

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

Análise funcional dos peptídeos RALF em Arabidopsis: avaliação do efeito do hormônio brassinolide em plantas superexpressoras e silenciadas para os genes *AtRALF1* e *AtRALF34*

Tábata Bergonci

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

**Piracicaba
2012**

Tábata Bergonci
Bióloga

Análise funcional dos peptídeos RALF em Arabidopsis: avaliação do efeito do hormônio brassinolide em plantas superexpressoras e silenciadas para os genes *AtRALF1* e *AtRALF34*

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

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

**Piracicaba
2012**

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

Bergonci, Tábata

Análise funcional dos peptídeos RALF em Arabidopsis: avaliação do efeito do hormônio brassinolide em plantas superexpressoras e silenciadas para os genes *AtRALF1* e *AtRALF34* / Tábata Bergonci. - - Piracicaba, 2012.
78 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Alongamento 2. Desenvolvimento vegetal 3. Fumo 4. Hormônios vegetais
5. Peptídeos 6. Plantas transgênicas I. Título

CDD 581.1927
B499a

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

DEDICATÓRIA

*Dedico a minha mãe,
Fátima Justo Bergonci,
e ao meu pai,
Hermínio Carlos Bergonci,
que tão cedo partiu*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador, Daniel Scherer de Moura, pelos ensinamentos, pela oportunidade, pelo exemplo, pela confiança, pelo apoio, pela amizade e pela paciência todos os dias desses dois anos de trabalho.

Ao professor Márcio de Castro Silva-Filho e a professora Helaine Carrer por terem disponibilizado seus respectivos laboratórios sempre que precisei.

Ao professor Lázaro Eustáquio Pereira Peres e a Alice Noemi Aranda-Peres, pela confiança e pelos conselhos acertados.

A minha mãe Fátima Justo Bergonci, pela paciência e confiança, pelo amor incondicional e por estar sempre me apoiando. Ao Irineu Moro pelo apoio e carinho. Aos meus queridos irmãos Richard Bergonci e Renan Bergonci e ao meu irmãozinho de coração Matheus Messias Fonseca Moro, por toda a amizade, amor, carinho e companheirismo. As minhas irmãs Daiany Fonseca Moro e Adrielle Fonseca Moro. Ao meu primo Cleber Moriggi, pelo carinho e amizade. Aos meus avôs, tios e primos, por entenderem minhas ausências em todo esse tempo de trabalho.

Ao Giovani Rossi, pelo amor, pelo carinho, pela paciência, pelo grande apoio, por sempre acreditar no meu trabalho e por me escutar todos os dias.

A minha grande amiga Bianca Ribeiro, por estar presente na minha vida todos os dias, sempre me escutando, apoiando e compartilhando muitos momentos de alegria. A também grande amiga Marcela Fernanda Esteves, pelo carinho, pelo apoio e por todos os bons momentos que passamos juntas.

Ao grande amigo Fausto Andrés Ortiz-Morea, pelo apoio, companheirismo e paciência, pelas longas conversas e por estar todos os dias ao meu lado compartilhando

momentos alegres e difíceis. Ao também grande amigo Geraldo Felipe Ferreira e Silva, pelo carinho, pelo apoio e confiança, e pelas trocas de conhecimento e momentos de alegria juntos compartilhados.

Aos amigos Lincoln de Carvalho Junior, Liliane Ribeiro Melo, Vanessa Martins Mussini e Greice Rovero, por todo o apoio e compreensão durante esses dois anos, pelos grandes momentos passados juntos.

Aos companheiros do Laboratório de Bioquímica de Proteínas, Bianca Ribeiro, pela amizade e trocas de conhecimento, Fausto Andrés Ortiz-Morea, pelo carinho e parceria, Juliano Rodrigo Guerreiro, pelas trocas de ideia e pelo bom humor, Juan Carlos Guerrero Abad, pela amizade e companheirismo, Antônio Francisco Câmara Amaral, pelo grande apoio, Paulo Henrique de Oliveira Ceciliato, pela ajuda e pelas risadas, Wellington Ferreira Campos, pela amizade e paciência, Keini Dressano, pelos momentos de alegria e Amanda Morato do Canto, pelos momentos compartilhados.

Aos amigos George Lambais, Leonardo Soriano, Wanderley de Jesus Souza, William Macedo e Frederico Almeida de Jesus, pelos momentos de estudo, pelas trocas de conhecimento, pelo apoio e carinho.

Aos amigos distantes Paulo Roberto Machado Filho, Wellton Araújo Pinto, Rodrigo Paes Casagrande e Thiago Magalhães, que mesmo longe deram todo o apoio possível.

A Valentina de Fátima De Martin, Marcelo Rogalski, Daniel Ramiro, André Luíz Barboza, Esteban Galeano e todos os colegas do laboratório de Genômica e Biologia Molecular de Plantas.

EPÍGRAFE

"Um dos paradoxos dolorosos do nosso tempo reside no fato de serem os estúpidos os que têm a certeza, enquanto os que possuem imaginação e inteligência se debatem em dúvidas e indecisões."

Bertrand Russell

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Desenvolvimento e Crescimento Celular.....	19
2.2 Peptídeo Hormonal RALF.....	22
2.3 Brassinosteróides.....	26
2.4 Efeito de outros hormônios no peptídeo RALF.....	28
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Crescimento de plantas.....	31
3.2 Clonagem das sequências de <i>AtRALF1</i> e <i>AtRALF34</i>	31
3.2.1 Clonagem e recombinação.....	31
3.2.2 Preparação de bactérias eletrocompetentes.....	32
3.2.3 Extração de DNA plasmidial.....	33
3.3 Geração de plantas transgênicas pelo método da imersão das inflorescências.....	33
3.4 Análise fenotípica de plantas transgênicas.....	34
3.5 Visualização de plantas transgênicas no microscópio confocal.....	34
3.6 Análise de expressão gênica.....	35
3.6.1 Extração de RNA total.....	35
3.6.2 Quantificação do RNA.....	35
3.6.3 Síntese de cDNA.....	35
3.6.4 RT-PCR.....	36
3.7 Confirmação de mutantes nocaute.....	36
3.8 Tratamentos com peptídeos RALF e hormônios.....	36
3.8.1 Tratamentos com peptídeos RALF e hormônio brassinolide.....	36
3.8.2 Tratamentos com hormônios.....	37
3.9 Ensaio de alcalinização com o peptídeo RALF e o hormônio brassinolide e análise de expressão em células em suspensão.....	37

4 RESULTADOS.....	39
4.1 Geração de plantas transgênicas e análise de expressão dos transgenes.....	39
4.1.1 Plantas transformadas com a sequência do <i>AtRALF1</i> repetida e invertida (35S:irAtRALF1).....	39
4.1.2 Plantas transformadas com o transgene quimérico AtRALF1-GFP (35S:AtRALF1-GFP).....	40
4.1.3 Plantas transformadas com a sequência do <i>AtRALF34</i> repetida e invertida (35S:irAtRALF34).....	41
4.1.4 Plantas transformadas com a sequência do <i>AtRALF34</i> sob controle do promotor viral 35S (35S:AtRALF34).....	42
4.1.5 Plantas controle transformadas com o vetor vazio (VV).....	42
4.2 Análise das plantas transgênicas para o <i>AtRALF1</i>	44
4.2.1 Plantas 35S:irAtRALF1.....	44
4.2.2 Plantas 35S:AtRALF1-GFP, localização subcelular do AtRALF1 e funcionalidade da proteína quimérica AtRALF1-GFP.....	45
4.3 Análise das plantas transgênicas para o <i>AtRALF34</i>	47
4.4 Genes induzidos e reprimidos em plantas 35S:AtRALF1.....	49
4.5 O peptídeo hormonal RALF e o hormônio brassinolide.....	52
5 DISCUSSÃO.....	59
6 CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS.....	67
APÊNDICES.....	73

RESUMO

Análise funcional dos peptídeos RALF em Arabidopsis: avaliação do efeito do hormônio brassinolide em plantas superexpressoras e silenciadas para os genes *AtRALF1* e *AtRALF34*

A exemplo do que ocorre em animais, peptídeos hormonais em plantas desempenham papéis importantes no crescimento, desenvolvimento e defesa. RALF é um peptídeo hormonal ubíquo em plantas que foi primeiramente isolado de folhas de tabaco. Embora não se saiba exatamente sua função, as informações até agora existentes apontam para um envolvimento com aspectos básicos da biologia celular, provavelmente alongamento celular. Peptídeos RALF em Arabidopsis são encontrados em uma família multigênica de 37 membros. Plantas transgênicas superexpressando o *AtRALF1* sob o controle do forte promotor constitutivo 35S, mostram um fenótipo semi-anão e inibição do crescimento das raízes. Um fenótipo semelhante também foi observado quando o *AtRALF23* foi superexpresso. O *AtRALF23*, ao contrário do *AtRALF1*, tem sua expressão inibida por brassinosteróides. Esses fatos sugerem que diferentes peptídeos hormonais RALF, apesar de convergirem para a mesma função, apresentam uma relação individualizada com outros hormônios. O objetivo desse trabalho foi contribuir para a determinação da função dos peptídeos RALF em plantas e para o esclarecimento da inter-relação existente entre eles e os demais hormônios vegetais. Para tal, selecionou-se as isoformas *AtRALF1* e *AtRALF34* com base em semelhança/dessemelhança estrutural e padrão de expressão. Plantas silenciadas e com altos níveis de expressão para ambos os genes foram obtidas e avaliadas. A construção gênica *AtRALF1*-GFP foi inserida em Arabidopsis sob o controle do promotor 35S e foi observada fluorescência no retículo endoplasmático, complexo de Golgi e apoplasto. Genes anteriormente reportados como induzidos em plantas 35S:*AtRALF1* foram validados e utilizados em experimentos com o *AtRALF1* e o brassinolide. O conjunto dos resultados sugere um efeito antagônico do peptídeo *AtRALF1* com relação ao efeito do brassinolide no alongamento de hipocótilos e raízes. Plantas com altos níveis de *AtRALF1* são resistentes a aplicação exógena de brassinolide, não exibindo as respostas características do hormônio esteróide. O antagonismo entre os dois hormônios também foi sugerido pela análise da expressão de genes que são induzidos por *AtRALF1* e brassinolide.

Palavras-chave: Alongamento; Hormônio Vegetal; Desenvolvimento

ABSTRACT

Functional analysis of RALF peptides in Arabidopsis: evaluation of the hormone brassinolide effect in plants overexpressing and silenced for both *AtRALF1* e *AtRALF34* genes

Like in animals, plant peptide hormones play important roles in growth, development and defense. RALF is a peptide hormone ubiquitous in plants that was first isolated from tobacco leaves. Although its function has not been established, the information gathered so far suggest its involvement with basic aspects of cellular biology, probably cellular elongation. RALF peptides in Arabidopsis are found in a multigene family of 37 members. Transgenic plants overexpressing *AtRALF1* under the control of the strong constitutive promoter 35S, show a semi-dwarf phenotype and root growth inhibition. A similar phenotype was also observed when *AtRALF23* was overexpressed. *AtRALF23*, as opposed to *AtRALF1*, is inhibited by brassinosteroids. These facts suggest that different RALF peptide hormones, despite the convergence to the same function, show a unique relationship with other hormones. The goal of this work was to contribute to the determination of the function of RALF peptides in plants and to clarify the inter-relationship between RALF and the other plant hormones. With that in mind, the isoforms *AtRALF1* and *AtRALF34* were selected based on primary structure similarity/dissimilarity and pattern of gene expression. Plants with high levels of expression or silenced for both genes were obtained and evaluated. The gene construct *AtRALF1*-GFP was introduced in Arabidopsis under the control of the 35S promoter and fluorescence was observed in the endoplasmic reticulum, Golgi apparatus and apoplast. Genes previously reported as induced in 35S:*AtRALF1* plants were validated and used in *AtRALF1* peptide and brassinolide experiments. Taken together our results suggest an antagonistic effect of the peptide *AtRALF1* regarding the elongation effect of brassinolide in hypocotyls and roots. Plants with high levels of *AtRALF1* are resistant to exogenously applied brassinolide, and do not show typical responses to the steroid hormone. The antagonism between the two hormones was also suggested by the gene expression analysis of the *AtRALF1* and brassinolide inducible genes.

Keywords: Elongation; Plant Hormone; Development

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura primária do prepropeptídeo NtRALF.....	23
Figura 2 - Árvore de semelhanças de estrutura primária dos RALFs encontrados em Arabidopsis (AtRALFs).....	24
Figura 3 - Via biossintética do hormônio brassinolide.....	27
Figura 4 - Análise de expressão gênica do <i>AtRALF1</i> em raízes de plantas transformadas com a sequência do cDNA do <i>AtRALF1</i> repetida e invertida (35S:irAtRALF1).....	40
Figura 5 - Análise da expressão gênica do <i>AtRALF1</i> em raízes de plantas 35S:AtRALF1- GFP.....	41
Figura 6 - Análise de expressão gênica do <i>AtRALF34</i> em folhas de plantas transformadas com a sequência do cDNA do <i>AtRALF34</i> repetida e invertida (35S:irAtRALF34).....	42
Figura 7 - Análise de expressão gênica do <i>AtRALF34</i> em folhas de plantas 35S:AtRALF34.....	42
Figura 8 - Análise de expressão dos genes <i>AtRALF1</i> e <i>AtRALF34</i> em plantas transformadas com o vetor vazio pk7WG2.....	43
Figura 9 - Comprimento de raiz, hipocótilo e folhas e largura de folhas de plantas transformadas com vetor vazio.....	44
Figura 10 - Comprimento de raiz e hipocótilo de plantas 35S:AtRALF1 e 35S:irAtRALF1.....	45
Figura 11 - Localização subcelular do peptídeo AtRALF1 fusionado a GFP.....	46
Figura 12 - Comprimento de raiz e número de raízes laterais de plantas 35S:AtRALF1- GFP.....	47
Figura 13 - Comprimento de raiz de plantas 35S:irAtRALF34.....	48
Figura 14 - Comprimento e largura da folha número 7 de plantas 35S:irAtRALF34.....	48
Figura 15 - Validação de genes com expressão alterada em plantas 35S:AtRALF1.....	51
Figura 16 - Comprimento de raiz de plantas 35S:AtRALF1 em resposta a tratamento do hormônio brassinolide (BL).....	52
Figura 17 - Comprimento de hipocótilo de plantas que superexpressam <i>AtRALF1</i> (35S:AtRALF1).....	53

Figura 18 - Efeito do brassinolide (BL), sozinho ou em associação com os peptídeos AtRALF23 ou AtRALF1, no alongamento do hipocótilo de plantas de Arabidopsis.....	54
Figura 19 - Análise de expressão de genes induzidos por AtRALF1 na presença e na ausência de brassinolide (BL).....	55
Figura 20 - Análise de expressão de genes induzidos por brassinolide (BL).....	56
Figura 21 - Resposta de alcalinização e análise de expressão de células em suspensão de Arabidopsis expostas a AtRALF1 e brassinolide (BL).....	57

1 INTRODUÇÃO

Diversos processos fisiológicos relacionados ao crescimento, desenvolvimento, defesa e reprodução são coordenados através da comunicação intercelular. Em plantas, a caracterização genética e bioquímica de uma nova classe de sinalizadores intra e intercelulares, os peptídeos hormonais, vem revelando e desvendando novos cenários fisiológicos (MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 2006; MOURA; SILVA-FILHO, 2006; RYAN et al., 2002).

O peptídeo hormonal RALF, do inglês *Rapid ALkalinization Factor*, foi isolado de extratos proteicos de tabaco através do ensaio de alcalinização de suspensões celulares (PEARCE et al., 2001). Sabe-se que RALF está envolvido com desenvolvimento vegetal, mais especificamente com alongamento celular (MOURA; SILVA-FILHO, 2006), e que age de forma a regular a expansão dos tecidos em que atua (COVEY et al., 2010; MATOS et al., 2008; MINGOSSI et al., 2010, PEARCE et al., 2001).

Pouco se sabe sobre a função das 37 isoformas de RALF encontradas na última versão do genoma de *Arabidopsis* disponível em *The Arabidopsis Information Resources* - TAIR (LAMESCH et al.; 2011). Porém, sabe-se que os peptídeos hormonais RALF podem ser tanto tecido-específicos quanto ubíquos, ou ainda, de baixa ou alta expressão (MOURA; SILVA-FILHO, 2006). Das 37 isoformas encontradas em *Arabidopsis*, somente nove apresentam as características essenciais para atividade do peptídeo RALF originalmente isolado de tabaco. AtRALF1 e AtRALF34 são duas dessas isoformas que se caracterizam por padrões de expressão gênica bem distintos, a primeira por expressão majoritária e quase que exclusiva em raízes e a segunda por um padrão mais ubíquo de expressão tecidual.

O objetivo do trabalho foi entender o papel fisiológico das isoformas AtRALF1 e AtRALF34, buscando um melhor entendimento das funções fisiológicas dos peptídeos RALF. Mais especificamente, buscou-se: a) analisar fenotipicamente plantas superexpressoras e de baixa expressão para os genes *AtRALF1* e *AtRALF34*; b) identificar genes induzidos e reprimidos pelo peptídeo AtRALF1 e, c) analisar a relação entre o peptídeo AtRALF1 e o hormônio brassinolide.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Desenvolvimento e crescimento celular

O desenvolvimento e crescimento vegetais têm plasticidade e podem ser influenciados pelas condições ambientais, sendo essa característica importante para que a planta possa resistir a estresses e perturbações externas (JAFPE; FORBES, 1993). Embora não se conheça todos os mecanismos envolvidos na regulação do desenvolvimento e crescimento vegetais, sabe-se que as características estruturais da parede celular, como a orientação de sua extensibilidade, são críticas na determinação do formato, tamanho e propriedades mecânicas da planta (CARPITA; GIBEAUT, 1993; COSGROVE, 2005).

Para que as células vegetais cresçam, ocorre a expansão das paredes celulares. Essa expansão acontece a partir do afrouxamento da parede, dependente de um pH ácido, onde as expansinas atuam. As expansinas catalisam o afrouxamento da parede de forma rápida (COSGROVE, 2005). A parede celular é um complexo formado por carboidratos, proteínas, lignina e água (SHOWALTER, 1993). Durante a expansão celular o metabolismo da parede é ativado e microfibrilas novas e polímeros de celulose são fixados na superfície interior da parede, formando um tecido altamente estratificado e com ligações cruzadas (CARPITA; GIBEAUT, 1993). Este tecido tem composição e estrutura variadas, dependentes das condições bióticas e abióticas que ocorrem durante o desenvolvimento da planta (SHOWALTER, 1993).

Carpita e Gibeaut (1993) propuseram que a parede celular primária de dicotiledôneas e gramíneas é formada por uma estrutura fundamental de polissacarídeos como celulose e xiloglucanos (50% da massa total da parede) que está incorporada em uma outra estrutura formada por polissacarídeos pécticos (30% da massa). Um terceiro domínio independente seria constituído de proteínas estruturais (20% da massa). Em células em crescimento a parede consiste em uma fina camada de polissacarídeos e proteínas, comprimindo e dando forma a célula (COSGROVE, 2005).

Os xiloglucanos podem fazer ligações entrecruzadas com a celulose restringindo a expansão celular ou também podem ser clivados por enzimas permitindo o afrouxamento da parede celular e seu conseqüente crescimento (FRY et al., 1992). As xiloglucanos

endotransglicosilases (XET) são as enzimas responsáveis por modificar os polímeros de xiloglicanos clivando-os e, assim, afrouxando a parede celular e permitindo o crescimento, mas depois fazendo novamente a ligação desses xiloglicanos a outras microfibrilas de celulose, motivo pelo qual o processo de clivagem é considerado reversível (FRY et al., 1992). Xu et al. (1996) relata que, talvez, além de ligar e desligar xiloglicanos das microfibrilas, rearranjando-os, as XETs sejam importantes na incorporação de novos xiloglicanos na parede celular em crescimento.

