

ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE A VIA GENÉTICA DO  
microRNA156/*SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE* E  
BRASSINOSTERÓIDES DURANTE O DESENVOLVIMENTO

JUVENIL DE *Arabidopsis thaliana*



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – CÂMPUS DE BOTUCATU  
SÃO PAULO, BRASIL

2015

ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE A VIA GENÉTICA DO  
microRNA156/*SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE* E  
BRASSINOSTERÓIDES DURANTE O DESENVOLVIMENTO  
JUVENIL DE *Arabidopsis thaliana*

**CARLOS HERNÁN BARRERA ROJAS**

Mestrando em Ciências Biológicas (Genética)

**FÁBIO TEBALDI SILVEIRA NOGUEIRA, Prof. Dr.**

Orientador

Dissertação apresentada como requisito para a  
obtenção do título de Mestre no programa de Pós-  
Graduação em Ciências Biológicas (Genética).

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – CÂMPUS DE BOTUCATU  
SÃO PAULO, BRASIL

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Barrera Rojas, Carlos Hernán.

Estudo da interação entre a via genética do microRNA156/squamosa promoter-binding protein-like e brassinosteróides durante o desenvolvimento juvenil de *Arabidopsis thaliana* / Carlos Hernán Barrera Rojas. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Fábio Tebaldi Silveira Nogueira

Capes: 20203004

1. Genética vegetal. 2. Expressão gênica. 3. Plantas - Efeito dos genes. 4. Plantas - Genética molecular.

Palavras-chave: *Arabidopsis thaliana*; Brassinosteróides; Interação gênica; SPLs; miR156.

## **AGRADECIMENTOS**

Expresso os meus agradecimentos a todas as pessoas e instituições que contribuíram ao desenvolvimento do presente trabalho, especialmente a:

- Deus, os meus pais e a minha família, por serem o meu motivo da minha vida, a força que me leva a continuar.
- Meu orientador Fabio TS Nogueira por me aceitar e acreditar em mim, e por me “jogar” na aventura dos brassinosteróides.
- A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” por virar o meu segundo lar.
- O Programa Estudante de Convênio de Pós-graduação PEC-PG pela concessão da bolsa.
- Ao pessoal do programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) e do Departamento de Genética pelo apoio técnico e burocrático.
- Ao grupo de pesquisa em Genética Molecular do Desenvolvimento Vegetal GMDV, pelos ensinamentos, conselhos e especialmente pela paciência.
- A Unidade de Microscopia Eletrônica do IB pelas fotografias no microscópio confocal.
- Os membros da banca por aceitar o convite para avaliar o meu projeto.
- Aos meus amigos brasileiros pela paciência e ensinamentos no meu português.
- À colônia colombiana por criar um “canto da minha terra” no Brasil.
- Aos meus amigos da minha casa no Brasil por virar a minha família.
- A você, por estar lendo o presente estudo.

**MUITO OBRIGADO**

*“For God so loved the world, that he gave his only Son, that whoever believes in him should not perish but have eternal life.*

*John 3:16*

## SUMÁRIO

	Pág.
ABREVIACÕES.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Os microRNAs.....	16
2.1.1 Mecanismos de regulação dos alvos pelos miRNAs.....	17
2.1.2 O miRNA156 e os seus alvos no desenvolvimento vegetal.....	19
2.2 Os fitohormônios (Brassinosteróides).....	23
2.2.1 Biossíntese dos BRs.....	24
2.2.2 Transdução de sinais dos BRs.....	25
2.2.3 Metabolismo dos BRs.....	26
2.2.4 Os Brassinosteróides no desenvolvimento vegetal.....	27
2.3 Interação miRNAs e fitohormônios.....	28
3. OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo geral.....	32
3.2 Objetivos específicos .....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Material vegetal.....	33
4.1.1 Plantas que expressam constitutivamente o precursor <i>AtMIR156a</i> (plantas miR156-OE).....	33
4.1.2. Plantas com níveis reduzidos do miR156 "livre" (Mimicry-156).....	33
4.1.3. Plantas com perda de função para o gene <i>BAS1</i> ( <i>bas1-2</i> ).....	34
4.2 Desinfecção de sementes e condições de crescimento.....	34
4.3 Tratamentos com 24-Epibrassinolide (24-EBL).....	34
4.4 Avaliações.....	36

4.4.1 Avaliação fenotípica.....	36
4.4.1.1 Formação do sistema radicular.....	36
4.4.1.2 Crescimento do hipocótilo.....	37
4.4.1.3 Comprimento celular.....	37
4.4.2 Avaliação da expressão gênica.....	38
4.5 Isolamento, tratamento com DNase I e quantificação do RNA total.....	38
4.6 Síntese de cDNA via <i>pulsed stem-loop</i> RT-PCR.....	39
4.7 Estabelecimento dos cruzamentos.....	39
4.8 Análise estatística dos dados.....	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1 miR156/ <i>SPL</i> e formação do sistema radicular.....	41
5.1.1 Interação miR156/ <i>SPL</i> -BRs no desenvolvimento radicular.....	46
5.2 miR156/ <i>SPL</i> e crescimento do hipocótilo.....	50
5.2.1 Interação miR156/ <i>SPL</i> -BRs no crescimento do hipocótilo.....	53
5.3 miR156/ <i>SPL</i> e tamanho celular.....	57
5.4 Análises de expressão gênica.....	59
5.5 Interação genética miR156/ <i>SPL</i> -BRs.....	64
5.5.1 Caracterização fenotípica da formação do sistema radicular e do comprimento celular no mutante <i>bas1-2</i> .....	65
5.5.2 Estabelecimento dos cruzamentos.....	67
5.5.3 Obtenção e caracterização genotípica das plantas F1 e F2.....	68
6. CONCLUSÕES.....	70
7. ANEXOS.....	71
REFERÊNCIAS.....	74

