brotos regenerados a partir de raiz de Arabidopsis thaliana com |
| a via gênica miR156/SPL alterada46 |
| Figura 7 - Diferença morfológica no processo de regeneração de brotos in vitro a |
| partir de raiz de Arabidopsis thaliana após 15 dias em meio SIM49 |
| Figura 8 - Diferença morfológica no processo de regeneração de brotos in vitro a |
| partir de raiz de Arabidopsis thaliana após 20 dias em meio SIM50 |
| Figura 9 - Microscopia eletrônica de varredura em WT e <i>rSPL10</i> 52 |
| Figura 10 - Cortes transversais de explantes excisados de plântulas com sete dias |
| após germinação54 |
| Figura 11 - Cortes longitudinais de eventos da organogênese indireta a partir de raiz |
| de Arabidopsis thaliana55 |
| Figura 12 - Análise histoquímica durante organogênese indireta a partir de raiz |
| principal de Arabidopsis thaliana58 |
| Figura 13 - Análise de expressão gênica via pulsed stem-loop RT-PCR60 |
| Figura 14 - Análise de expressão gênica via pulsed stem-loop RT-qPCR61 |
| Figura 15 - Localização da expressão do gene <i>MIR156a</i> 64 |
| Figura 16 - Distribuição de auxina nos cruzamentos durante a regeneração de brotos |
| in vitro65 |
| Figura 17 - Distribuição de citocinina nos cruzamentos durante a regeneração de |
| brotos in vitro68 |

1 INTRODUÇÃO

A arquitetura do sistema radicular de Arabidopsis thaliana consiste de uma raiz principal de origem embrionária e de raízes laterais com desenvolvimento pósembrionário. Sua estrutura histológica é composta pela epiderme, sendo essa a mais externa, seguida do córtex, endoderme e periciclo no qual circunda todo o sistema vascular. O periciclo é composto por dois tipos diferentes de células (PARIZOT et al., 2008): células pericíclicas localizadas adjacentemente aos polos do floema, nas quais apresentam características de células diferenciadas e células pericíclicas adjacentes aos polos do xilema (XPP - do inglês "xylem pole pericycle") com características meristemáticas, apresentando três ou mais vacúolos e citoplasma denso contendo numerosos ribossomos. Raízes laterais (RL) iniciam seu desenvolvimento ao longo da raiz principal a partir de divisões anticlinais de determinadas células do XPP e posterior divisão periclinal das mesmas originando uma segunda camada de tecido. Tal processo segue com divisões periclinais e anticlinais originando uma estrutura de primórdio de raiz lateral em formato de domo que progressivamente apresenta alongamento e diferenciações celulares até o momento em que emerge da raiz principal (MALAMY; BENFEY, 1997).

Porém, nem todas as células do XPP são capazes de originar a RL, apenas as chamadas *founder cells* que estão distribuídas em intervalos regulares ao longo da raiz principal (MORENO-RISUENO et al., 2010) terão competência para iniciar o desenvolvimento. A identidade dessas *founder cells* se dá por um acúmulo máximo local de auxina (DUBROVSKY et al., 2008), o qual é consequência de uma complexa interação envolvendo transportadores de auxina (CASIMIRO et al., 2001; BENKOVÁ et al., 2003) e moléculas sinalizadoras (DE RYBEL et al., 2010; ARASE et al., 2012). Durante o desenvolvimento da raiz lateral, a auxina também regula e coordena tanto a polarização quanto as primeiras divisões anticlinais assimétricas das LR *founder cells* (GOH et al., 2012). Além disso, o gradiente de auxina gerado por transportadores de auxina no primórdio do novo órgão especifica e organiza as células e tecidos estruturando-os de forma padronizada para o correto desenvolvimento da raiz lateral (BENKOVÁ et al., 2003).

Recentemente, mostrou-se o importante papel do microRNA156, e seus genes-alvo, no aumento da formação de raiz lateral em *Arabidopsis thaliana* (YU et

al., 2015). Em plantas, microRNAs são pequenos RNAs não codantes de 21 a 24 nucleotídeos codificados por genes *MIRNAs* (*MIRs*) que regulam a expressão gênica pós-transcricionalmente por meio de interações miRNA-mRNA de forma a parear sua sequência com a sequência de mRNA alvo (VOINNET, 2009). No genoma de arabidopsis, pelo menos 155 loci de microRNAs já foram identificados (LU et al., 2006), sendo um deles referente ao miR156, o qual possui dez membros (MIR156A-J) e é conservado em todas as Angiospermas avaliadas até o momento (MOREA et al., 2016).

Os alvos para esse microRNA são os membros da família SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like (SPLs) que codificam uma classe de fatores de transcrição específicos de plantas (SCHWAB et al., 2005). Em arabidopsis, 10 dos 16 genes SPLs são regulados pelo microRNA156 (WU et al., 2009). Os genes SPLs exercem papel fundamental no controle do tempo de florescimento, transição da fase juvenil-adulta, formato da lâmina foliar, distribuição de tricomas, regulação da biossíntese de antocianina e desenvolvimento de frutos (WANG; CZECH; WEIGEL, 2009; WU et al., 2009)

A via miR156/SPL foi recentemente implicada no controle da arguitetura do sistema radicular de arabidopsis. Segundo Yu et al., 2015, a superexpressão do miR156 (p35S:MIR156) tem um papel positivo no aumento da formação de raiz bloqueio lateral. Plantas apresentando da atividade do microRNA156 (p35S:MIM156) e genes alvos resistentes a ação do microRNA, principalmente o gene SPL10 (pSPL10:rSPL10), diminuíram significativamente o desenvolvimento de raizes laterais. Resultados ainda obtidos no mesmo estudo demonstram que a auxina pode induzir a expressão do microRNA156 e de genes SPLs, sendo, portanto, esse fitormônio um sinal de regulação da via miR156/SPL no desenvolvimento de raiz lateral.

Interessantemente, a formação de raiz lateral e a regeneração de brotos compartilham os mesmos estágios iniciais de desenvolvimento (ATTA et al., 2009; SUGIMOTO; JIAO; MEYEROWITZ, 2010), ambas a partir de células do periciclo. Em relação à organogênese *in vitro* de brotos sabe-se que o processo de regeneração apresenta algumas etapas que envolvem desde a especificação/identidade das *founder cells*, aquisição de competência e desenvolvimento de primórdios de um broto, até, finalmente, o desenvolvimento do órgão por completo (ZHAO et al., 2008; DUCLERCQ et al., 2011). O processo de regeneração indireta *in vitro* (VALVEKENS

et al., 1988) é dividido em duas etapas: primeiramente, o tecido que irá regenerar um broto *in vitro* é submetido a um meio com maior razão auxina:citocinina e posteriormente transferido a um meio com menor razão auxina:citocininarico em citocinina, sendo que a especificação/identidade das *founder cells* e aquisição de competência para formação do primórdio são mediados pela auxina e o direcionamento para que tal primórdio adquira identidade de broto é mediado pela citocinina (MOTTE et al., 2014).

Recentemente foi demostrado em *Arabidopsis thaliana* o importante papel da via miR156/SPL na modulação da capacidade regenerativa de brotos *in vitro* a partir de explantes aéreos (ZHANG et al., 2015).

Nesse contexto, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar o possível papel da via genética miR156/SPL na regeneração in vitro de brotos a partir de raízes de *Arabidopsis thaliana,* analisando quantitativamente e qualitativamente características morfogênicas, anatômicas, fisiológicas e moleculares.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Arquitetura radicular

O sistema radicular de plantas vasculares consiste de uma raiz de origem embrionária bem como outros tipos de raízes que têm seu início de formação em eventos pós-embrionários. Tal sistema fornece não apenas suporte estrutural à parte aérea, mas também tem como função adquirir nutrientes e água para o crescimento e desenvolvimento da planta (PETRICKA et al., 2012; WACHSMAN et al., 2015). Uma visão mais aprofundada conceitua o sistema radicular como um sistema dinâmico, capaz de regular direta ou indiretamente a morfologia de uma planta, a fisiologia, bioquímica, floração e síntese de metabólitos secundários (ABHILASH; DUBEY, 2015).

A configuração espacial do sistema radicular ou a arguitetura do sistema radicular (ASR) é determinada pela espécie vegetal, composição do solo, disponibilidade de água e nutrientes minerais, interações genéticas e hormonais, além de outros fatores exógenos e endógenos (HODGE et al., 2009). Embora não exista uma classificação simples para a ASR, é aceito que duas principais morfologias para o sistema radicular são recorrentes (FITTER, 1987; OSMONT et al., 2007). A primeira é tipicamente encontrada em monocotiledôneas (por exemplo, Zea mays L. e Oryza sativa L.) na qual o sistema radicular derivado a partir da raiz principal embrionária é pequeno e importante apenas nos primeiros estágios de desenvolvimento da planta, sendo que a maior parte do sistema radicular dessa classe é, de forma pós-embrionária, derivado a partir de raízes adventícias, nas quais podem ser amplamente definidas como raízes que se originam a partir de estruturas aéreas como hastes e folhas (OSMONT et al., 2007; BELLINI et al., 2014). De forma contrastante, em eudicotiledôneas (por exemplo, Arabidopsis thaliana, Solanum lycopersicum L. e Populus spp.), o sistema radicular inicia-se de forma embrionária com a raiz primária e, posteriormente, ocorre a formação de órgãos laterais e suas ramificações, conjuntamente denominadas raízes laterais (MALAMY, 2005). Nesse caso a ASR corresponde ao alongamento da raiz principal e raízes laterais, bem como a quantidade de raízes laterais em desenvolvimento

(KHAN et al., 2011). Raízes adventícias são raras em eudicotiledôneas, mas ocasionalmente emergem a partir do hipocótilo ou hastes, em particular mediante algum ferimento (OSMONT et al., 2007).

2.1.2 Formação da raiz principal em Arabidopsis thaliana

O sistema radicular inicia-se embrionariamente com a raiz principal, na qual radialmente cada camada celular concêntrica corresponde a um tecido específico (podendo determinado tecido ser composto por mais de uma camada) e que apresenta funções distintas na raiz. A camada mais externa que compõe o órgão refere-se à epiderme, seguida do córtex, endoderme e periciclo, sendo que este último circunda o cilindro vascular central com xilema e floema (Figura 1A) (KHAN et al., 2011).

Tais tecidos são gerados pelo meristema apical radicular (MAR), o qual gera novas células para o crescimento da raiz. O MAR é composto por um conjunto de células iniciais (stem cells) pluripotentes (células que possuem a habilidade de originar a maior parte dos diferentes tipos celulares que compõe o organismo) que circundam o centro quiescente (CQ), e apresentam baixa atividade mitótica. Tais células são responsáveis pela manutenção do estado indiferenciado das células iniciais (VERDEIL et al., 2007; PETRICKA et al., 2012). As novas células geradas a partir do MAR são classificadas em três grandes zonas de desenvolvimento conforme sua posição longitudinal ao longo da raiz principal, até que atinjam a maturidade celular. Essas zonas foram subdivididas, perfazendo 12 regiões de desenvolvimento radicular em arabidopsis (SUGIMOTO et al., 2010). Entretanto, nesta dissertação, serão discutidas somente três principais zonas de crescimento radicular. Na região mais distal da raiz principal encontra-se a Zona meristemática (MZ), onde as células se dividem continuamente, gerando um conjunto de células que irão diferenciar-se e alongar-se. A zona de alongamento (EZ), região da raiz onde as células perdem sua capacidade de divisão e aumentam o seu comprimento. E, finalmente, na região mais próxima ao hipocótilo, a zona de diferenciação (DZ), onde as células apresentam características e funções especializadas, como é observado na Figura 1B (PETRICKA et al., 2012).



Figura 1 – Caracterização da raiz principal de Arabidopsis thaliana. (A) Corte transversal e longitudinal da raiz primária. As cores representam as camadas celulares. (B) Visão geral das zonas de desenvolvimento da raiz primária de A. thaliana (Figura adaptada de Petricka et al., 2012)

2.1.3 Formação de raiz lateral em Arabidopsis thaliana

Ao longo da raiz principal, o periciclo é composto por dois tipos diferentes de células (PARIZOT et al., 2008): células pericíclicas localizadas adjacentemente aos polos do floema, nas quais apresentam características de células diferenciadas e células pericíclicas adjacentes aos polos do xilema (XPP - do inglês *xylem pole pericycle*) com características meristemáticas, apresentando três ou mais vacúolos e citoplasma denso contendo numerosos ribossomos (Figura 2). Raízes laterais (RL) iniciam seu desenvolvimento ao longo da raiz principal a partir de divisões anticlinais de, normalmente, três células do XPP (ATTA et al., 2009), originando o primórdio de raiz lateral (PRL). Segundo Malamy *et al.* (1997), o desenvolvimento da raiz lateral é dividida em oito estágios, sendo essa fase de divisões anticlinais classificada como a primeira etapa. O segundo estágio é caracterizado por uma divisão periclinal das células do LRP originando duas camadas celulares: *Inner layer* ou camada mais interna e *outer layer* ou camada mais externa. Tal processo de desenvolvimento

segue suas etapas com divisões anticlinais e periclinais, com as células se diferenciando e se alongando radialmente no sentido da epiderme, de forma a penetrar nos tecidos adjacentes ao periciclo. Entretanto, nem todas as células envolvidas no PRL participam do processo de divisão periclinal, normalmente as células periféricas não sofrem essas divisões periclinais, o que favorece o formato em domo do PRL.



Figura 2 - Microscopia eletrônica de transmissão comparando células pericíclicas do polo do protoxilema (A), com células pericíclicas do polo do protofloema (B). Flechas localizam os ribossomos na célula pericíclica e asterico localiza o vacúolo na célula. Nota-se presença de vários ribossomos e vacúolo fracionado em uma mesma célula XPP. Pc, periciclo; pX, polo do protoxilema; pP, polo do protofloema (Figura adaptada de Parizot et. al., 2008)

Nem todas as células do XPP são capazes de originar o PRL, apenas as chamadas "founder cells" ou "células fundadoras" que estão distribuídas em intervalos regulares ao longo da raiz principal (MORENO-RISUENO et al., 2010), terão competência para iniciar o desenvolvimento. A identidade dessas founder cells se dá por um acúmulo máximo local de auxina (DUBROVSKY et al., 2008) no qual é consequência de uma complexa interação envolvendo transportadores de auxina (CASIMIRO et al., 2001; BENKOVÁ et al., 2003) e moléculas sinalizadoras (DE RYBEL et al., 2010; ARASE et al., 2012). Durante o desenvolvimento da raiz lateral,

a auxina também regula e coordena tanto a polarização quanto as primeiras divisões anticlinais assimétricas das *founder cells* das RLs (GOH et al., 2012). Além disso, o gradiente de auxina gerado por transportadores de auxina no primórdio do novo órgão especifica e organiza as células e tecidos estruturando-os de forma padronizada para o correto desenvolvimento da raiz lateral (BENKOVÁ et al., 2003).

2.1.4 Regulação hormonal no desenvolvimento da raiz lateral

Os hormônios vegetais estão entre os principais reguladores endógenos do desenvolvimento da raiz. Cada hormônio vegetal: auxina, citocinina, giberelina, brassinosteróides, ácido abscísico, estrigolactonas e poliaminas, apesar de terem rotas de biossíntese específicas e rotas de sinalização específicas, devem interagir entre si e atuar mutuamente para a correta formação da raiz (PACIFICI et al., 2015). Brassinosteróides e poliaminas regulam positivamente a formação da raiz lateral, enquanto que, ácido abscísico, giberelina, ácido jasmônico, etileno, citocinina e estrigolactonas, inibem o desenvolvimento do órgão. Em contraste, poliaminas, brassinosteróides e estrigolactonas regulam positivamente o desenvolvimento da raiz primária, enquanto que o desenvolvimento de pêlos radiculares é positivamente regulado por brassinosteróides, etileno e estrigolactonas (SAINI et al., 2013).

A auxina está envolvida em todos os estágios do desenvolvimento da raiz lateral, incluindo iniciação, padronização e o processo de emergência a partir da raiz principal (DE SMET et al., 2007; PÉRET et al., 2009; TIAN et al., 2014). A auxina atua como um "sinal de permissão" para a divisão celular, fornecendo competência necessária nas etapas iniciais do ciclo celular, promovendo a expressão de genes essenciais para fase que antecede a síntese de DNA (*gap* G1) e a fase de síntese de DNA (fase S), fases que precedem a replicação celular (STALS; INZÉ, 2001; INZE; DE VEYLDER, 2006). Tal hormônio também atua no alongamento celular de forma indireta através de um processo de sinalização e diminuição do pH da matriz da parede celular, o que promove a ativação de proteínas responsáveis pela expansão da célula (RÜCK et al., 1993; COSGROVE, 2000).

Uma das auxinas endógenas em planta é o ácido indol-3-acético (AIA). Em *Arabidopsis thaliana*, a nível celular, existem dois principais transportadores de AIA na sua forma aniônica, sendo as proteínas AUX1/LAX (AUXIN1/ LIKE AUX1), em particular AUXIN PERMEASE1 (AUX1), responsáveis pelo influxo celular de auxina (SWARUP et al., 2001). Já o efluxo celular de auxina é realizado pelas proteínas PIN-FORMED (PIN) localizadas de forma polar na membrana celular e responsáveis pelo transporte polar de auxina (PAT) e pela formação de gradientes de auxina ao longo da raiz (GRIENEISEN et al., 2007).

Demonstrou-se que mutações nos genes PIN inibem a padronização do meristema radicular, a formação da raiz lateral, a diferenciação do tecido vascular e resposta ao gravitropismo (BENNETT et al., 1996; BLILOU et al., 2005), sendo que o correto funcionamento da proteína PIN estabelece um acúmulo máximo de auxina no ápice da raiz primária e nas raízes laterais, proporcionando a correta polarização do hormônio, crescimento e desenvolvimento da raiz (GRIENEISEN et al., 2007). Adicionalmente, a alteração no transporte e distribuição do hormônio auxina através da aplicação de inibidores específicos, tais como ácidos 1-N-naftilftalâmico (NPA) e triiodobenzóico (TIBA), reduziram o crescimento da raiz primária e a correta ação da auxina no processo de divisão celular e diferenciação celular na raiz (PETERSSON et al., 2009; DING, 2010). Outra consequência da ação de inibidores do transporte polar de auxina e o incorreto funcionamento das proteínas PIN é a inibição do início do processo de formação da raiz lateral devido a falta de ação da auxina sobre as XPP(CASIMIRO et al., 2001), visto que a auxina é necessária para a divisão assimétrica das founder cell - sendo esse tipo de divisão um indicativo de que as duas células filhas geradas terão um padrão distinto de desenvolvimento e diferenciação (SCHERES; BENFEY, 1999; ABRASH; BERGMANN, 2009) - e para o correto início da formação de tal órgão, como é esquematizado na figura 3.