Uma grande família de genes em *Arabidopsis* codifica enzimas XETs (PURUGGANAN et al., 1997), sendo um desses genes o *TCH* (do inglês *touch*), que tem uma forte e rápida indução na expressão gênica quando há um estímulo ambiental. Xu et al. (1995) revelaram que o gene *TCH4* codifica uma XET, mostrando até 64% de identidade entre a sequência de aminoácidos da proteína TCH4 com outras XETs já descritas. Sabe-se que a expressão de *TCH4* é aumentada na presença de auxina e brassinosteróide, além de também haver alteração na expressão do gene por toque, escuro e mudanças bruscas de temperatura (XU et al., 1995). Outros genes que codificam enzimas XETs não têm sua expressão aumentada pelas mesmas causas que aumentam a expressão do gene *TCH4*. Xu et al. (1996) sugeriram que as proteínas codificadas por esta família gênica possuem especificidade tecidual e funções diferentes na parede celular.

Showalter (1993) mostra as cinco classes majoritárias de proteínas que compõem a parede celular, não mencionando as enzimas, sendo elas as extensinas (EXT), as proteínas ricas em glicina (GRPs), as proteínas ricas em prolina (PRPs), as lectinas solanáceas e as proteínas arabinogalactanas (AGPs). Mais tarde, Showalter et al. (2010) classifica três famílias de parede celular, EXTs, PRPs e AGPs, como fazendo parte da superfamília de proteínas ricas em hidroxiprolinas, tendo algumas dessas proteínas, inclusive, características de mais de uma família.

Extensinas são uma superfamília de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina e serina que passam por diversas modificações pós-traducionais e sofrem ação de peroxidases para formar uma rede entre elas (SHOWALTER, 1993; VELASQUEZ et al., 2011). Showalter et al. (2010) verificou que as extensinas, em geral, possuem entre 212 e 1018 aminoácidos, com duas ou mais repetições das sequências SPPP, SPPPP ou SPPPPP. Das extensinas

encontradas por Showalter et al. (2010), a maioria é expressa em raízes ou pólen e contém peptídeo sinal, indicando que são secretadas.

Os genes que codificam as PRPs são regulados durante o desenvolvimento da planta, sendo também expressos diferencialmente nos diversos tecidos vegetais (FOWLER; BERNHARDT; TIERNEY, 1999). As PRPs estão envolvidas em defesa contra patógenos e danos físicos a planta e são críticas para manter a integridade estrutural de tecidos maduros (FOWLER; BERNHARDT; TIERNEY, 1999). Showalter et al. (2010) demonstraram que frequentemente as PRPs tem a sequência pentapeptídica PPVX(K/T), podendo X ser um resíduo Y, H ou E, e também contêm a sequência KKPCPP. O tamanho dessas proteínas varia entre 126 e 761 aminoácidos e a maioria possui peptídeo sinal sugerindo que as proteínas são secretadas (SHOWALTER et al., 2010). Diversas PRPs tem domínios conservados iguais aos das extensinas e, tais como estas, também são modificadas pós-traducionalmente por peroxidases (SHOWALTER et al., 2010).

Algumas outras proteínas com funções pouco conhecidas também tem domínios de extensinas em suas sequências de aminoácidos. Este é o caso das uclacianinas (do inglês *University of California Los Angeles*), um tipo de fitocianina presente em *Arabidopsis*. Fitocianinas compõem uma família de proteínas específicas de plantas que, assim como as plastocianinas, possuem um íon de cobre ligado a estrutura protéica (NERSISSIAN et al., 1998). As fitocianinas diferem das plastocianinas pelo local onde o íon de cobre é ligado e, principalmente, por estarem localizadas em diferentes lugares dentro da célula, sendo as plastocianinas presentes em cloroplastos, enquanto as fitocianinas possuem peptídeo sinal de encaminhamento para a via secretória (NERSISSIAN et al., 1998). A família de fitocianinas está dividida em quatro subfamílias, sendo uma delas a das uclacianinas. Existem, pelo menos, oito proteínas uclacianinas no genoma de *Arabidopsis*, e pouco se sabe sobre suas funções na célula, sendo provável que estas estejam envolvidas em reações redox (BORNER et al., 2002; NERSISSIAN et al., 1998). Borner et al. (2002) relatou que as uclacianinas provavelmente vão para o meio extracelular, já que possuem um domínio para serem ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI), uma molécula que auxilia na ligação de proteínas a membranas.

2.2 Peptídeo hormonal RALF

A comunicação intercelular é importante para o desenvolvimento e funcionamento dos organismos multicelulares. Historicamente, a denominação hormônio em plantas foi utilizada para pequenas moléculas orgânicas tais como as auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico, etileno, jasmonato, ácido salicílico, estrigolactonas e brassinosteróides (BISHOP; KONCZ, 2002; KENDE; ZEEVAART, 1997; RASKIN, 1997; XIE; YONEYAMA; YONEYAMA, 2010). Porém, em 1991, com a descoberta do peptídeo hormonal sistemina, surge uma nova classe de hormônios vegetais e é quebrado esse paradigma (PEARCE et al., 1991; RYAN et al., 2002). Atualmente, são conhecidos mais de 15 peptídeos hormonais que estão envolvidos com diversos aspectos da fisiologia vegetal, entre eles, defesa, reprodução, crescimento e desenvolvimento (MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 2006; MOURA; SILVA-FILHO, 2006).

O peptídeo hormonal RALF (do inglês, *Rapid Alkalinization Factor*), foi isolado de extratos protéicos de tabaco através de ensaio de alcalinização de suspensões celulares quando se buscava o peptídeo hormonal sistemina (PEARCE et al., 2001). Além da indução de uma rápida alcalinização do meio extracelular, o novo peptídeo também ativa de forma rápida, uma MAP quinase em células de tabaco (PEARCE et al., 2001). O peptídeo de 49 aminoácidos é derivado da porção C-terminal de um prepeptídeo de 115 aminoácidos, que apresenta um peptídeo sinal de 23 aminoácidos na porção N-terminal e uma porção intermediária de função ainda desconhecida com 43 aminoácidos (Figura 1). O peptídeo foi encontrado em diversos representantes do reino vegetal, incluindo monocotiledôneas e dicotiledôneas (MOURA; SILVA-FILHO, 2006). O peptídeo maduro localiza-se após um sítio dibásico, típico do processamento de peptídeos hormonais em animais. A estrutura primária do peptídeo maduro ainda apresenta duas características essenciais para atividade, a presença do motivo YISL e quatro cisteínas que formam duas pontes disulfeto (PEARCE et al., 2001 e Figura 1).

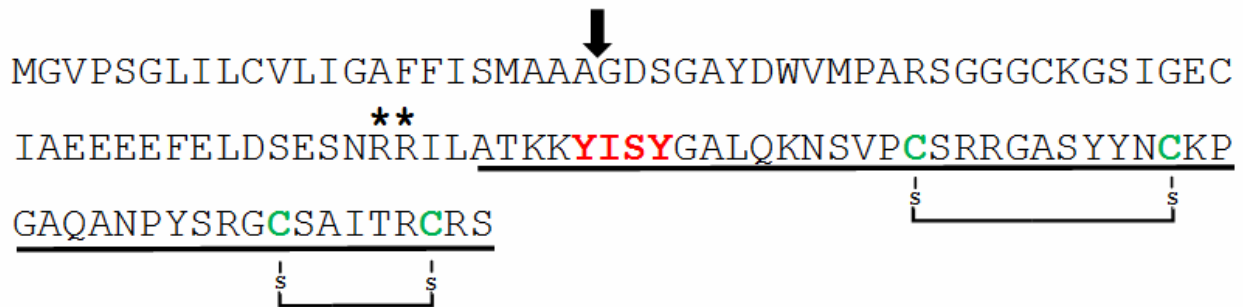


Figura 1 - Estrutura primária do prepropeptídeo NtRALF. Prepropeptídeo mostrando o local de clivagem do peptídeo sinal (seta) e a dupla arginina, sítio de clivagem para a liberação do peptídeo maduro (asteriscos). O peptídeo maduro (sublinhado) apresenta duas características essenciais para sua atividade: o motivo YISY (letras em vermelho) e 4 cisteínas (letras em verde) que formam 2 pontes dissulfeto (sinalizadas pelas linhas de conexão)

Olsen, Mundy e Skriver (2002) propuseram a existência de uma família gênica em *Arabidopsis* de 34 genes semelhantes ao RALF (*RALF-LIKE*), considerando como critério a conservação da estrutura primária, majoritariamente na região C-terminal onde reside o peptídeo maduro. Hoje sabe-se que a família dos RALFs de *Arabidopsis* é composta por 37 membros, AtRALFs, e esses, de acordo com suas semelhanças de estrutura primária, podem ser organizados em três grupos principais, I, II e III (Figura 2). Se colocado entre os genes de *Arabidopsis*, o RALF originalmente isolado de tabaco, NtRALF, ficaria no grupo III, delimitando o subgrupo IIIa onde estão as nove isoformas de *Arabidopsis* que possuem as duas características essenciais para a atividade alcalinizadora identificadas em NtRALF, o motivo YISI e as 4 cisteínas (Figura 2). Ryan et al. (2002) já haviam proposto a existência dessas 9 isoformas que apresentam peptídeo sinal, um sítio dibásico (dupla arginina) acima do N-terminal do peptídeo maduro e diversos resíduos de ácidos glutâmicos acima da dupla arginina.

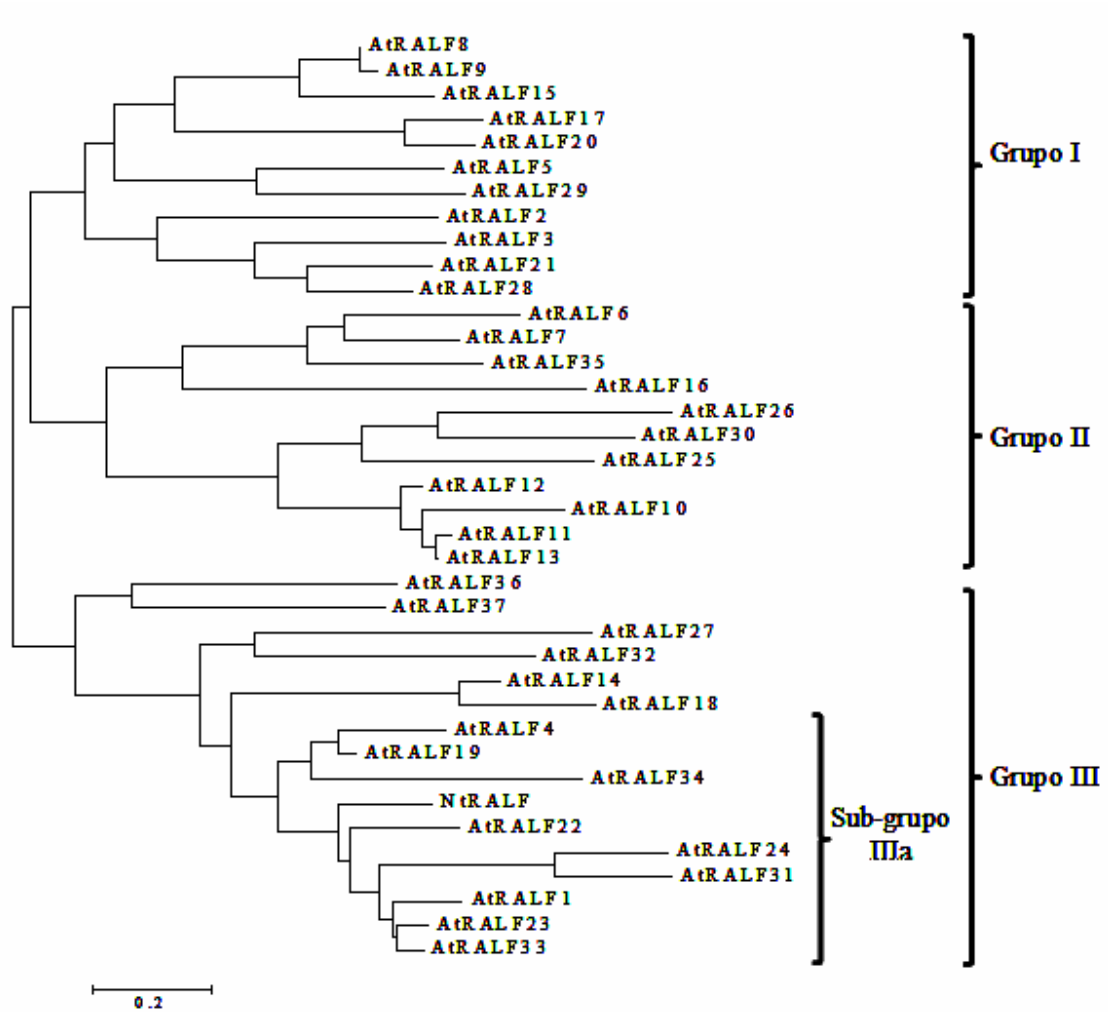


Figura 2 - Árvore de similaridade de estrutura primária dos RALFs encontrados em Arabidopsis (AtRALFs). O RALF de tabaco, NtRALF, foi utilizado para fins de identificação das isoformas de Arabidopsis mais semelhantes a ele. Os 37 RALFs estão organizados em três grupos I, II e III, sendo que no grupo III encontra-se o NtRALF que limita as nove isoformas de Arabidopsis que apresentam as características essenciais para a atividade de alcalinização

Em um estudo de transporte de proteínas em tabaco, Escobar et al. (2003) mostraram que a fusão do preproRALF a proteína verde fluorescente (GFP) foi visualizada primeiramente no retículo endoplasmático (RE) e, depois de 24 h, no RE e na parede celular. Zhang, Wu e Wang (2010) mostraram que o peptídeo RALF de brócolis (BoRALF) quando fusionado a GFP foi encontrado na membrana plasmática de protoplastos.

O fato do peptídeo ser secretado sugere a existência de receptores de membrana que seriam responsáveis pela percepção do peptídeo. Investigando essa possibilidade, foram descobertas duas proteínas integrais de membrana de peso molecular

25 e 120 kDa que interagiram de forma específica com o peptídeo RALF de tomate (LeRALF) (SCHEER; PEARCE; RYAN, 2005).

A isoforma AtRALF1 de *Arabidopsis* apresenta sua expressão gênica quase que exclusivamente em raízes (HARUTA et al., 2008) e é uma das mais próximas ao NtRALF originalmente isolado (PEARCE et al., 2001). Matos et al. (2008) superexpressaram a isoforma AtRALF1 em *Arabidopsis* sob o controle do promotor constitutivo 35S e as plantas obtidas, 35S:AtRALF1, apresentaram um crescimento de raízes reduzido e fenótipo semi-anão. Dados *in silico* mostram que células com baixa taxa de divisão celular apresentam alta expressão do *AtRALF1*, enquanto que em células com alta taxa de divisão celular, como meristemas, a expressão é baixa (BIRNBAUM et al., 2003; MOURA; PEARCE; RYAN, 2006). O peptídeo recombinante AtRALF1 quando aplicado exogenamente inibiu o alongamento de hipocótilos de *Arabidopsis* (MINGOSSI et al., 2010). Análises preliminares da expressão gênica das plantas 35S:AtRALF1 através de micro-arranjos Affymetrix, mostraram que um grupo de genes envolvidos com rearranjo da parede celular teve sua expressão alterada (NCBI, Gene Expression Omnibus, Series GSE641). Quando o gene *AtRALF23* foi também superexpresso sob o controle do promotor 35S, plantas arbustivas e menores, com fenótipo semelhante ao semi-anão observado para plantas 35S:AtRALF1 foi observado (SRIVASTAVA et al., 2009).

Em *Nicotiana attenuata* foi identificada uma única isoforma do peptídeo RALF (*NaRALF*), cujo silenciamento gênico levou a um aumento do crescimento das raízes e perturbação do desenvolvimento dos pelos radiculares (WU et al., 2007).

Em cana-de-açúcar, dois peptídeos RALF foram isolados bioquimicamente de folhas de plantas jovens e 4 genes que codificam peptídeos RALF foram identificados, *SacRALF1* a 5 (MINGOSSI et al., 2010). O estudo da expressão gênica dos *SacRALFs* demonstrou que os mesmos estão envolvidos na regulação da expansão celular, sendo expressos em regiões em expansão e praticamente ausentes em regiões onde as células cessaram a expansão.

Covey et al. (2010) isolaram SIPRALF, um RALF específico de pólen isolado de tomateiro. Quando SIPRALF foi aplicado exogenamente em tubos polínicos foi observada a inibição do alongamento dos mesmos, mostrando sua importância na regulação negativa da expansão do tubo polínico.

Sabe-se que os peptídeos da família RALF não estão relacionados a defesa, pois não induzem a síntese de inibidores de proteinases (PEARCE et al., 2001), e também não estão envolvidos com a resposta contra patógenos e ferimentos (HARUTA; CONSTABEL, 2003; OLSEN; MUNDY; SKRIVER, 2002; WU et al., 2007). Evidências tais como a inibição do crescimento de raízes, a inibição do alongamento do hipocótilo e a inibição do alongamento do tubo polínico, apontam para uma função dos peptídeos hormonais RALF na regulação da expansão celular (COVEY et al., 2010; MINGOSSI et al., 2008; PEARCE et al., 2001).

2.3 Brassinosteróides

Em plantas, os esteróides são derivados do cicloartenol via uma série de metilações, reduções, isomerizações e dessaturações (CLOUSE, 2002). Os brassinosteróides são hormônios esteróides envolvidos em vários aspectos do crescimento e desenvolvimento vegetais, tais como divisão e expansão celular, diferenciação vascular, crescimento de raiz, resposta à luz, resistência ao estresse e senescência (KIM; WANG, 2010). Entre os brassinosteróides, o mais ativo é o brassinolide (BL), sendo este derivado do campesterol (CLOUSE, 2002).

Muito do que se conhece da via biossintética do BL (Figura 3) está ligado ao estudo de mutantes nocautes específicos para enzimas que fazem parte da rota de síntese do hormônio. O estudo do mutante *cpd* (*constitutive photomorphogenesis and dwarfism*), deficiente no gene que codifica uma citocromo P450, indica que essa enzima catalisa a conversão de catasterona para teasterona por hidroxilação, controlando um passo essencial da biossíntese de BL (MATHUR, 1998). Quando plantas de *Arabidopsis* foram expostas ao hormônio BL exógeno o gene *CPD* teve sua expressão diminuída, demonstrando ser controlado pelo produto final da via biossintética do hormônio (MATHUR, 1998).