## ABREVIACÕES

**24-EBL:** 24-EpiBrassinolídeo

**ABA:** Ácido abscísico

**ARFs** (*Auxin Response Factors*): Fatores de resposta a auxinas

**BL:** Brassinolídeo

**BRs:** Brassinosteróides

**CS:** Castasterona

**DAG:** Dias após germinação

**GA:** ácidos giberélicos

**Mimicry-156:** Plantas com níveis reduzidos do microRNA156

**miR156-OE:** Plantas que expressam constitutivamente o precursor *AtMIR156a*

**miRNAs:** MicroRNAs

**MS:** Meio de cultura Murashige e Skoog

**RL:** Raízes laterais

**RP:** Raiz principal

**SPL:** Fatores de transcrição *SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like*

**tasi-RNAs:** (*Trans-actin small interferenceRNAs*): pequenos RNAs interferentes de ação em *trans*.

**WT** (*Wild Type*): Plantas selvagens



## LISTA DE FIGURAS

		Pág.
<b>Figura 1.</b>	<b>Biogênese dos miRNAs em plantas.</b> Após a transcrição dos genes <i>MIR</i> (1) num transcrito primário chamado de Pri-miRNA (2), a DCL1 cliva-o e processa-o em pre-miRNA (3) e em um duplex de miRNA (4). Uma vez processado, o duplex é metilado pela HEN1 (5) para ser transportado para o citoplasma pela HST (6). No citoplasma, a ligação de uma das fitas do miRNA no complexo RISC (7) permite o reconhecimento e a clivagem ou a repressão da tradução dos alvos.....	16
<b>Figura 2.</b>	<b>Pareamentos miRNA-alvo em plantas.</b> <b>A:</b> Pareamento canônico, caracterizado por uma região de complementariedade perfeita entre os nucleotídeos 2–13. <b>B:</b> Pareamento Mimicry, caracterizado pela presença de um <i>mismatch loop</i> no sítio de clivagem da AGO, o qual impede a clivagem do mRNA-alvo. <b>C:</b> Exemplo do pareamento Mimicry em arabidopsis, o transcrito <i>IPSI</i> “sequestra” o miR399 permitindo a tradução do alvo <i>*PHOSPHATE2</i> (Franco <i>et al.</i> , 2007).....	17
<b>Figura 3.</b>	<b>A:</b> Classificação da família <i>SPL</i> em arabidopsis. As <i>SPLs</i> não reguladas pelo miR156 estão sublinhadas (Xing <i>et al.</i> , 2010). <b>B:</b> Representação do elemento de resposta ao miR156. Este elemento é uma sequência conservada (em cinza) presente em todas as <i>SPLs</i> reguladas por este miRNA.....	20
<b>Figura 4.</b>	Circuito de regulação miR156/ <i>SPLs</i> em <i>A. thaliana</i> (Chen <i>et al.</i> , 2010). O crescimento está dividido em três estágios: juvenil, adulto e reprodutivo. O sombreamento gradual representa mudanças nos níveis de expressão do miR156 (verde), dos genes <i>SPLs</i> (laranja) e do miR172 (cinza). Setas designam regulação positiva, e linhas com barras indicam regulação negativa.....	22
<b>Figura 5.</b>	Resumo da rota de produção biossintética e estruturas químicas dos precursores e do BL. 1: produção do cicloartenol (precursor dos esteroides vegetais). 2: produção do campesterol, precursor do BL. 3: produção do BL. As setas listradas indicam que, para a produção desses compostos, ocorrem diferentes reações bioquímicas (Clouse, 2011).....	23
<b>Figura 6.</b>	Transdução de sinais dos BRs. Na ausência dos BRs (esquerda), BRI1 está inativa pela ligação com BKI1. BIN2 fosforila e inativa BES1 e BZR1 (transportando-as citoplasma e degradando-as no citoplasma). Na presença dos BRs (direita), BRI1 é ativada ligando-se com BAK1, a qual se dissocia de BKI1. Uma vez que	

	BRI1 é ativada, BSK1/CDG1 são fosforiladas e ativam BSU1. Esta última desfosforila e inativa BIN2, permitindo a ativação de BES1 e BZR1 e, portanto, a modulação dos genes de resposta aos BRs (Hao <i>et al.</i> , 2013).....	24
<b>Figura 7.</b>	Diferentes processos do desenvolvimento vegetal controlados pelo miR156/ <i>SPL</i> e pelos BRs. Os processos que são compartilhados pelas duas vias genéticas estão sublinhados (Clouse, 2011; Chen <i>et al.</i> , 2010).....	30
<b>Figura 8.</b>	Fenótipo das plantas com 30 dias após germinação. A) Planta selvagem (WT); B) miR156-OE; C) Mimicry-156, e D) Mutante com perda de função para o gene <i>BAS1</i> ( <i>bas1-2</i> ).....	34
<b>Figura 9.</b>	Esquema da avaliação do desenvolvimento da raiz. As sementes são colocadas em placas Petri contendo meio MS e mantidas a 4°C no escuro por 48 horas. Posteriormente, as placas são transferidas para câmara de crescimento e mantidas em posição vertical até as plântulas atingirem cinco dias após germinação (DAG). Depois, as plântulas são transferidas para meio MS com ausência (Mock) ou presença de 24-EBL (0,1 nM ou 10 nM) e mantidas por cinco dias adicionais até atingirem 10 DAG.....	36
<b>Figura 10.</b>	Esquema do <i>pulsed stem-loop</i> RT-PCR. Iniciadores específicos <i>stem-loop</i> anelam na porção 3' das moléculas do miRNA maduro, iniciando a transcrição reversa. O miRNA maduro é amplificado utilizando iniciador <i>Forward</i> específico para o miR156 e um iniciador <i>Reverse</i> universal (Kramer, 2011).....	38
<b>Figura 11.</b>	Média do comprimento (mm) da RP e do número de RL de WT, miR156-OE e Mimicry-156 crescidas em MS durante 10 DAG. <b>A:</b> raiz principal, n = 30 réplicas (P-valor < 0,05). <b>B:</b> raízes laterais, n = 50 réplicas (P-valor < 0,05). Valores das médias com mesma letra não diferem estatisticamente segundo Tukey HSD. <b>C:</b> fotografias dos genótipos avaliados (escala: 1 cm).....	42
<b>Figura 12.</b>	Média do comprimento (mm) da RP de WT, miR156-OE e Mimicry-156 crescidas em MS (Mock) e MS + 24-EBL (0,1 nM) 10 DAG. n = 40 réplicas. Letras maiúsculas e minúsculas correspondem respectivamente às comparações entre controles e entre tratamentos e, em vermelho, quando comparado o mesmo genótipo tratado e não tratado. P < 0,05 (interação), valores das médias com mesma letra não diferem estatisticamente segundo Tukey HSD.....	46
<b>Figura 13.</b>	Média do comprimento (mm) da RP e número de RL em WT, miR156-OE e Mimicry-156 crescidas em MS (Mock) e MS + 24-EBL (10 nM) 10 DAG. <b>A:</b> comprimento da RP, n = 24 réplicas. <b>B:</b>	