A partir do momento em que se atinge seu local de ação, a auxina é percebida pela família de proteínas receptoras TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1) nas quais interagem e ubiquitinam as proteínas AUXIN/ INDOLE-3-ACETIC ACID (Aux/IAA). Isso ocorre pelo fato do gene *TIR1* codificar uma subunidade do complexo SCF^{TIR1} (SKIP1, CDC53/CULLIN, F-box) ubiquitina ligase e consequentemente degradar a proteína Aux/IAA na presença de auxina. As proteínas Aux/IAA atuam como inibidores de resposta à auxina formando heterodímeros com os fatores de transcrição ARF (AUXIN RESPONSE FACTOR) e, portanto, inibindo a ativação de genes responsivos a auxina (MOUBAYIDIN et al., 2009). Estudos mostram que a formação de raiz lateral é intensamente prejudicada já nos seus estágios iniciais de desenvolvimento em plantas mutantes *arf7 e arf19* pelo fato de que a ausência das proteínas ARF7 e ARF19 inibe a divisão das células

do periciclo induzida pela auxina e consequentemente inibindo o início do processo de formação da raiz lateral (OKUSHIMA et al., 2007).



Figura 3 - Processo de formação da raiz lateral (RL). Percepção e acúmulo de auxina por determinadas células do periciclo do polo do xilema (asterisco escuro) e divisão assimétrica das mesmas (asterisco claro). Acúmulo de auxina no ápice do primóridio de raiz também é detectado (flecha). A citocinina não impede a percepção ou ação da auxina nas founder cells, mas sim a divisão celular assimétrica das mesmas como consequência da interferência na expressão de genes PIN (adaptado de LAPLAZE et al., 2007).

Entretanto, a degradação das proteínas Aux/IAA é dependente da concentração de auxina: elevada concentração desse hormônio causa a degradação de tal proteína, enquanto que, em baixas concentrações de auxina as proteínas Aux/IAA permanecem estáveis e interagidas com a proteínas ARF. Tal concentração e distribuição de auxina em níveis celulares pode ser analisada através do nível de expressão do gene repórter *pDR5::GUS*. Esse gene quimérico é formado pelo promotor sintético DR5 (pDR5) (responsivo à auxina), o qual está fusionado ao gene repórter β - glucuronidase (uidA ou GUS) (SABATINI et al., 1999).

Em contraste com as atividades da auxina, os efeitos da citocinina no desenvolvimento da raiz lateral permanecem menos estudados. Em *Arabidopsis thaliana* a forma mais abundante da citocinina é a isopenteniladenina (iP) e a transzeatina (tZ). Não se sabe ao certo como é realizado o transporte da citocinina

(PACIFICI et al., 2015), porém, estudos mostram que além do processo de difusão, o transporte desse hormônio a longa distância (da raiz para a parte aérea) ocorre através do floema e xilema (BISHOPP et al., 2011; KO et al., 2014).

Em arabidopsis, as citocininas são percebidas e sinalizadas por receptores transmembranares histidina guinase denominados ARABIDOPSIS HIS KINASE 2 (AHK2), AHK3 e AHK4 também conhecido como CYTOKININ RESPONSE 1 (CRE1) ou WOODENLEG (WOL) (HWANG; SHEEN, 2001; INOUE et al., 2001) que na presença da citocinina ativam uma série de fosforilações que finaliza na transferência de um grupo fosfato de membros da família ARABIDOPSIS HIS PHOSPHOTRANSFER PROTEIN (AHP) para uma família de proteínas localizada no núcleo celular, denominada ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR (ARR) (HUTCHISON et al., 2006). As proteínas ARR são codificadas por uma família multigênica pertencentes a duas classes: tipo-A (ARR3-ARR9 e ARR15-ARR17), formados unicamente de domínios receptores e tipo-B (ARR1, ARR2, ARR10-ARR14 e ARR18-21), que possuem um domínio de fator de transcrição, além do domínio receptor, sendo esses dois tipos os primeiros genes a serem ativados em resposta à citocinina. ARRs tipo B são reguladores positivos e promovem diretamente a expressão de ARRs tipo A e a expressão de genes reponsivos a citocinina. Entretando, as proteínas ARRs tipo A atuam como reguladores negativos, interferindo na ação das proteínas ARRs tipo B e estabelecendo um feedback negativo na rota de sinalização da citocinina (HWANG et al., 2012), de forma que mutações arr-tipo A com perda de função são mais sensíveis à citocinina (TO et al., 2004).

Alguns estudos demonstram o efeito inibitório de citocinina endógena e exógena no processo de formação da RL (GOODWINA; MORRISAB, 1979; WIGHTMAN et al., 1980; LAPLAZE et al., 2007), resultando na diminuição da densidade de raiz lateral em tratamentos com crescente concentração de citocinina. Tal efeito inibitório se deve a um aumento no nível de citocinina nas células iniciais do XPP e, consequentemente, de um padrão anormal de divisão nessas células desde o primeiro estágio do processo de formação de raiz lateral. Por exemplo, no primeiro estágio de formação da RL, ao invés do padrão normal de divisões anticlinais, observa-se divisões periclinais e oblíquas. Similarmente, no segundo estágio da formação, foram observadas divisões anticlinais ectópicas na *inner layer*, sendo que essas divisões ocorrem apenas na *camada mais externa* (LAPLAZE et

24

al., 2007). Porém, a maior concentração de citocinina não atua por impedir o início da formação da raiz lateral (já que a presença de citocinina não impede a percepção e ação da auxina), mas sim por interferir na expressão dos genes *PIN*, impedindo a correta formação de gradiente de auxina nas *founder cells* do periciclo, interferindo na divisão assimétrica inicial (figura 3), resultando em mudanças no padrão de divisão e diferenciação celular (LAPLAZE et al., 2007).

Recentemente foi demonstrado a ação da auxina sobre a via gênica do microRNA156/SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE(SPL), na qual apresenta um papel na modulação da formação da raiz lateral. Interessantemente, nesse caso a auxina induz tanto a expressão do microRNA156, que atua estimulando a formação de raiz lateral, quanto dos seus genes alvos *SPLs* que agem inibindo a formação de raiz lateral (YU et al., 2015).

2.1.5 MicroRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas endógenas de RNA não codante que têm entre 21-24 nucleotídeos de comprimento e que regulam negativamente a expressão gênica a nível pós-transcricional (ZHANG; WANG, 2015). Primeiramente identificados em animais (LEE, 1993) e posteriormente em plantas, os miRNAs são codificados pelos genes *MIRNAs (MIRs)* localizados principalmente nas regiões intergênicas, mas também na região intragênica, embora essa última forma seja menos frequente em plantas (REINHART et al., 2002).

A biogênese dos miRNAs é iniciada com a transcrição dos genes *MIR*s pela RNA polímerase II (Pol II), gerando um transcrito primário (pri-miRNA) contendo uma estrutura secundária tipo "*hairpin*" (LEE et al., 2004), a qual é processada via a ação da enzima tipo RNase III DICER-LIKE1 (DCL1), gerando um precursor intermediário ou pre-miRNA. Nesta etapa, a DCL1 atua de forma conjunta com duas proteínas nucleares: HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1) E SERRATE (SE). Em sequência, o pre-miRNA é novamente clivado pela enzima DCL1, gerando um duplex de miRNA/miRNA* (21-24 nt) composto tanto o miRNA maduro quanto a sua fita complementar, denominado "miRNA*". O duplex é então metilado nas extremidades 3' por ação da enzima nuclear metiltransferase Hua Enhancer 1 (HEN1), conferindolhe maior estabilidade e evitando sua degradação pela classe de exonucleases SMALL RNA DEGRADING NUCLEASE (SDN) (YU et al., 2005) e transportado para o citoplasma pela enzima HASTY 1 (HST1) (PARK et al., 2005). No citoplasma, a dupla fita é desfeita pela ação de helicases e, finalmente, o miRNA maduro é incorporado ao Complexo de Silenciamento via interferência por RNA (RISC), enquanto que o miRNA* é excluído do RISC e degradado. Um componente central desse complexo de silenciamento é um membro da família proteica ARGONAUTE. *AGO1* é o único gene da família Argonaute conhecido e necessário para a função dos miRNAs em arabidopsis. A proteína AGO1, por ação dos miRNAs, é "guiada" até mRNAs alvos que são reconhecidos pela complementariedade de bases bases e cliva-os ou promove a repressão da tradução dos genes alvos do microRNA em questão (Figura 4) (JONES-RHOADES et al., 2006; VOINNET, 2009). Tanto a clivagem quanto o mecanismo de repressão da tradução requerem um certo grau de complementariedade de pares de bases entre o miRNA e o seu mRNA alvo.

Plantas mutantes deficientes na biogênese de microRNAs apresentam um aumento na concentração de pri-miRNAs e uma quantidade reduzida de microRNAs maduros, consequentemente aumentando o acúmulo de seus mRNAs alvos, resultando numa ampla variedade de defeitos morfológicos (HAN et al., 2004; VAZQUEZ et al., 2004; VOINNET, 2009). Mutação nula nos alelos *DCL1* ou *SE* são embrionariamente letais. As mutações por perda de função do *hyl1-1* e *hyl1-2*, nos quais sofreram inserção de transposon *Ds* (dissociação) e T-DNA, respectivamente, apresentam uma série de fenótipos mutantes, como baixa estatura, crescimento hiponástico das folhas, atraso no florescimento, redução na fertilidade da planta, diminuição da taxa de crescimento da raiz e alteração da resposta radicular ao gravitropismo (LU; FEDOROFF, 2000; VAZQUEZ et al., 2004).

Especificamente em plantas, os miRNAs e seus alvos apresentam alto grau de complementariedade, nenhum com poucos ou mismatch (não complementariedade entre os nucleotídeos). A inibição ocorre, de um modo geral, via clivagem do RNA mensageiro alvo e acontece usualmente no centro da complementariedade, entre o décimo e décimo primeiro nucleotídeo que pareia com o miRNA (YANG et al., 2007). Outro tipo de pareamento pouco comum em plantas, chamado de Mimicry, caracteriza-se pela presença de um mismatch loop (gerando um "protuberância" ou bulge) entre as posições 10 e 12 do pareamento entre o miRNA e sua sequência alvo. Em plantas, pelo fato dos pareamentos serem quase sempre perfeitos, estes mismatches impedem a clivagem do mRNA-alvo pela AGO1

de forma a "sequestrar" o microRNA correspondente e reduzir o seu nível de atividade. Um exemplo naturalmente encontrado em plantas é o transcrito *INDUCED BY PHOSPHATE STARVATION1 (IPS1)*. Este transcrito não codante apresenta sequência semelhante ao gene alvo do microRNA-399, o *PHOSPHATE 2 (PHO2)*. Por complementariedade o miR399 se liga ao *IPS1*, mas por apresentar mismatches na região de clivagem e não sofrer clivagem, sequestra tal microRNA e impede sua ação sobre o seu mRNA alvo. Dessa forma o termo "mimicry" foi cunhado para descrever a regulação do microRNA por meio de seu *mimc* alvo (MIM), sendo esse um mecanismo utilizado cientificamente para modular e estudar os efeitos da regulação gênica dos microRNAs em determinado organismo (FRANCO-ZORRILLA et al., 2007; MENG et al., 2012).



Figura 4 - Biogênese dos miRNAs em plantas. Após a transcrição dos genes *MIRs* (1) num transcrito primário chamado de pri-miRNA (2), a DCL1 cliva-o e processa-o em pre-miRNA (3) e miRNA duplex (4). Uma vez processado, o duplex é metilado pela HEN1 (5) para ser transportado do núcleo para o citoplasma pela HST (6). No citoplasma, a ligação de uma das fitas do miRNA no complexo RISC (7) permite o reconhecimento e a clivagem ou a repressão da tradução dos alvos (Fonte: Barrera, 2015)

MiRNAs são agrupados em famílias gênicas de acordo com a similaridade da sequência madura. Certas famílias possuem um grande número de membros (miR156, miR166, miR169), enquanto outras apenas um ou dois (miR162, miR390). Estudos mostram que muitas famílias de miRNA são evolutivamente conservadas em todas as linhagens de plantas incluindo musgos, monocotiledôneas e

eudicotiledôneas, o que sugere que a regulação gênica mediada pelos microRNAs existiu desde os primeiros estágios do processo de evolução vegetal. Em plantas, assim como novos miRNAs são gerados, outros, em alguns casos foram perdidos ao longo da evolução (MOREA et al., 2016). Uma pesquisa identificou que aproximadamente 50% da família de genes de miRNA presentes nos ancentrais de plantas com flores foram perdidos em algumas espécies de plantas examinadas (NOZAWA et al., 2012; ZHANG; WANG, 2015).

Entre os miRNAs altamente conservados encontram-se o miR156, expresso tanto em monocotiledôneas guanto em eudicotiledôneas (XIE et al., 2012; MOREA et al., 2016). Este microRNA apresenta seu maior acúmulo em plântulas e seu nível diminui ao longo do desenvolvimento vegetal (WU; POETHIG, 2006; WANG et al., 2009; WU et al., 2009). Sua superexpressão prolonga a fase juvenil da planta, enquanto que a redução da atividade do miR156 resulta num precoce fenótipo de planta adulta (WU et al., 2009). A família do miRNA156 possui dez membros descritos em arabidopsis (*AtMIR156a-j*; miRbase release 21.0 http://www.mirbase.org/). Os genes alvo do miR156, membros da família SQUAMOSA Promotor binding Protein-like ou SPL, codificam fatores de transcrição encontrados somente em plantas (Chen et al., 2010). A característica fundamental desta família é o domínio SBP (SQUAMOSA Binding Protein) de 76 aminoácidos de comprimento, o qual é responsável pela ligação ao DNA (Cardon et al., 1999). Em arabidopsis, esta família é composta por 16 genes SPLs (SPL1-16), os quais estão divididos em dois grupos. O primeiro grupo está representado pelas SPL1/7/12/14/16, os quais consistem de dez ou mais exons e codificam proteínas com um tamanho superior a 800 aminoácidos (aa). O segundo grupo representa os 12 genes SPLs restantes, com dois ou quatro exons que codificam proteínas com menos da metade do tamanho das SPLs do primeiro grupo (Riese et al., 2008). Em arabidopsis, dos 16 genes membros da família SPL, 10 são regulados pelo miR156 (SPL2, SPL3, SPL4, SPL5, SPL6, SPL9, SPL10, SPL11, SPL13 e SPL15) (WU et al., 2009) e são divididos em quatro clados. O clado I, composto pelas SPLs 3, 4, e 5, corresponde àquele com proteínas de menor tamanho molecular (131-181 aa), nas quais atuam principalmente no controle do tempo de florescimento e na mudança de fase do estágio vegetativo para o reprodutivo através da regulação dos genes LEAFY (LFY), FRUITFULL (FUL) e APETALA1 (AP1), genes envolvidos na transição da identidade meristemática (BENLLOCH et al., 2007; YAMAGUCHI et al., 2009). O segundo clado é composto pelos genes SPL9 e o seu parálogo SPL15 (SCHWARZ et al., 2008). Em arabidopsis, o duplo mutante spl9/spl15 promove o atraso na transição da fase vegetativa, apresenta encurtamento do tempo de plastochron foliar (tempo decorrente entre a produção de um primórdio foliar e o próximo), elevada taxa de formação foliar e aumento na brotação lateral (shoot branching), sendo que a expressão do gene SPL9 insensível a ação do miR156 (SPL9 resistente ou rSPL9) acelera o florescimento vegetal, encurtando a fase vegetativa e acelerando a expressão de características específicas de folhas adultas como, por exemplo, folhas com lâminas alongadas e margem serrilhada (SCHWARZ et al., 2008; WANG et al., 2009; WU et al., 2009). O terceiro clado inclui os genes SPL10, SPL11 e SPL2, nos quais regulam principalmente mudanças morfológicas nos órgão laterais (plantas expressando a forma resistente do gene SPL10, plantas rSPL10, apresentam folhas mais arredondadas e ainda mais serrilhadas em relação a plantas rSPL9). O quarto clado é composto pelos genes SPL6 e SPL13 e está relacionado com respostas imunológicas e regulação negativa de emergência de folhas no estádio cotiledonar, respectivamente (MARTIN et al., 2010; PADMANABHAN et al., 2013; AUNG et al., 2015).

Interessantemente, a superexpressão do microRNA156 em *Arabidopsis thaliana* promove severa redução da dominância apical, levando a uma maior produção de ramos laterais (SCHWAB et al., 2005; WU; POETHIG, 2006). Os estudos mencionados anteriormente demostraram a importância geral da via genética miR156/*SPL* no desenvolvimento vegetal. No entanto, estudos mais específicos revelaram que esta via age em diferentes processos como desenvolvimento do ovário e frutos (SILVA et al., 2014), resposta ao estresse abiótico (CUI et al., 2014; STIEF et al., 2014), desenvolvimento de tricomas (YU et al., 2010; XUE et al., 2014), menor produção de pólen (XING et al., 2010), desenvolvimento embrionário (NODINE; BARTEL, 2010) e biossíntese de antocianina (GOU et al., 2011), e mais recentemente, desenvolvimento radicular (YU et al., 2015).

Recentemente foi demonstrado que a via miR156/SPL modula o desenvolvimento da raiz lateral. Plantas de arabidopsis superexpressando o miR156 mostraram aumento no crescimento da raiz principal e significativo aumento no número de raízes laterais quando comparado com a planta controle. Adicionalmente, plantas transgênicas de arabidopsis contendo determinados alvos diretos do miR156

nas suas formas resistentes (rSPL3, rSPL9 e rSPL10), apresentaram reduzida formação de raiz lateral, sendo a planta rSPL10 com maior efeito, praticamente não apresentado formação de raízes laterais nas condições estudadas (YU et al., 2015). Além disso, tanto o microRNA156 quanto seus alvos em estudo (SPL3, SPL9 e SPL10) foram induzidos na presença de auxina, hormônio esse envolvido em todos os estágios do desenvolvimento da raiz lateral. Supõe-se, portanto, que a indução do miR156 mediado pela auxina aumenta a formação de raiz lateral. Adicionalmente, a indução dos SPLs por meio da auxina serve como um mecanismo para finalizar a sinalização (pelo fato de inibirem a formação de raiz lateral) e reiniciar o processo de desenvolvimento da raiz lateral, já que SPL3, SPL9 e SPL10, apesar de serem alvos, regulam positivamente a transcrição do miR156 (YU et al., 2015). Entretanto, o mecanismo pelo qual as SPLs regulam o tamanho da raiz principal e a formação de raízes laterais ainda necessita ser elucidado. Nosso grupo de pesquisa recentemente observou que o controle do tamanho da raiz principal pelas SPLs pode ser via a regulação negativa do fitormônio citocinina e divisões celulares (dados não mostrados).