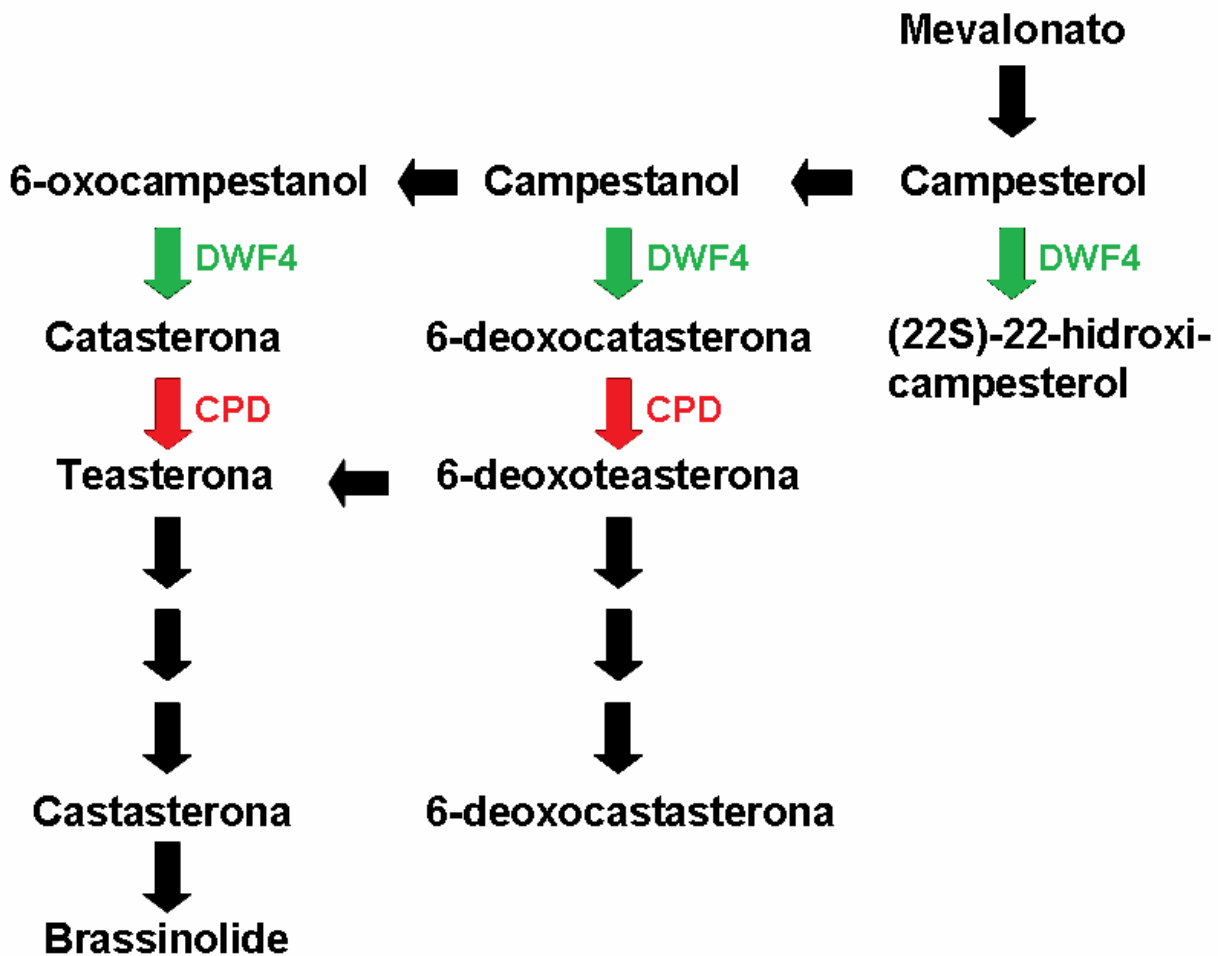


Figura 3 - Via biossintética do hormônio brassinolide. Setas indicam locais onde as enzimas atuam. Setas vermelhas são passos controlados pela enzima CPD e setas verdes são passos controlados pela enzima DWF4

Um outro mutante nocaute da via biossintética do BL, *dwf4* (*dwarf4*), não possui a enzima citocromo P450 22-hidroxilase, que participa de várias hidroxilações do carbono 22 durante a biossíntese do hormônio. *DWF4* é essencial para a síntese do BL (GUO et al., 2010). Goda et al. (2002) analisando genes regulados por brassinosteróides, verificaram que o gene *DWF4* tem sua expressão diminuída quando em contato com o hormônio BL. Mutantes *dwf4* podem ter seu fenótipo anão revertido quando expostos a baixas concentrações do hormônio BL (GUO et al., 2010). Baixas concentrações do hormônio também promovem crescimento de raiz de plantas de *Arabidopsis* selvagens (CLOUSE; LANGFORD; MCMORRIS, 1996). Fujioka et al. (1997) mostraram que o efeito de brassinosteróides exógenos em relação a expansão celular é dependente de sua

concentração. Quando em altas concentrações, o hormônio causa inibição de crescimento de raiz (CLOUSE; LANGFORD; MCMORRIS, 1996; FUJIOKA et al., 1997). Quando brassinosteróides são aplicados exogenamente em plantas de *Arabidopsis* selvagens o hipocótilo também sofre alterações em seu alongamento. Na presença de luz, o aumento na concentração de BL exógeno promove aumento no comprimento do hipocótilo (CLOUSE; LANGFORD; MCMORRIS, 1996). Já em tratamentos no escuro, plantas de *Arabidopsis* têm o crescimento do hipocótilo inibido conforme há aumento na concentração do hormônio BL exógeno (TURK et al., 2003).

O modelo proposto para explicar a resposta da planta aos brassinosteróides inclui a ligação do hormônio no domínio extracelular de um receptor quinase rico em repetições de leucina chamado BRI1, abreviação para *BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1* (CLOUSE; LANGFORD; MCMORRIS, 1996). Estudos com o mutante *bri1* mostraram que este receptor é indispensável para a via de transdução de sinal do hormônio, sendo o mutante insensível a brassinosteróides exógenos (CLOUSE; LANGFORD; MCMORRIS, 1996).

Em *Arabidopsis*, tratamentos com BL promovem a interação entre BRI1 e *BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE1*, BAK1 (KIM; WANG, 2010; WANG et al., 2005). Quando isso acontece, ocorre autofosforilação e transfosforilação entre os receptores, desencadeando por fosforilação uma cadeia de sinalização que culmina na ativação de genes responsivos a brassinosteróides (GUDESBLAT; RUSSINOVA, 2011).

2.4 Efeito de outros hormônios no peptídeo RALF

Pouco se sabe sobre a relação entre os peptídeos RALF e os demais hormônios. Haruta e Constabel (2003), estudando genes que codificam peptídeos RALF em álamo (híbrido *Populus trichocarpa* x *Populus deltóides*) não encontraram efeito significativo dos hormônios benzil adenina e ácido naftaleno acético. Porém, quando células em suspensão foram tratadas com metil jasmonato houve uma inibição transiente da expressão dos dois genes RALF existente em poplar, *PtdRALF1* e *PtdRALF2*, sendo que *PtdRALF2* foi menos expresso que *PtdRALF1* na presença do hormônio (HARUTA; CONSTABEL, 2003).

Em *Arabidopsis*, o gene *AtRALF23* tem sua expressão diminuída quando a planta é tratada com o hormônio BL (NEMHAUSER; MOCKLER; CHORY, 2004). Srivastava

et al. (2009) mostraram que o mesmo não ocorre com *AtRALF1*. Ainda, plantas com *AtRALF23* superexpresso tratadas com BL por 5 d não apresentam a elongação de hipocótilo típico do tratamento com o hormônio (SRIVASTAVA et al., 2009). A superexpressão do *AtRALF23* causou nas plantas de *Arabidopsis* uma resistência ao tratamento com BL.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Crescimento de plantas

Plantas de *Arabidopsis thaliana*, ecótipo Columbia-0 foram crescidas em câmaras Conviron ATC26 e casa de vegetação com 16 h de luz (200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) e 8 h de escuro a 22°C e 18°C, respectivamente.

3.2 Clonagem das sequências de *AtRALF1* e *AtRALF34*

3.2.1 Clonagem e recombinação

Os genes RALF em *Arabidopsis* não possuem introns, por esse motivo foi possível a utilização de DNA genômico de plantas de *Arabidopsis* como molde para as amplificações através da reação em cadeia da polimerase (PCR). O DNA genômico foi extraído com DNAzol® (Invitrogen) de acordo com instruções do fabricante. A porção codante do *AtRALF1* (locus At1g02900) e do *AtRALF34* (locus At5g67070) foram obtidos através de técnicas convencionais de PCR, com iniciadores contendo a sequência de bases CACC acima do códon da metionina inicial ATG para clonagem no vetor de entrada pENTR/D-TOPO® (Invitrogen). Esse vetor utiliza as tecnologias TOPO e Gateway para fins de clonagem. Todas as sequências dos iniciadores utilizados estão no apêndice A.

A clonagem foi feita incubando-se o fragmento gerado por PCR e o vetor de entrada por 5 min a temperatura ambiente. A reação foi colocada em células eletrocompetentes de *Escherichia coli* (cepa TOP10, Invitrogen) que sofreram eletroporação (Gene Pulse, BioRad) e foram crescidas em meio SOC líquido (20 g/L de triptona, 10 g/L de extrato de levedura, 0,5 g/L de cloreto de sódio, 1 mL de cloreto de potássio, 180 μL de glicose 20% e 180 μL de cloreto de magnésio 1 M, pH 7,0) (HANAHAN, 1983) a 37°C por uma hora. O meio SOC contendo as bactérias foi espalhado em placas contendo meio LB semi-sólido (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L cloreto de sódio e 12 g/L de ágar; pH 7,5) e canamicina 50 mg/L. As placas foram colocadas a 37°C por 18 h.

Colônias resistentes ao antibiótico tiveram seu DNA plasmidial extraído. Para verificação da clonagem foi feita a digestão do plasmídeo com a enzima *Not I* (Fermentas) e também reações de PCR com iniciadores complementares a sequências do vetor (Apêndice

A). Após as confirmações dos tamanhos moleculares dos plasmídeos linearizados e dos fragmentos amplificados, os vetores foram enviados para sequenciamento.

Após a confirmação da clonagem as sequências clonadas foram transferidas para seus vetores de destino por intermédio de recombinação utilizando-se a mistura enzimática LR-Clonase II (Invitrogen). A sequência do *AtRALF34* foi recombinação para o vetor de destino pk7WG2 (KARIMI et al., 2002) gerando a construção para a superexpressão sob a regulação do promotor 35S. A sequência do *AtRALF1* foi recombinação para o vetor pk7FWG2 (KARIMI et al., 2002) gerando uma fusão do gene de interesse a proteína fluorescente GFP, também sob regulação do promotor 35S. As sequências *AtRALF1* e *AtRALF34* foram recombinação em orientação senso e anti-senso (para geração de RNA dupla fita e conseqüente silenciamento) no vetor pk7GWIWG2I (KARIMI et al., 2002).

Os vetores resultantes das reações de recombinação foram transformados novamente em *E. coli* e espalhados em meio contendo espectinomicina 50 mg/L. Novamente as construções foram verificadas através de digestão plasmidial com a enzima *Hind III* (Fermentas) e PCR utilizando iniciadores dos vetores. Os produtos foram confirmados por sequenciamento.

As sequências, mapas e demais informações sobre os vetores aqui utilizados estão disponíveis em <http://gateway.psb.ugent.be/search>.

3.2.2 Preparação de bactérias eletrocompetentes

Células de *E. coli* (TOP10, Invitrogen) ou de *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101) foram estriadas em placas contendo meio LB semi-sólido e crescidas 18 h a 37°C ou 48 h a 28°C respectivamente. Ao meio LB para *Agrobacterium* foram adicionados os antibióticos rifampicina 50 mg/L e gentamicina 50 mg/L.

Uma colônia da placa estriada foi utilizada como pré-inóculo em 10 mL de meio líquido colocado sob agitação de 180 rpm nas mesmas condições de crescimento anteriores. Após aproximadamente 18 h, adicionou-se 5 mL do pré-inóculo em 500 mL de meio líquido e este foi mantido nas mesmas condições de crescimento até a densidade ótica (DO₆₀₀) atingir entre 0,5 e 0,8.

As células foram centrifugadas por 10 min a 5000 rpm a 4°C. Foram feitas três lavagens com água estéril gelada. As células foram ressuspensas em 3 mL de glicerol 10% filtro-esterilizado. Foram feitas alíquotas de 70 µL e estas foram armazenadas a -80°C.

A eletroporação foi feita utilizando o eletroporador gene pulse (BioRad) sob uma descarga de 2,5 kV, seguindo instruções do fabricante.

3.2.3 Extração de DNA plasmidial

Colônias isoladas obtidas na clonagem e recombinação foram crescidas em 5 mL de meio LB líquido com os antibióticos adequados a 37°C, sob agitação de 180 rpm durante 18 h. Centrifugou-se 1 mL da cultura bacteriana a 12000 rpm, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 75 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 7,6 e 1 mM EDTA). Adicionou-se 300 µL de tampão TENS (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,1 M NaOH e 0,5% SDS) e incubou-se a temperatura ambiente por 5 min. Após, 150 µL de acetato de potássio 3 M (pH 5,2) foram adicionados e centrifugou-se a 12000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi coletado e adicionou-se 1 µL de RNase (10 U/µL), incubando-se a 37°C. Após 20 min de incubação, centrifugou-se a 12000 rpm por 5 min e o sobrenadante foi coletado. O plasmídeo foi precipitado do sobrenadante adicionando-se 500 µL de etanol 100% gelado por 5 min e centrifugando-se a 12000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi descartado e a lavagem do plasmídeo foi feita com etanol 70% gelado e centrifugando-se a 12000 rpm durante 5 min. O sobrenadante foi novamente descartado e após secagem o sedimento foi ressuspensado em 20 µL de água estéril livre de DNase.

3.3 Geração de plantas transgênicas pelo método da imersão das inflorescências

Arabidopsis transgênicas foram geradas de acordo com o método de imersão das inflorescências (*floral-dip*) em solução contendo *Agrobacterium tumefaciens* (CLOUGH; BENT, 1998). Plantas com idade entre 30 e 45 d tiveram síliquas e flores retiradas para transformação apenas de botões florais fechados.

Agrobacterium contendo os vetores de escolha foram crescidas em pré-inóculo de 10 mL de meio LB a 28°C e 180 rpm. Após 24 h o pré-inóculo foi transferido para 500 mL de LB mantido a 28°C e 180 rpm. Após 48 h de agitação, ao meio LB contendo Agrobacterium foram adicionados 125 g de sacarose e 70 µL de Silwet L-77. Inflorescências

foram então mergulhadas brevemente nesta solução. Plantas tratadas com a solução de *Agrobacterium* foram colocadas em bandejas fechadas com plástico e deixadas no escuro por 24 h. Após o período de escuro os plásticos foram retirados e as plantas voltaram para casa de vegetação ou câmara de crescimento, conforme seu local de origem.

Sementes potencialmente transformadas foram esterilizadas superficialmente (50% etanol, 0,5% Triton X-100 por 3 min, seguidos de uma breve lavagem com 95% etanol), secas ao ar e plaqueadas em meio seletivo contendo sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) (0,5x), 6 g/L de fitagel (Gibco) e 100 mg/L de canamicina (Sigma).

3.4 Análise fenotípica de plantas transgênicas

Plantas transgênicas homozigotas foram avaliadas quanto ao comprimento de raiz, número de raízes laterais e comprimento e largura da folha de número 7 da roseta de *Arabidopsis*.

Sementes de plantas transgênicas foram esterilizadas, incubadas a 4°C no escuro por 2 d e plaqueadas em meio contendo sais MS (0,5x) e 9 g/L de fitagel. As placas foram dispostas verticalmente. Após 7 d, imagens das placas foram capturadas através de câmera digital (Nikon) e raízes foram medidas com o programa ImageJ (National Institutes of Health, USA). Raízes laterais foram contadas.

Plantas com 15 d tiveram a folha de número 7 da roseta retirada e imagem foi capturada através de câmera digital para medições de comprimento e largura no programa ImageJ.

3.5 Visualização de plantas transgênicas no microscópio confocal

Plantas transgênicas de primeira geração, resistentes a canamicina e contendo o vetor para a superexpressão do AtRALF1 fusionado a proteína verde fluorescente (GFP), tiveram suas folhas analisadas no microscópio confocal (Olympus FV1000) para verificação da expressão da proteína. Sementes da segunda geração de plantas transgênicas, já confirmadas para a expressão da fusão protéica, foram colocadas em meio líquido contendo sais MS (0,5x) e mantidas sob agitação de 130 rpm e luz constante por 36 h. Após este período foram levadas ao microscópio confocal para análise da localização subcelular do

peptídeo superexpresso. Para detecção da GFP, a excitação ocorreu com laser 488 nm e a emissão foi selecionada para ser detectada entre 510-550 nm.

3.6 Análise de expressão gênica

3.6.1 Extração de RNA total

O RNA total de folhas ou raízes foi extraído com Trizol® (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Tecido radicular ou folhas foi macerado em nitrogênio líquido e colocados em tubos de 1,5 mL. Foi adicionado 1 mL de Trizol® (Invitrogen) ao tubo, este foi agitado e incubou-se por 10 min a temperatura ambiente. Adicionou-se 200 µL de clorofórmio, agitou-se por inversão durante 15 s e incubou-se por 3 min a temperatura ambiente. Centrifugou-se a 12000 rpm por 15 min a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo onde foi adicionado 500 µL de isopropanol e incubou-se a temperatura ambiente por 10 min. A solução foi centrifugada a 12000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75% e centrifugado a 7500 rpm por 5 min a 4°C. O precipitado foi seco a temperatura ambiente por 10 min e ressuscitado em 40 µL de água ultra-pura. Adicionalmente, as amostras foram tratadas com DNase.

3.6.2 Quantificação do RNA

As amostras de RNA total ressuscitadas em água tiveram uma alíquota de 5 µL retirados do tubo e colocados em 995 µL de TE. O RNA diluído foi utilizado para leitura de absorbância no comprimento de onda 260 nm e 280 nm. Os valores de absorbância foram usados para calcular a concentração e avaliar a qualidade do RNA por meio da razão 260/280.

3.6.3 Síntese de cDNA

O cDNA foi produzido a partir de 1 µg de RNA com a enzima Improm II Reverse Transcriptase (Promega) seguindo recomendações do fabricante. Foram misturados 2 µL de oligodT 50 µM com 1 µg de RNA e estes foram incubados a 70°C por 5 min. Após este período a amostra foi colocado em gelo por 5 min. Em seguida, solução contendo tampão

Improm II IX, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 10 mM e 1 U de enzima Improm II Reverse Transcriptase foi adicionada e incubou-se por 5 min a 25°C, 60 min a 42°C e 15 min a 70°C.

3.6.4 RT-PCR

O RT-PCR foi feito a partir de 3 µL de cDNA sendo a reação de PCR conduzida até 20 e 30 ciclos de amplificação, podendo, quando necessário, ter outros ciclos acrescentados.

Como controle para todas as análises de expressão foi utilizado o par de iniciadores do gene *GAPDH* (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), com sequência podendo ser verificada no Apêndice B. As sequências de iniciadores utilizados para verificação de superexpressão e silenciamento dos transgênicos obtidos e expressão de genes marcadores de brassinosteróides também se encontram no Apêndice B.

3.7 Confirmação de mutantes nocaute

Linhagens nocautes para os genes *AtRALF1* e *AtRALF34* foram obtidas através do *Arabidopsis Biological Resource Center* - ABRC (<https://abrc.osu.edu/>). As sementes foram colocadas a 4°C por 48 h para quebra de dormência e depois plantadas em vasos.

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

3.8 Tratamentos com peptídeos RALF e hormônios

3.8.1 Tratamentos com peptídeos RALF e hormônio brassinolide

Sementes de *Arabidopsis selvagens* foram esterilizadas e colocadas em placas de 24 poços contendo 1 mL de meio líquido contendo sais MS (0,5x). Em cada poço foram colocadas 30 sementes. As placas foram colocadas em tratamentos de luz (fotoperíodo 16/8 h) ou escuro conforme o caso.

Os tratamentos em luz e no escuro foram feitos colocando-se diferentes concentrações de 24 epi-brassinolide (Phytotechnology Laboratories) e AtRALF1 e AtRALF23. Os peptídeos recombinantes foram obtidos através de expressão heteróloga em *E. coli* (CECILATO; MOURA¹, em fase de elaboração; MATOS et al., 2008). Após 5 d as plantas foram coletadas dos poços e dispostas em placas contendo meio semi-sólido (água e ágar). Fotos das placas foram capturadas imediatamente com câmera digital e medições de hipocótilos foram feitas com auxílio do programa ImageJ (National Institutes of Health, USA).

3.8.2 Tratamentos com hormônios

Plantas de *Arabidopsis* que superexpressam o *AtRALF1* foram expostas a diferentes concentrações de 24 epi-brassinolide (Phytotechnology Laboratories). O hormônio foi adicionado em meio contendo sais MS (0,5x) e 6 g/L de fitagel. Sementes de transgênicos e plantas selvagens foram esterilizadas e colocadas em placas dispostas verticalmente. Após 7 d, fotos das placas foram capturadas através de câmera digital (Nikon) e medições de raízes, hipocótilos e raízes laterais foram feitas com auxílio do programa ImageJ (National Institutes of Health, USA).