- número de RL, n = 30 réplicas. Letras maiúsculas e minúsculas correspondem respectivamente às comparações entre controles e entre tratamentos e, em vermelho, quando comparado o mesmo genótipo tratado e não tratado.  $P < 0,05$ . Valores das médias com mesma letra não diferem estatisticamente segundo Tukey HSD (A) e Student T (B)..... 48
- Figura 14.** Comprimento (mm) do hipocótilo de WT, miR156-OE e Mimicry-156 crescidas em MS 5 DAG. **A:** Média do comprimento crescido na luminosidade. n = 45 réplicas. **B:** Média do comprimento crescido no escuro. n = 70 réplicas.  $P < \alpha 0,05$ . Valores das médias com mesma letra não diferem estatisticamente segundo Tukey HSD. **C:** fotografias dos genótipos avaliados tanto na luminosidade (parte superior) quanto no escuro (parte inferior) (escala: 3 mm)..... 51
- Figura 15.** Média do comprimento (mm) do hipocótilo de WT, miR156-OE e Mimicry-156 crescidos em condições de luminosidade 5 DAG. **A:** Ensaio número 1: meios MS e MS+24-EBL (0,1 nM), n = 30 réplicas. **B:** ensaio número 2: meios MS e MS+24-EBL (10 nM), n = 30 réplicas. Letras maiúsculas e minúsculas correspondem respectivamente às comparações entre controles e entre tratamentos e, em vermelho, quando comparado o mesmo genótipo tratado e não tratado.  $P < 0,05$ . Valores das médias com mesma letra não diferem estatisticamente segundo Tukey HSD..... 53
- Figura 16.** Média do comprimento (mm) do hipocótilo de plântulas WT, miR156-OE e Mimicry-156 crescidas em condições de escuro 5 DAG. **A:** Ensaio número 1: meio MS e MS+24-EBL (0,1 nM), n = 60 réplicas. **B:** ensaio número 2: meio MS e MS+24-EBL (10 nM), n = 45 réplicas. Letras maiúsculas e minúsculas correspondem respectivamente às comparações entre controles e entre tratamentos e, em vermelho, quando comparado o mesmo genótipo tratado e não tratado.  $P < 0,05$ . Valores das médias com mesma letra não diferem estatisticamente segundo Tukey HSD..... 54
- Figura 17.** Comprimento celular da raiz de WT, miR156-OE e Mimicry-156 crescidas em MS durante 10 DAG. **A:** média do comprimento celular ( $\mu\text{m}$ ) de células da zona de maturação da raiz principal, n = 400. Valores das médias com mesma letra não diferem estatisticamente segundo teste de Tukey HSD ( $P < 0,05$ ). **B:** fotografias obtidas no microscópio confocal dos diferentes genótipos (Escala 100  $\mu\text{m}$ )..... 57
- Figura 18.** Análise de expressão gênica via *pulsed stem-loop* RT-PCR do miR156 e dos genes *SPLs* regulados por este miRNA em plântulas WT, miR156-OE e Mimicry-156 não tratadas (Mock) e tratadas com 24-EBL..... 60

- Figura 19.** Análise de expressão gênica via *pulsed stem-loop* RT-PCR dos genes da via genética do BL em plântulas WT, miR156-OE e Mimicry-156 não tratadas (Mock) e tratadas com 24-EBL..... 62
- Figura 20.** Modelo do gene *BASI* (3107 bp) de *A. thaliana* indicando o códon de início da tradução (ATG) e o sítio de inserção de T-DNA (indicado por ▼) que gera a perda de função do *BASI*..... 64
- Figura 21.** Média do comprimento (mm) da RP e do número de RL de plântulas WT e *bas1-2* crescidas em MS durante 10 DAG. **A:** raiz principal, n = 30. **B:** raízes laterais, n = 28. Valores das médias com mesma letra não diferem estatisticamente segundo Student T ( $P < 0,05$ )..... 65
- Figura 22.** Comprimento celular da raiz de *bas1-2* e WT crescidas em MS durante 10 DAG. **A:** média do comprimento celular ( $\mu\text{m}$ ) de células da epidermis da zona de maturação da raiz principal, n = 300 células (10 plântulas/genótipo). Valores das médias com mesma letra não diferem estatisticamente segundo teste de Student ( $P < 0,05$ ). **B:** fotografias obtidas com objetivo de 40x no microscópio confocal (Escala 100  $\mu\text{m}$ )..... 66
- Figura 23.** Cruzamentos estabelecidos no presente trabalho. O mutante *bas1-2* foi utilizado como doador de pólen nos cruzamentos realizados com as plantas miR156-OE ♀ (A) e com as plântulas Mimicry-156 ♀ (B)..... 67

## RESUMO

O desenvolvimento vegetal é influenciado por diferentes fatores como os microRNAs (miRNAs) e os fitohormônios, os quais interagem numa complexa rede de regulação. Entre os miRNAs, o miRNA156 (miR156) regula os fatores de transcrição *SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like* (SPL) afetando diferentes processos do desenvolvimento vegetal. Entre os fitohormônios, os brassinosteróides (BRs) participam na regulação dos eventos associados à fase juvenil da planta. A interação miR156/SPL-BRs não é conhecida, pelo qual, este estudo avaliou a interação destas duas vias durante o desenvolvimento juvenil de *Arabidopsis thaliana*. Formação da raiz principal (RP) e número de raízes laterais (RL) bem como o crescimento do hipocótilo foram utilizados como marcadores desta possível interação. Foram utilizadas plantas de *A. thaliana* (Ecotipo Col-0) que expressam constitutivamente o miR156 (miR156-OE), plantas com níveis reduzidos do miR156 (Mimicry-156) e plantas selvagens (WT). Entre os BRs foi escolhido o 24-EpiBrassinolídeo (24-EBL) por ser o BR mais ativo. Plântulas miR156-OE apresentam maior comprimento da RP, maior número de RL e maior sensibilidade aos tratamentos com 24-EBL; fenótipos e comportamento opostos foram observados nas plântulas Mimicry-156. Além disso, plântulas miR156-OE apresentam maior comprimento do hipocótilo, enquanto as plântulas Mimicry-156 apresentam reduzido comprimento. Entre os genes SPLs que respondem ao tratamento com 24-EBL se encontram os SPL2, -3, -4, -5, e -6. Entre os genes da via dos BRs foram observadas alterações na expressão dos genes CPD, BZR1, BES1 e BAS1. Estes dados sugerem que a via genética do miR156/SPL interage com os BRs, e também contribuem para um melhor conhecimento da genética molecular do desenvolvimento de *Arabidopsis*.