2.1.6 Raizes laterais e brotos organogênicos compartilham as mesmas vias de desenvolvimento

Segundo Atta et al. (2009), a formação de raiz lateral a partir da raiz principal e a regeneração de brotos organogênicos *in vitro* a partir da raiz principal como explante compartilham os mesmos estágios iniciais de desenvolvimento. Tal estudo demonstrou que a regeneração de brotos apresenta a mesma origem a partir de células do periciclo adjacentes ao polo do xilema ou XPP (ATTA et al., 2009).

A regeneração de plantas *in vitro* ocorre através de duas vias principais, embriogênese somática e organogênese *de novo*, sendo essa última a mais frequentemente usada em métodos de melhoramento biotecnológico como, por exemplo, propagação *in vitro* e produção de haplóides (DUCLERCQ et al., 2011). A regeneração de plantas *in vitro* por meio da organogênese *de novo* é influenciada pelo tipo de explante usado e pelas condições ambientais, como por exemplo, meio de cultura, agente geleificante e hormônio vegetal, especialmente no que se refere ao efeito antagônico de auxina e citocininas na regeneração de raízes e brotos. Uma razão relativamente alta auxina/citocinina induz a regeneração de raiz ("*de novo* root organogenesis"), numa baixa razão espera-se induzir a regeneração de brotos ("*de novo* shoot organogenesis ou DNSO") e uma razão intermediária entre esses fitormônios leva a uma proliferação celular resultando na formação do que se chama de calo (SKOOG; MILLER, 1957).

O processo DNSO é o mais estudado no que se refere à organogênese *de novo*, isso porque o meristema apical caulinar dá origem a todas as partes aéreas da planta, sendo, portanto, o DNSO um sistema experimental utilizado para estudar processos biológicos fundamentais tais como iniciação das células-tronco vegetais (*stem cells*), determinação e diferenciação celular e interação entre os hormônios vegetais (CHE et al., 2006; BIRNBAUM; SÁNCHEZ, 2008). O desenvolvimento *de novo* do meristema apical apresenta padrão e organização celular semelhantes ao meristema apical caulinar (SAM) embrionário (GORDON et al., 2007). O SAM consiste em três zonas celulares distintas, a zona central (CZ, *central zone*), a zona periférica (PZ, *peripheral zone*) e a zona medular (RZ, *rib zone*). No ápice do SAM a CZ é composta pelas células-tronco, as quais pelas suas divisões geram células que irão se deslocar para a PZ (podendo sofrer diferenciação para formar órgãos específicos) ou para a RZ, que irá contribuir com células que compõem o eixo principal (MURRAY et al., 2012).

O processo DNSO *in vitro* pode ocorrer de forma direta, sem a formação intermediária de calo organogênico, ou indireta, com formação de calo organogênico (VALVEKENS et al., 1988; ATTA et al., 2009). O processo direto ocorre quando os explantes possuem células que já apresentam competência de resposta a determinados estímulos que reiniciam o ciclo celular e rapidamente direcionam a formação de brotos ou raízes, a depender do tipo e quantidade de estímulo recebido. O processo indireto ocorre quando as células presentes em determinados tecidos dos explantes ainda não são competentes e, portanto, se faz necessária a formação do calo organogênico, uma massa celular pluripotente (ATTA et al., 2009). Vários estudos importantes em arabidopsis envolvendo DNSO a partir de raiz como explante (ATTA et al., 2009; QIAO et al., 2012; ZHANG et al., 2015) utilizam um processo indireto proposto por Valvekens et al. (1988). Na primeira etapa, o explante é submetido ao meio de indução de calo (*callus-inducing medium* ou CIM), contendo razão auxina/citocinina elevada e tem como objetivo especificar células fundadoras (*founder* cells) e adquirir habilidade para regenerar um órgão (raiz ou broto).

Posteriormente, os explantes são transferidos para um meio de indução de broto (*shoot-inducing medium* ou SIM) com menor razão auxina/citocinina e com o intuito de atribuir a identidade de broto para as subsequentes etapas de desenvolvimento do calo organogênico.

No meio CIM normalmente são utilizadas auxinas sintéticas, como, por exemplo, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) ou ácido naftaleno acético (ANA). Tais auxinas, diferente das naturais, têm como característica serem muito pouco metabolizadas e em específico o 2,4-D não ser transportado para fora da célula pela proteína PIN (DELBARRE et al., 1996). Esse acúmulo gera no interior das células XPP um máximo de auxina necessário para a especificação das founder cells. A sinalização da auxina para a formação de broto também é semelhante à sinalização durante a formação da raiz lateral (MOTTE et al., 2014). O acúmulo é percebido pelas proteínas TIR1 que degradam os repressores transcricionais do tipo Aux/IAA, como a Aux/IAA28 que regula a especificação das founder cells e a SOLITARY ROOT (SLR/IAA14) que, após sua degradação, permite que as proteínas ARFs (ARF7 e ARF9) regulem a expressão de genes dependentes de auxina LATERAL **BOUNDARIES-DOMAIN29/ASYMETRIC** ORGAN LEAVES2-LIKE16 (LDB29/ASL16), LBD16/ASL18 e LBD18/ASL20 que regulam a migração nuclear e subsequente divisão anticlinal assimétrica de cada célula fundadora que dará início ao processo de organogênese (FUKAKI et al., 2002; OKUSHIMA et al., 2005; FUKAKI et al., 2006; LEE et al., 2009; GOH et al., 2012). Essas divisões anticlinais seguidas de divisões periclinais irão originar camadas celulares, levando à formação do calo organogênico. Esse processo é semelhante a formação da raiz lateral, porém, essa massa celular formada ao longo de quatro dias em CIM apresenta forma estrutural mais espaçada e menos definida (CHE et al., 2007).

Mutações com ganho de função dos genes *SLR/IAA14* e perda de função para os genes *arf7* e *arf9* impedem a iniciação tanto de primórdios de raiz lateral quanto de regeneração de broto organogênico (FUKAKI et al., 2002; VANNESTE et al., 2005). Além disso, a expressão ectópica ou suprimida de genes *LBD* aumentou ou impediu a formação de calo organogênico, respectivamente, levando a uma capacidade anormal de regeneração de brotos (WILMOTH et al., 2005; OKUSHIMA et al., 2007).

Vários genes induzidos durante o início da formação de raiz lateral também são induzidos na etapa em CIM do processo de DNSO. Por exemplo, o gene

WUSCHEL-RELATED HOMEOBOX5 (WOX5) expresso tanto nas células do centro quiescente quanto nas camadas subepidérmicas do calo organogênico; os genes SHORT ROOT (SHR) e SCARECROW (SCR) expressos na endoderme e no centro quiescente da raiz também expressos em todo o calo organogênico (SUGIMOTO et al., 2011); os genes ROOT CLAVATA HOMOLOG1 (RCH1) e QUIESCENT CENTRE25 (QC25) descritos como marcadores do meristema apical radicular, também foram detectados na fase de indução de calo (CASAMITJANA-MARTINEZ et al., 2003; ATTA et al., 2009).

O objetivo final em submeter os explantes ao meio CIM é a obtenção de calo organogênico competente para a formação de órgãos vegetais (CHE et al., 2007). A partir de então, o calo organogênico passa a ser classificado como primórdio de um órgão, mais especificamente como o primórdio de um broto organogênico, no caso de transferência do explante do meio CIM para o meio SIM. O primeiro requisito para a formação de broto organogênico é que a citocinina (presente em níveis elevados no meio SIM e responsável por determinar a identidade do calo organogênico) estimule as células que previamente em CIM adquiriram competência organogênica (MOTTE et al., 2014). Vários elementos relacionados com a percepção e sinalização da citocinina, como por exemplo, o gene CYTOKININ INDEPENDENT KINASE (CKI1), fatores de transcrição CYTOKININ RESONSE FACTORs (CRFs) e ARRs, afetam a capacidade de regeneração de brotos. Um dos marcadores da aquisição de competência do calo organogênico é o receptor de citocinina ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE4 (AHK4), que tem a expressão de seu gene aumentada durante a formação do calo na presença de auxina exógena proveniente do meio CIM. O local de expressão do AHK4 ao longo do calo organogênico identifica onde o gene WUSCHEL (WUS) será expresso por indução da citocinina exógena proveniente do meio SIM (GORDON et al., 2007). Estudos apontam que o bloqueio da ação de AHK4 leva a completa recalcitrância na regeneração de brotos (NISHIMURA et al., 2004).

A expressão do WUSCHEL (WUS) é o evento primordial de iniciação das células-tronco e sua expressão espaço-temporal é crítica para o estabelecimento do meristema durante a formação do broto *de novo* (GORDON et al., 2007). Durante a etapa em meio SIM, o WUS é expresso em duas fases. Inicialmente sua expressão é observada ao longo da região do explante que envolve as áreas precursoras da

formação do broto e expressão do gene *CUP-SHAPED COTYLEDON2* (*CUC2*) (CHE et al., 2006; GORDON et al., 2007).

Posteriormente, a expressão do *WUS* fica restrita as regiões onde o gene *AHK4* foi previamente induzido no calo. Logo após esse padrão de expressão, o gene *CLAVATA3* (*CLV3*), no qual codifica um peptídeo sinal que restringe a expressão do *WUS*, é expresso no ápice do primórdio do órgão, durante sua conversão para meristema apical (CHATFIELD et al., 2013), sendo que, a citocinina exógena presente em SIM é determinante para essa conversão (MOTTE et al., 2014). Interessantemente, a citocinina exógena proveniente do meio SIM regula a expressão no primórdio dos genes *PINs* e genes *YUCCAs* (*YUCs*), esses relacionados à biossíntese de auxina. A princípio na fase SIM, as células mais próximas da epiderme do primórdio do broto são ricas em proteínas PIN1 e proteínas AUX1, que atuam transportando a auxina sentido ápice dessa estrutura, consequentemente gerando um máximo de auxina nessa região (GORDON et al., 2007; ATTA et al., 2009). Posteriormente as proteínas PIN apresentam uma mudança na sua localização, promovendo o transporte e acúmulo da auxina no sentido da região incipiente ao primórdio do órgão (HEISLER et al., 2005).

Outros genes essenciais para a regeneração do broto são modulados pela auxina e citocinina durante a etapa em SIM. O gene *SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*), relacionado com a iniciação do meristema apical, manutenção do estado indiferenciado das células na CZ e biossíntese de citocinina é, a princípio, expresso nas células base do primórdio. Posteriormente, com a mudança da localização das proteínas PIN1 e pelo fato de ser suprimido pela auxina, o gene *STM* passa a ser expresso ao longo de todo o primórdio do broto (GORDON et al., 2007). Adicionalmente, as duas fases de transporte de auxina em SIM coincidem com duas fases distintas de expressão do gene *CUP-SHAPED COTYLEDON2* (*CUC2*). Na primeira fase, o *CUC2* é expresso ao longo de todo o primórdio, enquanto que após a mudança de sentido do deslocamento da auxina, o gene *CUC2* fica restrito na zona periférica do já então estabelecido SAM, sendo que tal gene é importante para a diferenciação celular do órgão nessa região (GORDON et al., 2007).

Sabe-se, portanto, que o sucesso para a regeneração do broto se dá não apenas pela diferença de concentração exógena nos meios CIM e SIM, mas também pela interação entre os fitormônios auxina e citocinina. Recentemente foi demostrado em arabidopsis o papel da via miR156/SPL na modulação da capacidade regenerativa de brotos *in vitro* a partir de explantes aéreos (ZHANG et al., 2015). A partir de tal estudo, concluiu-se que a diminuição da capacidade de regeneração de brotos ao longo da idade da planta está relacionado com o nível de concentração de miR156 na planta. A concentração desse microRNA diminui com o avanço da idade da planta e, portanto, torna-se insuficiente para impedir o aumento da expressão do gene *SPL9*, alvo direto do miR156. A proteína SPL9 é capaz de se ligar a determinados domínios dos fatores de transcrição ARRs tipo B e, consequentemente, impedir a correta sinalização da citocinina e expressão de genes dependentes da citocinina envolvidos no DNSO.

Sabe-se, então, que a via miR156/SPL afeta tanto a modulação do desenvolvimento da raiz lateral quanto na capacidade de regeneração de brotos a partir de explantes provenientes da parte aérea da planta, como folha e hipocótilo. Portanto, este trabalho teve como hipótese geral avaliar se a via miR156/SPL afeta o DNSO a partir de raízes principais de arabidopsis. Para tal, os objetivos específicos foram:

- Quantificar o número de brotos regenerados a partir de raizes de plantas de *Arabidopsis thaliana* com a via do miR156/*SPL* alterada;

- Determinar a distribuição de auxina e citocinina durante a regeneração de brotos a partir de plantas *Arabidopsis thaliana* superexpressando o microRNA156;

- Analisar a estrutura de tecidos e células durante a regeneração de brotos a partir de raiz de plantas *Arabidopsis thaliana* com a via miR156/SPL alterada;

- Avaliar a expressão do miR156 e genes *SPLs*, especificamente envolvidos na formação de raiz lateral, durante a regeneração de brotos a partir de raiz de *Arabidopsis thaliana*.

- Avaliar o padrão de expressão do gene *MIR156a* durante a regeneração de brotos a partir de raiz de *Arabidopsis thaliana*.
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

No presente trabalho foram utilizadas plantas de *Arabidopsis thaliana* ecótipo Columbia (Col-0) dos seguintes genótipos:

Plantas que expressam constitutivamente o precursor AtMIR156a (plantas miR156-OE). Estas plantas foram modificadas geneticamente por Wu e Poethig (2006) e caracterizam-se por possuir inserido, dentro do genoma, o precursor do gene AtMIR156a de arabidopsis sob o controle transcricional do promotor constitutivo do vírus do mosaico da couve flor (CaMV-35S). Em resposta à expressão constitutiva deste precursor, estas plantas, em comparação com o genótipo selvagem apresentam maior quantidade do miR156 maduro e características juvenis na fase adulta (WU e POETHIG 2006; MOREA et al., 2016).

Plantas com perda de função para os genes SPL9 e SPL15: Este duplo mutante foi obtido pelo cruzamento dos mutantes simples *spl9-1* (SALK_006573) e *spl15-1* (SALK_074426) (SCHWARZ et al., 2008). Estes genes agem redundantemente no controle da transição da fase juvenil para adulta em arabidopsis.

Plantas com resistência à clivagem "guiada" pelo miR156 no gene SPL9 (rSPL9): estas plantas possuem região contendo o promotor e a matriz de leitura do gene SPL9, essa última com mutações silenciosas introduzidas no sitio de reconhecimento do miR156, gerando uma versão resistente do SPL9 à clivagem do miR156 (WANG et al., 2008).

Plantas com resistência à clivagem do miR156 no gene SPL10 (rSPL10): estas plantas possuem região contendo o promotor e a matriz de leitura do gene SPL10, essa última com mutações silenciosas introduzidas no sitio de reconhecimento do miR156, gerando uma versão resistente do SPL10 à clivagem do miR156 (WANG et al., 2008).

Planta mutante com perda de função para o gene HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1).

Esse mutante (*hyl1-2*) foi obtido através da inserção de T-DNA no gene *HYL1,* apresentando um acúmulo reduzido de microRNAs maduros (principalmente o miR156; Li et al., 2012) e consequente acúmulo de seus mRNAs alvos pelo fato da proteína HYL1 fazer parte do processo de biogênese dos microRNAs (LU; FEDOROFF, 2000). Tal mutante é caracterizado pela baixa estatura, atraso no florescimento, redução de fertilidade, diminuição na taxa de crescimento radicular e reposta alterada ao gravitropismo radicular.

Plantas miR156-OE;DR5:GFP; miR156-OE;ARR5:GUS: Para a realização dos cruzamentos, além dos genótipos descritos anteriormente, foram também utilizadas plantas transgênicas com marcadores para análise de distribuição de auxina e citocinina. Foram utilizadas plantas transgênicas contendo gene quimérico com o promotor sintético de resposta a auxina (pDR5), fusionado ao gene repórter *GFP* (*green flouresence protein*) (doravante denominada *pDR5::GFP*), plantas transgênicas com o gene quimérico contendo o promotor de resposta a citocinina (pARR5) fusionado com o gene repórter *GUS* (β-glucuronidase) (doravante denominada *AtARR5::GUS*). Tais cruzamentos foram realizados por Ortiz-Morea (2013).

Plantas pMIR156a::MIR156a:GUS: estas plantas foram modificadas geneticamente e gentilmente cedidas pelo Dr. Scott Poethig (Universidade de Pensilvânia, EUA). Caracterizam-se por ser possível identificar a localização específica da expressão do gene *AtMIRNA156a* por meio do gene repórter *GUS* (β-glucuronidase) (YANG et al., 2013).

3.2 Assepsia de sementes e condições de crescimento

As sementes foram desinfetadas superficialmente em solução de hipoclorito de sódio 1% com *Tween 20* por 10 minutos sob agitação constante, e lavadas três vezes com água destilada estéril, em câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas. Após a desinfecção, as sementes foram colocadas em placas de Petri

(60 x 15 mm) contendo meio MS ½ X (MURASHIGE; SKOOG, 1962) autoclavado, suplementado com vitaminas, sacarose 1% e 0,8% de PhytoAgar. Posteriormente, as placas contendo as sementes foram vedadas em filme PVC, embrulhadas em folha de alumínio e armazenadas a 4°C por 48 horas para quebrar a dormência; transcorrido esse tempo, foram transferidas à câmara de crescimento. As condições do crescimento foram ajustadas segundo Weigel e Glazebrook (2002). Em resumo, 22°C +/- 1°C de temperatura, 16 horas-luminosidade de foto-período, 100 µmol m⁻² s⁻¹ de intensidade luminosa, e 50% de umidade relativa.

3.3 Organogênese indireta de brotos *in* vitro a partir da raiz principal

Os experimentos relacionados com a organogênese de brotos *de novo in vitro* foram inicialmente realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos II (LCT II), localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa, localizada no Município de Viçosa - Minas Gerais. Posteriormente, os demais experimentos de organogênese de brotos *in vitro* foram realizados no laboratório de Genética Molecular do Desenvolvimento Vegetal (GMDV).

O procedimento de organogênese *in vitro* foi realizado segundo Qiao et al. (2012). No sétimo dia após a germinação, as raízes das plântulas foram excisadas abaixo do hipocótilo e transferidas para placas de Petri, (60 x 15 mm) vedadas com filme PVC, contendo meio de indução de calo ou meio CIM composto por: meio basal B5 (Gamborg *et. al*, 1968) na concentração de 3,2 g/L, suplementado com 0,5 g/L de ácido 2-*morfolino etano sulfônico* (MES); 2,2 μ M de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); 0,2 μ M de Cinetina; 20g/L de glicose e 7g/L de ágar a um pH de 5,75 ± 0,1. Os fitorreguladores foram adicionados ao meio CIM os explantes foram transferidos para o meio de indução de broto ou meio SIM composto por: meio basal MS (Murashige & Skoog, 1962); suplementado com 5 μ M *isopenteniladenina (2-iP); 0,9* μ M *ácido indol-3-acético* (AIA); 10 g/L de sacarose e 7g/L de ágar a um pH de 5,75. Os fitorreguladores foram adicionados ao meio de cultura previamente à autoclavagem. As etapas em meio CIM e SIM foram conduzidas em condições de

25°C +/- 1°C de temperatura, 16 horas-luminosidade de fotoperíodo e 100 µmol m⁻² s⁻¹ de intensidade luminosa.