3.9 Ensaio de alcalinização com o peptídeo RALF e o hormônio brassinolide e análise de expressão em células em suspensão

Ensaio de alcalinização foram realizados com células em suspensão de *Arabidopsis* MM1 (MENGES; MURRAY, 2002). As suspensões celulares foram mantidas por 5 d em meio líquido sob luz contínua, a 120 rpm e a 24°C. No quinto dia, placas de 24 poços contendo alíquotas de 1 mL de suspensão celular foram mantidas sob agitação (130 rpm) por 1 h antes da adição do peptídeo AtRALF1 e do hormônio brassinolide. O monitoramento do pH foi feito após 5, 15, 30 e 60 min da aplicação do peptídeo e/ou hormônio. Os ensaios foram feitos alternando-se a ordem de aplicação entre o peptídeo e brassinolide. O tempo entre a aplicação de um e outro também variou, sendo eles aplicados juntos e com intervalos de 15 e 30 min.

¹ CECILIATO, P.H.O.; MOURA, D.S. (Universidade de São Paulo). Atividade biológica dos peptídeos hormonais AtRALF19, AtRALF23 e AtRALF31.

As células em suspensão foram coletadas após os tratamentos e centrifugadas por 9 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em Trizol® (Invitrogen). O RNA foi extraído e cDNA produzido conforme já descrito anteriormente. Análise de expressão através de RT-PCR foi feita para genes selecionados como possíveis marcadores de AtRALF1 e genes marcadores de brassinosteróides.

4 RESULTADOS

4.1 Geração de plantas transgênicas e análise de expressão dos transgenes

Com a finalidade de compreender melhor o papel fisiológico dos peptídeos RALF em plantas buscou-se o silenciamento dos genes *AtRALF1* (At1g02900) e *AtRALF34* (At5g67070). A escolha desses genes deu-se em função dos mesmos fazerem parte de um subgrupo de nove isoformas semelhantes àquela originalmente isolada de tabaco. O *AtRALF1* foi escolhido por possuir expressão gênica quase que exclusiva em raízes e por ser, dentro do subgrupo, um dos mais próximos ao RALF de tabaco. O *AtRALF34* foi escolhido por apresentar características contrastantes ao *AtRALF1*, é a isoforma mais distinta em termos de estrutura primária e apresenta expressão gênica ubíqua nos tecidos de *Arabidopsis*.

4.1.1 Plantas transformadas com a sequência do *AtRALF1* repetida e invertida (35S:irAtRALF1)

A princípio buscou-se linhagens nocautes por inserção de T-DNA para o gene *AtRALF1* no TAIR (LAMESCH et al., 2011) e foi encontrado o mutante SALK_089792. A inserção do T-DNA na linhagem SALK_089792 está localizada após a região 3'UTR (*Untranslated Region*) e, provavelmente por esse motivo, apesar da inserção ter sido confirmada, o gene se expressa normalmente (Apêndice C). Como não se encontrou linhagens nocaute por inserção para o gene *AtRALF1*, buscou-se o silenciamento por RNA de interferência através da expressão da sequência do cDNA repetida e invertida (35S:irAtRALF1). Foram obtidas 30 plantas 35S:irAtRALF1 de primeira geração (T1) que expressam o gene de resistência ao antibiótico canamicina, marcador da transgenia, e estas foram analisadas quanto a expressão do gene alvo do silenciamento utilizando RT-PCR (Figura 4A). A análise mostrou diferentes níveis de expressão do gene *AtRALF1* porém a maior parte sem uma redução significativa da expressão do gene. Foram escolhidas quatro plantas para serem levadas a homozigose. Das quatro plantas selecionadas, a 35S:irAtRALF1-1 mostrou redução satisfatória do nível de expressão do gene *AtRALF1* em raízes de plantas homozigotas (Figura 4B). Plantas derivadas da 35S:irAtRALF1-3 não foram reavaliadas pois ainda não se encontram em homozigose. Algumas das plantas com nível de

expressão gênica de *AtRALF1* baixo não sobreviveram, foram escolhidas então, além da 35S:*AtRALF1*-1 já em homozigose e da 35S:*AtRALF1*-3, as plantas 35S:ir*AtRALF1*-2 e 35S:ir*AtRALF1*-23 para posterior avaliação dos níveis de expressão em plantas homozigotas.

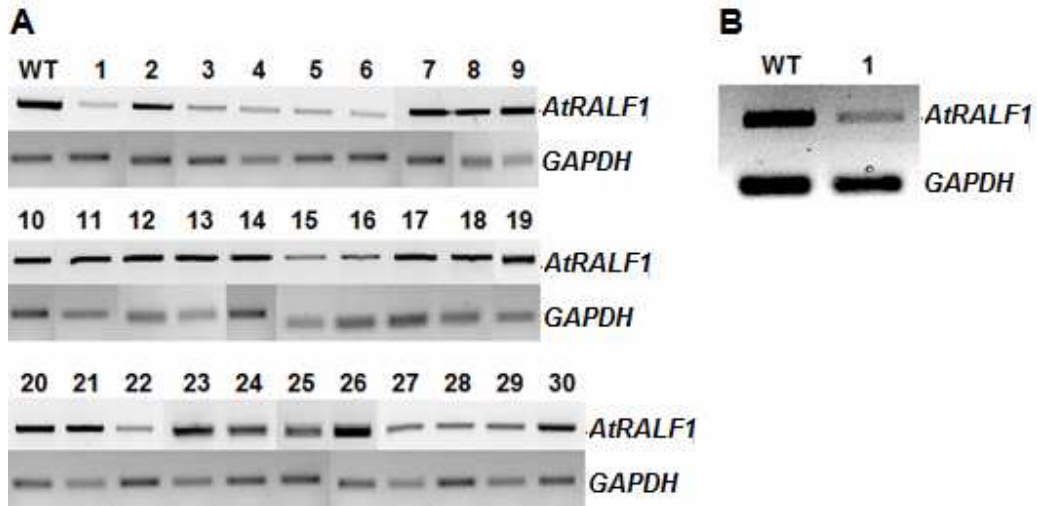


Figura 4 - Análise de expressão gênica do *AtRALF1* em raízes de plantas transformadas com a sequência do cDNA do *AtRALF1* repetida e invertida (35S:ir*AtRALF1*). (A) Análise de expressão do *AtRALF1* em 30 plantas T1, primeira geração de transgênicos. (B) Análise de expressão do gene *AtRALF1* em planta homozigota 35S:ir*AtRALF1*-1 em comparação com plantas selvagens (WT). Para o RT-PCR utilizou-se 25 e 30 ciclos, são mostrados somente os resultados de reações com 30 ciclos. O gene *GAPDH* foi utilizado como referência

4.1.2 Plantas transformadas com o transgene quimérico *AtRALF1*-GFP (35S:*AtRALF1*-GFP)

Para estudar a localização subcelular do peptídeo *AtRALF1* foram obtidas plantas superexpressando o gene *AtRALF1* fusionado a proteína verde fluorescente GFP (35S:*AtRALF1*-GFP). Plantas resistentes a canamicina, antibiótico marcador da transgenia, foram colocadas em vasos e folhas foram coletadas para análise da presença da proteína quimérica *AtRALF1*-GFP sob microscópio confocal. Foram obtidas 20 plantas 35S:*AtRALF1*-GFP que apresentaram fluorescência detectável no microscópio confocal. Essas plantas foram posteriormente avaliadas quanto a expressão do gene *AtRALF1* fusionado a GFP através de RT-PCR (Figura 5).

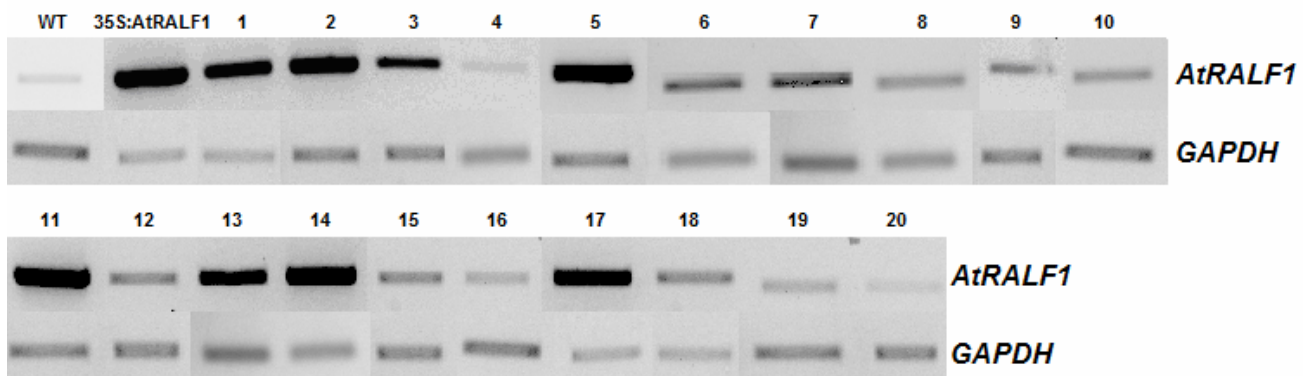


Figura 5 - Análise da expressão gênica do *AtRALF1* em raízes de plantas 35S:AtRALF1-GFP. O nível de expressão do gene *AtRALF1* em raízes de plantas 35S:AtRALF1-GFP (linhagens de 1 a 20) foi comparado com plantas 35S:AtRALF1 e plantas selvagens (WT). Para o RT-PCR utilizou-se 25 e 30 ciclos, são mostrados somente os resultados de reações com 30 ciclos. O gene *GAPDH* foi utilizado como referência

Com base nos níveis de expressão do transgene foram selecionadas as linhagens 35S:AtRALF1-GFP1, 3 e 7. Embora outras linhagens (35S:AtRALF1-GFP2, 5, 11 e 14) apresentassem um nível de expressão superior as selecionadas, as plantas se mostraram inviáveis, não produzindo sementes.

4.1.3 Plantas transformadas com a sequência do *AtRALF34* repetida e invertida (35S:irAtRALF34)

Obteve-se 32 plantas que expressam o RNA fita dupla para o silenciamento do gene *AtRALF34* (35S:irAtRALF34), porém 12 linhagens não sobreviveram a transferência para a casa de vegetação. O nível de expressão do gene *AtRALF34* foi analisado por RT-PCR na primeira geração em 20 plantas (Figura 6). As plantas 35S:irAtRALF34-2, 35S:irAtRALF34-8, 35S:irAtRALF34-15 e 35S:AtRALF34-16 foram selecionadas por apresentarem os níveis mais baixos de expressão do gene *AtRALF34* e serão levadas a homozigose.

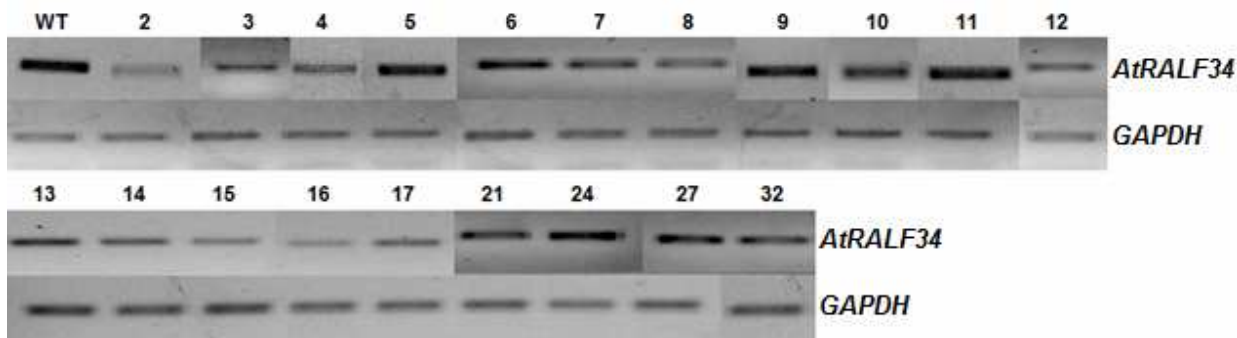


Figura 6 - Análise de expressão gênica do *AtRALF34* em folhas de plantas transformadas com a sequência do cDNA do *AtRALF34* repetida e invertida (35S:ir*AtRALF34*). Números na parte superior do gel identificam as 20 plantas analisadas. Para o RT-PCR utilizou-se 25 e 30 ciclos, são mostrados somente os resultados de reações com 30 ciclos. O gene *GAPDH* foi utilizado como referência

4.1.4 Plantas transformadas com a sequência do *AtRALF34* sob controle do promotor viral 35S (35S:*AtRALF34*)

Trinta plantas transgênicas com o gene *AtRALF34* sob o controle do promotor 35S foram obtidas (35S:*AtRALF34*). O nível de expressão gênica para o gene alvo foi analisado em 10 plantas por RT-PCR na primeira geração (Figura 7). As plantas obtidas na primeira geração foram perdidas nas gerações seguintes por uma série de problemas de cultivo na casa de vegetação. Novas plantas estão sendo obtidas para dar continuidade ao trabalho.

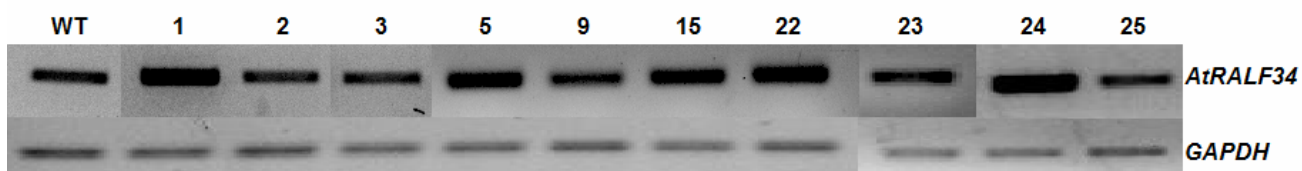


Figura 7 - Análise de expressão gênica do *AtRALF34* em folhas de plantas 35S:*AtRALF34*. Plantas 35S:*AtRALF34* (linhagens representadas por números no alto do gel) tiveram seu nível de expressão do gene *AtRALF34* comparados as plantas selvagens (WT)

4.1.5 Plantas controle transformadas com o vetor vazio (VV)

Com a finalidade de obter plantas controle para os experimentos, 25 plantas transgênicas transformadas com vetor vazio pk7WG2 foram obtidas. Após 10 d no vaso, RNA foi extraído de todas as plantas e a expressão dos genes *AtRALF1*, *AtRALF34* e *GAPDH* foi analisada através de RT-PCR (Figura 8). Dessas plantas foram selecionadas duas linhagens homocigotas, chamadas respectivamente de VV1 (planta 3 na Figura 8) e

VV2 (planta 4 na Figura 8), que apresentam expressão dos três genes analisados igual às plantas selvagens, fenótipo normal e produção de sementes viáveis.

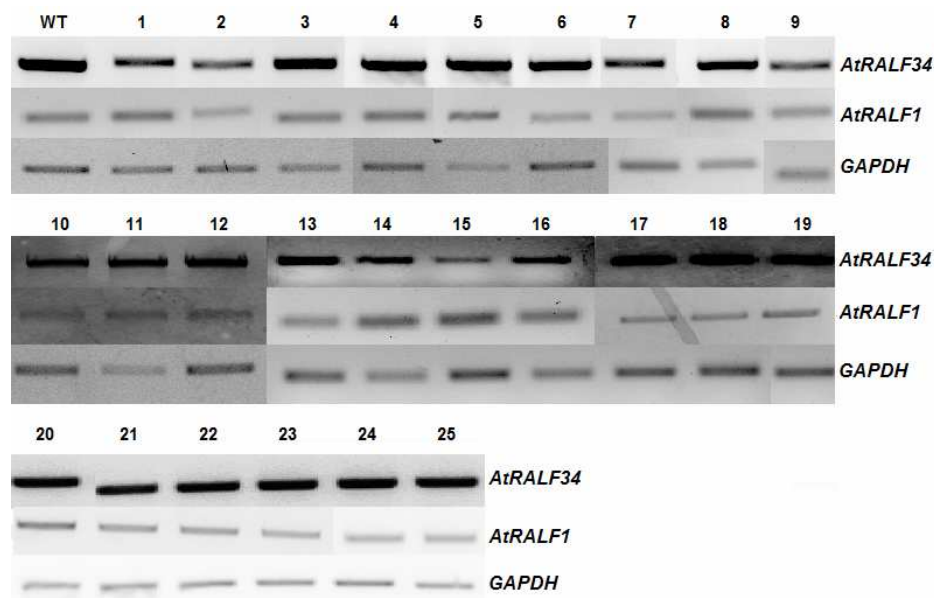


Figura 8 - Análise de expressão dos genes *AtRALF1* e *AtRALF34* em plantas transformadas com o vetor vazio pk7WG2. Os números acima do gel representam as plantas analisadas

As duas linhagens homozigotas de plantas transgênicas transformadas com vetor vazio tiveram suas raízes analisadas em comparação a plantas selvagens, sendo observado comprimento de raiz (Figura 9A), comprimento do hipocótilo (Figura 9B) e comprimento e largura da folha número 7 da roseta (Figura 9C-D). Após as análises fenotípicas, concluiu-se que as duas linhagens poderiam ser utilizadas como controle nos experimentos.

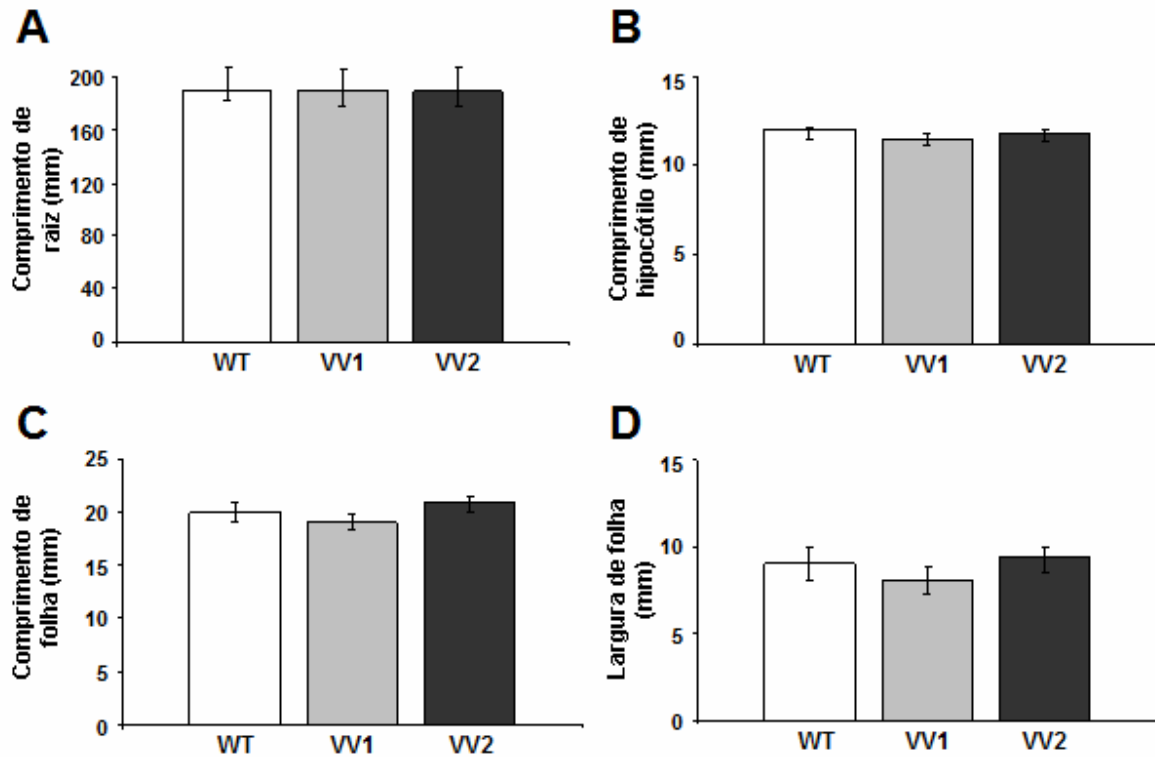


Figura 9 - Comprimento de raiz, hipocótilo e folhas e largura de folhas de plantas transformadas com vetor vazio. (A) Comprimento de raiz de duas linhagens de plantas transformadas com vetor vazio (VV1 e VV2) em comparação a plantas selvagens (WT). (B) Comprimento de hipocótilo de plantas transformadas com vetor vazio. (C) Comprimento da sétima folha da roseta de plantas transformadas com vetor vazio. (D) Largura da sétima folha da roseta de plantas transformadas com vetor vazio

4.2 Análise das plantas transgênicas para o *AtRALF1*

4.2.1 Plantas 35S:irAtRALF1

O gene que codifica o peptídeo *AtRALF1* é expresso em raízes e hipocótilos, e plantas transgênicas 35S:*AtRALF1* possuem raízes menores que plantas selvagens (HARUTA et al., 2008; MATOS et al., 2008). Buscou-se com a obtenção de linhagens homocigotas para o transgene que expressa a sequência repetida e invertida do *AtRALF1* (35S:irAtRALF1) o silenciamento ou redução da expressão do gene. A linhagem 35S:irAtRALF1-1 mostrou um comprimento de raízes próximo ao dobro do exibido por plantas não transformadas e mais do que o dobro se comparado com plantas 35S:*AtRALF1* (Figura 10A). Ao contrário das raízes, a avaliação do comprimento dos hipocótilos mostrou que as diferenças não são significativas (Figura 10B).