**Palavras chaves:** *Arabidopsis thaliana*, miR156, SPLs, Brassinosteróides, Interação gênica.

## ABSTRACT

Plant development is affected by different factors such as micro-RNAs (miRNAs) and phytohormones which interact in a complex regulation network. Among miRNAs, miRNA156 (miR156) regulates *SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like (SPL)* transcription factor family affecting different plant development processes. Among phytohormones, brassinosteroids (BRs) participate in regulation of vegetal juvenile processes. miR156/SPL-BRs interaction is unknown whereby the aim of this work was to evaluate the interaction between those two pathways during *Arabidopsis thaliana* juvenile development. Main root (RP), lateral root number (RL) and hypocotyl length were selected as markers of this interaction. *A. thaliana* (Col-0 ecotype) over-expressing miR156 (miR156-OE), plants with miR156 reduced activity (Mimicry-156) and wild type (WT) plants were used. 24-Epibrassinolide (24-EBL), the most active BRs, was selected. miR156-OE plants have longer RP length, more RL and 24-EBL sensitivity. Opposite phenotypes were observed on Mimicry-156 plants. Besides, miR156-OE plants have longer hypocotyl length while Mimicry-156 plants have shorter. *SPLs* genes, *SPL2*, -3, -4, -5, and -6 responded to 24-EBL treatment. BRs pathway genes, *CPD*, *BZR1*, *BES1* and *BASI* had changes in gene expression. Our data suggest an interaction between the miR156/SPL and BRs pathways and help to understand the molecular genetics of *Arabidopsis* development.

**Key words:** *Arabidopsis thaliana*, miR156, *SPLs*, Brassinosteroids, gene interaction.

## 1. INTRODUÇÃO

As plantas são organismos que, em resposta às condições do ambiente e ao seu próprio desenvolvimento, têm a capacidade de gerar novos órgãos e tecidos ao longo de seu ciclo de vida. Fatores tanto exógenos quanto endógenos determinam o desenvolvimento da planta, afetando a ontogênese e, portanto, o sucesso reprodutivo. Entre os fatores endógenos, um grupo de pequenos RNAs chamados de microRNAs (miRNAs), e os reguladores de crescimento vegetal (fitohormônios), têm sido identificados como controladores centrais do desenvolvimento vegetal que, em conjunto, determinarão a arquitetura da planta (Rubio e Weigel, 2011; Taiz e Zeiger, 2006).

Os miRNAs são uma classe de pequenos RNAs versáteis e não codantes que têm a capacidade de regular pós-transcricionalmente a expressão dos genes-alvos nos organismos, desde humanos até plantas, controlando muitos aspectos das funções celulares (Zhang *et al.*, 2006; Pillai, 2005). Os miRNAs foram primeiramente descritos em animais e posteriormente em plantas (Reinhart *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 1993) e, a partir destas descobertas, vários avanços foram feitos visando o melhor entendimento da sua biogênese, modo de ação e efeitos biológicos. Estes avanços mostraram que os miRNAs estão envolvidos em redes de regulação gênica e afetam uma variedade de processos de desenvolvimento e metabolismo celular (Zhao *et al.*, 2010; Nogueira *et al.*, 2007; Bartel, 2004). Um exemplo destas redes regulatórias inclui o miRNA156 (miR156) e seus alvos, os fatores de transcrição do tipo *SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like (SPL)*, os quais têm sido estudados pela regulação de diversos processos do desenvolvimento vegetal (Silva *et al.*, 2014; Ortiz-Morea, 2013; Chen *et al.*, 2010).

Em plantas, os miRNAs desempenham funções importantes em vários aspectos do desenvolvimento (Nogueira *et al.*, 2007); no entanto, eles não agem sozinhos, pois estão imersos em complexas vias que incluem interações com fitohormônios (Liu e Chen, 2009). Entre os fitohormônios, os brassinosteróides (BRs) atuam como reguladores do crescimento vegetal, estimulando a divisão e alongação celular nos tecidos jovens da planta (Fridman e Savaldi, 2013; Clouse, 2011). A relação miR156/*SPL* e BRs durante o desenvolvimento vegetal ainda não é conhecida. Portanto, estudos da relação entre miRNAs e fitohormônios podem auxiliarna elucidaçãodas bases genéticas e moleculares das interações desses reguladores nos processos de desenvolvimento vegetal. Além disso, melhor conhecimento da interação entre miRNAs e fitohornônios pode ser útil em programas de melhoramento, visando aobtenção de plantas com aumento na produção em culturas de importância econômica. O presente trabalho apresenta os dados iniciais obtidos da interação miR156/*SPL* e BRs durante o desenvolvimento juvenil de *A. thaliana*, como um aporte ao conhecimento das redes de interação miRNAs-fitohormônios durante o desenvolvimento vegetal.



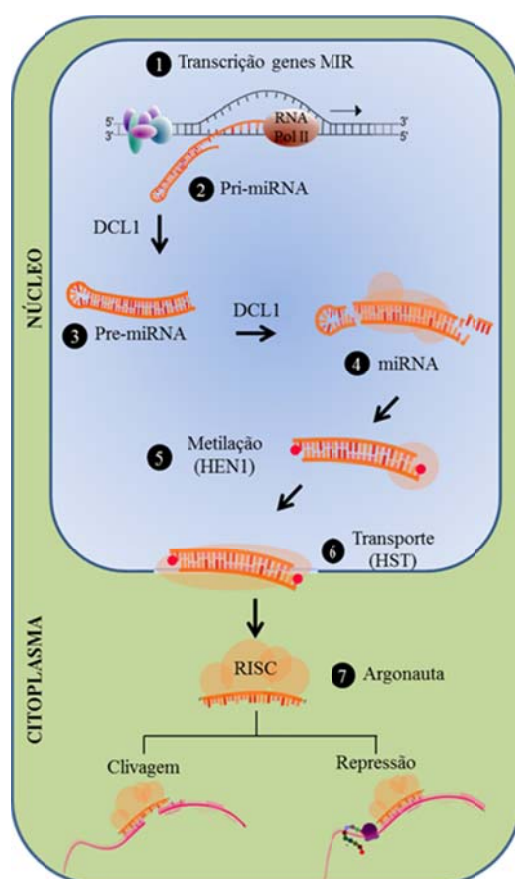
## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Os microRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas endógenas de RNA fita simples não codante que têm entre 21-24 nucleotídeos de comprimento (Axtell, 2013). Primeiramente identificados em animais (Lee *et al.*, 1993), estas moléculas são reconhecidas como agentes que regulam a expressão gênica da maioria dos genomas eucarióticos, a partir de controle transcricional e pós-transcricional. (Saumet e Lecellier, 2006). Em plantas, os miRNAs se encontram envolvidos em diferentes redes de regulação gênica, afetando uma variedade de processos do desenvolvimento e metabolismo celular (Rubio e Weigel, 2011).