3.4 Microscopia de luz e caracterização histoquímica

As análises anatômicas foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa, localizada no Município de Viçosa - Minas Gerais.

Para tanto, estruturas organogênicas, provenientes dos explantes de raiz de *Arabidopsis thaliana,* foram coletadas com quatro dias em meio CIM, 10 e 20 dias em meio SIM e foram fixados por pelo menos 72 horas em solução Karnovsky, composta por 2,5 % de glutaraldeído, 4,0 % de paraformaldeído, 3,0 % de sacarose, 5 mM de CaCl2, em tampão de cacodilato a 0,1M (pH 6,8), permanecendo em refrigeração. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série alcoólica (10 a 95%) e incluídas em metacrilato (Historesin [®], Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha). Cortes seriados de 5 µm de espessura foram obtidos utilizando-se micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA), com utilização de navalhas de aço descartáveis. As secções obtidas foram coradas com azul de toluidina pH (3,2), para detectar radicais aniônicos e metacromasia (O'BRIEN E MCCULLY, 1981).

Cortes histológicos foram também submetidos ao ácido periódico – reagente de Schiff (PAS - *Periodic acid-Schiff*) para detecção de polissacarídeos totais (FEDER; O'BRIEN, 1968).

A análise estrutural do material e a captura de imagens foram realizadas em microscópio de luz (modelo Olympus AX 70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) com sistema U-Photo, com câmara digital acoplada (modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments inc.New York, USA). Os demais registros fotográficos foram obtidos em microscópio estereoscópio (modelo Olympus SZX) com sistema de captura de imagens acoplado (modelo Olympus E-330).

3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

As amostras foram fixadas em glutaraldeído 2% durante 24 horas, e pósfixadas em tetróxido de ósmio (Bozzola e Russel, 1992), durante 3 horas, preparados com tampão de cacodilato de sódio a 0,1 M. Após a desidratação do material em série etílica, realizou-se a secagem em ponto crítico com CO₂ (Balzers modelo CPD 020). Esses materiais foram pulverizados com uma película de ouro metálico de 10 nm (Bozzola e Russel, 1992), em equipamento de Balzers (modelo FDU 010). As análises foram feitas utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura Leo, 1430VP, acoplado a sonda de raio-X (EDS) no Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) na Universidade Federal de Viçosa. As imagens foram processadas digitalmente.

3.6 Avaliação da expressão gênica via RT-PCR

Na avaliação da expressão gênica via RT-PCR, foram realizadas análises de expressão do miR156 maduro e dos genes *SPL9, -10 e -15*. Nestas análises, foi utilizado o seguinte material:

a) raízes de plântulas WT com 7 DAG (dias após germinação) em meio MS ¹/₂
X (controle).

 b) raízes com 7 DAG em meio MS ½ X e incubadas em meio de indução de calo (CIM) por quatro dias adicionais.

c) raízes com 7 DAG incubadas em meio CIM por quatro dias e posteriormente em meio de indução de broto (SIM) por seis dias adicionais.

As sequências dos iniciadores *Forward* e *Reverse* dos genes avaliados são indicadas na Tabela 1 na qual consta no tópico "Anexos".

3.7 Isolamento, tratamento com DNAsel e quantificação do RNA total

O isolamento do RNA foi realizado utilizando o *RNeasy*® *Plant Mini Kit* (Qiagen), segundo o procedimento do fabricante. Após a extração, a integridade do RNA das amostras foi verificada por eletroforese em agarose 2% corado com 0,01% (v/v) de brometo de etídio. Posteriormente, as amostras foram tratadas com *DNasel*

Amplification Grade (Invitrogen) para a remoção do DNA genômico. A concentração e pureza do RNA foram avaliadas por espectrofotometria de absorção, utilizando o equipamento *Thermo NanoDrop 2000* (Uniscience). Finalmente, a ausência de DNA genômico nas amostras foi confirmada por meio da realização de PCR convencional usando iniciadores específicos *Forward* e *Reverse* do gene endógeno *ACT2* (AT3G18780).

3.8 Síntese de cDNA via pulsed stem-loop RT-PCR

O RNA total, tratado com enzima DNase I, tal como descrito anteriormente, foi utilizado para a síntese da primeira fita de cDNA por *Pulsed stem-loop* RT- PCR (Figura 5) (Varkonyi *et al.*, 2007). Esta metodologia é utilizada para avaliar o acúmulo de microRNAs e genes de interesse. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada a partir de 1,5 µg do RNA total purificado usando o Kit *Improm-II Reverse Transcriptase* (Promega). Ao RNA tratado com DNAsel foi adicionado 1 µl de oligodT (1 µM), juntamente com o iniciador RT para o miR156 maduro. As amostras foram incubadas a 70°C por 10 min. para desnaturação das estruturas secundárias e depois incubadas a 5°C por 10 min. Em seguida, adicionou-se 4 µl de *Improm-II 5x Reaction Buffer*, 2,4 µl de MgCl₂ 25 mM, 0,5µl de *Ribolok RNase* (Invitrogen) e 1 µl da enzima *Improm- II Reverse Transcriptase*. As reações foram incubadas em termociclador a 16°C por 30 min., seguidas por transcrição reversa de 60 ciclos de 30°C por 30 seg., 42°C por 30 segundos e 50°C por 1 seg.



Figura 5 - Esquema do *pulsed stem-loop* RT-PCR. Iniciadores específicos *stem-loop* anelam na porção 3' das moléculas do miRNA maduro, iniciando a transcrição reversa. O miRNA maduro é amplificado utilizando iniciador *Forward* específico para o miR156 e um iniciador *Reverse* universal (Kramer, 2011).

3.9 Avaliação do acúmulo dos transcritos por RT-qPCR

Na avaliação da expressão gênica via RT-qPCR, foram realizadas análises de expressão do miR156 maduro e dos genes *SPL9 e SPL10*. Nestas análises, foi utilizado o seguinte material para extração de RNA total:

a) raízes de plântulas WT com 7 DAG em meio MS ½ X (controle).

b) raízes com 7 DAG em meio MS ½ X e incubadas em meio de indução de calo (CIM) por quatro dias adicionais.

c) raízes com 7 DAG incubadas em meio CIM por quatro dias e em meio de indução de broto (SIM) por seis dias adicionais.

Posteriormente à extração de RNA total foi realizada síntese de cDNA pelo método pulsed RT-PCR (ver itens 2.6.1 e 2.6.2).

Para a análise quantitativa de transcritos reversos foi utilizado 5 µL KAPA SYBR FAST®, 0,2 µM de cada iniciador (sequências de iniciadores indicada na "Tabela 1" no tópico "Anexos") , 1 µL do cDNA 1:10 (v/v) e água Milli-Q estéril para um volume final de reação de 10 µL. Todas as reações de RT-qPCR continham um controle negativo (sem cDNA) e foram realizadas no RotorGene-6000 (Qiagen; Hilden, Alemanha). O perfil da reação foi designado com duas temperaturas iniciais: 50° C por 10 min e 95° C por 2 min, seguidos de 40 ciclos de três passos: 95° C por 20 s, 600 C por 25 s e 72° C por 25 s. Após a amplificação, determinou-se a curva de dissociação entre 72 e 95° C. Em todos os experimentos os valores dos CQ (quantification cycle) foram utilizados para determinar a diferença da expressão gênica, de acordo com método "Delta Delta" (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001): razão =2 - Δ (Δ Cq) sendo Δ CQ = CQ (gene alvo) – CQ (gene referência) e o Δ = Δ CQ (tratamento) - Δ CQ (controle). Para todos os experimentos o gene AtUbiq2 de arabidopsis foi utilizado como gene de referência. Para cada tratamento foram realizadas analises em triplicata técnica.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise quantitativa da regeneração de brotos *in vitro* em plantas com a via genética miR156/SPL alterada

Para o presente estudo, raízes de *Arabidopsis thaliana* foram utilizadas para o processo de organogênese indireta de brotos *in vitro*. Os explantes foram excisados de plântulas com sete dias após a germinação e incubadas em meio CIM durante quatro dias (VALVEKENS et al., 1988; ATTA et al., 2009). Inicialmente, afim de avaliar se a modulação da via genética do miR156/*SPL* é capaz de alterar a capacidade de regeneração, fez-se a quantificação de brotos regenerados após um período de 20 dias de transferência dos explantes do meio CIM para o meio SIM (QIAO et al., 2012). A eficiência de regeneração obtida no presente estudo foi semelhante ao valor obtido no protocolo de regeneração utilizado (QIAO et al., 2012), visto que a planta controle *wild type* (WT) atingiu a média de seis brotos por explante (Figura 6).

Como era de se esperar, as plantas transgênicas *SPL9* e *SPL10* resistentes a ação do microRNA156 (rSPL9 e rSPL10) apresentaram número de brotos menor em relação ao controle WT, com média de regeneração por explante de 1,8 e 0 (zero), respectivamente. Segundo Zhang et al. (2015), durante a regeneração de brotos a partir de hipocótilo, as proteínas SPL9 e SPL10 interferem negativamente na reposta à citocinina por se ligarem e mudarem a conformação de determinados fatores de transcricão ARRs-tipo B (ARR1, ARR2, ARR10 e ARR12) e, portanto, prejudicando a ativação transcricional de genes *downstream* de resposta à citocinina, visto que, em relação à plantas WT, a capacidade de regeneração é significativamente reduzida em mutantes *arr2, arr12* e completamente perdida em mutantes *arr1, arr10* e *arr12*.

Em contraste, o duplo mutante *spl9/spl15* apresentou aumento no número de brotos regenerados em relação ao controle, atingindo uma média de 15,4 brotos por explante. Os genes *SPL9* e *SPL15* são considerados parálogos e em arabidopsis atuam de forma redundante no processo de transição da fase vegetal juvenil para adulta (SCHWARZ et al., 2008). Coerentemente o duplo mutante apresentou número maior de brotos regenerados a partir da raiz, visto que estudos recentes mostram que o mesmo duplo mutante apresentou valores maiores para a formação

de raiz lateral e brotos regenerados a partir de hipocótilo, quando comparado com o genótipo selvagem (YU et al., 2015; ZHANG et al., 2015).



Figura 6 - Média de brotos regenerados a partir de raiz de arabidopsis com a via gênica miR156/SPL alterada. Plantas controle WT Col-0; plantas transgênicas superexpressando o microRNA156 (miR156-OE); plantas transgênicas contendo o gene SPL9 na forma resistente ao silenciamento pelo microRNA156 (rSPL9); plantas transgênicas contendo o gene SPL10 na forma resistente ao silenciamento pelo microRNA156 (rSPL10); plantas duplo mutante com perda de função para os genes SPL9 e SPL15 (spl9/15); plantas mutantes com perda de função para o gene hyl1. Quantificação realizada após 20 dias do explante em meio SIM

Em relação ao mutante *hyl1-2*, nenhuma regeneração de brotos a partir de raiz foi observada. Em conjunto com as proteínas DICER-LIKE1 (DCL1) e SERRATE (SE), a proteína HYL1 atua no processamento do microRNA primário (VOINNET, 2009), sendo essa uma das primeiras etapas da biogênese do microRNA. Mutações para os genes *dcl1, hen1 e hyl1*, exibem aumento no acúmulo de pri-miRNA e diminuição no acúmulo de miRNAs maduros, o que resulta em ampla variedade de alterações morfológicas (HAN et al., 2004; VAZQUEZ et al., 2004; YANG et al., 2006). Entretanto, a diminuição de acúmulo de miRNAs maduros em *hyl1* é limitado. Apesar do menor nível acumulado de miR156, miR159, miR160 e miR164, outros, como por exemplo, miR161, miR167, miR168 e miR171 são normalmente detectados (VAZQUEZ et al., 2004). Dentre os microRNAs que são negativamente regulados, o miR156 é o que, de forma mais significativa, apresenta redução no seu acúmulo em mutantes *hyl1* (LI et al., 2012), sendo que a proteína HYL1 é capaz de regular temporalmente e espacialmente a expessão do miR156 e de todos seus

alvos *SPLs*. Segundo Qiao et al. (2012), calos pluripotentes com capacidade de regenerar brotos apresentam padrão específico de expressão de microRNAs diferente do padrão de expressão apresentado por calos recalcitrantes para a regeneração de brotos (ainda que esse tipo de calo apresente proliferação celular). Hipotetiza-se que a alteração no padrão de acúmulo do miR156 em mutantes *hyl1* interfira negativamente no processo de regeneração de brotos. Tal hipótese soma-se ao fato de que o *HYL1* é expresso nas mesmas regiões em que o miR156a se acumula: meristema apical caulinar, primórdio foliar e em folhas em desenvolvimento (LI et al., 2012) e que, portanto, o correto acúmulo desse microRNA e consequente controle da expressão de seus genes *SPLs* nas células envolvidas no processo de regeneração do meristema apical e formação de brotos organogênicos.

Surpreendentemente, raízes superexpressando o microRNA156a (miR156-OE) apresentaram média de 3,8 brotos regenerados por explante, valor relativamente menor à média de brotos regenerados a partir de raízes WT, no qual obteve-se uma média de seis brotos (Figura 6). Tal resultado foi inesperado pelo fato de que em estudos recentes, raízes e hipocótilos de plantas superexpressando o microRNA156 apresentaram respectivamente números significativamente maiores de raízes laterais e brotos regenerados quando comparados com WT (YU et al., 2015; ZHANG et al., 2015). Segundo Yu et al. (2015), em plântulas miR156-OE com oito dias após a germinação, o número de primórdios de raízes laterais nos estágios iniciais é duas vezes menor que em plantas WT, enquanto que em plântulas resistentes para os genes SPL9 e SPL10 esse número é praticamente duas vezes maior em relação ao WT. Porém, o número de raízes laterais e o comprimento das raízes laterais que emergem da raiz principal são maiores em plântulas miR156-OE em relação a plantas rSPL9 e rSPL10 após 8 dias de germinação, o que levou o autor a concluir que a perturbação na via genética miR156/SPL afeta principalmente a taxa de desenvolvimento da raiz lateral no estágio após sua emergência da raiz principal ao invés de afetar o processo de iniciação do primórdio da raiz lateral.

Levando tal estudo em consideração, supõe-se que o número de founder cells presentes ao longo do periciclo de raízes de plântulas miR156-OE com 7 DAG seja menor em relação a raízes de plântulas WT, ainda assim, os primórdios gerados a partir dessas células iniciais são capazes de se desenvolver e regenerar brotos organogênicos. Adicionalmente, supõe-se que no caso das raízes de plântulas

rSPL9 e rSPL10, o número de *founder cells* seja maior em relação a raízes de plântulas WT, porém os primórdios gerados a partir das células iniciais apresentam baixa ou até mesmo nenhuma capacidade para continuar se desenvolvendo e regenerar brotos. Como o duplo mutante *spl9/spl15* apresentou alta taxa de regeneração de brotos (Figura 6), é também possível que uma correta "dosagem" de proteínas SPLs (além das SPL9, SPL15 e SPL10) presente nas *founders cells* seja necessária para o correto desenvolvimento temporal dos brotos organogênicos em raízes de plântulas de 7 DAG.

Apesar da ausência de formação de brotos, os genótipos *hyl1*-2 e rSPL10 apresentaram formação de protuberâncias ao longo da raiz principal em resposta ao processo de organogênese *in vitro*. Adicionalmente os brotos regenerados em WT, miR156-OE e rSPL9 apresentaram características específicas que foram melhor analisadas através de análises morfológicas, histológicas, histoquímicas e moleculares.

4.2 Aspectos morfológicos dos brotos regenerados *in vitro*

Além da alteração na capacidade quantitativa de regeneração de brotos a partir da raiz principal, explantes com a via genética do miR156/SPL modificada também apresentaram anormalidades morfológicas durante o processo de organogênese *in vitro*. As estruturas regeneradas ao longo dos explantes foram avaliadas com 15 dias após transferência para o meio SIM (Figura 7) e ao final do experimento com 20 dias em meio SIM (Figura 8). Para melhor interpretação do fenótipo, as imagens registradas são, de forma dimensional, comparáveis entre si.

Apesar da menor capacidade de regeneração em relação a WT, o genótipo superexpressando o miR156 (miR156-OE) apresentou uma maior quantidade de folhas por broto regenerado (Figura 7B e Figura 8E). Tal aumento é associado ao encurtamento do *plastochron* (padrão temporal de produção de um primórdio foliar em relação ao próximo). Segundo Wang et al. (2008), plantas de arabidopsis do tipo selvagem com 30 dias de idade haviam produzido 20 folhas, enquanto que plantas supersexpressando o miR156 produziram 30 ou mais folhas.

Consistente com a alteração *in vivo* do *plastochron* através da modulação da via miR156/SPL (WANG et al., 2008), explantes *in vitro* contendo o gene SPL9 resistente (rSPL9) apresentaram uma menor quantidade de folhas por broto

regenerado como consequência do aumento do tempo de formação entre os primórdios foliares (Figura 7D e Figura 8B). Tal resultado é similar ao estudo realizado por Wang et al. (2008), no qual demonstra-se que plantas transgênicas contendo *rSPL9*, sob regulação de seu promotor endógeno, apresentaram aumento do *plastochron* e redução da taxa de iniciação foliar para um terço do padrão observado em plantas WT.



Figura 7 - Diferença morfológica no processo de regeneração de brotos *in* vitro a partir de raiz de *Arabidopsis thaliana* após 15 dias em meio SIM. *Wild Type* (A), miR156-OE (B), rSPL10 (C), rSPL9 (D) e *hyl1-2* (E), sendo que não houve formação de brotos nos genótipos rSPL10 e *hyl1-2*, mas sim formação de protuberâncias e raízes laterais, respectivamente. Barras: 2mm



Figura 8 - Diferença morfológica no processo de regeneração de brotos *in* vitro a partir de raiz de *Arabidopsis thaliana* após 20 dias em meio SIM. *Wild Type* (A), miR156-OE (E) e rSPL9 (B) apresentaram diferença no *plastochron* dos brotos regenerados. rSPL10 (C) e *hyl1-2* (D) não apresentaram formação de brotos, mas sim um aumento no desenvolvimento de raízes laterais e protuberâncias, respectivamente. Barras: 1mm.

Apesar da ausência de regeneração de brotos a partir de explantes do genótipo *hyl1-2,* pode-se observar densa regeneração de raízes ao longo do explante com 15 dias em SIM (Figura 7E) e intensificação ao longo de 20 dias após

transferência para o meio SIM (Figura 8D). Tal genótipo será melhor discutido nos tópicos seguintes.