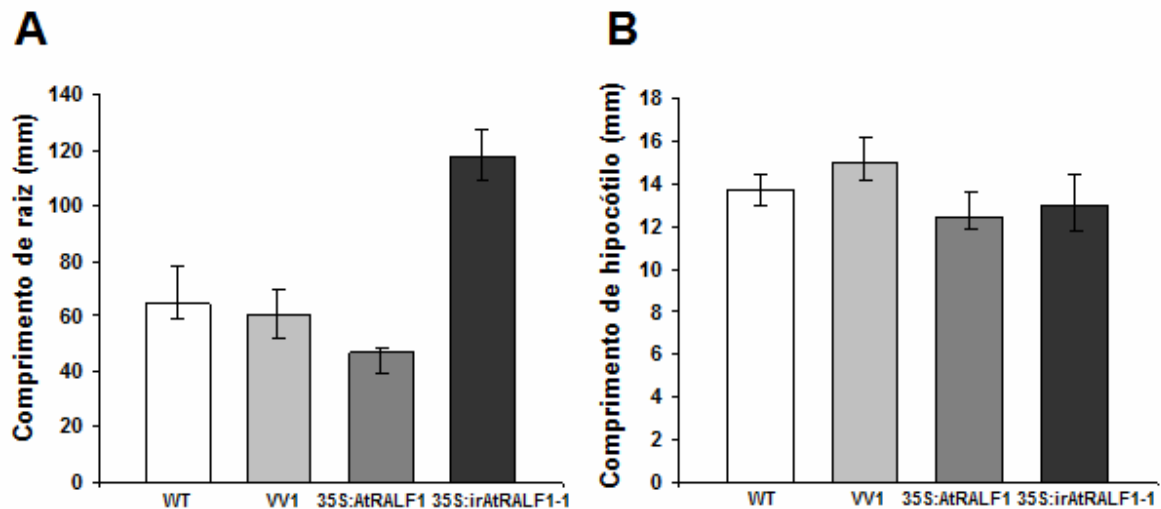


Figura 10 - Comprimento de raiz e hipocótilo de plantas 35S:AtRALF1 e 35S:irAtRALF1. (A) Comprimento de raízes de plantas 35S:AtRALF1 e plantas com o gene *AtRALF1* silenciado (35S:irAtRALF1-1). (B) Comprimento de hipocótilos de plantas 35S:AtRALF1 e 35S:irAtRALF1-1. Foram analisadas 50 plantas de cada amostra por experimento e os experimentos foram repetidos três vezes. As plantas foram medidas no sétimo dia após germinação. Plantas selvagens (WT) e transformadas com vetor vazio (VV1) foram colocadas para comparação

4.2.2 Plantas 35S:AtRALF1-GFP, localização subcelular do AtRALF1 e funcionalidade da proteína quimérica AtRALF1-GFP

Resultados de expressão transiente do gene que codifica o peptídeo RALF de tabaco e de brócolis mostraram que este se localiza no retículo endoplasmático e, posteriormente, na parede celular e membrana plasmática (ESCOBAR et al., 2003; ZHANG; WU; WANG, 2010). Para identificarmos a localização subcelular do peptídeo AtRALF1 analisamos plantas 35S:AtRALF1-GFP.

Dentre as plantas geradas, plantas com alta expressão de *AtRALF1* e com raízes menores do que as selvagens, semelhantes as plantas 35S:AtRALF1, foram levadas ao microscópio confocal para análise de localização subcelular do peptídeo. Plântulas 35S:AtRALF1-GFP apresentam fluorescência em todos os tecidos, como seria esperado devido ao promotor 35S (Figura 11A). A proteína quimérica AtRALF1-GFP foi encontrada no retículo endoplasmático (Figura 11B), sendo também visível em estruturas que já foram identificadas como o complexo de Golgi (Figura 11C) (NELSON; CAI; NEBENFÜHR, 2007). Fluorescência da AtRALF1-GFP também foi observada no apoplasto, claramente mostrada em células plasmolisadas (Figura 11D).

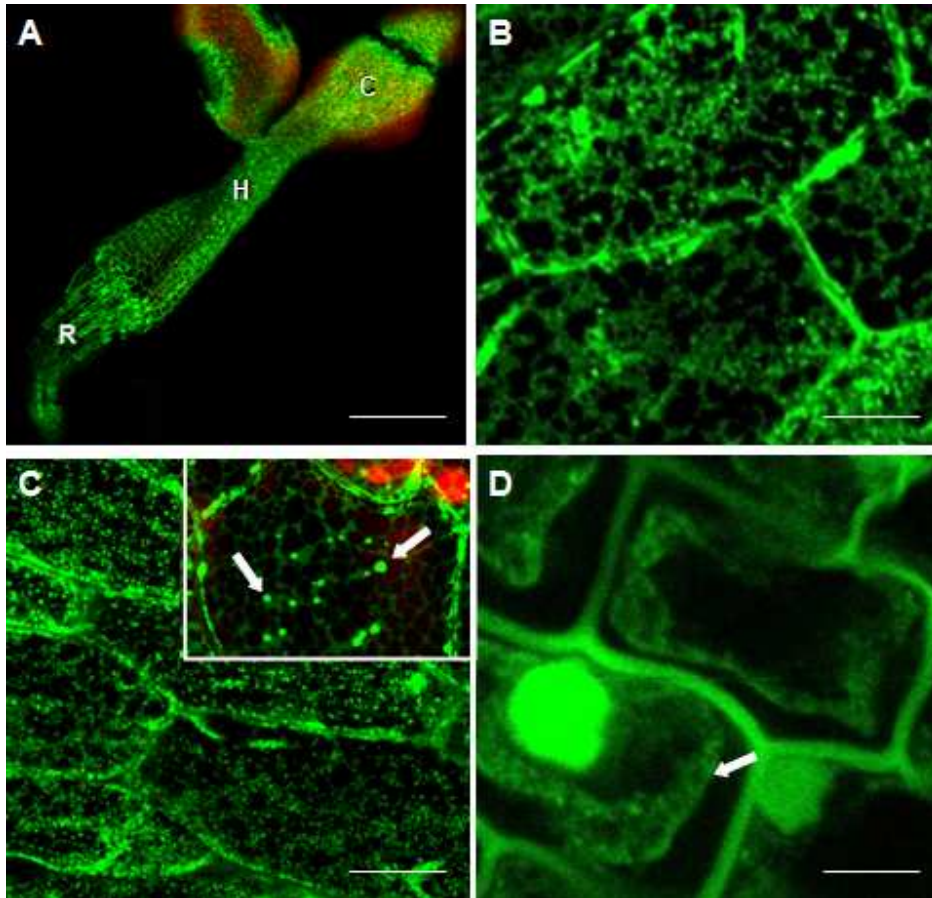


Figura 11 - Localização subcelular do peptídeo AtRALF1 fusionado a GFP. (A) Plântula 35S:AtRALF1-GFP após 36 h de germinação mostrando cotilédones (C), hipocótilo (H) e radícula (R). (B) AtRALF1 no retículo endoplasmático. (C) Presença de AtRALF1 no complexo de Golgi. No detalhe mostram-se em uma célula com maior aumento as estruturas identificadas como complexo de Golgi (setas). (D) Célula plasmolisada mostrando o recuo da membrana plasmática (seta) e a fluorescência tanto no citoplasma quanto na parede celular. Barra em (A) = 100 μ m e em (B), (C) e (D) = 10 μ m

Linhagens superexpressoras de *AtRALF1*, 35S:AtRALF1, apresentam o comprimento das raízes reduzido em comparação ao selvagem (MATOS et al., 2008). Bergonci e Moura² (em fase de elaboração) também observaram que plantas 35S:AtRALF1 apresentam um reduzido número de raízes laterais. Para avaliar se o peptídeo AtRALF1 fusionado a GFP não perdeu a atividade devido a fusão, foram selecionadas as linhagens 35S:AtRALF1-GFP1, 3 e 7. Essas linhagens apresentam diferentes níveis de expressão do gene quimérico *AtRALF1-GFP* e foram avaliadas quanto ao efeito do AtRALF1-GFP no

² BERGONCI, T.; MOURA, D.S. (Universidade de São Paulo). Efeito do hormônio brassinolide em plantas superexpressoras de *AtRALF1*.

comprimento das raízes e número de raízes secundárias (Figuras 12A-B). Observou-se que na linhagem com maior expressão do gene quimérico, linhagem 35S:AtRALF1-GFP-1, as raízes tinham menor tamanho e menor número de raízes laterais, igualmente ao que ocorre em plantas 35S:AtRALF1, mostrando que a fusão com a proteína GFP não alterou funcionalmente a função do peptídeo. As demais, 35S:AtRALF1-GFP-3 e 7 posicionaram-se entre as plantas selvagens e a 35S:AtRALF1.

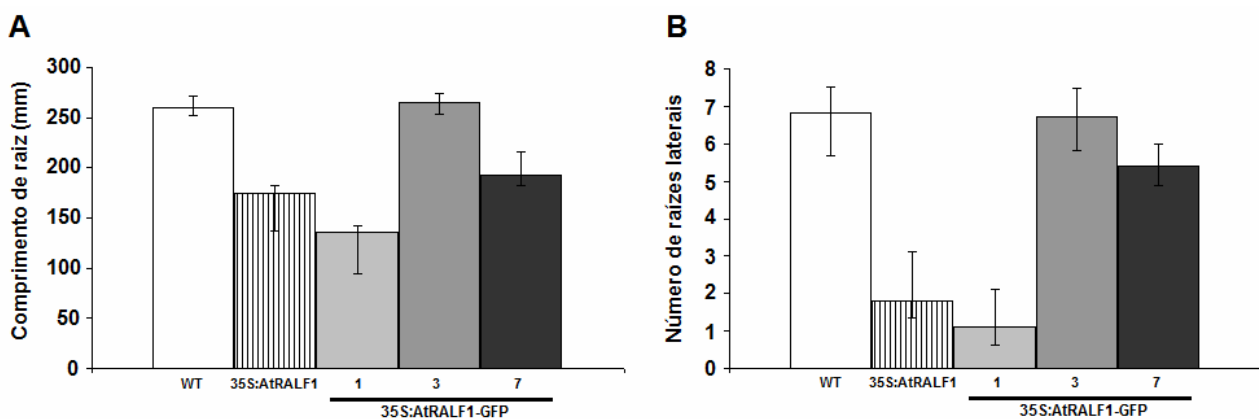


Figura 12 - Comprimento de raiz e número de raízes laterais de plantas 35S:AtRALF1-GFP. (A) Comprimento de raiz de três linhagens de plantas 35S:AtRALF1-GFP (1, 3 e 7). (B) Número de raízes laterais das linhagens 35S:AtRALF1-GFP-1, 3 e 7. Foram feitas três repetições com 30 plantas por amostragem e medidas foram tomadas no sétimo dia após germinação. Plantas selvagens (WT) e 35S:AtRALF1 foram incluídas para comparação

4.3 Análise das plantas transgênicas para o *AtRALF34*

Três linhagens nocautes por inserção de T-DNA do gene At5g67070 foram encontradas no TAIR (LAMESCH et al., 2011). O mutante SALK_055591 ainda não foi verificado. A mutante SALK_003116 possui o T-DNA inserido na região 3'UTR, é homocigota, mas expressa normalmente o gene (Apêndice D). Mutantes SALK_102494 foram confirmados para a inserção do T-DNA, não possuem expressão do gene *AtRALF34* e iniciadores foram desenhados para amplificar a região que flanqueia o local de inserção do T-DNA para comprovar a homocigose (Apêndice D). A avaliação dessas plantas está em andamento.

Como alternativa às linhagens nocaute por inserção de T-DNA, plantas transgênicas expressando a sequência repetida e invertida do gene *AtRALF34* (35S:irAtRALF34) foram obtidas. A análise do comprimento das raízes revelou um pequeno aumento na linhagem 35S:irAtRALF34-2 e 15 (Figura 13).

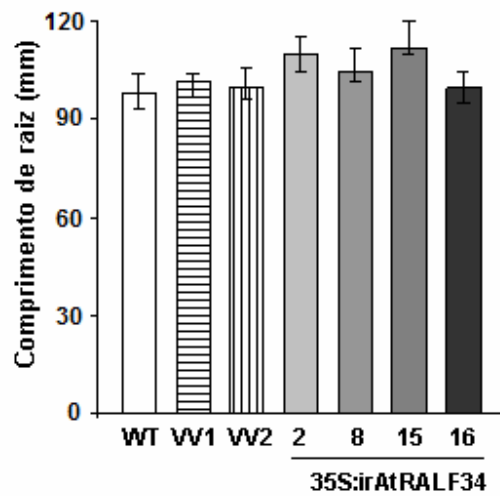


Figura 13 - Comprimento de raiz de plantas 35S:irAtRALF34. Medições de raízes foram feitas no décimo dia após germinação em quatro linhagens de plantas, 35S:irAtRALF34-2, 8, 15 e 16. Plantas selvagens (WT) e plantas transformadas com vetor vazio (VV1 e VV2) foram incluídas para comparação

Como o gene *AtRALF34* é expresso em toda a planta, comprimento e largura da folha número 7 foram também avaliados (Figura 14). As medidas do comprimento das folhas revelou um pequeno aumento em plantas da linhagem 35S:irAtRALF34-15 (Figura 14A). As linhagens 35S:irAtRALF34-2, 35S:irAtRALF34-8 e 35S:irAtRALF34-15 também apresentaram um aumento na largura da sétima folha da roseta em relação a plantas selvagens e linhagens transformadas com vetor vazio (Figura 14B).

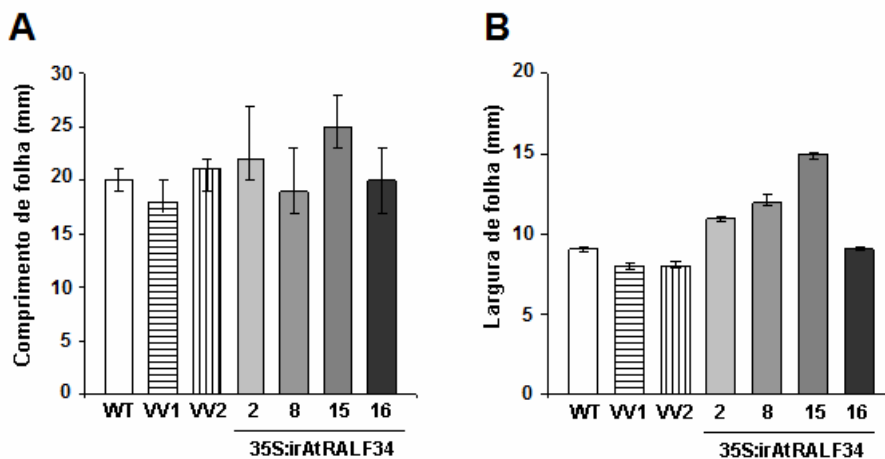


Figura 14 - Comprimento e largura da folha número 7 de plantas 35S:irAtRALF34. (A) Comprimento da sétima folha da roseta das linhagens 35S:irAtRALF34-2, 8, 15 e 16. (B) Largura da sétima folha da roseta das plantas 35S:irAtRALF34-2, 8, 15 e 16. Medidas foram feitas no décimo dia após germinação. Plantas selvagens (WT) e plantas transformadas com vetor vazio (VV1 e VV2) foram incluídas para comparação

4.4 Genes induzidos e reprimidos em plantas 35S:AtRALF1

Com o intuito de encontrar genes regulados por AtRALF1 e portanto estabelecer marcadores moleculares para o efeito do peptídeo, foram selecionados genes que tiveram sua expressão alterada em plantas 35S:AtRALF1. De acordo com resultados obtidos em análises de expressão gênica através de micro-arranjos Affymetrix e disponíveis no *Gene Expression Omnibus*, Series GSE641 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), foram escolhidos 14 genes. Dentre os escolhidos, 11 foram induzidos e 3 reprimidos em plantas 35S:AtRALF1 (Tabela 1).

Tabela 1 - Genes selecionados como potenciais marcadores para o efeito do peptídeo AtRALF1

Locus	Iniciadores	Expressão gênica	Grupo funcional
At1g26250	F: ACCGCCAGCTCCATATGTTTCG R: GTGGTGATGGCGAACTATAGACA	+2.3	Extensina
At1g54970	F: AAGATTGTGTGCTCGGAGAGG R: CCCTTGTTGACATTGGTTGG	+2.1	Proteína Rica em Prolina
At1g76930	F: TCACCTCCACACCAACCCTA R: TCCCGTCAACGATCTTGTGT	+2.5	Extensina
At3g62680	F: GTTCCGACCCAGCATCATA R: GCAAGTCTCGACCGGAGATA	+2.4	Proteína Rica em Prolina
At5g14920	F: TCAAACCTCCAACACCACCT R: TTGGCGTAACAAGATCCAC A	+2.2	Extensina
At5g19800	F: CACAGTTGCTAATGGAAACGACT R: CGGCGGTGAATATCTCTTGTA	+2.9	Extensina
At2g44790	F: GAGAACCATTCCGATGGAGA R: TAGGAGTTCCCGGAGTTGAA	+2.3	Uclacianina
At3g49960	F: AATGTGGACCCAAGAATTGC R: AGTTTGAGGCCCAAGCATT	+9.5	Peroxidase
At5g67400	F: GCCGTTGACCCAACCTCTAAA R: AGTCCTTTGCCTTGTTGCAG	+4.3	Peroxidase
At1g21120	F: TGATTGGACCGACGAAGACT R: TGTCCATGTCAAAGGCAATG	+3.2	Metiltransferase
At5g25350	F: ATCCAACGTTGTGGCAGAAT R: GCGACCAAACCTAGGAAAA	+2.9	F-box
At2g37640	F: CAGGGTACCTTGTCGGAAGA R: CGACTCATCCTCACCCAATC	-1.4	Expansina
At4g28250	F: TCTCTGCTGGTCGAGTTTGA R: GATGGAGAATGGTCCCTTGA	-2.6	Expansina
At3g29030	F: GGACGTACACTCGGTCTCAA R: AGACGACACTTCGACGATCA	-1.8	Expansina

Os genes escolhidos, em sua maioria, estão envolvidos com rearranjo de parede celular. Embora o micro-arranjo da Affymetrix possibilite a avaliação da expressão gênica de mais de 23000 genes de *Arabidopsis*, devido a expressão do *AtRALF1* ser restrita a raízes, para esse estudo foram selecionados somente genes com expressão nesse órgão.