Segundo Chen (2009), o processo de formação dos miRNAs em plantas começa com a transcrição dos genes *MIR* pela RNA polimerase II, gerando transcrito primário denominado *pri-miRNA*. Esta molécula forma estrutura secundária chamada de *hairpin* que é reconhecida pela enzima Dicer-Like1 (DCL1), uma RNase tipo III, que o processa numa molécula menor denominada *pre-miRNA*. O *pre-miRNA*, por sua vez, é processado no duplex miRNA-miRNA pela DCL1, em conjunto com outras enzimas. Este duplex é metilado pela enzima HEN1 (*HUA ENHANCER 1*) e é transportado do núcleo para o citoplasma pela enzima HST (*HASTY 1*). No citoplasma, uma das fitas do duplex miRNA-miRNA é incorporada na proteína AGO1 (*ARGONAUTA1*), dentro do Complexo de Silenciamento via interferência por RNA (RISC), que reconhece o seu alvo pela complementariedade de bases, clivando-o ou inibindo sua tradução (Figura 1). Em plantas, esta complementariedade, chamada de pareamento canônico (Figura 2a), geralmente é extensiva, isto é, poucos *mismatches* ocorrem entre o alvo e o miRNA. Os *mismatches* em geral ocorrem nas extremidades 5' ou 3' do

miRNA, com uma região crítica entre os nucleotídeos 2-13 de complementariedade perfeita (Axtell, 2013).

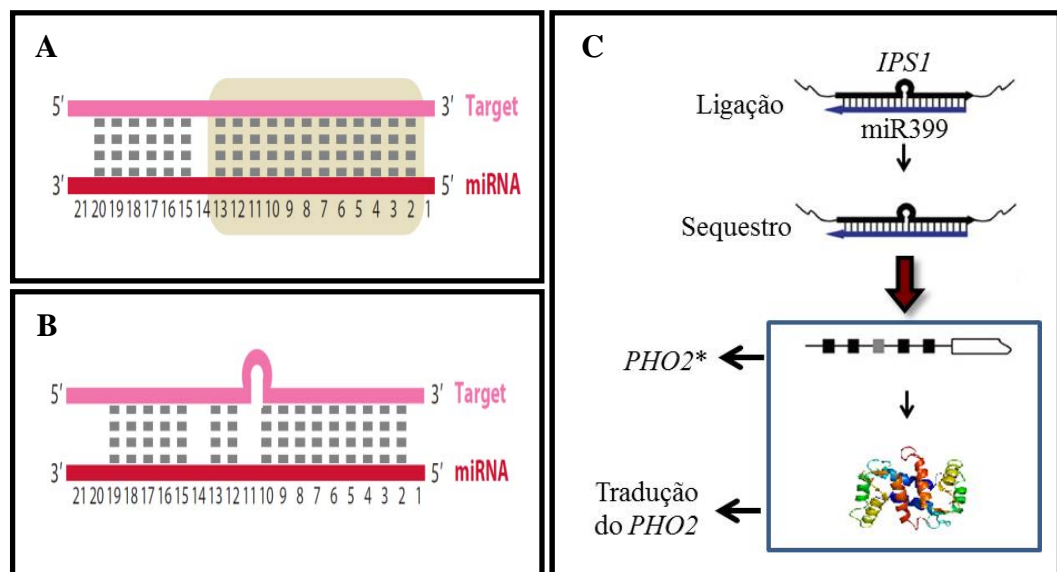


**Figura 1. Biogênese dos miRNAs em plantas.** Após a transcrição dos genes *MIR* (1) num transcrito primário chamado de Pri-miRNA (2), a DCL1 cliva-o e processa-o em pre-miRNA (3) e em um duplex de miRNA (4). Uma vez processado, o duplex é metilado pela HEN1 (5) para ser transportado para o citoplasma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

### 2.1.1 Mecanismos de regulação dos alvos pelos miRNAs

Existem vários mecanismos de repressão do RNA alvo. Em geral, uma vez identificado o alvo pelo miRNA, o mRNA é clivado pela atividade da AGO1, geralmente nas posições 10 e 11 do pareamento miRNA::mRNA. Este tipo de regulação é chamado de regulação pós-transcricional. No entanto, é conhecido que o mecanismo de regulação também pode ser ao nível da tradução (Gandikota *et al.*, 2007). Embora a regulação pós-transcricional tenha o papel central nas funções dos miRNAs, outros mecanismos envolvem modificações da cromatina, e desencadeamento de produção de pequenos RNAs interferentes ou *siRNAs* (Marin *et al.*, 2010).

Outro tipo de pareamento chamado de Mimicry, não muito comum em plantas, caracteriza-se pela presença de um *mismatch loop* entre as posições 10 – 12 do pareamento entre o miRNA e RNA-alvo. Este *mismatch* forma uma "protuberância" ou *bulge* que impede o corte do RNA-alvo pela AGO e, portanto, "sequestra" o miRNA. Um exemplo encontrado naturalmente em arabisopsis é o transcrito *INDUCED BY PHOSPHATE STARVATION1 (IPS1)*. Este transcrito não codante tem complementariedade com o miR399 pelo qual ocorre pareamento sem clivagem e, portanto, o "sequestro" desse miRNA (Figura 2C), trazendo como consequência a não regulação do seu gene-alvo, o *PHOSPHATE 2 (PHO2)* (Franco *et al.*, 2007).



**Figura 2. Pareamentos miRNA-alvo em plantas.** **A:** Pareamento canônico, caracterizado por uma região de complementariedade perfeita entre os nucleotídeos 2–13. **B:** Pareamento Mimicry, caracterizado pela presença de um *mismatch loop* no sítio de clivagem da AGO, o qual impede a clivagem do mRNA-alvo. **C:** Exemplo do pareamento Mimicry em arabisopsis, o transcrito *IPS1* “sequestra” o miR399 permitindo a tradução do alvo *\*PHOSPHATE2* (Franco *et al.*, 2007).