Segundo Yu et al. (2015), o gene SPL10 desempenha o papel mais importante dentre outros genes SPLs no desenvolvimento da raiz lateral, praticamente não havendo formação de LR em plantas contendo o gene rSPL10, o qual é resistente a clivagem pelo miR156. No presente estudo, o gene SPL10 também apresentou o efeito mais severo dentre os genes testados na via miR156/SPL, de forma a impedir a regeneração de brotos ao longo de todo o explante. Interessantemente, ao longo de explantes contendo o gene rSPL10 foi observada considerável formação de protuberâncias (Figura 7C e Figura 8C). Com o intuito de uma avaliação mais detalhada, tal estrutura formada após 20 dias em meio SIM foi analisada em microscopia de varredura (Figura 9). Em comparação com o broto regenerado a partir de raiz de WT (Figura 9A e B), as protuberâncias obtidas em explantes contendo rSPL10 não apresentaram indícios de primórdio foliares (Figura 9C) ou formação de tricomas (Figura 9D). Entretanto, observou-se intensa formação de estômatos ao longo de sua camada tecidual mais externa (Figura 9D). Os estômatos são formados por células especializadas da epiderme e estão presentes em todo o tecido da parte aérea vegetal, exceto pétalas e estâmes (PILLITTERI; TORII, 2012) e seu desenvolvimento é caracterizado por uma série de divisões e diferenciação celular (BERGMANN; SACK, 2007).

De acordo com Nodine e Bartel (2010), linhagens mutantes homozigotas com perda de função para o gene dcl1 apresentam o desenvolvimento do embrião zigótico "preso" no estágio globular inicial, no qual não é capaz de produzir cotilédones. Sabe-se que a proteína DCL1 está envolvida na biogênese microRNAs e a sua não atividade remete a diminuição do acúmulo de miRNAs maduros e consequente aumento da expressão de seus genes alvos. Em relação ao WT, o gene com maior nível de expressão no zigoto dcl1 é o SPL10, sendo que sua é expressão aumentada especificamente no estágio globular inicial. Consistentemente, em embriões WT, a detecção da expressão do miR156 ocorre inicialmente no estágio globular inicial e tem aumento pronunciado em seu acúmulo nos estágios mais avançados do desenvolvimento do embrião, denominado coração ou heart stage, o que indica que o gene SPL10 é controlado nesses estágios de desenvolvimento embrionário pelo miR156. Adicionalmente, no estágio globular a proteína SPL10 foi capaz de reduzir a transcrição do gene WOX2 (WUSCHEL- related HOMEOBOX). Constatou-se, também, que no mutante *dcl1*, genes normalmente expressos nos estágios de desenvolvimento mais avançados foram expressos de forma prematura no estágio globular, sendo que os 10 genes prematuramente mais expressos foram induzidos pela SPL10, sendo possível concluir que o fator de transcrição SPL10 foi suficiente para promover a diferenciação precoce do embrião embrionário no estágio globular, de forma a estagnar o seu desenvolvimento (NODINE; BARTEL, 2010).



Figura 9 – Microscopia eletrônica de varredura em WT e rSPL10. Formação de protuberâncias a partir de explantes rSPL10 (C, D), diferentemente do genótipo controle que no mesmo período do processo de organogênese apresenta a formação de brotos devidamente desenvolvidos (A, B). Pontas de flechas indicam a presença de estômatos, células diferenciadas e especializadas da epiderme. Barras: 100 μm (A, C), 20 μm (B, D)

Levando tal estudo em consideração, supõe-se que nos explantes rSPL10, inicialmente, houve a formação de primórdio de broto, porém, a expressão da forma resistente do *SPL10* foi capaz de induzir genes que são precoces a esse estágio de desenvolvimento. A protuberância formada é provavelmente consequência tanto da repressão de genes responsáveis pelo correto desenvolvimento do meristema

quanto da diferenciação precoce das células que compõem tal estrutura, como é o caso da ausência de primórdio foliares e a formação de estômatos na epiderme desenvolvida (Figura 9C e D). Para confirmar tal hipótese, hibridizações *in situ* para avaliar a expressão de *CLAVATA1* e *CUC1* (genes associados a formação e manutenção do meristema apical caulinar) estão sendo realizadas em explantes de raízes principais de WT, miR156-OE e rSPL10.

4.3 Análise histológica e histoquímica

O processo de regeneração *in vitro* foi acompanhado também por meio de análises histológicas e histoquímicas a fim de demonstrar as alterações nesses parâmetros durante a organogênese a partir dos genótipos estudados.

Para a análise histológica, as secções no material em estudo foram coradas com azul de toluidina para caracterização estrutural (O'BRIEN; McCULLY, 1981). Cortes transversais foram realizados nos explantes dos genótipos WT, miR156-OE e rSPL10 coletados antes de serem incubados em meio CIM, ou seja, com 0 (zero) dias em CIM, com o intuito de verificar a ausência de primórdios de raiz lateral.

Em nenhum dos cortes avaliados foi verificada a presença de primórdios de raiz lateral nos explantes excisados de plântulas com sete dias após a germinação (Figura 10). Essa característica é verificada pela ausência de divisões anticlinais e periclinais no periciclo, visto que, anatomicamente o início do desenvolvimento da raiz lateral ocorre por meio dessas divisões no periciclo (MALAMY; BENFEY, 1997). Adicionalmente, essa verificação se faz necessária pelo fato de que o processo de iniciação de raiz lateral é base para o processo de regeneração de brotos e a presença dos fatores determinantes da genuína identidade radicular ocorre apenas posteriormente aos estágios iniciais do desenvolvimento de raiz lateral (MOTTE et al., 2014), o que torna esse primórdio susceptível a gerar tanto raiz quanto broto, dependendo das condições a serem impostas. Portanto, a presença de primórdios de raiz lateral poderia influenciar de forma negativa na avaliação da regeneração de brotos.



Figura 10 - Cortes transversais de explantes excisados de plântulas com sete dias após germinação. Secções tratadas com Azul de toluidina para os diferentes genótipos: WT (A), miR156-OE (B), rSPL10 (C). Pc: Periciclo; Ed: Endoderme. Escala: 100 µm.

Adicionalmente, cortes longitudinais foram realizados nos explantes dos genótipos WT, miR156-OE, rSPL10 e hy/1-2 nos períodos de quatro dias após inoculação em CIM, 10 dias e 20 após transferência do meio CIM para o meio SIM (Figura 11). Após quatro dias em meio CIM, pode-se observar determinado padrão em divisões anticlinais e periclinais em todos os genótipos, exceto em hy/1-2. A princípio, os primórdios nos explantes dos genótipos WT (Figura 11A), miR156-OE (Figura 11B) e rSPL10 (Figura 11C) apresentaram estágio de desenvolvimento semelhante, no qual as divisões periclinais originadas das células do periciclo já haviam penetrado o tecido endodérmico. Porém, no explante do genótipo hy/1-2, as divisões anticlinais nas células do periciclo apresentaram um ritmo mais retardado em relação aos outros genótipos, sendo que as divisões celulares periclinais a partir do periciclo praticamente não foram observadas (Figura 11D). O menor avanço nas divisões a partir de células do periciclo obtido nesse estudo foi relacionado com o fato de que o mutante hy/1-2 é menos sensível à auxina (VAZQUEZ et al., 2004).



Figura 11. Cortes longitudinais de eventos da organogênese indireta a partir de raiz de Arabidopsis thaliana Col-0. Secções tratadas com azul de toluidina para os diferentes genótipos: WT (A, E e I), miR156 OE (B, F e J), rSPL10 (C,G e L) e hyl-1 (D,H e M). Ep: Epiderme; Ct: Córtex; Ed: Endoderme; SV: Sistema vascular; F: folha em desenvolvimento; Pf: primórdio foliar; Me: meristema apical caulinar. Flechas nas figuras 11H e M indicam as regiões do explante onde houve formação de raiz lateral. Ponta de flecha na figura 11G indica a região de formação de protuberância em explantes rSPL10. Escala : A até H: 100 μm IJ,K,M: 400 μm; L: 200 μm.

Consistente com as explanações nos tópicos anteriores, tanto para a formação de raiz lateral, quanto para a regeneração de brotos a partir da raiz, a auxina tem papel fundamental na especificação das células fundadoras no tecido do periciclo. A partir de então, após o processo de sinalização do hormônio nessas células, ocorrem as primeiras divisões assimétricas e anticlinais e posteriormente periclinais (CASIMIRO et al., 2001; BENKOVÁ et al., 2003; LAPLAZE et al., 2007; DUBROVSKY et al., 2008; DE RYBEL et al., 2010; ARASE et al., 2012; GOH et al., 2012). Supõe-se, portanto, que a menor sensibilidade à auxina das células do mutante hyl1-2 interfira na sinalização desse hormônio, consequentemente retardando ou inibindo o início do processo de formação do primórdio do órgão partir da organogênese indireta in vitro (Figura 11D). Tal redução de sensibilidade a resposta ou sinalização de auxina pode ser devido a desregulação precoce de alvos de microRNAs, como por exemplo os genes SPLs. Li et al . (2012) mostraram que tanto o gene SPL9 quanto o gene SPL10 são induzidos em plântulas mutantes hyl1. Inclusive, os autores do trabalho sugerem que as alterações de mudança de fase juvenil/adulta observadas no mutante hyl1 são causadas principalmente pela desregulação precoce desses genes SPLs (LI et al., 2012)..

Em relação ao mutante *hyl1-2*, com 15 e 20 dias em SIM, observou-se a formação de massa calosa em apenas um extremo do explante (Figura 11M), porém intensa formação de raiz lateral ao longo de todo o explantes e ausência de regeneração de brotos (Figura 7E; 8D; 11H). Para esse mutante supõe-se que, apesar da baixa sensibilidade a auxina, a razão hormonal no meio CIM, induziu, ainda que estruturalmente restrita (Figura 11D), a formação de primórdios. Além da baixa sensibilidade à auxina, o mutante *hyl1-2* é caracterizado por também apresentar baixa sensibilidade a citocinina (VAZQUEZ et al., 2004). Sabe-se que a razão da transferência do explante do meio CIM para o meio SIM é que a maior concentração de citocinina promova aos primórdios a identidade de broto (MOTTE et al., 2014). Porém, a baixa sensibilidade a citocinina, impediu que a concentração de tal hormônio presente no meio SIM promovesse a diferenciação dos primórdios em brotos o que possibilitou o desenvolvimento intrínseco dos primórdios gerados a partir da raiz principal em raízes laterais.

Em relação ao genótipo rSPL10 observou-se a fomação de massa celular menor (Figura 11G) em relação ao apresentado pelos explantes WT e miR156-OE com 10 dias em meio SIM. Aos 20 dias em meio SIM, houve a formação, a partir dessa massa celular, de uma estrutura na qual não apresenta primórdios foliares, porém, observa-se a formação de epiderme (Figura 11L). Tal estrutura formada corrobora com a ideia de que o gene *SPL10*, na sua forma resistente ao miR156, reprime genes responsáveis pela manutenção da indiferenciação e divisão celular nos estágios iniciais de desenvolvimento do primórdio do broto e induz a expressão de genes precoces ao estágio inicial de forma a promover a diferenciação celular prematura, como é o caso da presença de epiderme envolvendo tal estrutura.

Com 10 dias em meio SIM, os genótipos WT (Figura 11E) e miR156-OE (Figura 11F) apresentaram intensa divisão celular acompanhada da formação de massa calosa. Supõe-se que tal massa celular seja o meristema fundamental em diferenciação devido a presença do sistema vascular conectado entre o explante e o novo órgão em desenvolvimento, característica essa específica do processo de organogênese (TERZI; LO SCHIAVO, 1990). Após 20 dias, o processo de organogênese apresentou pleno desenvolvimento para esses dois genótipos, sendo possível observar a presença a estrutura do meristema apical caulinar, folhas e primórdios foliares (Figura 11I e J).

Adicionalmente aos testes para análise histológica estrutural, cortes histológicos longitudinais foram submetidos ao ácido periódico – reagente de Schiff (PAS - *Periodic acid-Schiff*) para a detecção de polissacarídeos totais (FEDER; O'BRIEN, 1968). Na cultura de tecidos normalmente é requerido uma fonte de carbono externa, sendo que, usualmente, essa fonte é a sacarose adicionada durante o preparo do meio de cultura. A sacarose é, normalmente, a principal fonte de carbono para a síntese de polissacarídeos estruturais e de armazenamento (MANGAT et al., 1990; MARTIN et al., 2000). Diferentes estudos mostram a presença de grãos de amido nas células vegetais envolvidas nos processos de regeneração *in vitro* (MARTIN et al., 2000; CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2009; ROCHA et al, 2011) sugerindo que este polissacarídeo atue como fonte de energia ou como um agente osmótico essencial para tal desenvolvimento.

Os resultados foram obtidos de material coletado com 20 dias em meio SIM e avaliados apenas a partir de parâmetros qualitativos, ou seja, se há ou não a presença de grãos de amido. Para os genótipos WT (Figura 12A) e miR156-OE (Figura 12B) constatou-se a presença de compostos de reserva principalmente nas células do meristema apical e do calo nos quais são caracterizados por apresentar intensa divisão celular; e nas células das folhas e primórdios foliares, nas quais as células encontram-se em processo de diferenciação e alongamento.

Para o mutante *hyl1-2*, grãos de amido também foram detectados na região do explante onde houve a formação de calo (Figura 12F) e no meristema apical das raízes laterais regeneradas a partir do explante (Figura 12D).



Figura 12. Análise histoquímica durante organogênese indireta a partir de raiz principal de Arabidopsis thaliana. Análises feitas após 20 dias em meio de indução de brotos. Cortes longitudinais submetidos ao teste com reagente de Schiff (PAS) para a detecção de polissacarídeos como reserva celular. Genótipos: Wild Type (A), miR156-OE (B), rSPL10 (C e E) e hyl1-2 (D e F). Ga: Grãos de amido corados positivamente ao teste com PAS. Barras: 200 μm (A, B, D e F); 100 μm (C e E)

Interessantemente, na região do explante de rSPL10 onde houve a formação de calo (Figura 12C), foi detectada a presença de compostos de reserva celular, porém, ao longo das protuberâncias geradas nesse genótipo não se observou a presença de grãos de amido (Figura 12E). Estudos *in vitro* revelam que durante a organogênese *in vitro*, este amido é acumulado e metabolizado em células que estão sob o processo de regeneração de brotos e raízes, com o intuito de serem fonte de energia e substrato para a síntese de vários compostos associados com o processo de diferenciação celular (NEUMANN et al., 2009). Corroborando com suposições anteriormente feitas a respeito do processo de organogênese apresentado por esse genótipo, a ausência de grãos de amido na protuberância

formada indica que nesse estágio as células que compõem essa estrutura não estão sofrendo divisões e, provavelmente, não estão sofrendo diferenciação celular com o intuito de regenerar brotos. Nenhuma modificação nessa protuberância foi observada, mesmo permanecendo o explante por 35 dias em meio SIM (dados não mostrados).

4.4 Análise de expressão gênica via RT-PCR e RT-qPCR

A fim de avaliar o perfil de expressão gênica da via miR156/SPL durante a regeneração de brotos a partir de raiz principal, foram realizadas análises de expresssão por meio de PCR semi-quantitativo (RT-PCR) e PCR quantitativo (RT-qPCR). Além do microRNA156 maduro, três genes *SPLs* foram selecionados para serem avaliados: *SPL9, SPL10* e *SPL15*. Isso pelo fato de que esses genes *SPLs* apresentam funções mais expressivas tanto na formação de raiz lateral (YU et al., 2015), quanto na regeneração de brotos *in vitro* a partir de folhas e hipocótilos de plantas de *Arabidopsis thaliana* que têm a via miR156/SPL modificada (ZHANG et al., 2015).

As coletas do material para análise foram realizadas em três estágios do processo de organogênese. A primeira coleta, composta de raízes excisadas de plântulas com sete dias após a germinação, teve como objetivo analisar a expressão dos genes antes da incubação dos explantes no meio CIM, momento da organogênese em que ainda não existe especificação da *founder cell* e divisões anticlinais e periclinais referentes ao início do processo de regeneração de brotos. A segunda coleta ocorreu quatro dias após as raízes terem sido submetidas ao meio de indução de calo (CIM), etapa em que os explantes já apresentam a formação de calos competentes (MOTTE et al., 2014). A terceira análise foi realizada seis dias após os explantes terem sido transferidos para o meio de indução de broto (SIM), estágio da organogênese em que as células do calo organogênico adquirem identidade meristemática apical caulinar (MOTTE et al., 2014).

Os dados obtidos a partir de RT-PCR (Figura 13) mostram que há variação da expressão do miR156 maduro e dos genes *SPL9, SPL10* e *SPL15* nas diferentes etapas da DNSO estudadas, sendo que tanto o microRNA como seus genes alvo apresentaram seus maiores níveis de expressão quando os explantes radiculares estavam há quatro dias em meio CIM.



(-) $7 \text{ DAG}^* 4 \text{ CIM} 6 \text{ SIM}$

* DAG: Dias após germinação

Figura 13 - Análise de expressão gênica via *pulsed stem-loop* RT-PCR. Genes *SPL9*, *SPL10* e *SPL15* e o miRNA156 maduro em raízes de plantas WT sete dias após a germinação, após quatro dias em meio CIM e após seis dias em meio SIM . Entre parênteses se encontram o número de ciclos realizados (c) em cada RT-PCR e temperatura de anelamento empregada

Os dados obtidos a partir de RT-qPCR (Figura 14) são complementares aos resultados obtidos pelo RT-PCR. O gene *SPL9* apresentou um aumento de sua expressão de praticamenente oito vezes em explantes radiculares com quatro dias em meio CIM em relação a sua expressão com 0 (zero) dias em CIM (7 DAG), havendo uma pequena diminuição de expressão aos seis dias em SIM (Figura 14A).



Figura 14 - Análise de expressão gênica via *pulsed stem-loop* RT-qPCR. Genes *SPL9* (A), *SPL10* (B) e miR156 maduro (C) em três estágios da organogênese de broto *in vitro* a partir de raízes de plantas WT. O nível do transcrito é representado no eixo Y; no eixo X estão representadas as diferentes amostras avaliadas sete dias após a germinação, quatro dias após a germinação e seis dias após a germinação. As barras representam o desvio padrão de três amostras biológicas. *DAG=dias após germinação

Já o gene *SPL10* aumentou em cerca de três vezes sua expressão em explantes radiculares com quatro dias em CIM em relação a expressão obtida com 0 dias em meio CIM (7 DAG) e, posteriormente, redução de sua expressão pela metade, após seis dias em meio SIM (Figura 14B). Finalmente, o miR156 também apresentou aumento de sua expressão de aproximadamente 35 vezes em relação a expressão observada em explantes radiculares com zero dias em CIM (7 DAG), sendo que com seis dias em SIM sua expressão volta a um nível semelhante ao encontrado em explantes 7 DAG.