A validação da alteração da expressão gênica, para mais ou para menos, dos potenciais marcadores do efeito do *AtRALF1* foi feita através da análise da expressão gênica em raízes de plantas 35S:*AtRALF1*. Os genes que codificam a uclacianina UCC2 (At2g44790), as duas peroxidases, PEROX1 (At3g49960) e PEROX2 (At5g67400), e as duas proteínas ricas em prolina PRP1 (At1g54970) e PRP3 (At3g62680) confirmaram um aumento de expressão gênica em raízes de plantas 35S:*AtRALF1* (Figura 15). Alguns genes não foram validados, ou seja, não mostraram diferença de expressão entre plantas 35S:*AtRALF1* e plantas selvagens. Os genes que não foram validados codificam uma proteína F-box (At5g25350) relacionada a resposta a etileno e as extensinas EXT1 (At5g14920), EXT2 (At1g26250) e EXT4 (At1g76930) (Figura 15). Os genes que codificam as expansinas EXP3 (At2g37640), EXPB3 (At4g28250) e EXP5 (At3g29030), o gene que codifica a extensina EXT3 (At5g19800), e o gene que codifica a metiltransferase IGMT2 (At1g21120), não foram detectados, nem mesmo em plantas selvagens. Esses genes não detectados apresentam uma expressão gênica muito baixa de acordo com dados *in silico* (<http://www.bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) e, talvez por esse motivo, não puderam ser detectados por RT-PCR.

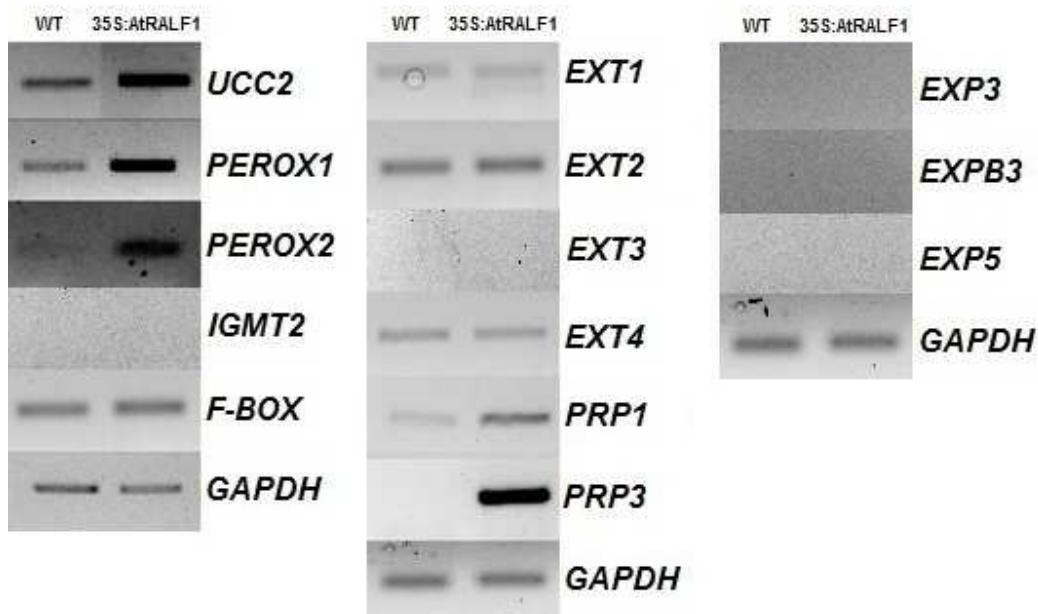


Figura 15 - Validação de genes com expressão alterada em plantas 35S:AtRALF1. A expressão gênica foi feita através de RT-PCR em raízes de plantas 35S:AtRALF1 com 28 e 32 ciclos (dados mostrados são de 28 ciclos). *UCC2*, uclacianina; *PEROX1*, peroxidase 1; *PEROX2*, peroxidase 2; *IGMT2*, indol glicosinolato 0-metiltransferase 2; *EXT1*, extensina 1; *EXT2*, extensina 2; *EXT3*, extensina 3; *EXT4*, extensina 4; *PRP1*, proteína rica em prolina 1; *PRP3*, proteína rica em prolina 3; *EXP3*, expansina 3; *EXPB3*, expansina beta 3; *EXP5*, expansina 5; *GAPDH*, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

4.5 O peptídeo hormonal RALF e o hormônio brassinolide

Plantas tratadas com baixas concentrações de brassinolide (BL) apresentam um alongamento das raízes, enquanto que plantas expostas a altas concentrações mostram raízes menores do que plantas não tratadas (MÜSSIG; SHIN; ALTMANN, 2003; RODDICK; RIJNENBERG; IKEKAWA, 1993; SASSE, 1994). BL também induz o alongamento de hipocótilos de plantas crescidas na luz e um aumento do número das raízes laterais (BAO et al., 2004; FUKAKI; TASAKA, 2009; PÈRET; LARRIEU; BENNETT, 2009). Buscando investigar a relação entre o peptídeo hormonal AtRALF1 e o hormônio brassinolide (BL), plantas 35S:AtRALF1 e 35S:irAtRALF1 foram tratadas por 7 d com BL e o comprimento da raiz e o número de raízes laterais foram avaliados (Figura 16A-C). Plantas 35S:AtRALF1 não apresentam o crescimento de raiz observado em plantas selvagens tratadas com BL em baixas concentrações (Figura 16A). Quando plantas 35S:AtRALF1 foram tratadas com alta concentração de BL, observou-se uma maior inibição do crescimento em relação a inibição em plantas selvagens (Figura 16B). Na concentração de 1 nM de BL, plantas selvagens apresentaram uma inibição de 40% no crescimento da raiz, enquanto plantas 35S:AtRALF1

tiveram o crescimento inibido em 66% em relação a plantas não tratadas com o hormônio. Plantas 35S:AtRALF1 não mostraram aumento no número de raízes laterais quando na presença do hormônio (Figura 16C).

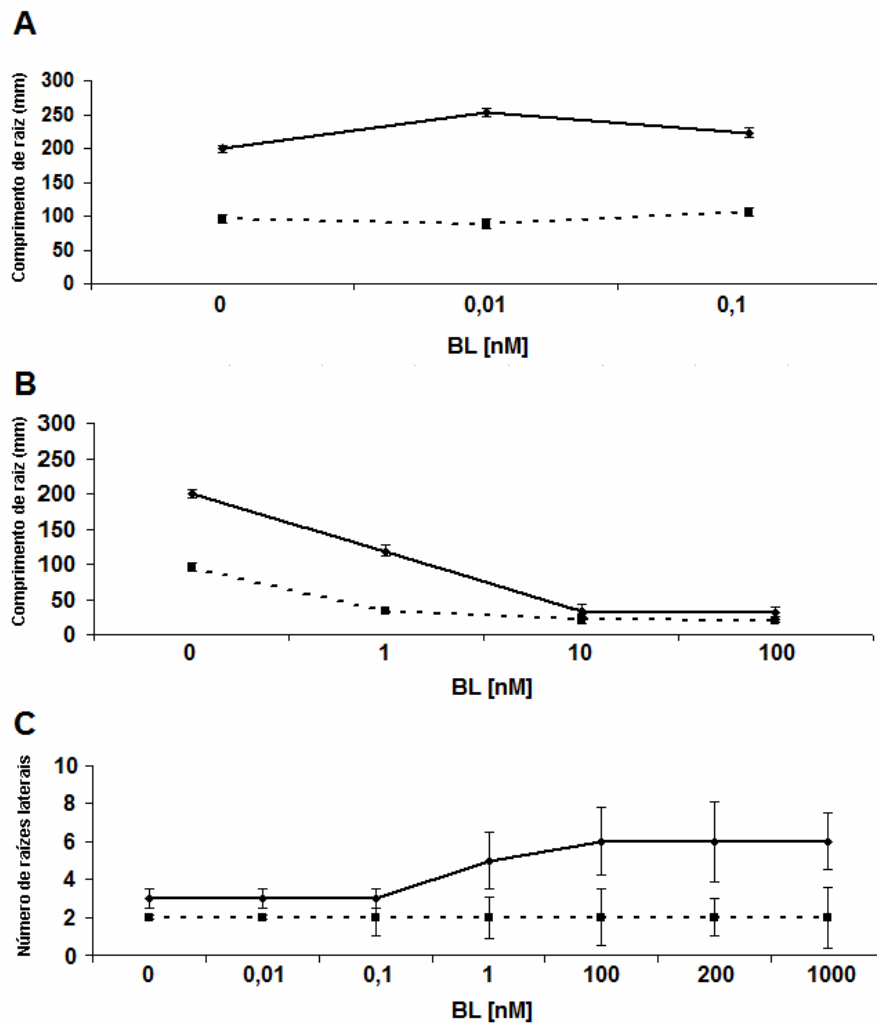


Figura 16 - Comprimento de raiz de plantas 35S:AtRALF1 em resposta a tratamento do hormônio brassinolide (BL). (A) Plantas 35S:AtRALF1 (linha pontilhada) e plantas selvagens (linha contínua) expostas a 0, 0,01 e 0,1 x 10⁻⁹M de BL. (B) Plantas 35S:AtRALF1 (linha pontilhada) e plantas selvagens (linha contínua) expostas a 0, 1, 10 e 100 x 10⁻⁹M de BL. (C) Número de raízes laterais em plantas 35S:AtRALF1 (linha pontilhada) e plantas selvagens (linha contínua) expostas a 0, 0,01, 0,1, 1, 100, 200 e 1000 x 10⁻⁹M de BL

O tamanho do hipocótilo foi medido após 7 d de tratamento com BL (Figura 17). Nesse experimento foi observado que plantas 35S:AtRALF1 não têm o mesmo aumento do

tamanho do hipocótilo quando comparadas a plantas selvagens. Hipocótilos de plantas selvagens tratadas com 10 nM de BL, quando comparados a hipocótilos de plantas selvagens não tratadas, alongou 16,2%. Já os hipocótilos das plantas 35S:AtRALF1, também tratadas com 10 nM, não apresentaram diferença com relação a plantas não tratadas. A diferença na presença de 100 nM do hormônio chegou a 355% de alongamento nas plantas selvagens e 205% nas plantas 35S:AtRALF1.

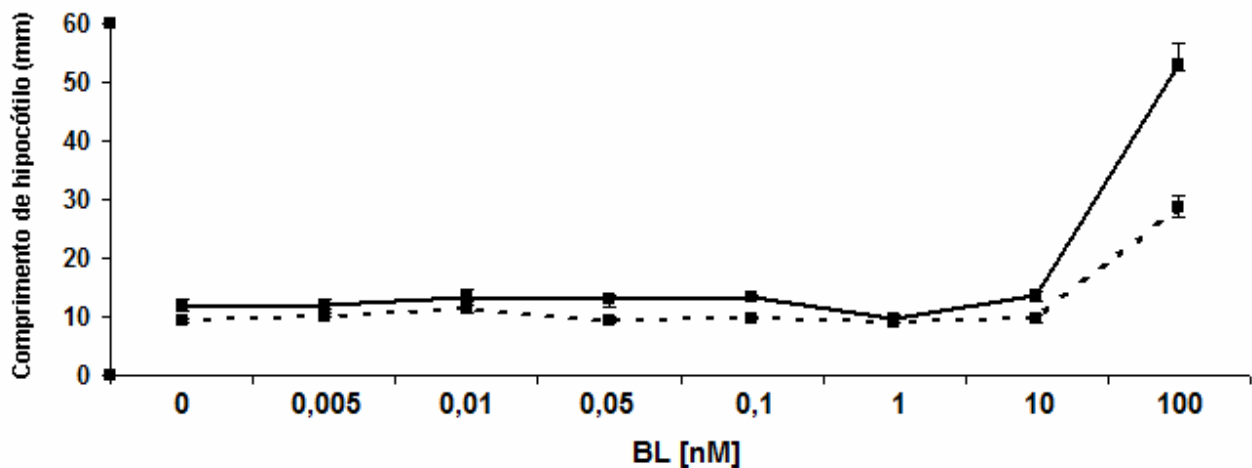


Figura 17 - Comprimento de hipocótilo de plantas que superexpressam AtRALF1 (35S:AtRALF1). Plantas 35S:AtRALF1 (linha pontilhada) e plantas selvagens (linha contínua) quando expostas a diferentes concentrações de brassinolide (BL). Hipocótilos foram medidos no sétimo dia de tratamento após a adição do BL.

Srivastava et al. (2009), observaram que plantas superexpressando *AtRALF23* não possuíam o alongamento de hipocótilo característico do tratamento com BL. Para uma maior compreensão dos efeitos dos peptídeos RALF e sua relação com BL no alongamento do hipocótilo, plantas selvagens foram crescidas em meio contendo somente BL ou BL em associação com os peptídeos AtRALF23 ou AtRALF1 (Figura 18A-D).

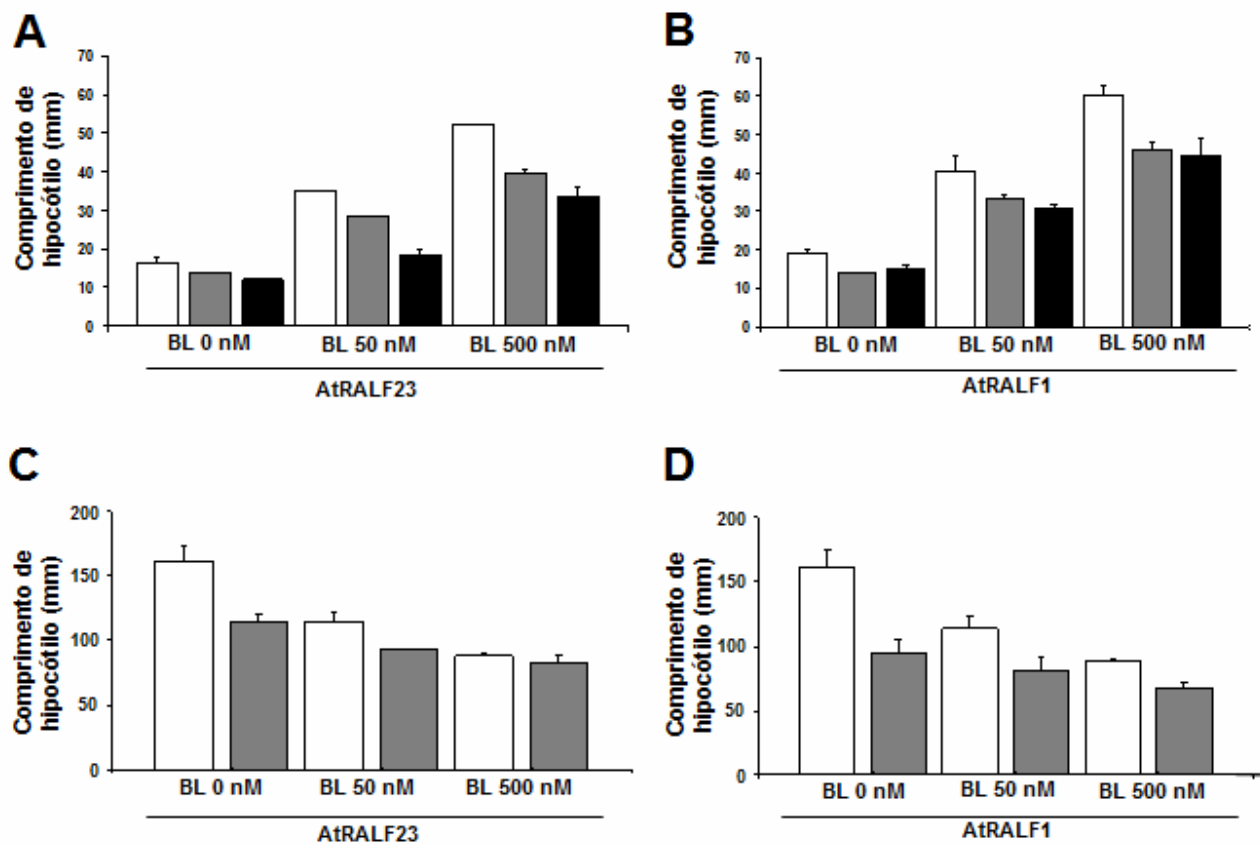


Figura 18 - Efeito do brassinolide (BL), sozinho ou em associação com os peptídeos AtRALF23 ou AtRALF1, no alongamento do hipocótilo de plantas de *Arabidopsis*. Plantas foram tratadas com somente BL (barras brancas) nas concentrações de 0, 50 ou 500 nM, ou em associação com 1 μ M (barras cinzas) ou 10 μ M (barras pretas) dos peptídeos AtRALF1 ou 23. Plantas foram ainda crescidas na presença de luz (A e B) ou no escuro (C e D). Os hipocótilos foram medidos no quinto dia após o início dos tratamentos. Os ensaios foram repetidos três vezes utilizando-se 30 sementes por tratamento

Quando tratadas apenas com brassinolide e na presença de luz, plantas de *Arabidopsis* mostram o característico alongamento do hipocótilo (CLOUSE; LANGFORD; MCMORRIS, 1996). Porém, na presença do peptídeo AtRALF23 ou AtRALF1 o alongamento foi menor, mostrando que o peptídeo antagoniza os efeitos do hormônio BL quanto a seu efeito positivo no alongamento celular (Figura 18A-B).

Sabe-se que plantas tratadas com brassinosteróides no escuro têm hipocótilos menores que plantas não tratadas com o hormônio (TURK et al., 2003). O ensaio no escuro, onde foram adicionados BL e os peptídeos AtRALF23 ou AtRALF1 mostraram que estes, quando adicionados após 24 h de tratamento com BL, inibem mais fortemente o crescimento

do hipocótilo do que quando os dois hormônios são colocados sozinhos (Figura 18C-D). Esses resultados na ausência de luz sugerem um efeito sinérgico do BL com os AtRALFs 1 e 23 quando o efeito de ambos é inibitório do alongamento celular.

A relação antagônica, ou seja, na presença de luz, entre o peptídeo AtRALF1 e o BL foi também investigada no nível molecular utilizando-se dos genes marcadores para o efeito do RALF. Plantas selvagens foram tratadas com o peptídeo AtRALF1 na presença e na ausência de BL, e a expressão de três genes induzidos por AtRALF1 foi analisada após 30 min e 3 h do início dos tratamentos (Figura 19).

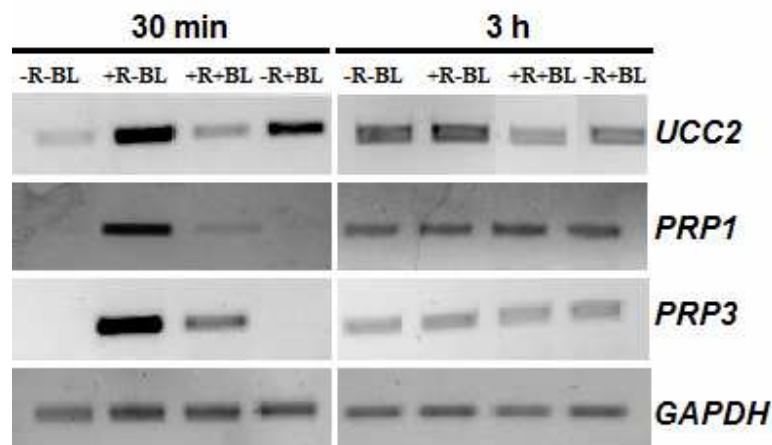


Figura 19 - Análise de expressão de genes induzidos por AtRALF1 na presença e na ausência de brassinolide (BL). Plantas de *Arabidopsis* com 7 d foram tratadas com 1 μ M de AtRALF1 (+R-BL), 1 μ M de BL (-R+BL) ou ambos os hormônios (+R+BL). Tratamentos controle com água e metanol 1% (-R-BL) foram incluídos para comparação. A análise de expressão gênica se deu nos tempos de 30 min e 3 h de tratamento. A análise foi feita com 25 (dados não mostrados) e 30 ciclos com três repetições do experimento. Um experimento representativo dos demais é mostrado. *UCC2*, uclacianina; *PRP1*, proteína rica em prolina 1; *PRP3*, proteína rica em prolina 3; *GAPDH*, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

Observou-se que o gene que codifica a proteína UCC2 é induzido pelo tratamento com AtRALF1 e BL, porém, na presença dos dois hormônios a expressão é mais baixa. Isso ocorre com mais evidência após 30 min de tratamento com os hormônios, já que em 3 h de tratamento nota-se pouca diferença de expressão entre os tratamentos.