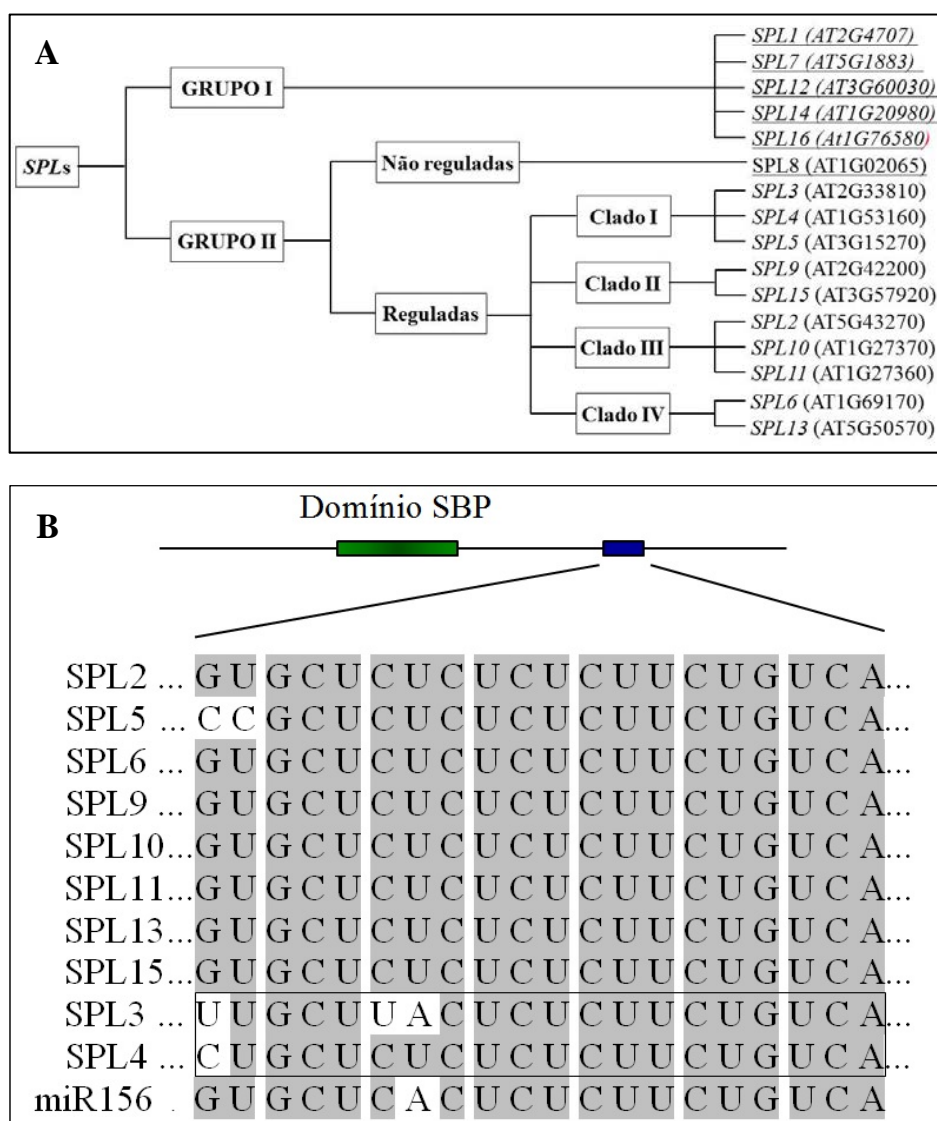
### 2.1.2 O miRNA156 e os seus alvos no desenvolvimento vegetal

Os miRNAs, como um subconjunto de pequenos RNAs não codantes, podem ser conservados ou linhagem específico. Os primeiros estão presentes entre muitas espécies ou famílias de plantas demonstrando que, a relação miRNA/alvo tem sido estável por longos períodos de tempo na evolução das plantas (Axtell, 2013). Os segundos são encontrados somente em uma espécie ou em um grupo de espécies relacionadas (Fahlgren *et al.*, 2010). Entre os miRNAs altamente conservados encontram-se o miR156, expresso tanto em monocotiledôneas quanto em eudicotiledôneas (Xie *et al.*, 2012).

Os genes alvo do miR156, membros da família *SQUAMOSA Promotor-binding Protein-like* ou *SPL*, codificam fatores de transcrição encontrados somente em plantas (Chen *et al.*, 2010). A característica fundamental desta família é o domínio SBP (*SQUAMOSA Binding Protein*) de 76 aminoácidos de comprimento, o qual é responsável pela ligação ao DNA (Cardon *et al.*, 1999). Em *Arabidopsis*, esta família é composta por 16 genes *SPL* (*SPL1-16*) os quais estão divididos em dois grupos (Figura 3A). O primeiro grupo está representado pelas *SPLs*, *SPL1/7/12/14/16*, os quais consistem de dez ou mais exons e codificam proteínas com um tamanho superior a 800 aminoácidos (aa). O segundo grupo representa os 12 genes *SPLs* restantes, com dois ou quatro exons que codificam para proteínas com menos da metade do tamanho das *SPLs* do primeiro grupo (Riese *et al.*, 2008). O grupo das *SPLs* reguladas pelo miR156 são por sua vez divididas em quatro clados. O clado I, composto pelas *SPLs* 3, 4, e 5, corresponde àquele com proteínas de menor tamanho molecular (131-181 aa), as quais participam na formação dos tecidos foliares em *Arabidopsis*. Os clados restantes são proteínas de tamanho intermediário (~400 aa) que controlam o formato da folha (clado II), forma da lâmina foliar (clado III) e imunidade e desenvolvimento da plântula (clado IV). Com a exceção do *SPL8*, todos os

membros do segundo grupo possuem um elemento de resposta ao miR156 e estão, portanto, sujeitos à regulação pós-transcricional por este miRNA (Xing *et al.*, 2010). Este elemento de resposta, altamente conservado em *Arabidopsis*, está localizado *downstream* ao domínio SBP na maioria das *SPLs* (Figura 3B), com a exceção da *SPL3* e *SPL4*, nas quais o têm na região 3'UTR (Sunkar, 2012; Gandikota *et al.*, 2007).

A interação do miR156 com os fatores de transcrição *SPL* define uma via genética de regulação de numerosos e importantes processos no crescimento e desenvolvimento vegetal (Chen *et al.*, 2010). Nesta regulação, dois cenários contrastantes em *Arabidopsis* permitiram concluir a importância desta via genética no desenvolvimento vegetal. No primeiro, a expressão constitutiva do miR156 e, portanto, a regulação negativa e constitutiva das *SPLs*, tem como consequência mudanças no fenótipo, caracterizadas principalmente pelo aumento no número de folhas, perda de dominância apical e floração tardia (Wu e Poethig, 2006; Schwab *et al.*, 2005). No cenário oposto, a repressão do miR156 gera plantas com menor número de folhas e com características fenotípicas associadas à fase adulta como lamina serrada, presença de tricomas e menor número de folhas (Franco *et al.*, 2007).