Supõe-se que o maior pico obtido com a expressão de miR156 nos explantes radiculares com quatro dias em CIM seja necessário para reprimir seus alvos e manter o primórdio de broto na sua forma indiferenciada, visto que seus alvos, apesar de terem sido detectados nessa data, são responsáveis por expressar genes precoces em primórdios de órgãos (NODINE; BARTEL, 2010) e serem responsáveis por fenótipos de planta adulta (SCHWARZ et al., 2008; WANG; CZECH; WEIGEL, 2009; WU et al., 2009).

A detecção de *SPL9* e *SPL10* em quatro dias em CIM mesmo na presença de níveis elevados de expressão do miR156 é atribuída ao fato desses genes serem induzidos na presença de auxina (YU et al., 2015), visto que no meio CIM tal hormônio encontra-se numa razão maior em relação a citocinina. Como mostrado por YU et al. (2015), *SPL9* e *SPL10* induzem a expressão de vários precursores de miR156 nas raízes de arabidopsis, o que pode ter contribuído para acúmulo observado de miR156 maduro em explantes radiculares incubados no meio CIM por quatro dias (Figura 14B e C).

Supõe-se também que a diminuição do miR156 com seis dias em SIM (Figura 14C) se faz necessária para que seus alvos atuem gradualmente na diferenciação celular do primórdio que nessa etapa já adquiriu identidade de broto. Adicionalmente é levantada a hipótese de que essa redução de acúmulo do miR156 pode não ocorrer nos explantes radiculares de plântulas miR156-OE, o que possivelmente afeta de forma negativa o processo de regeneração *in vitro* nesses explantes (Figura 13 e 14).

No genoma de arabidopsis, cerca de oito precursores de miR156 (*MIR156a-j*) foram identificados, os quais produzem o mesmo miRNA maduro (miRbase release 21.0 http://www.mirbase.org/). Yang et al. (2013) demonstraram que os precursores *MIR156a* e *c* são os principais responsáveis pelo controle de mudança de fase

juvenil-adulta em arabidopsis. A fim de avaliar especificamente a expressão espacial do *MIR156a* ao longo do processo de organogênese *in vitro* a partir de raiz principal, foram utilizadas plantas transgênicas de arabidopsis *pMIR156a::MIR156a:GUS* (Yang et al., 2013). Com 0 dias em meio CIM (7 DAG), a expressão de tal precursor foi detectada em cotilédones, folhas, primórdios foliares e especificamente no cilindro vascular (Figura 15A, B, C e D).

Com quatro dias em meio CIM, o *MIR156a* foi detectado tanto no meristema apical radicular, quanto no tecido do periciclo, havendo, portanto, um deslocamento de sua expressão, que previamente se encontrava no estelo, para o tecido que dará origem *in vitro* ao primórdio de broto (Figura 15E e F), o que sugere que sua função seja reprimir os genes *SPLs* especificamente nesse tecido para o correto início do processo de organogênese. É possível que nas plantas transgênicas miR156-OE (contendo o transgene *p35S::MIR156a*), a expressão ectópica e precoce do miR156a em raízes principais reduza a capacidade de regeneração de brotos das mesmas (Figura 6). Adicionalmente, o perfil espacial de expressão acompanha as regiões de acúmulo de auxina (YU et al., 2015) em ambas as datas analisadas, inclusive após seis dias em meio SIM onde tal gene tem sua expressão restrita no ápice do broto, visto que nessa etapa, o acúmulo de auxina se faz necessário nessa região do broto (MOTTE et al., 2014).

Esses resultados sugerem que talvez o gene *MIR156a* seja um dos principais responsáveis pelo controle da expressão dos genes *SPL9* e *SPL10* na fase de organogênese *in vitro* a partir de explantes radiculares.



Figura 15 - Localização da expressão do gene *MIR156a*. Plântulas de *Arabidopsis thaliana* transgênicas *pMIR156a::MIR156a::GUS* com sete dias após a germinação (A, B, C e D) e explantes radiculares durante o processo de organogênese *in vitro* após quatro dias em CIM (E, F) e após seis dias em SIM (G, H). A seta (Figura 15E) indica a ação do *miR156a* no meristema apical radicular após quatro dias em CIM. Escala=1mm

4.5 Análise da distribuição de auxina e citocinina

A citocinina presente no meio SIM é determinante para que o primórdio originado no meio CIM seja convertido em meristema apical caulinar. No entanto, o sucesso para a regeneração nesse estágio é também controlado pela auxina e a interação auxina/citocinina (SU et al., 2010; MOTTE et al., 2014). Afim de comparar a distribuição de auxina entre plantas controle e plantas superexpressando o miR156a durante a organogênese, utilizou-se o gene repórter *pDR5::GFP*. Para tanto, foram analisadas e comparadas as plântulas F1 dos cruzamentos entre plantas WT e *pDR5::GFP (WT;pDR5::GFP)* e o cruzamento entre plantas miR156-OE e *pDR5::GFP (miR156-OE;pDR5::GFP)*. Os primórdios de brotos foram avaliados com dois e seis dias após os explantes serem transferidos para o meio SIM, estágio em que o meristema apical caulinar está em processo de organização (MOTTE et al., 2014). Segundo Atta et al. (2009), o sinal de GFP dirigido pelo promotor *DR5* encontra-se localizado ao longo de todo o primórdio de broto em desenvolvimento a partir de raízes principais.

Conforme os resultados obtidos (Figura 16) a expressão de *pDR5:GFP* foi detectada em ambos os cruzamentos.



Figura 16 - Distribuição de auxina nos cruzamentos durante a regeneração de brotos *in vitro*. Raízes de plântulas WT;*pDR5:GFP* após 2 dias em meio SIM (A, B) e após 6 dias em meio SIM

(E, F) comparadas com raízes de plântulas miR156OE;*pDR5:GFP* após 2 dias em meio SIM (C, D) e após 6 dias em meio SIM (G, H). As figuras A, C, E e G são respectivas às figuras B, D, F e H, porém, foram obtidas na ausência de filtro óptico para detecção de GFP. Escala: 500 μ m.

Procurou-se obter imagens de regiões dos explantes com estágios de desenvolvimento similares para ambos os genótipos e para ambas as datas. Também como forma de identificar o estágio de desenvolvimento dos primórdios e melhor interpretar os resultados, obteve-se imagens sem o filtro óptico para detecção de GFP (Figuras 16A, C, E, G). Apesar de a auxina ter sido detectada ao longo de todos os primórdios de raiz lateral (o que indica que a via de sinalização de auxina está em funcionamento), a expressão do gene repórter ocorreu de forma mais intensa nos primórdios de raízes do cruzamento WT;*pDR5::GFP* (B, F) em comparação com primórdios em raízes superexpressando o *MIR156a* (D, H), sendo essa diferença tanto nos primórdios em desenvolvimento com dois dias em meio SIM (Figura 16B, D), quanto nos primórdios com desenvolvimento mais avançado com seis dias em SIM (Figura 16F, H).

Sabe-se que a proteína PIN tem um aumento em sua atividade durante a etapa de incubação em meio SIM, especialmente nas regiões que apresentaram um aumento na expressão do receptor de citocinina ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE4 (AHK4). Apesar de fazer parte da via de sinalização da citocinina, tal gene é induzido pela auxina durante a etapa CIM (GORDON et al., 2007, 2009; ATTA et al., 2009). Com o maior acúmulo de PINs, indiretamente resultante da ação da auxina, ocorre também um aumento na efluxo celular e atividade desse hormônio. Por exemplo, fatores de resposta a auxina, tais como ARF10, ARF16 e ARF17, estão possivelmente envolvidos na organogênese. O microRNA160a, no qual regula negativamente a expressão desses ARFs, tem sua expressão diminuída na etapa SIM e a superexpressão de microRNA reduz a capacidade de regeneração de brotos (QIAO et al., 2012). Além disso, mutantes mARF10 contendo a forma do gene ARF10 resistente a clivagem pelo miR160 apresentaram um aumento na expressão do gene WUS, resultando num significativo aumento na capacidade de regeneração, enquanto que mutantes arf10 com perda de função obtiveram uma diminuição na capacidade de regeneração de brotos (QIAO et al., 2012).

O fato dos explantes miR156-OE terem apresentado uma capacidade de regeneração menor se comparado ao controle e o fato de que a auxina tem papel

essencial também nos primeiros estágios de desenvolvimento do primórdio em meio CIM, supõe-se que a menor atividade de pDR5::GFP detectada em miR156-OE;*pDR5:GFP* esteja relacionada com menor atividade de auxina e, portanto, menor eficiência no estabelecimento das "founder cells" em explantes miR156-OE. Como vários genes SPLs são reprimidos nas plantas miR156-OE (MOREA et al., 2016), é possível que algumas SPLs atuem positivamente na formação do primórdio a partir de raízes principais.

Adicionalmente, a auxina atua diretamente na percepção da citocinina na etapa em que o explante se encontra em meio SIM. Juntamente com as proteínas transmembranares histidina quinase AHK2, AHK3, a proteína AHK4, induzida no calo pela ação da auxina ainda em meio CIM, atua na percepção e sinalização de citocinina, subsequentemente fosforilando proteínas AHPs nas quais atuam transferindo um grupo fosfato para a família de proteínas ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR (ARR) (HUTCHISON et al., 2006).

Com o intuito de avaliar se a via genética miR156/SPL também regula a regeneração de brotos através da modulação da resposta a citocinina, foi utilizado o gene quimérico contendo o promotor de resposta a citocinina (pARR5) fusionado com o gene repórter *GUS* (β-glucuronidase), gene denominado *pARR5::GUS*. Para tanto, foram realizados os cruzamentos entre plantas WT e *pARR5::GUS* (WT;*pARR5::GUS*) e o cruzamento entre plantas miR156-OE e plantas *pARR5::GUS* (miR156-OE; *pARR5::GUS*). As análises foram realizadas nas plântulas F1 de cada cruzamento. As análsies foram realizadas nos explantes radiculares transferidos para o meio SIM, com dois e seis dias após a transferência.

Conforme o resultado obtido (Figura 17), ambos os cruzamentos apresentam a via de sinalização da citocinina em funcionamento, visto que tanto em explantes de WT;*pARR5::GUS* (Figura 17B, E) quanto em explantes de miR156-OE; *pARR5::GUS* (Figura 17C, F), a citocinina induziu, por meio dos fatores de transcrição ARRs-tipo B, a expressão do gene quimérico *pARR5::GUS*, no qual se espera que o seu padrão de expressão seja o mesmo do gene endógeno ARR5-tipo A. Concomitantemente, com o intuito de avaliar a eficiência do experimento, foram utilizadas explantes de plantas WT sem o gene quimérico *pARR5::GUS* (Figura 17 A, D).





Figura 17 - Distribuição de citocinina nos cruzamentos durante a regeneração de brotos *in vitro*. Raízes de plântulas *pARR5:GUS* após dois dias em meio SIM (B) e após seis dias em meio SIM (E) comparadas com raízes de plântulas miR156OE;*pDR5:GFP* após dois dias em meio SIM (C) e após 6 dias em meio SIM (F). As figuras A e D representam raízes de plantas Wild Type Col-0 na ausência do gene repórter *GUS* após 2 dias em meio SIM e após seis dias em meio SIM, respectivamente

GUS Observou-se maior atividade de nos explantes de plantas superexpressando miR156a em relação aos explantes 0 de plantas WT;pARR5::GUS, tanto com dois dias quanto seis dias após a transferência para o meio SIM. Adicionalmente, essa maior expressão foi mais dispersa com dois dias em meio SIM (Figura 17B, C) e mais concentrada nas supostas regiões de primórdio de broto com seis dias em meio SIM (Figura 17E, F).

O gene *ARR5*-tipo A é expresso principalmente no meristema apical radicular e meristema apical caulinar (D'AGOSTINO et. a., 2000), sendo que sua expressão é aumentada na presença de citocinina (TO; KIEBER, 2008). O *WUSCHEL,* gene crucial durante a formação/manutenção do meristema apical e essencial para induzir a regeneração de brotos a partir de raiz (LENHARD et al., 2002; GORDON et al., 2009) também é induzido em resposta a citocinina, tendo sua expressão aumentada durante o período de incubação do explante no meio SIM, mais especificamente em regiões onde previamente o gene *AHK4* havia sido expresso (CARY et al., 2002; GORDON et al., 2009; MOTTE et al., 2014). Segundo Leibfried et al. (2005) e Gordon et al. (2009), o WUS, como um fator de transcrição, atua diretamente reprimindo a expressão de um conjunto de *ARRs*-tipo A, entre eles o *ARR5*. Da mesma forma a superexpressão desse conjunto específico de *ARRs*-tipo A, incluindo o *ARR5*, reduz o nível de expressão de *WUS*, resultando em um fenótipo, idêntico ao mutante *wus*. Entretanto, a atividade residual de *WUS* nas plantas que superexpressavam esse genes *ARR*-tipo A, inclusive o *ARR5* foi capaz de apresentar determinada atividade meristemática, ainda que de forma reduzida. Tais estudos concluem que os genes *ARRs*-tipo A influenciam negativamente o tamanho do meristema e a repressão desses genes pelo gene *WUS* se faz necessária para o correto funcionamento do meristema apical.

A partir da ativação por fosforilação, os ARRs-tipo B, que atuam positivamente como fatores de transcrição, induzem a expressão de genes controlados pela citocinina e a ação proteínas ARRs-tipo A, nas quais atuam como reguladores negativos, interferindo na ação das proteínas ARRs tipo B, de forma a estabelecer um feedback negativo na rota de sinalização da citocinina (HWANG et al., 2012). Mutações com perda de função para os ARRs-tipo B, reduzem a capacidade regenerativa (ISHIDA et al., 2008). Em contraste, a superexpressão do ARR2 e ARR11, ambos ARRs-tipo B, resulta numa intensa regeneração de brotos independente de citocinina exógena (HWANG; SHEEN, 2001). Perfis de expressão de um grupo de mutantes de arabidopsis recalcitrantes para regeneração de brotos revelaram que o nível de expressão do ARR18-tipo B foi muito baixo em relação às plantas com alta regeneração (LALL et al., 2004), sugerindo que o nível de expressão de ARRs-tipo B é um parâmetro que determina a capacidade de regeneração. Pelo fato de que a primeira resposta dos ARRs-tipo A é mediar um feedback negativo sobre a sinalização de citocinina (HWANG; SHEEN, 2001), a superexpressão de, por exemplo, ARR7 e ARR15, ambos ARRs-tipo A, reduz a sinalização de citocinina e diminúi a capacidade regenerativa da planta. Por outro lado, mutantes com perda de função para os genes ARR7 e ARR15 apresentam aumento na capacidade de regeneração (BUECHEL et al., 2010).

Levando tais fatos em consideração e associando-os com o menor número de brotos regenerados obtidos em explantes de plantas superexpressando o miR156, supõe-se que o aumento na expressão do gene *pARR5::GUS* nos primórdios de brotos de explantes de plantas miR156-OE ou P35S::*MIR156a*; *pARR5::GUS* esteja relacionada com o aumento do nível de expressão do gene *ARR5* tipo A, sendo esse

um regulador negativo da via de sinalização da auxina. Outro fator é a possível repressão do gene *WUS* pelo ARR5 endógeno, visto que mutantes *wus* apresentam redução ou até mesmo ausência de regeneração (GORDON et al., 2007; CHATFIELD et al., 2013) e a superexpressão de *WUS*, é capaz de aumentar a regeneração de brotos (GALLOIS et al., 2002).

5 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, foi possível concluir que:

- A modulação da via miR156/SPL é capaz de alterar a capacidade de regeneração *in vitro* de brotos a partir da raiz principal.
- Plantas miR156-OE apresentaram menor quantidade de brotos regenerados em relação a WT, porém apresentaram encurtamento do *plastochron* durante o desenvolvimento dos brotos.
- Plantas rSPL9 apresentaram menor quantidade de brotos regenerados além do alongamento do plastochron em relação a plantas WT.
- Plantas rSPL10 não apresentaram a formação de brotos através da organogênese *in vitro* a partir de raiz principal, porém, houve a formação de estruturas contendo tecido epidérmico precocemente diferenciado e células especializadas do tipo estomática.
- Plantas mutantes *hyl1-2* não apresentaram regeneração de brotos a partir da raiz principal, porém, houve intensa formação de raiz lateral.
- A expressão constitutiva do miR156 alterou a distribuição tanto de auxina quanto de citocinina em calos envolvidos no processo de regeneração de brotos, sendo que tais fatores influenciaram negativamente no número de brotos regenerados.
- O gene *miR156a* provavelmente é um dos principais responsáveis pelo controle da expressão dos alvos *SPLs* no processo de regeneração de brotos a partir de tecidos radiculares de arabidopsis, visto que sua expressão ocorre temporalmente e espacialmente em tecidos e células envolvidas diretamente no DNSO.
REFERÊNCIAS

ABHILASH, P.C.; DUBEY, R.K. Root system engineering: prospects and promises. **Trends in Plant Science**, London, v. 20, n. 7, p. 408–409, 2015.

ABRASH, E.B.; BERGMANN, D.C. Asymmetric Cell Divisions: A View from Plant Development. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 16, n. 6, p. 783–796, 2009.

ARASE, F.; NISHITANI, H.; EGUSA, M.; NISHIMOTO, N.; SAKURAI, S.; SAKAMOTO, N.; KAMINAKA, H. IAA8 involved in lateral root formation interacts with the TIR1 auxin receptor and ARF transcription factors in Arabidopsis. **PLoS ONE**, Gottingen, v. 7, n. 8, p. 300-3092012.

ATTA, R.; LAURENS, L.; BOUCHERON-DUBUISSON, E.; GUIVARC'H, A.; CARNERO, E.; GIRAUDAT-PAUTOT, V.; RECH, P.; CHRIQUI, D. Pluripotency of Arabidopsis xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown *in vitro*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 57, n. 4, p. 626–644, 2009.

AUNG, B.; GRUBER, M.Y.; AMYOT, L.; OMARI, K.; BERTRAND, A.; HANNOUFA, A. MicroRNA156 as a promising tool for alfalfa improvement. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 156, p. 1–12, 2015.

BELLINI, C.; PACURAR, D.I.; PERRONE, I. Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 65, p. 639–666, 2014.

BENKOVÁ, E.; MICHNIEWICZ, M.; SAUER, M.; TEICHMANN, T.; SEIFERTOVÁ, D.; JÜRGENS, G.; FRIML, J. Local, Efflux-Dependent Auxin Gradients as a Common Module for Plant Organ Formation. **Cell**, Cambridge, v. 115, n. 5, p. 591–602, 2003.