As proteínas PRP1 e PRP3 têm sua expressão gênica induzida com 30 min de exposição ao peptídeo AtRALF1, sendo que com 3 h de tratamento a expressão de ambas volta aos níveis exibidos pelas plantas controle. Quando AtRALF1 e BL são colocados juntos verifica-se uma queda de expressão dos dois genes em relação as plantas tratadas apenas

com AtRALF1, porém, o nível de expressão de ambos ainda continua sendo maior quando comparados a plantas não tratadas ou tratadas apenas com BL.

Para verificarmos a resposta de genes relacionados a via de biossíntese ou sinalização de BL ao peptídeo AtRALF1, foram analisados o nível de expressão de genes induzidos pelo BL quando também expostos ao AtRALF1. Observou-se que o tratamento com AtRALF1 leva a indução de todos os 4 genes induzidos por BL (Figura 20).

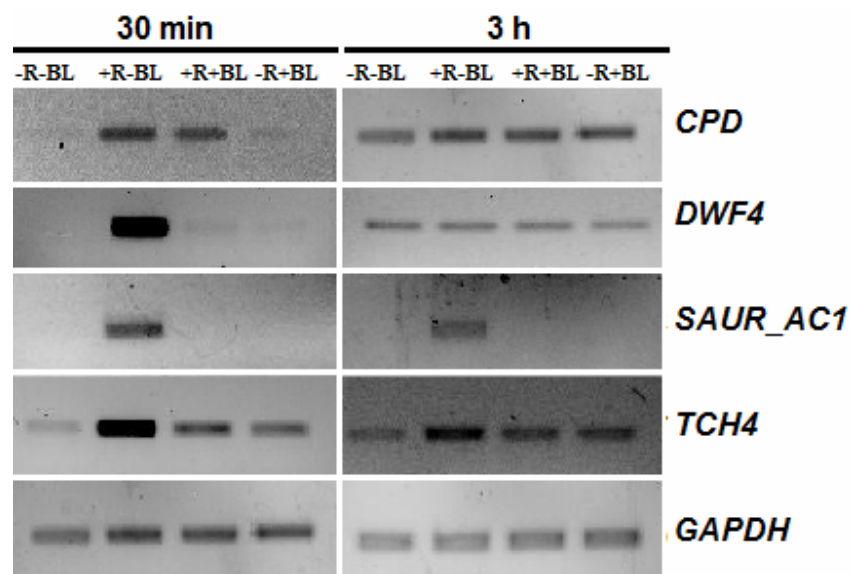


Figura 20 - Análise de expressão de genes induzidos por brassinolide (BL). Plantas de *Arabidopsis* selvagens foram tratadas com 1 μ M de AtRALF1 (+R-BL), 1 μ M de BL (-R+BL) ou ambos os hormônios (+R+BL). Tratamentos controle com água e metanol 1% (-R-BL) foram incluídos para comparação. *CPD*, *constitutive photomorphogenesis and dwarfism*; *DWF4*, *dwarf 4*; *SAUR_AC1*, *small-auxin-up RNA_Arabidopsis Columbia 1*; *TCH4*, *touch 4*; *GAPDH*, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

Observa-se para os genes *TCH4*, *CPD* e *DWF4* um nível de expressão intermediário quando as plantas são tratadas com ambos os hormônios, BL e AtRALF1. Os resultados mostram que a combinação dos dois hormônios causa uma maior indução dos genes com relação ao tratamento com BL e uma menor indução com relação ao tratamento com AtRALF1. Esses dados precisam ser confirmados com uma técnica mais sensível como por exemplo PCR em tempo real, porém o apresentado com RT-PCR é também condizente com uma ação antagônica dos hormônios. Quanto a expressão do gene *SAUR_AC1*, esta foi detectada apenas em plantas tratadas com AtRALF1, o que provavelmente se deve ao fato de sua expressão em raízes ser muito baixa, também não sendo detectada na presença de BL (GIL; GREEN, 1997; NAKAMURA et al., 2003).

Peptídeos RALF são conhecidos por fazerem com que células em suspensão tenham seu meio alcalinizado rapidamente após o contato com ele (PEARCE et al., 2001). Assim, vários ensaios foram realizados adicionando-se AtRALF1 e BL em diversas concentrações, alternando-se ainda a ordem dos hormônios colocados. Em todas as concentrações analisadas para ambos os hormônios, notou-se que houve um pequeno aumento na alcalinização quando os dois estavam presentes (Figura 21A), mostrando que BL não afeta o poder de alcalinizar do AtRALF1.

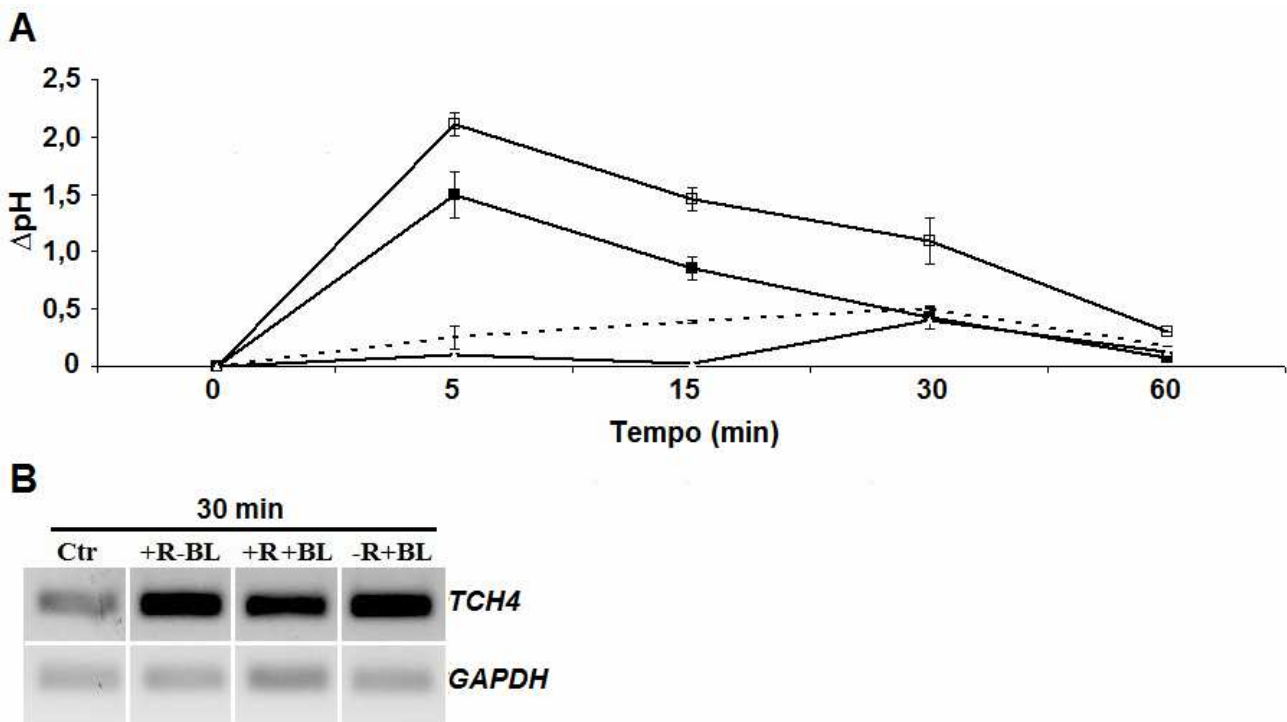


Figura 21 - Resposta de alcalinização e análise de expressão de células em suspensão de *Arabidopsis* expostas a AtRALF1 e brassinolide (BL). (A) Alcalinização ao longo do tempo de plantas tratadas com 10 nM de AtRALF1 (quadrados cheios), 10 μM de BL (linha tracejada) ou ambos (quadrado vazio). (B) Análise de expressão do gene *tch4* em células em suspensão tratadas por 30 min com 300 nM de AtRALF1 (+R-BL), 1 μM de BL (-R+BL) ou ambos (+R+BL)

Após 30 min de tratamento verificou-se a expressão gênica dos marcadores encontrados para AtRALF1 e BL. De todos os genes verificados (*UCC2*, *PRP1*, *PRP3*, *TCH4*, *SAUR_AC1*, *DWF4* e *CPD*) o único que se detectou expressão foi o que codifica a proteína TCH4 (Figura 21B). Uma hipótese para que a expressão gênica dos demais genes não tenha sido detectada poderia ser o fato de que estes são genes não expressos em raízes e as células em suspensão utilizadas serem fotossintetizantes. As células em suspensão tratadas com AtRALF1 e BL apresentaram maior expressão do gene *TCH4* que as células não

tratadas com os hormônios ou ainda que as células tratadas com ambos. Mais uma vez, sendo as diferenças detectadas pequenas, uma comprovação por técnica mais sensível se faz necessário, porém, novamente há uma indicação de comportamento antagônico entre os dois tratamentos. Ou seja, um hormônio na presença do outro nunca consegue exercer seu efeito na plenitude, quer seja para menos ou para mais.

5 DISCUSSÃO

Peptídeos RALF foram descobertos quando um novo ensaio que detecta alcalinização do meio extracelular foi criado (PEARCE et al., 2001). Desde a sua descoberta esforços têm sido direcionados para o entendimento de sua função. O fato deles serem encontrados somente em plantas e de serem ubíquos no reino vegetal sugere uma função básica dentro da fisiologia e desenvolvimento vegetais. Resultados recentes apontam para um papel na regulação do alongamento celular (COVEY et al., 2010; MATOS et al., 2008; MINGOSSI et al., 2010; WU et al., 2007). No presente trabalho, através de ferramentas da genética reversa e bioquímica, buscou um melhor entendimento das funções do RALF e de sua inter-relação com o brassinolide.

Plantas transgênicas com baixa expressão do *AtRALF1*, expressando a sequência repetida e invertida do *AtRALF1*, 35S:irAtRALF1, mostraram um fenótipo contrário ao apresentado por plantas com altos níveis de expressão do gene *AtRALF1* (Figura 10A; MATOS et al., 2008). Plantas transgênicas com baixo nível de expressão de genes RALF, como a 35S:irAtRALF1-1, e com raízes maiores que plantas selvagens foram também reportadas por Wu et al. (2007) quando silenciou o gene RALF em plantas de *N. attenuata*. Esses dados confirmam o efeito do peptídeo no controle do alongamento de raízes, mostrando que sua ausência ou redução na expressão gênica leva a liberação do efeito inibitório.

Os hipocótilos de plantas com 35S:irAtRALF1 não mostraram diferenças significativas em relação a plantas selvagens (Figura 10B). Uma explicação pode estar no fato de outras isoformas também serem expressas no hipocótilo e o efeito da ausência do *AtRALF1* pode estar sendo suprimido por redundância gênica. Importante também é o fato de que o nível de expressão do *AtRALF1* em hipocótilos é mais baixo do que em raízes, uma indicação de que seu papel no hipocótilo talvez seja secundário (HARUTA et al., 2008).

Quanto a localização subcelular do peptídeo *AtRALF1*, viu-se que este segue a via secretória padrão. Notável foi o fato do *AtRALF1*-GFP ter sido encontrado em estruturas típicas do complexo de Golgi (Figura 11C). Essa localização não foi relatada por Escobar et al. (2003) que estudou a localização intracelular do RALF em *N. benthamiana*. O peptídeo *AtRALF1* tem aproximadamente 5 kDa (PEARCE et al., 2001), e poderia ter sua função

afetada devido a fusão com a proteína GFP (aproximadamente 25 kDa). Esse problema foi recentemente relatado para uma proteína maior de membrana denominada BAK1 (NTOUKAKIS et al., 2011). Os resultados da análise fenotípica de plantas 35S:AtRALF1-GFP confirmaram o fenótipo semi-anão, característico da superexpressão do *AtRALF1* e, conseqüentemente, confirmaram a funcionalidade da proteína quimérica AtRALF1-GFP.

Peptídeos RALF podem ser tecido-específico ou ubíquos (MOURA; SILVA-FILHO, 2006). Em *Arabidopsis*, entre as 37 isoformas já descritas existem peptídeos como AtRALF1, específico de raízes, e AtRALF34, encontrado em toda a planta. A expressão de *AtRALF34* em raízes é menor que a expressão de *AtRALF1*, o que explica o fato de raízes de plantas 35S:irAtRALF1 serem maiores que raízes de plantas 35S:irAtRALF34 (Figuras 10 e 13). Em folhas, *AtRALF34* tem alta expressão e seu silenciamento aumentou o comprimento e largura das mesmas. Porém, proporcionalmente, o aumento não é tão acentuado quanto o observado em raízes de plantas silenciadas para o gene *AtRALF1* (Figura 10 e 14). Uma das explicações para esse efeito não tão acentuado da redução da expressão do *AtRALF34* poderia ser o fato de que em folhas existem outros genes RALF mais expressos que *AtRALF34*, como por exemplo o *AtRALF33*. Novamente, a redundância gênica poderia estar prejudicando uma manifestação mais clara da redução da expressão do *AtRALF34*. Um aspecto importante das análises fenotípicas de plantas 35S:irAtRALF34 é que a redução da expressão do *AtRALF34* aponta para um efeito semelhante ao observado na redução da expressão do *AtRALF1*, isso sugere similaridade de função entre esses dois membros da família, além da também similaridade de função de AtRALF23 relatada por Srivastava et al. (2009). Dados de linhagens silenciadas por inserção de T-DNA certamente ajudarão a esclarecer o efeito do *AtRALF34*.

A utilização de genes que alteram sua expressão como marcadores moleculares da ação de diferentes elicitores tem contribuído para um entendimento melhor não somente dos efeitos mas também das vias de sinalização envolvidas. Outros peptídeos hormonais, como AtPEP1 e *clavata3*, possuem marcadores moleculares para sua função já bem estabelecidos (HUFFAKER; DAFOE; SCHMELZ, 2011; HUFFAKER; PEARCE; RYAN, 2006; MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 2006). Encontramos em plantas 35S:AtRALF1 catorze genes com expressão alterada envolvidos com rearranjo de parede celular (Tabela 1).

Destes, cinco deles foram validados como presentes em raízes de plantas 35S:AtRALF1 com nível de expressão superior ao encontrado em raízes de plantas selvagens (Figura 15).

Dados *in silico* indicam que *AtRALF23* é reprimido por brassinolide (BL). Srivastava et al. (2009) investigaram os efeitos do hormônio brassinolide aplicado exogenamente em plantas que superexpressam o *AtRALF23* e observaram que as mesmas são resistentes ao tratamento do hormônio BL, não mostrando respostas características ao BL como alongamento do hipocótilo na presença de luz. Essas informações nos levaram a também investigar o efeito do BL com relação ao peptídeo AtRALF1. Apesar do AtRALF1 não ser reprimido por BL, as respostas ao BL em plantas 35S:AtRALF1 também não são típicas de plantas selvagens (Figuras 16A-C e Figura 17). Não somente a elevação da expressão dos genes *AtRALF1* e *AtRALF23* levaram a uma resistência ao BL exógeno, como também o tratamento das plantas selvagens com os peptídeos aplicados exogenamente produziram o mesmo efeito (Figura 18A-D).

Na busca de genes marcadores para presença do AtRALF1, dois genes que codificam PRPs específicas de raízes foram confirmados como genes induzidos por AtRALF1 (Figura 19). Fowler, Bernhardt e Tierney (1999) encontraram que PRP1 e PRP3 estão envolvidas em etapas de desenvolvimento da planta, tendo 76% de identidade entre elas, com 36,5 e 34,4 kDa, respectivamente. Os dois genes que codificam PRPs foram induzidos em plantas tratadas com AtRALF1, sendo que o gene que codifica PRP3 apresentou maior expressão entre eles. Pouco se sabe sobre o papel que essas PRPs desempenham no desenvolvimento, mas elas podem estar envolvidas na regulação da expansão da parede celular, já que também são importantes na manutenção de tecidos maduros (FOWLER; BERNHARDT; TIERNEY, 1999).

Apesar da alta identidade entre as PRPs analisadas, quando na presença do peptídeo e BL, o gene que codifica PRP3 mostrou ainda uma expressão elevada, enquanto o gene que codifica PRP1 quase volta ao nível de expressão de plantas selvagens. Tomou-se como evidência dos efeitos antagônicos de AtRALF1 e BL o fato da aplicação de ambos hormônios resultarem em uma expressão intermediária entre os tratamentos somente com um dos hormônios (Figura 19). Ao que tudo indica, genes *PRPs* estão envolvidos com o efeito do peptídeo e do BL na parede celular e não nas respectivas vias de sinalização, logo, o fato do tratamento simultâneo com ambos hormônios estar induzindo os genes que

codificam PRP1 e 3 para um nível intermediário, mais uma vez mostra antagonismo das vias de sinalização. Caso não houvesse interferência, o resultado esperado seria ou níveis iguais ao mais alto, no caso o induzido por *AtRALF1*, ou ainda um efeito aditivo, superior ao do induzido por *AtRALF1*. Um aspecto interessante nas análises no tempo, 30 min e 3 h, é que as diferenças são notadas somente em 30 min, esse tempo de resposta rápida faz sentido com o peptídeo hormonal RALF que apresenta outras respostas como alcalinização e indução de uma MAP quinase em 5 min (PEARCE et al., 2001).

O gene PRP3 tem sua expressão aumentada na presença de altas concentrações de auxina e etileno. Ebener et al. (1993) relata que *DcPRP1*, um gene de cenoura expresso em raízes e envolvido na formação de raízes secundárias, é induzido pelo tratamento com auxina. Sabe-se que altas concentrações de auxina promovem a inibição do crescimento de raízes, além de aumentar o comprimento dos pelos radiculares (PITTS; CERNAC; ESTELLE, 1998). Wu et al. (2007) mostrou diminuição de pelos radiculares em plantas com *NaRALF* silenciado. PRP3 parece ter efeito positivo no desenvolvimento de pelos radiculares (BERNHARDT; TIERNEY, 2003) e negativo no crescimento de raízes, sendo de alguma forma regulado por peptídeos RALF.

A proteína uclacianina (UCC2) foi induzida por tratamentos com o peptídeo *AtRALF1*, apresentando também uma alta expressão quando as plantas foram tratadas com BL. Curiosamente, quando os tratamentos continham o peptídeo e BL, a expressão do gene *UCC2* foi menor que ambos (Figura 19). Nesse caso o tratamento simultâneo está levando a uma indução menor do que o pior tratamento, o BL. Esse resultado somente exemplifica que as relações entre os hormônios podem ser muito mais complexas do que pode-se antecipar. Nersissian et al. (1996) estudando stellacianinas, proteínas da mesma família que uclacianinas, sugeriram que sua atividade redox e seu domínio de extensinas podem significar que estas participam, na parede celular, de reações que levam a geração de peróxido de hidrogênio. Uclacianinas poderiam ter atividade semelhante e sua indução em plantas 35S:*AtRALF1* poderia ser relacionada a indução das duas peroxidases analisadas, também com genes induzidos.

Genes conhecidos por serem induzidos pela presença do hormônio BL (*TCH4* e *SAUR_AC1*) tiveram sua expressão elevada na presença do peptídeo *AtRALF1* também (Figura 20). *TCH4* foi induzido nos tratamentos com *AtRALF1* e com BL. Quando ambos

foram colocados no meio onde estavam plantas de *Arabidopsis*, aos 30 minutos de tratamento, AtRALF1 induziu uma expressão do gene maior que os tratamentos com BL ou com ambos. Sabe-se que *TCH4* tem sua expressão aumentada quando em contato com altas concentrações de auxina e BL, ocorrendo também uma indução do gene quando em tratamento de escuro, toque e choque térmico, indicando que este está envolvido com resposta a situações de estresse (XU et al., 1996). Apesar do gene *SAUR_AC1* ter baixa expressão em raízes, plantas tratadas com AtRALF1 mostraram uma expressão elevada do gene (Figura 20). Assim como *TCH4*, o gene *SAUR_AC1* (***Small-Auxin-up-RNA_Arabidopsis Columbia 1***) também é induzido na presença de auxina (GIL et al., 1994) e brassinosteróides (CLOUSE et al., 1992).