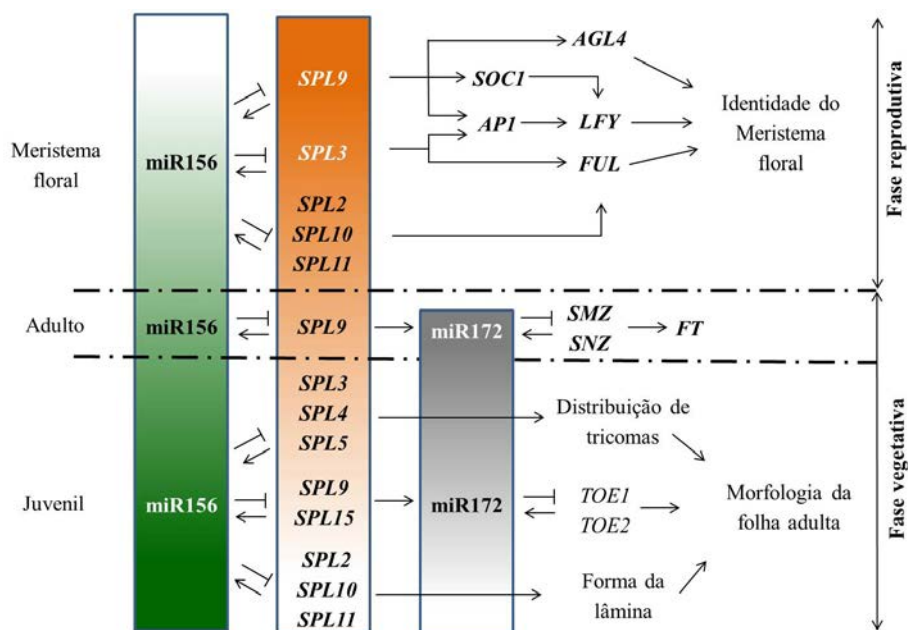


**Figura 3.A:** Classificação da família *SPL* em arabidopsis. As *SPLs* não reguladas pelo miR156 estão sublinhadas (Xing *et al.*, 2010). **B:** Representação do elemento de resposta ao miR156. Este elemento é uma sequência conservada (em cinza) presente em todas as *SPLs* reguladas por este miRNA.

Os estudos mencionados anteriormente demonstraram a importância geral da via genética miR156/*SPL* no desenvolvimento vegetal. No entanto, estudos mais específicos revelaram que esta via age em diferentes processos como desenvolvimento do ovário e frutos (Silva *et al.*, 2014), resposta ao estresse abiótico (Cui *et al.*, 2014; Stiefel *et al.*, 2014), regulação da transição da fase juvenil-adulta (Wang *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009), redução na dominância

apical (Chuck *et al.*, 2007; Schwab *et al.*, 2005), regulação do *plastocron* (Jiao *et al.*, 2010), desenvolvimento de tricomas (Xue *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2010), menor produção de pólen (Xing *et al.*, 2010), desenvolvimento embrionário (Nodine e Bartel, 2010), e biossíntese de antocianina (Gou *et al.*, 2011). Portanto, estes estudos demonstram que, além de conservada, a via genética *miR156/SPL* é uma via central no desenvolvimento vegetal.

Em *arabidopsis*, os genes *SPL* são expressos em diferentes tecidos e estágios do desenvolvimento (Figura 4). Por exemplo, durante o desenvolvimento foliar, oito genes são necessários para a apropriada formação; entre esses, os genes *SPL3*, *-4* e *-5* regulam a distribuição de tricomas e o número e tamanho celular na folha (Usami *et al.*, 2009). A forma da lâmina foliar é controlada pelas *SPL10*, *-11* e *-2* (Shikata *et al.*, 2009), e o formato da folha pelas *SPL9* e *-15* (Usami *et al.*, 2009). Durante a mudança de fase, a expressão do *miR156* diminui enquanto que, a expressão dos genes *SPLs* atinge seu nível mais elevado. O gene *SPL9* de *arabidopsis* se liga diretamente ao promotor de outro miRNA, o *miR172*, e ativa a sua transcrição. Este miRNA regula a expressão dos fatores de transcrição do tipo *APETALA2 (AP2)*, *TARGET OF EAT 1 (TOE1)* e *TOE2*, os quais reprimem as características adultas na epiderme foliar. Quando o *miR172* é ativado pela *SPL9*, são reprimidos os fatores de transcrição *SCHLAFMUTZE (SMZ)* e *SCHLAFNUTZE (SNZ)*, trazendo como consequência a ativação do *FLOWERING LOCUS T (FT)*. *FT* é o ativador do processo de floração, permitindo a indução da fase reprodutiva (Benlloch *et al.*, 2007). Uma vez que o meristema floral é estabelecido, o gene *SPL9* junto com *SPL2*, *SPL3*, *SPL10*, *SPL11* promove a identidade do meristema floral pela regulação direta dos genes *FUL (FRUITFUL)*, *API (APETALA1)*, *SOC1 (SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1)*, *LFY (LEAFY)*, e *AGL42 (AGAMOUS-LIKE 42)* (Wang *et al.*, 2009; Yamaguchi *et al.*, 2009) (Figura 4).



**Figura 4.** Circuito de regulação miR156/SPL em *A. thaliana* (Chen *et al.*, 2010). O crescimento está dividido em três estágios: juvenil, adulto e reprodutivo. O sombreamento gradual representa mudanças nos níveis de expressão do miR156 (verde), dos genes SPLs (laranja) e do miR172 (cinza). Setas designam regulação positiva, e linhas com barras indicam regulação negativa.

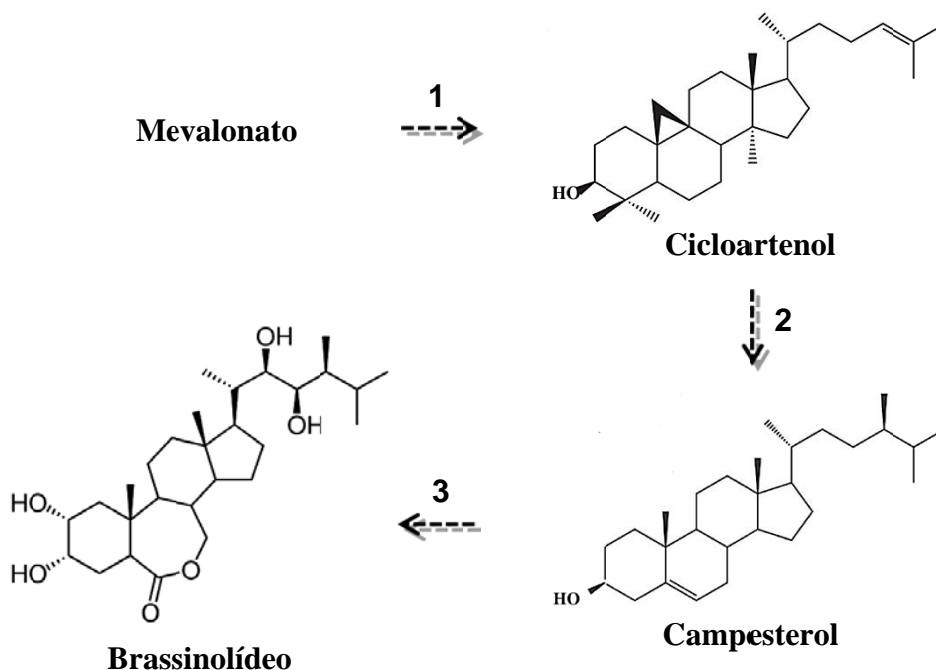
## 2.2 Os fitohormônios (Brassinosteróides)

Além dos miRNAs, como importantes fatores endógenos que determinam o crescimento e o desenvolvimento do corpo vegetal, os fitohormônios constituem uma peça chave na fisiologia e genética das plantas. Entre estes se encontram os brassinosteróides (BRs), uma família de compostos esteroidais essenciais para o normal crescimento e desenvolvimento vegetal (Clouse, 2011). Estes compostos, isolados pela primeira vez a partir do pólen de *Brassica napus* (Grove *et al.*, 1979), estão distribuídos por todo o reino vegetal, e caracterizam-se, por possuírem uma estrutura química esteroide e por estimularem a divisão e o alongamento celular nos tecidos jovens da planta (Fujioka e Sakurai, 1997).