BENLLOCH, R.; BERBEL, A.; SERRANO-MISLATA, A.; MADUEÑO, F. Floral initiation and inflorescence architecture: a comparative view. **Annals of Botany**, London, v. 100, n. 3, p. 659–76, 2007.

BENNETT, M.J.; MARCHANT, A.; GREEN, H.G.; MAY, S.T.; WARD, S.P.; MILLNER, P.A.; WALKER, A.R.; SCHULZ, B.; FELDMANN, K.A. Arabidopsis AUXI **Gene** : A Permease-Like Regulator of Root Gravitropism. v. 273, n. Aug., p. 948– 950, 1996.

BERGMANN, D.C.; SACK, F.D. Stomatal Development. Annual Review of Plant Biology, Palo Alto, v. 58, n. 6, p.163-181,2007.

BIRNBAUM, K.D.; SÁNCHEZ ALVARADO, A. Slicing across kingdoms: regeneration in plants and animals. **Cell**, Cambridge, v. 132, n. 4, p. 697–710, 2008.

BISHOPP, A.; LEHESRANTA, S.; VATÉN, A.; HELP, H.; EL-SHOWK, S.; SCHERES, B.; HELARIUTTA, K.; MÄHÖNEN, A.P.; SAKAKIBARA, H.; HELARIUTTA, Y. Phloem-Transported Cytokinin Regulates Polar Auxin Transport and Maintains Vascular Pattern in the Root Meristem. **Current Biology**, London, v. 21, n. 11, p. 927–932, 2011.

BLILOU, I.; XU, J.; WILDWATER, M.; WILLEMSEN, V.; PAPONOV, I.; FRIML, J.; HEIDSTRA, R.; AIDA, M.; PALME, K.; SCHERES, B. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. **Nature**, London, v. 433, p. 39–44, 2005.

BOZZOLA, J. J.; RUSSEL. L. D. Electron microscopy. **Jones and Bartlett Publishers**, Boston, v.2, n.3, p. 542, 1992.

BUECHEL, S.; LEIBFRIED, A.; TO, J.P.C.; ZHAO, Z.; ANDERSEN, S.U.; KIEBER, J.J.; LOHMANN, J.U. Role of A-type Arabidopsis Response Regulators in meristem maintenance and regeneration. **European Journal of Cell Biology**, Hamburg, v. 89, n. 2/3, p. 279–284, 2010.

CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; STEINER, N.; MALDONADO, S.B.; GUERRA, M.P. Patterns of protein and carbohydrate accumulation during somatic embryogenesis of Acca sellowiana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 3, p. 217–224, 2009.

CARY, A.J.; CHE, P.; HOWELL, S.H. Developmental events and shoot apical meristem gene expression patterns during shoot development in Arabidopsis thaliana. **The Plant journal,** Oxford, v. 32, n. 6, p. 867–877, 2002.

CASAMITJANA-MARTINEZ, E.; HOFHUIS, H.F.; XU, J.; LIU, C.M.; HEIDSTRA, R.; SCHERES, B. Root-specific CLE19 overexpression and the sol1/2 suppressors implicate a CLV-like pathway in the control of Arabidopsis root meristem maintenance. **Current Biology**, London, v. 13, n. 7, p. 1435–1441, 2003.

CASIMIRO, I.; MARCHANT, A; BHALERAO, R.P.; BEECKMAN, T.; DHOOGE, S.; SWARUP, R.; GRAHAM, N.; INZÉ, D.; SANDBERG, G.; CASERO, P.J.; BENNETT, M. Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation. **The Plant Cell**,Rockville, v. 13, n. 4, p. 843–852, 2001.

CHATFIELD, S.P.; CAPRON, R.; SEVERINO, A.; PENTTILA, P.A.; ALFRED, S.; NAHAL, H.; PROVART, N.J. Incipient stem cell niche conversion in tissue culture: Using a systems approach to probe early events in WUSCHEL-dependent conversion of lateral root primordia into shoot meristems. **The Plant Journal**, Oxford, v. 73, p. 798–813, 2013.

CHE, P.; LALL, S.; HOWELL, S.H. Developmental steps in acquiring competence for shoot development in Arabidopsis tissue culture. **Planta**, Berlin, v. 226, n. 5, p. 1183–1194, 2007.

CHE, P.; LALL, S.; NETTLETON, D.; HOWELL, S.H. Gene expression programs during shoot, root, and callus development in Arabidopsis tissue culture. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 141, n. June, p. 620–637, 2006.

COSGROVE, D.J. Loosening of plant cell walls by expansins. **Nature**, London, v. 407, n. 6802, p. 321–326, 2000.

CUI, L.-G.; SHAN, J.-X.; SHI, M.; GAO, J.-P.; LIN, H.-X. The *miR156-SPL9-DFR* pathway coordinates the relationship between development and abiotic stress tolerance in plants. **The Plant Journal**, Oxford, v. 80, n. 6, p. 1108–1117, 2014.

D'AGOSTINO, I.B.; DERUÈRE, J.; KIEBER, J.J. Characterization of the response of the Arabidopsis response regulator gene family to cytokinin. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 124, n. 4, p. 1706–1717, 2000.

DE RYBEL, B.; VASSILEVA, V.; PARIZOT, B.; DEMEULENAERE, M.; GRUNEWALD, W.; AUDENAERT, D.; VAN CAMPENHOUT, J.; OVERVOORDE, P.; JANSEN, L.; VANNESTE, S.; MÖLLER, B.; WILSON, M.; HOLMAN, T.; VAN ISTERDAEL, G.; BRUNOUD, G.; VUYLSTEKE, M.; VERNOUX, T.; DE VEYLDER, L.; INZÉ, D.; WEIJERS, D.; BENNETT, M.J.; BEECKMAN, T. A novel Aux/IAA28 signaling cascade activates GATA23-dependent specification of lateral root founder cell identity. **Current Biology**, London, v. 20, n. 19, p. 1697–1706, 2010.

DE SMET, I.; TETSUMURA, T.; DE RYBEL, B.; FREY, N.F.D.; LAPLAZE, L.; CASIMIRO, I.; SWARUP, R.; NAUDTS, M.; VANNESTE, S.; AUDENAERT, D.; INZE, D.; BENNETT, M.J.; BEECKMAN, T. Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of Arabidopsis. **Development**, Cambridge, v. 134, n. 4, p. 681–690, 2007.

DELBARRE, A.; MULLER, P.; IMHOFF, V.; GUERN, J. Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid, and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. **Planta**,Berlin, v. 198, n. 4, p. 532–541, 1996.

DING, Z; FRIML, J. Auxin regulates distal stem cell differentiation in Arabidopsis roots. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 107, n. 26, p. 12046-12051, 2010.-

DUBROVSKY, J.G.; SAUER, M.; NAPSUCIALY-MENDIVIL, S.; IVANCHENKO, M. G.; FRIML, J.; SHISHKOVA, S.; CELENZA, J.; BENKOVÁ, E. Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, n. 25, p. 8790–8794, 2008.

DUCLERCQ, J.; SANGWAN-NORREEL, B.; CATTEROU, M.; SANGWAN, R.S. De novo shoot organogenesis: From art to science. **Trends in Plant Science**, London, v. 16, n. 11, p. 597–606, 2011.

FEDER, N.; O'BRIEN, T.P. **Plant microtechnique**: Some Principles and New Methods, v. 55, n. 1, p. 123–142, 1968.

FITTER, a H. An Architectural Approach To The Comparitice Ecology Of Plant Root Systems. **New Phytologist**, Lancaster, v. 106, p. 61–77, 1987.

FRANCO-ZORRILLA, J.M.; VALLI, A.; TODESCO, M.; MATEOS, I.; PUGA, M.I.; RUBIO-SOMOZA, I.; LEYVA, A.; WEIGEL, D.; GARCÍA, J. A.; PAZ-ARES, J. Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. **Nature Genetics**, London, v. 39, n. 8, p. 1033–1037, 2007.

FUKAKI, H.; TAMEDA, S.; MASUDA, H.; TASAKA, M. Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of Arabidopsis. **The Plant journal :** For Cell And Molecular Biology, Oxford, v. 29, n. 2, p. 153–168, 2002.

FUKAKI, H.; TANIGUCHI, N.; TASAKA, M. PICKLE is required for SOLITARY-ROOT/IAA14-mediated repression of ARF7 and ARF19 activity during Arabidopsis lateral root initiation. **The Plant Journal :** For Cell And Molecular Biology, Oxford, v. 48, n. 3, p. 380–9, 2006.

GALLOIS, J.; WOODWARD, C.; REDDY, G.V.; SABLOWSKI, R. Combined SHOOT MERISTEMLESS and WUSCHEL trigger ectopic organogenesis in Arabidopsis. **Development**, Cambridge,v. 3217, p. 3207–3217, 2002.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. NUTRIENT REQUIREMENTS OF SOYBEAN OF SUSPENSION. **Experimental Cell Research**, Stockholm, v. 158, n. 9901, p. 151–158, 1968.

GOH, T.; JOI, S.; MIMURA, T.; FUKAKI, H. The establishment of asymmetry in Arabidopsis lateral root founder cells is regulated by LBD16/ASL18 and related LBD/ASL proteins. **Development**, Cambridge,v. 139, n. 5, p. 883–893, 2012.

GOODWINA, P.B.; MORRISAB, S.C. Application of Phytohormones to Pea Roots after Removal of the Apex: Effect on Lateral Root Production. **Australian Journal of Plant Physiology,** Camberra, v. 6, p. 195–200, 1979.

GORDON, S.P.; CHICKARMANE, V.S.; OHNO, C.; MEYEROWITZ, E.M. Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the Arabidopsis shoot meristem. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 106, n. 38, p. 16529–16534, 2009.

GORDON, S.P.; HEISLER, M.G.; REDDY, G.V.; OHNO, C.; DAS, P.; MEYEROWITZ, E.M. Pattern formation during de novo assembly of the Arabidopsis shoot meristem. **Development**, Cambridge, v. 134, n. 19, p. 3539–3548, 2007.

GOU, J.-Y.; FELIPPES, F. F.; LIU, C.-J.; WEIGEL, D.; WANG, J.-W. Negative Regulation of Anthocyanin Biosynthesis in Arabidopsis by a miR156-Targeted SPL Transcription Factor. **The Plant Cell**, Rockville, v. 23, n. 4, p. 1512–1522, 2011. GRIENEISEN, V. a; XU, J.; MARÉE, A. F. M.; HOGEWEG, P.; SCHERES, B. Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. **Nature**, London, v. 449, n. Oct., p. 1008–1013, 2007.

HAN, M.-H.; GOUD, S.; SONG, L.; FEDOROFF, N. The Arabidopsis double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 4, p. 1093–8, 2004.

HEISLER, M.G.; OHNO, C.; DAS, P.; SIEBER, P.; REDDY, G.V.; LONG, J. a.; MEYEROWITZ, E.M. Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the Arabidopsis inflorescence meristem. **Current Biology**, London, v. 15, n. 21, p. 1899–1911, 2005.

HODGE, A.; BERTA, G.; DOUSSAN, C.; MERCHAN, F. Plant root growth, architecture and function. **Plant Soil**, Crawley, v. 321, p. 153-187 [s.l: s.n.]

HUTCHISON, C.E.; LI, J.; ARGUESO, C.; GONZALEZ, M.; LEE, E.; LEWIS, M.W.; MAXWELL, B.B.; PERDUE, T.D.; SCHALLER, G.E.; ALONSO, J.M.; ECKER, J. R.; KIEBER, J.J. The Arabidopsis Histidine Phosphotransfer Proteins Are Redundant Positive Regulators of Cytokinin Signaling. **The Plant Cell**, Rockville, v. 18, n. 11, p. 3073–3087, 2006.

HWANG, I.; SHEEN, J. Two-component circuitry in Arabidopsis cytokinin signal transduction. **Nature**, London, v. 413, n. 6854, p. 383–389, 2001.

HWANG, I.; SHEEN, J.; BRUNO, M. Cytokinin Signaling Networks. 2012.

INOUE, T.; HIGUCHI, M.; HASHIMOTO, Y.; SEKI, M.; KOBAYASHI, M.; KATO, T.; TABATA, S.; SHINOZAKI, K.; KAKIMOTO, T. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from Arabidopsis. **Nature**, London, v. 409, n. 6823, p. 1060–1063, 2001.

INZE, D.; DE VEYLDER, L. Cell cycle regulation in plant development. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 40, p. 77–105, 2006.

ISHIDA, K.; YAMASHINO, T.; YOKOYAMA, A.; MIZUNO, T. Three type-B response regulators, ARR1, ARR10 and ARR12, play essential but redundant roles in cytokinin signal transduction throughout the life cycle of Arabidopsis thaliana. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 49, n. 1, p. 47–57, 2008.

JONES-RHOADES, M.W.; BARTEL, D.P.; BARTEL, B. MicroRNAS and their regulatory roles in plants. **Annual Review Of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 19–53, 2006.

KHAN, G. a.; DECLERCK, M.; SORIN, C.; HARTMANN, C.; CRESPI, M.; LELANDAIS-BRIÈRE, C. MicroRNAs as regulators of root development and architecture. **Plant Molecular Biology**, Dordrech, v. 77, n. 1, p. 47–58, 2011.

KO, D.; KANG, J.; KIBA, T.; PARK, J.; KOJIMA, M.; DO, J.; KIM, K.Y.; KWON, M.; ENDLER, a.; SONG, W.-Y.; MARTINOIA, E.; SAKAKIBARA, H.; LEE, Y. Arabidopsis ABCG14 is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 111, n. 19, p. 7150–7155, 2014.

LALL, S.; NETTLETON, D.; DECOOK, R.; CHE, P.; HOWELL, S.H. Quantitative trait loci associated with adventitious shoot formation in tissue culture and the program of shoot development in Arabidopsis. **Genetics**, Austin, v. 167, n. 4, p. 1883–1892, 2004.

LAPLAZE, L.; BENKOVA, E.; CASIMIRO, I.; MAES, L.; VANNESTE, S.; SWARUP, R.; WEIJERS, D.; CALVO, V.; PARIZOT, B.; HERRERA-RODRIGUEZ, M. B.; OFFRINGA, R.; GRAHAM, N.; DOUMAS, P.; FRIML, J.; BOGUSZ, D.; BEECKMAN, T.; BENNETT, M. Cytokinins Act Directly on Lateral Root Founder Cells to Inhibit Root Initiation. **The Plant Cell**, Rockville, v. 19, n. 12, p. 3889–3900, 2007.

LEE, H.W.; KIM, N.Y.; LEE, D.J.; KIM, J. LBD18/ASL20 Regulates Lateral Root Formation in Combination with LBD16/ASL18 Downstream of ARF7 and ARF19 in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Washington, v. 151, n. 3, p. 1377–1389, 2009.

LEE, R.C. The C . elegans Heterochronic Gene lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to lin-14. **Cell**, Cambridge, v. 75, p. 843–854, 1993.

LEE, Y.; KIM, M.; HAN, J.; YEOM, K.-H.; LEE, S.; BAEK, S. H.; KIM, V. N. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **The EMBO journal**, Heidelberg, v. 23, n. 20, p. 4051–4060, 2004.

LEIBFRIED, A.; TO, J. P. C.; BUSCH, W.; STEHLING, S.; KEHLE, A.; DEMAR, M.; KIEBER, J. J.; LOHMANN, J. U. WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. **Nature**, London v. 438, n. 7071, p. 1172–1175, 2005.

LENHARD, M.; JÜRGENS, G.; LAUX, T. The WUSCHEL and SHOOTMERISTEMLESS genes fulfil complementary roles in Arabidopsis shoot meristem regulation. **Development**, Cambridge, v. 129, p. 3195–3206, 2002.

LI, S.; YANG, X.; WU, F.; HE, Y. HYL1 controls the miR156-mediated juvenile phase of vegetative growth. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 7, p. 2787–2798, 2012.

LU, C.; FEDOROFF, N. A mutation in the Arabidopsis HYL1 gene encoding a dsRNA binding protein affects responses to abscisic acid, auxin, and cytokinin. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, n. 12, p. 2351–2366, 2000.

LU, C.; LU, C.; KULKARNI, K.; KULKARNI, K.; MUTHUVALLIAPPAN, R.; MUTHUVALLIAPPAN, R.; TEJ, S. S.; TEJ, S. S.; POETHIG, S.; POETHIG, S.; HENDERSON, I. R.; HENDERSON, I. R.; JACOBSEN, S. E.; JACOBSEN, S. E.; WANG, W.; WANG, W.; GREEN, P. J.; GREEN, P. J.; MEYERS, B. C.; MEYERS, B. C. MicroRNAs and other small RNAs enriched in the. **Plant and Soil**, Crawley, n. 302, p. 1276–1288, 2006. MALAMY, J.E. Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 28, n. 1, p. 67–77, 2005.

MALAMY, J.E.; BENFEY, P.N. Organization and cell differentiation in lateral roots of Arabidopsis thaliana. **Development**, Cambridge, v. 124, n. 1, p. 33–44, 1997.

MANGAT, B.S.; PELEKIS, M.K.; CASSELLS, A.C. Changes in the starch content during organogenesis in in vitro cultured *Begonia* rex stem explants. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 79, n. 2, p. 267–274, 1990.

MARTIN, A.B.; CUADRADO, Y.; GUERRA, H.; GALLEGO, P.; HITA, O.; MARTIN, L.; DORADO, A.; VILLALOBOS, N. Differences in the contents of total sugars, reducing sugars, starch and sucrose in embryogenic and non-embryogenic calli from Medicago arborea L. **Plant Science**, Davis, v. 154, n. 2, p. 143–151, 2000.

MARTIN, R.C.; ASAHINA, M.; LIU, P.-P.; KRISTOF, J.R.; COPPERSMITH, J.L.; PLUSKOTA, W.E.; BASSEL, G.W.; GOLOVIZNINA, N. a.; NGUYEN, T.T.; MARTÍNEZ-ANDÚJAR, C.; ARUN KUMAR, M.B.; PUPEL, P.; NONOGAKI, H. The microRNA156 and microRNA172 gene regulation cascades at post-germinative stages in Arabidopsis. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 20, n.2, p. 79, 2010.

MENG, Y.; SHAO, C.; WANG, H.; JIN, Y. Target mimics: an embedded layer of microRNA-involved gene regulatory networks in plants. **BMC Genomics**, Michigan, v. 13, n. 1, p. 197, 2012.

MOREA, E.G.O.; DA SILVA, E.M.; E SILVA, G.F.F.; VALENTE, G.T.; BARRERA ROJAS, C.H.; VINCENTZ, M.; NOGUEIRA, F.T.S. Functional and evolutionary analyses of the miR156 and miR529 families in land plants. **BMC Plant Biology**, Michigan, v. 16, n. 1, p. 40, 2016.

MORENO-RISUENO, M. a; VAN NORMAN, J. M.; MORENO, A.; ZHANG, J.; AHNERT, S.E.; BENFEY, P. N. Oscillating gene expression determines competence for periodic Arabidopsis root branching. **Science, New York**, v. 329, n. 5997, p. 1306–1311, 2010.