Genes que codificam enzimas que participam da via biossintética de BL também tem sua expressão aumentada quando em contato com o peptídeo AtRALF1. *DWF4* tem uma elevada expressão na presença de AtRALF1, sendo que em tratamentos onde BL está presente junto com o peptídeo essa expressão cai consideravelmente. *CPD* mostra uma expressão elevada quando na presença de AtRALF1, porém não tão acentuada quanto a expressão de *DWF4* (Figura 20). Diferentemente de *DWF4*, a adição de BL junto com o peptídeo parece alterar pouco a expressão de *CPD*. Uma possível explicação para o fato de genes relacionados a biossíntese de BL terem sua expressão aumentada seria uma tentativa de compensação da planta, que aumenta a produção do hormônio, responsável pelo alongamento de raízes, para diminuir o efeito do peptídeo AtRALF1, de efeito inibidor no crescimento.

O correto crescimento e desenvolvimento de um indivíduo é função de inúmeros aspectos genéticos e fisiológicos pré-programados no genoma de cada organismo. Um dos aspectos pré-programados é a produção de hormônios que agem de forma antagônica ou sinérgica, estimulando ou reprimindo diferentes etapas do desenvolvimento. Inúmeros são os exemplos dentro da fisiologia animal e vegetal, de hormônios que possuem efeitos antagônicos e cujas produções atuam na regulação de importantes aspectos fisiológicos e do desenvolvimento, assim são insulina e glucagon, somatostatina e hormônio do crescimento, auxina e etileno, ácido salicílico e ácido jasmônico e auxina e citocinina para citar alguns exemplos (DAVIES, 2007; KASTIN, 2006). Resultados como o menor número de raízes laterais de plantas 35S:AtRALF1, a insensibilidade dessas plantas a tratamentos com BL e o

aparente conflito das vias de sinalização sugerido pelos genes induzidos por AtRALF1 e BL indicam que os hormônios AtRALF1 e BL possuem funções antagônicas.

6 CONCLUSÕES

Plantas 35S:AtRALF1 são insensíveis a aplicações exógenas de brassinolide e não apresentam as respostas características de plantas de *Arabidopsis* ao hormônio esteróide.

Plantas 35S:irAtRALF1 mostram fenótipo contrastante ao das plantas 35S:AtRALF1, sugerindo que o efeito no alongamento celular pode ser o efeito fisiológico do peptídeo.

Plantas 35S:AtRALF-GFP revelam que o peptídeo AtRALF1-GFP é funcional como proteína quimérica e que segue a via secretória padrão, retículo endoplasmático e complexo de Golgi, com destino final no apoplasto.

Os genes *PRP1*, *PRP3*, *UCC2*, *DWF4*, *TCH4*, *CPD* e *SAUR_AC1* são induzidos por AtRALF1 e o padrão de indução em resposta aos hormônios AtRALF1 e BL fornecem evidências de ações antagônicas entre os hormônios AtRALF1 e BL.

REFERÊNCIAS

- BAO, F.; SHEN, J.; BRADY, S.R.; MUDAY, G.K.; ASAMI, T.; YANG, Z. Brassinosteroids interact with auxin to promote lateral root development in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 134, p. 1624-1631, 2004.
- BERNHARDT, C.; TIERNEY, M. Expression of AtPRP3, a proline-rich structural cell wall protein from Arabidopsis, is regulated by cell-type-specific developmental pathways involved in root hair formation. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 122, p. 705-714, 2003.
- BIRNBAUM, K.; SHASHA, D.E.; WANG, J.Y.; JUNG, J.W.; LAMBERT, G.M.; GALBRAITH, D.W.; BENFEY, P.N. A gene expression map of the Arabidopsis root. **Science**, New York, v. 302, p. 1956-1960, 2003.
- BISHOP, G.J.; KONCZ, C. Brassinosteroids and plant steroid hormone signaling. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 97-110, 2002.
- BORNER, G.H.H.; SHERRIER, D.J.; STEVENS, T.J.; ARKIN, I.T.; DUPREE, P. Prediction of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in Arabidopsis: a genomic analysis. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 129, p. 486-499, 2002.
- CARPITA, N.; GIBEAUT, D.M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **The Plant Journal**, Oxford, v. 3, p. 1-30, 1993.
- CLOUGH, S.J.; BENT, A.F. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 16, p. 735-743, 1998.
- CLOUSE, S.D. Arabidopsis mutants reveal multiple roles for sterols in plant development. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 1995-2000, 2002.
- CLOUSE, S.D.; LANGFORD, M.; MCMORRIS, T. A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 111, p. 671-678, 1996.
- CLOUSE, S.D.; ZUKEK, D.M.; MCMORRIS, T.C.; BAKER, M.E. Effect of brassinolide on gene expression in elongating soybean epicotyls. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 100, p. 1377-1383, 1992.
- COSGRAVE, D.J. Growth of the plant cell wall. **Nature**, London, v. 6, p. 850-861, 2005.
- COVEY, P.A.; SUBBIAH, C.C.; PARSONS, R.L.; PEARCE, G.; LAY, F.T.; ANDERSON, M.A.; RYAN, C.A.; BEDINGER, P.A. A pollen-specific RALF from tomato that regulates pollen tube elongation. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 2, p. 703-715, 2010.
- DAVIES, P.J. The plant hormones: their nature, occurrence and function. In: DAVIES, P.J. **The Plant Hormones: biosynthesis, signal transduction and action!** Dordrecht:Springer, 2004, p. 1-15.

EBENER, W.; FOWLER, T.J.; SUZUKI, H.; SHAVER, J.; TIERNEY, M.L. Expression of *DcPRP1* is linked to carrot storage root formation and is induced by wounding and auxin treatment. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 101, p. 252-265, 1993.

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

FOWLER, T.J.; BERNHARDT, C.; TIERNEY, M.L. Characterization and expression of four proline-rich cell wall protein genes in *Arabidopsis* encoding two distinct subsets of multiple domain proteins. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 121, p. 1081-1091, 1999.

FRY, S.C.; SMITH, R.C.; RENWICK, K.F.; MARTIN, D.J.; HODGE, S.K.; MATTHEWS, K.J. Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. **Biochemical Journal**, Colchester, v. 282, p. 821-828, 1992.

FUJIOKA, S.; LI, J.; CHOI, Y.; SETO, H.; TAKATSUTO, S.; NOGUCHI, T.; WATANABE, T.; KURIYAMA, H.; YOKOTA, T.; CHORY, J.; SAKURAI, A. The *Arabidopsis deetiolated2* mutant is blocked early in brassinosteroid biosynthesis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, p. 1951-1962, 1997.

FUKAKI, H.; TASAKA, M. Hormone interactions during lateral root formation. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 69, p. 437-469, 2009.

GIL, P.; GREEN, P.J. Regulatory activity exerted by the SAUR_AC1 promoter region in transgenic plants. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 34, p. 803-808, 1997.

GIU, P.; LIU, Y.; ORBOVIC, V.; VERKAMP, E.; POFF, K.L.; GREEN, P.J. Characterization of the auxin-inducible SAUR_AC1 gene for use as a molecular genetic tool in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 104, p. 777-784, 1994.

GODA, H.; SHIMADA, Y.; ASAMI, T.; FUJIOKA, S.; YOSHIDA, S. Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 130, p. 1319-1334, 2002.

GUDESBLAT, G.E.; RUSSINOVA, E. Plants grow on brassinosteroids. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 14, p. 530-537, 2011.

GUO, Z.; FUJIOKA, S.; BLANCAFLOR, E.B.; MIAO, S.; GOU, X.; LI, J. TCP1 modulates brassinosteroid biosynthesis by regulating the expression of the key biosynthetic gene DWARF4 in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 22, p. 1161-1173, 2010.

HANAHAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 166, p. 557-580, 1983.

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

HARUTA, M.; MONSHAUSEN, G.; GILROY, S.; SUSSMAN, M.R. A cytoplasmatic Ca²⁺ functional assay for identifying and purifying endogenous cell signaling peptides in *Arabidopsis* seedlings: identification of AtRALF1 peptide. **Biochemistry**, Washington, v. 47, p. 6311-6321, 2008.

HUFFAKER, A.; DAFOE, N.; SCHMELZ, E.A. ZmPep1, an ortholog of *Arabidopsis* elicitor peptide 1, regulates maize innate immunity and enhances disease resistance. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 155, p. 1325-1338, 2011.

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

JAFFE, M.J.; FORBES, S. Thigmomorphogenesis: the effect of mechanical perturbation on plants. **Plant Growth Regulation**, Boston, v. 12, p. 313-324, 1993.

KARIMI, M.; INZÉ, D.; DEPICKER, A. GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. **Trends in Plant Science**, Killington, v. 7, p. 193-195, 2002.

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

KASTIN, A.J. **The Handbook Biologically Active Peptides**. San Diego: Academic Press, 2006, 1595 p.

KIM, T.; WANG, Z. Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 61, p. 681-704, 2010.

LAMESCH, P.; BERARDINI, T.Z.; LI, D.; SWARBRECK, D.; WILKS, C.; SASIDHARAN, R.; MULLER, R.; DREHER, K.; ALEXANDER, D.L.; GARCIA-HERNANDEZ, M.; KARTHIKEYAN, A.S.; LEE, C.H.; NELSON, W.D.; PLOETZ, L.; SINGH, S.; WENSEL, A.; HUALA, E. The *Arabidopsis* information resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. **Nucleic Acids Research**, London, v. 40, p. 1202-1210, 2011.

MATHUR, J.; MOLNÁR, G.; FUJIOKA, S.; TAKATSUTO, S.; SAKURAI, A.; YOKOTA, T.; ADAM, G.; VOIGT, B.; NAGY, F.; MAAS, C.; SCHELL, J.; KONCZ, C.; SZEKERES, M. Transcription of the *Arabidopsis* CPD gene, encoding a steroidogenic cytochrome P450, is negatively controlled by brassinosteroids. **The Plant Journal**, Oxford, v. 14, p. 593-602, 1998.

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

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

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

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

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

MOURA, D.S.; PEARCE, G.; RYAN, C.A.;RALF peptides. In: KASTIN, A.J. **The handbook biologically active peptides**. San Diego:Academic Press, 2006. p. 33-36.

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

MUSSIG, C.; SHIN, G.; ALTMANN, T. Brassinosteroids promote root growth in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 133, p. 1261-1271, 2003.

NAKAMURA, A.; SHIMADA, Y.; GODA, H.; FUJIWARA, M.T.; ASAMI, T.; YOSHIDA, S. AXR1 is involved in BR-mediated elongation and SAUR_AC1 gene expression in Arabidopsis. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 553, p. 28-32, 2003.

NELSON, B.K.; CAI, X.; NEBENFÜHR, A. A multicolored set of *in vivo* organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. **The Plant Journal**, Oxford, v. 51, p. 1126-1136, 2007.

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

NERSISSIAN, A.M.; IMMOOS, C.; HILL, M.G.; HART, P.J.; WILLIAMS, G.; HERRMANN, R.G.; VALENTINE, J.S. Uclacyanins, stellacyanins, and plantacyanins are distinct subfamilies of phytoeyanins: plant-specific mononuclear copper proteins. **Protein Science**, Malden, v. 7, p. 1915-1929, 1998.

NERSISSIAN, A.M.; MEHRABIAN, Z.B.; NALBANDYAN, R.M.; HART, P.J.; FRACZKIEWICZ, G.; CZERNUSZEWICZ, R.S.; BENDER, C.J.; PEISACH, J.; HERRMANN, R.G.; VALENTINE, J.S. Cloning, expression, and spectroscopic characterization of *Cucumis sativus* stellacyanin in its nonglycosylated form. **Protein Science**, Malden, v. 5, p. 2184-2192, 1996.

NTOUKAKIS, V.; SCHWESSINGER, B.; SEGONZAC, C.; ZIPFEL, C. Cautionary notes on the use of C-terminal BAK1 fusion proteins for functional studies. **The Plant Cell**, Rockville, v. 23, p. 3871-3878, 2011.

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

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

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

PÉRET, B.; LARRIEU, A.; BENNETT, M.J. Lateral root emergence: a difficult birth. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, p. 3637-3643, 2009.

PITTS, R.J.; CERNAC, A.; ESTELLE, M. Auxin and ethylene promote root hair elongation in Arabidopsis. **The Plant Journal**, Oxford, v. 16, p. 553-560, 1998.

PURUGGANAN, M.M.; BRAAM, J.; FRY, S.C. The Arabidopsis TCH4 xyloglucan endotransglycosylase. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 115, p. 181-190, 1997.

RASKIN, I. Role of salicylic acid in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 43, p. 439-463, 1992.

RODDICK, J.G.; RIJNENBERG, A.L.; IKEKAWA, N. Developmental effects of 24-epibrassinolide in excised roots of tomato grown *in vitro*. **Physiologia plantarum**, Copenhagen, v. 87, p. 453-458, 1993.

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

SASSE, J.M. Brassinosteroids and roots. **Plant Growth Regulation Society of America**, LaGrande, v. 21, p. 228-232, 1994.

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

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

SHOWALTER, A.M.; KEPPLER, B.; LICHTENBERG, J.; GU, D.; WELCH, L.R. A bioinformatics approach to the identification, classification, and analysis of hydroxyproline-rich glycoproteins. **Plant Physiology**, Lancaster, v.153, p. 485-513, 2010.

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

TURK, E.M.; FUJIOKA, S.; SETO, H.; SHIMADA, Y.; TAKATSUTO, S.; YOSHIDA, S.; DENZEL, M.A.; TORRES, Q.I.; NEFF, M.M. CYP72B1 inactivates brassinosteroid hormones: an intersection between photomorphogenesis and plant steroid signal transduction. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 133, p. 1643-1653, 2003.

VELASQUEZ, S.M.; RICARDI, M.M.; DOROSZ, J.G., FERNANDES, P.V.; NADRA, A.D.; POL-FACHIN, L.; EGELUND, J.; GILLE, S.; HARHOLT, J.; CIANCIA, M.; VERLI, H.; PAULY, M.; BACIC, A.; OLSEN, C.E.; ULVSKOV, P.; PETERSEN, B.L.; SOMERVILLE, C.; LUSEM, N.D.; ESTEVEZ, J.M. O-glycosylated cell wall proteins are essential in root hair growth. **Science**, New York, v. 332, p. 1401-1403, 2011.

WANG, X.; GOSHE, M.B.; SODERBLOM, E.J.; PHINNEY, B.S.; KUCHAR, J.A.; LI, J.; ASAMI, T.; YOSHIDA, S.; HUBER, S.C.; CLOUSE, S.D. Identification and functional analysis of in vivo phosphorylation sites of the Arabidopsis BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1 receptor kinase. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, p. 1685-1703, 2005.

WU, J.; KURTEN, E.L.; MONSHAUSEN, G.; HUMMEL, G.M.; GILROY, S.; BALDWIN, I.T. NaRALF, a peptide signal essential for the regulation of root hair tip apoplastic pH in *Nicotiana attenuata*, is required for root hair development and plant growth in native soils. **The Plant Journal**, Oxford, v. 52, p. 877-890, 2007.

XIE, X.; YONEYAMA, K.; YONEYAMA, K. The strigolactone story. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 48, p. 93-117, 2010.

XU, W.; CAMPBELL, P.; VARGHEESE, A.K.; BRAAM, J. The Arabidopsis XET-related gene family: environmental and hormonal regulation of expression. **The Plant Journal**, Oxford, v. 9, p. 879-889, 1996.

XU, W.; PURUGGANAN, M.M.; POLISENSKY, D.H.; ANDOSIEWICZ, D.M.; FRY, S.C.; BRAAM, J. Arabidopsis TCH4, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase. **The Plant Cell**, Rockville, v. 7, p. 1555-1567, 1995.

ZHANG, G.; WU, J.; WANG, X. Cloning and expression analysis of a pollen preferential rapid alkalization factor gene, *BoRALF1*, from broccoli flowers. **Molecular Biology Reports**, Boston, v. 37, p. 3273-3281, 2010.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Sequências de iniciadores utilizados para as clonagens

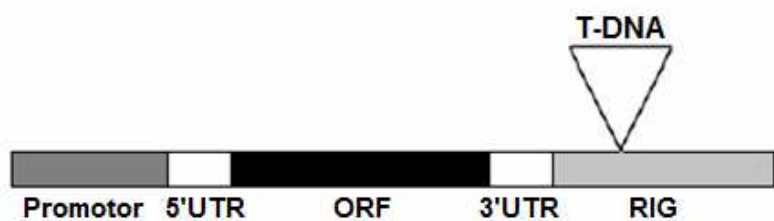
Gene ou Vetor	Sequência do Iniciador	Temp. de Anelamento (°C)
<i>AtRALF1</i>	F: 5' CACCATGGACAAGTCCTTTACTCTGT 3' R: 5' ACTCCTGCAACGAGCAATTT 3'	60
<i>AtRALF34</i>	F: 5' CACCATGGCAGCTTCGTCTTCA 3' R: 5' TCTCCGGCATCGAGTGAT 3'	60
pENTR/D-TOPO	M13F: 5' GTAAAACGACGGCCAGT 3' M13R: 5' CAGGAAACAGCTATGACC 3'	60
Pk7WG2	35SPromoter: 5' ATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTA 3' 35STerminator: 5' TGCCTGCAGGTCACTGGATTTTGGTTTTAGGAA 3'	56
Pk7FWG2	GFP-R: 5' TGGTGCAGATGAACTTCAGGGT 3'	56
Pk7WIWG2(I)	Intron I: 5' TTAGCATTTAACGTGTTTGCAGGTCACTT 3' Intron II: 5' AACTTACAGTGAAGACACAGAAAAGCCGTAA 3'	58

APÊNDICE B – Sequências de iniciadores utilizados para análise de expressão

Gene	Sequência do Iniciador	Temp. de Anelamento (°C)
<i>AtRALF1</i>	F: 5' TGATGCATGGGCTACGACTG 3' R: 5' AAGGCACACTGTTCCGTTTC 3'	60
<i>AtRALF34</i>	F: 5' CGAAGTTACGGAGGAAGACG 3' R: 5' ACTCTATTCGCCGACAATGC 3'	60
<i>CPD</i>	F: 5' AGCAACTCGGTAACGACAGG 3' R: 5' CAGAGAGTGCAACCCTAGCC 3'	61
<i>DWF4</i>	F: 5' GTGGGTGGAAAAGTGTACCG 3' R: 5' CTGTTGCCATCTCCAAGGAT 3'	61
<i>SAUR_AC1</i>	F: 5' AAGGGAATCATCGTCGACAC 3' R: 5' GTATGAAACCGGCACCACAT 3'	60
<i>TCH4</i>	F: 5' TCCTAATGCCTCGAAACAGG 3' R: 5' CTGCACCCATCTCATCCTTT 3'	60
<i>GAPDH</i>	F: 5' TTGGTGACAACAGGTCAAGCA 3' R: 5' AAACCTGTGCTCAATGCAATC 3'	60

APÊNDICE C - Análise de linhagem nocaute SALK_089792 para o gene *AtRALF1*. (A) Esquema mostrando região onde o T-DNA está inserido no mutante SALK_089792. (B) Confirmação de inserção de T-DNA no DNA genômico. (C) Análise de expressão do gene *AtRALF1*. UTR, região não traduzida. ORF fase de leitura aberta. RIG, região inter-gênica

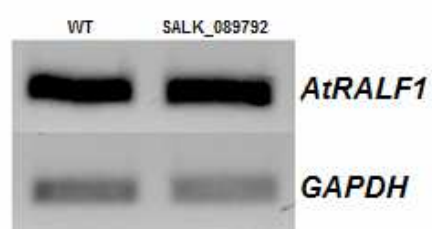
A



B



C



APÊNDICE D – Análise das linhagens nocaute SALK_003116 e SALK_102494 para o gene *AtRALF34*. (A) Esquema mostrando região onde o T-DNA está inserido no mutante SALK_003116. (B) Confirmação de inserção de T-DNA no DNA genômico no mutante SALK_003116. (C) Análise de expressão do gene *AtRALF34* no gene SALK_003116. (D) Esquema mostrando região onde o T-DNA está inserido no mutante SALK_102494. (E) Confirmação de inserção de T-DNA no DNA genômico no mutante SALK_102494. (F) Análise de expressão do gene *AtRALF34* no gene SALK_102494. UTR, região não traduzida. ORF fase de leitura aberta. RIG, região inter-gênica