MOTTE, H.; VEREECKE, D.; GEELEN, D.; WERBROUCK, S. The molecular path to in vitro shoot regeneration. **Biotechnology Advances**, New Jersey, v. 32, n. 1, p. 107–121, 2014.

MOUBAYIDIN, L.; DI MAMBRO, R.; SABATINI, S. Cytokinin–auxin crosstalk. **Trends** in **Plant Science**, Killington, v. 14, n. 10, p. 557–562, 2009.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiology**, Lund, v. 15, n.3, p.473-497, 1962.

MURRAY, J. a. H.; JONES, a.; GODIN, C.; TRAAS, J. Systems Analysis of Shoot Apical Meristem Growth and Development: Integrating Hormonal and Mechanical Signaling. **The Plant Cell**, Rockville v. 24, n. Oct., p. 3907–3919, 2012.

NEUMANN, K.-H.; KUMAR, A.; IMANI, J. **Plant cell and tissue culture - a tool in biotechnology**. Giessen: Springer, 2009. 333p. NISHIMURA, C.; OHASHI, Y.; SATO, S.; KATO, T.; TABATA, S.; UEGUCHI, C. Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, n. 6, p. 1365–1377, 2004.

NODINE, M.D.; BARTEL, D.P. MicroRNAs prevent precocious gene expression and enable pattern formation during plant embryogenesis. **Genes and Development**, Cold Spring Harbor, v. 24, n. 23, p. 2678–2692, 2010.

NOZAWA, M.; MIURA, S.; NEI, M. Origins and evolution of microRNA genes in plant species. **Genome Biology and Evolution**, Oxford, v. 4, n. 3, p. 230–239, 2012.

O'BRIEN, T. P. ; MCCULLY, M. E. The Study of Plant Structure: Principles and Selected. **International Association for Plant Taxonomy (IAPT)**, Melbourne, v. 32, n. 4, p. 789-791, 1981.

OKUSHIMA, Y.; FUKAKI, H.; ONODA, M.; THEOLOGIS, A.; TASAKA, M. ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 19, n. 1, p. 118–130, 2007.

OKUSHIMA, Y.; OVERVOORDE, P.J.; ARIMA, K.; ALONSO, J.M.; CHAN, A.; CHANG, C.; ECKER, J.R.; HUGHES, B.; LUI, A.; NGUYEN, D.; ONODERA, C.; QUACH, H.; SMITH, A. Functional Genomic Analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR Gene Family Members in Arabidopsis thaliana. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. Feb., p. 444–463, 2005.

ORTIZ MOREA, E.G. **Papel funcional de micrornas na arquitetura vegetativa e radicular de plantas.** 2013. cidade. Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", cidade, 2013. 87p.

OSMONT, K.S.; SIBOUT, R.; HARDTKE, C.S. Hidden branches: developments in root system architecture. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 58, p. 93–113, 2007.

PACIFICI, E.; POLVERARI, L.; SABATINI, S. Plant hormone cross-talk: the pivot of root growth. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 66, n. 4, p. 1113–1121, 2015.

PADMANABHAN, M.S.; MA, S.; BURCH-SMITH, T.M.; CZYMMEK, K.; HUIJSER, P.; DINESH-KUMAR, S.P. Novel Positive Regulatory Role for the SPL6 Transcription Factor in the N TIR-NB-LRR Receptor-Mediated Plant Innate Immunity. **PLoS Pathogens**, Gottingen, v. 9, n. 3, p. e1003235, 2013.

PARIZOT, B.; LAPLAZE, L.; RICAUD, L.; BOUCHERON-DUBUISSON, E.; BAYLE, V.; BONKE, M.; DE SMET, I.; POETHIG, S. R.; HELARIUTTA, Y.; HASELOFF, J.; CHRIQUI, D.; BEECKMAN, T.; NUSSAUME, L. Diarch symmetry of the vascular bundle in Arabidopsis root encompasses the pericycle and is reflected in distich lateral root initiation. **The Plant Physiology**, London, v. 146, n. 1, p. 140–148, 2008.

PARK, M.Y.; WU, G.; GONZALEZ-SULSER, A.; VAUCHERET, H.; POETHIG, R.S. Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, n. 10, p. 3691–3696, 2005.

PÉRET, B.; DE RYBEL, B.; CASIMIRO, I.; BENKOVÁ, E.; SWARUP, R.; LAPLAZE, L.; BEECKMAN, T.; BENNETT, M. J. Arabidopsis lateral root development: an emerging story. **Trends in Plant Science**, London, v. 14, n. 7, p. 399–408, 2009.

PETERSSON, S.V; JOHANSSON, A.I.; KOWALCZYK, M.; MAKOVEYCHUK, A.; WANG, J.Y.; MORITZ, T.; GREBE, M.; BENFEY, P.N.; SANDBERG, G.; LJUNG, K. An auxin gradient and maximum in the Arabidopsis root apex shown by high-resolution cell-specific analysis of IAA distribution and synthesis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 21, n. 6, p. 1659–1668, 2009.

PETRICKA, J.J.; WINTER, C.M.; BENFEY, P.N. Control of *Arabidopsis* Root Development. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 63, n. 1, p. 563–590, 2012.

PILLITTERI, L.J.; TORII, K.U. Mechanism of stomatal development. **Annual Review** of **Plant Biology**, Palo Alto, v. 63, p. 12.1–12.4, 2012.

QIAO, M.; ZHAO, Z.; SONG, Y.; LIU, Z.; CAO, L.; YU, Y.; LI, S.; XIANG, F. Proper regeneration from in vitro cultured Arabidopsis thaliana requires the microRNA-directed action of an auxin response factor. **The Plant Journal**, Oxford, v. 71, p. 14–22, 2012.

REINHART, B.J.; WEINSTEIN, E.G.; RHOADES, M.W.; BARTEL, B.; BARTEL, D. P. MicroRNAs in plants. **Genes and Development**, Cold spring Harbor, v.16, n.13, p. 1616–1626, 2002.

ROCHA, D. I.; VIEIRA, L. M.; TANAKA, F. A. O.; SILVA, L. C. Da; OTONI, W. C. Anatomical and ultrastructural analyses of in vitro organogenesis from root explants of commercial passion fruit (Passiflora edulis Sims). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Giessen, v. 111, n. 1, p. 69–78, 2012.

RÜCK, A.; PALME, K.; VENIS, M.A.; NAPIER, R.M.; FELLE, H.H. Patch-clamp analysis establishes a role for an auxin binding protein in the auxin stimulation of plasma membrane current in Zea mays protoplasts. **The Plant Journal**, Oxford, v. 4, p. 41–46, 1993.

SABATINI, S.; BEIS, D.; WOLKENFELT, H.; MURFETT, J.; GUILFOYLE, T.; MALAMY, J.; BENFEY, P. N.; LEYSER, O.; BECHTOLD, N.; WEISBEEK, P.; SCHERES, B. An Auxin-Dependent Distal Organizer of Pattern and Polarity in the *Arabidopsis* Root. **Cell**, Cambridge, v. 99, p. 463–472, 1999.

SAINI, S.; SHARMA, I.; KAUR, N.; PATI, P.K. Auxin: a master regulator in plant root development. **Plant Cell Reports**, Rockville, v. 32, n. 6, p. 741–757, 2013.

SCHERES, B.; BENFEY, P.N. Asymmetric Cell Division in Plants. Annual review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, cidade, v.50, 505-37, 1999.

SCHWAB, R.; PALATNIK, J. F.; RIESTER, M.; SCHOMMER, C.; SCHMID, M.; WEIGEL, D. Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 8, p. 517–527, 2005.

SCHWARZ, S.; GRANDE, A.V.; BUJDOSO, N.; SAEDLER, H.; HUIJSER, P. The microRNA regulated SBP-box genes SPL9 and SPL15 control shoot maturation in Arabidopsis. **Plant Molecular Biology**, Dordrech, v. 67, n. 1/2, p. 183–195, 2008.

SILVA, G.F.F.E.; SILVA, E.M.; DA SILVA AZEVEDO, M.; GUIVIN, M.A.C.; RAMIRO, D.A.; FIGUEIREDO, C.R.; CARRER, H.; PERES, L.E.P.; NOGUEIRA, F.T.S. microRNA156-targeted SPL/SBP box transcription factors regulate tomato ovary and fruit development. **The Plant Journal**, Oxford, v. 78, n. 4, p. 604–618, 2014.

STALS, H.; INZÉ, D. When plant cells decide to divide. **Trends in Plant Science**, London, v. 6, n. 8, p. 359–364, 2001.

STIEF, A.; ALTMANN, S.; HOFFMANN, K.; PANT, B.D.; SCHEIBLE, W.-R.; BÄURLE, I. Arabidopsis miR156 Regulates Tolerance to Recurring Environmental Stress through SPL Transcription Factors. **The Plant Cell**, Rockville, v. 26, n. 4, p. 1792–1807, 2014.

SU, Y.H.; CHENG, Z.J.; SU, Y.X.; ZHANG, X.S. Pattern analysis of stem cell differentiation during in vitro Arabidopsis organogenesis. **Frontiers in Biology**, New York, v. 5, n. 5, p. 464–470, 2010.

SUGIMOTO, K.; GORDON, S.P.; MEYEROWITZ, E.M. Regeneration in plants and animals: Dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? **Trends in Cell Biology**, London, v. 21, n. 4, p. 212–218, 2011.

SUGIMOTO, K.; JIAO, Y.; MEYEROWITZ, E.M. Arabidopsis regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 18, n. 3, p. 463–471, 2010.

SWARUP, R.; SWARUP, R.; MARCHANT, A.; MARCHANT, A.; LJUNG, K.; LJUNG, K.; SANDBERG, G.; SANDBERG, G.; PALME, K.; PALME, K.; BENNETT, M.; BENNETT, M. Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the Arabidopsis root apex. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v.15, n.20 p. 2648–2653, 2001.

TERZI, M.; LO SCHIAVO, F. Somatic embryogenesis. In: BHAJWANI, S.S. (Ed.) Plant Tissue Culture: Applications and Limitations. **Elsevier**, Amsterdam, v. 17, n. Nov., p. 54-66, 1990.

TIAN, H.; DE SMET, I.; DING, Z. Shaping a root system: regulating lateral versus primary root growth. **Trends in Plant Science**, London, v. 19, n. 7, p. 426–431, 2014.

TO, J.P.C.J.; HABERER, G.; FERREIRA, F.F.J.; DERUÈRE, J.; MASON, M.G.; SCHALLER, G.E.; ALONSO, J.M.; ECKER, J.R.; KIEBER, J.J. Type-A Arabidopsis response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, n. 3, p. 658–671, 2004.

TO, J.P.C.; KIEBER, J.J. Cytokinin signaling: two-components and more. **Trends in Plant Science**, London, v. 13, n. 2, p. 85–92, 2008.

VALVEKENS, D.; MONTAGU, M.V; VAN LIJSEBETTENS, M. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Arabidopsis thaliana root explants by using kanamycin selection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 85, n. 15, p. 5536–5540, 1988.

VANNESTE, S.; DE RYBEL, B.; BEEMSTER, G.T.S.; LJUNG, K.; DE SMET, I.; ISTERDAEL, G. Van; NAUDTS, M.; IIDA, R.; GRUISSEM, W.; TASAKA, M.; INZÉ, D.; FUKAKI, H.; BEEC. Cell Cycle Progression in the Pericycle Is Not Sufficient for SOLITARY ROOT / IAA14-Mediated Lateral Root Initiation in Arabidopsis thaliana. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. Nov., p. 3035–3050, 2005.

VAZQUEZ, F.; GASCIOLLI, V.; CRÉTÉ, P.; VAUCHERET, H. The Nuclear dsRNA Binding Protein HYL1 Is Required for MicroRNA Accumulation and Plant Development, but Not Posttranscriptional Transgene Silencing. **Current Biology**, London, v. 14, n. 4, p. 346–351, 2004.

VERDEIL, J.L.; ALEMANNO, L.; NIEMENAK, N.; TRANBARGER, T.J. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? **Trends in Plant Science**, London, v. 12, n. 6, p. 245–252, 2007.

VOINNET, O. Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. **Cell**, Cambridge, v. 136, n. 4, p. 669–687, 2009.

WACHSMAN, G.; SPARKS, E.E.; BENFEY, P.N. Genes and networks regulating root anatomy and architecture. **New Phytologist**, Lancaster, p. n/a–n/a, 2015.

WANG, J.W.; CZECH, B.; WEIGEL, D. miR156-Regulated SPL Transcription Factors Define an Endogenous Flowering Pathway in Arabidopsis thaliana. **Cell**, Cambridge, v. 138, n. 4, p. 738–749, 2009.

WANG, J.-W.; SCHWAB, R.; CZECH, B.; MICA, E.; WEIGEL, D. Dual Effects of miR156-Targeted SPL Genes and CYP78A5/KLUH on Plastochron Length and Organ Size in Arabidopsis thaliana. **The Plant Cell**, Rockville, v. 20, n. 5, p. 1231–1243, 2008.

WIGHTMAN, F.; THIMANN, K.V. Hormonal factors controlling the initiation and development of lateral roots. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 49, p. 304–314, 1980.

WILMOTH, J.C.; WANG, S.; TIWARI, S.B.; JOSHI, A.D.; HAGEN, G.; GUILFOYLE, T.J.; ALONSO, J.M.; ECKER, J.R.; REED, J.W. NPH4/ARF7 and ARF19 promote

leaf expansion and auxin-induced lateral root formation. **The Plant Journal**, Oxford, v. 43, n. 1, p. 118–130, 2005.

WU, G.; PARK, M.Y.; CONWAY, S.R.; WANG, J.W.; WEIGEL, D.; POETHIG, R.S. The Sequential Action of miR156 and miR172 Regulates Developmental Timing in Arabidopsis. **Cell**, Cambridge, v. 138, n. 4, p. 750–759, 2009.

WU, G.; POETHIG, R.S. Temporal regulation of shoot development in Arabidopsis thaliana by miR156 and its target SPL3. **Development**, Cambridge, v. 133, n. 18, p. 3539–3547, 2006.

XIE, K.; SHEN, J.; HOU, X.; YAO, J.; LI, X.; XIAO, J.; XIONG, L. Gradual Increase of miR156 Regulates Temporal Expression Changes of Numerous Genes during Leaf Development in Rice. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 158, n. 3, p. 1382–1394, 2012.

XING, S.; SALINAS, M.; HÖHMANN, S.; BERNDTGEN, R.; HUIJSER, P. miR156targeted and nontargeted SBP-box transcription factors act in concert to secure male fertility in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 22, n. 12, p. 3935–3950, 2010.

XUE, X.-Y.; ZHAO, B.; CHAO, L.-M.; CHEN, D.-Y.; CUI, W.-R.; MAO, Y.-B.; WANG, L.-J.; CHEN, X.-Y. Interaction between two timing microRNAs controls trichome distribution in Arabidopsis. **PLoS Genetics**, Gottingen, v. 10, n. 4, p. e1004266, 2014.

YAMAGUCHI, A.; WU, M.F.; YANG, L.; WU, G.; POETHIG, R.S.; WAGNER, D. The MicroRNA-Regulated SBP-Box Transcription Factor SPL3 Is a Direct Upstream Activator of LEAFY, FRUITFULL, and APETALA1. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 17, n. 2, p. 268–278, 2009.

YANG, L.; LIU, Z.; LU, F.; DONG, A.; HUANG, H. SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in Arabidopsis. **The Plant Journal**, Oxford, v. 47, n. 6, p. 841–850, 2006.

YANG, L.; XU, M.; KOO, Y.; HE, J.; SCOTT POETHIG, R. Sugar promotes vegetative phase change in Arabidopsis thaliana by repressing the expression of MIR156A and MIR156C. **eLife**, Cambridge, v. 2013, n. 2, p. 1–15, 2013.

YANG, T.; XUE, L.; AN, L. Functional diversity of miRNA in plants. **Plant Science**, Davis, v. 172, n. 3, p. 423–432, 2007.

YU, B.; YANG, Z.Y.; LI, J.J.; MINAKHINA, S.; YANG, M.C.; PADGETT, R.W.; STEWARD, R.; CHEN, X.M. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. **Science**, Washington, v. 307, n. 5711, p. 932–935, 2005.

YU, N.; CAI, W.-J.; WANG, S.; SHAN, C.-M.; WANG, L.-J.; CHEN, X.-Y. Temporal control of trichome distribution by microRNA156-targeted SPL genes in Arabidopsis thaliana. **The Plant Cell**, Rockville, v. 22, n. July, p. 2322–2335, 2010.

YU, N.; NIU, Q.-W.; NG, K.-H.; CHUA, N.-H. The Role of miR156/SPLs Modules in *Arabidopsis* Lateral Root Development. **The Plant Journal**, Oxford, v.83, n. 4, p. 673-685, 2015.

ZHANG, B.; WANG, Q. MicroRNA-Based Biotechnology for Plant Improvement. **Journal of Cellular Physiology**, Malden, v. 230, n. 1, p. 1–15, 2015.

ZHANG, T.-Q.; LIAN, H.; TANG, H.; DOLEZAL, K.; ZHOU, C.-M.; YU, S.; CHEN, J.-H.; CHEN, Q.; LIU, H.; LJUNG, K.; WANG, J.-W. An Intrinsic MicroRNA Timer Regulates Progressive Decline in Shoot Regenerative Capacity in Plants. **The Plant Cell**, Rockville, p. tpc.114.135186, 2015.

ZHAO, X. Y.; SU, Y. H.; CHENG, Z. J.; ZHANG, X. S. Cell fate switch during In vitro plant organogenesis. **Journal of Integrative Plant Biology**, Oxford, v. 50, n. 7, p. 816–824, 2008.

ANEXO

| GENE | SENTIDO* | SEQUÊNCIA |
|-------------------|----------|------------------------------|
| SPL9 | F | GGTCGGGTCAGTCGGGTCAGATACC |
| | R | ACTGGCCGCCTCATCACTCTTGTATCC |
| SPL10 | F | GTGGGAGAATGCTCAGGAGGC |
| | R | GAGTGTGTTTGATCCCTTGTGAATCC |
| SPL15 | F | TGAATGTTTTATCACATGGAAGCTC |
| | R | TCATCGAGTCGAAACCAGAAGAT |
| ACTIN-2 | F | GACCTTGCTGGACGTGACCTTAC |
| | R | GTAGTCAACAGCAACAAAGGAGAGC |
| miR156 maduro | F | CCTGAGTGACAGAAGAGAGTG |
| Stem-loop miR156 | | GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTAT |
| | | TCGCACTGGATACGACTGCTCT |
| Reverse universal | R | GTGCAGGGTCCGAGG |
| | | |

Tabela 1 - de iniciadores utilizados no presente estudo

*F: Forward. R: Reverse