### 2.2.1 Biossíntese dos BRs

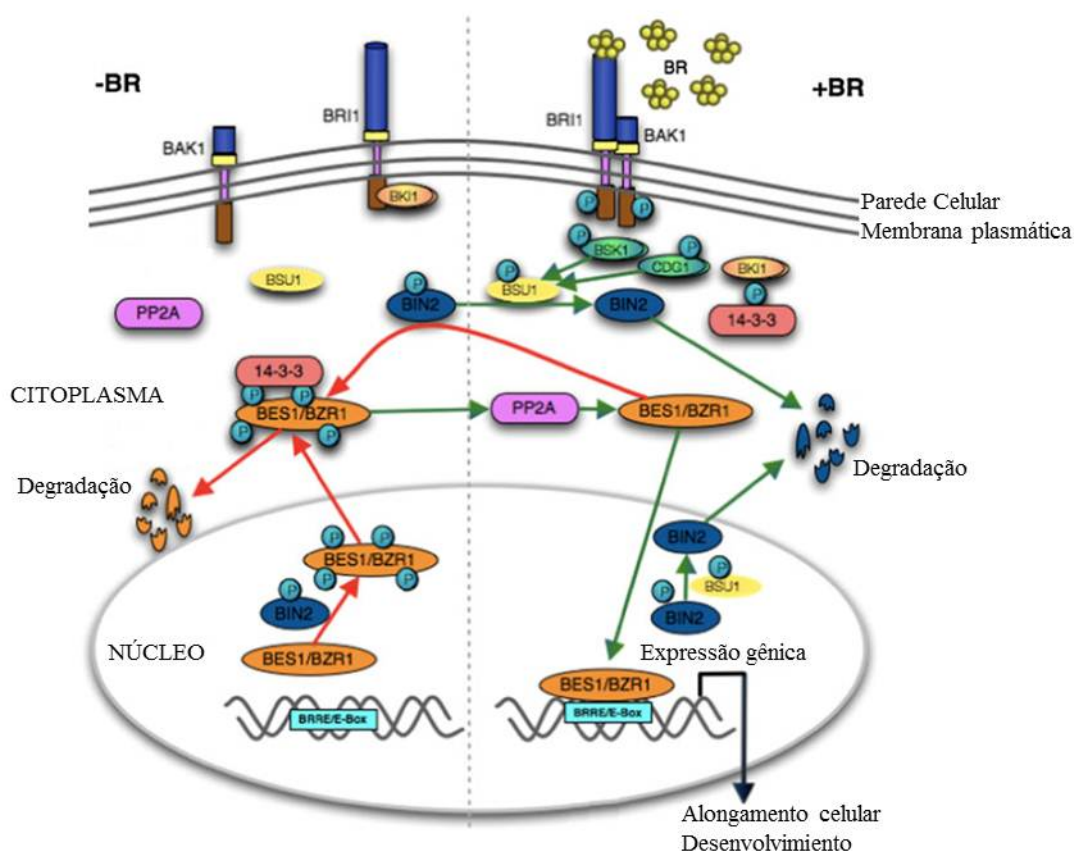
A biossíntese dos BRs ocorre em todos os órgãos da planta. No entanto, estes compostos são sintetizados mais ativamente nos tecidos jovens, tendo um efeito marcante durante o crescimento ativo (Shimada *et al.*, 2003). Em geral, a rota de biossíntese dos BRs tem três passos que desencadeiam a produção biossintética do brassinolídeo (BL), o membro da família dos BRs com maior atividade hormonal. De uma forma bem resumida, a biossíntese de BL é apresentada na Figura 5. No primeiro passo, a biossíntese do **cicloartenol** (o precursor dos esteroides em plantas) a partir de mevalonato; no segundo, a produção do **campesterol**, o precursor do BL, a partir do cicloartenol; e no terceiro passo ou rota específica do **BL**, ocorre a produção final do BL a partir do campesterol (Figura 5).



**Figura 5.** Resumo da rota de produção biossintética e estruturas químicas dos precursores e do BL. 1: produção do cicloartenol (precursor dos esteroides vegetais). 2: produção do campesterol, precursor do BL. 3: produção do BL. As setas listradas indicam que, para a produção desses compostos, ocorrem diferentes reações bioquímicas (Clouse, 2011).

## 2.2.2 Transdução de sinais dos BRs

Uma vez produzidos, os BRs se ligam diretamente ao receptor *BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1 (BRI1)* na superfície da membrana celular e ativam uma cascata de transdução de sinais que leva à ativação de dois fatores de transcrição, o *BRASSINAZOLE-RESISTANT1 (BZR1)* e *BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1 (BES1)*, este último também conhecido como *BZR2* (Figura 6). Estes dois fatores de transcrição regulam diretamente a expressão de genes de resposta aos BRs (Hao *et al.*, 2013).



**Figura 6.** Transdução de sinais dos BRs. Na ausência dos BRs (esquerda), BRI1 está inativa pela ligação com BKI1. BIN2 fosforila e inativa BES1 e BZR1 (transportando-as citoplasma e degradando-as no citoplasma). Na presença dos BRs (direita), BRI1 é ativada ligando-se com BAK1, a qual se dissocia de BKI1. Uma vez que BRI1 é ativada, BSK1/CDG1 são fosforiladas e ativam BSU1. Esta última desfosforila e inativa BIN2, permitindo a ativação de BES1 e BZR1 e, portanto, a modulação dos genes de resposta aos BRs (Modificado de Hao *et al.*, 2013).

### 2.2.3 Metabolismo dos BRs

O metabolismo dos BRs está acompanhado pela perda de atividade e diminuição nos níveis dos BRs. Alguns experimentos tem demonstrado que, ao nível bioquímico, podem ocorrer diferentes reações metabólicas como epimerização, hidroxilação e esterificação, entre outras, modificando a estrutura da molécula e, assim, inibindo a função dos BRs (Fujioka e Yokota, 2003). No entanto, estudos têm demonstrado que o gene *BASI*, um membro da família das Citocromo P450, é o responsável direto pela inativação dos BRs (Neff *et al.*, 1999). A inativação dos BRs ocorre pela adição de um grupo hidroxílico no carbono 26 da molécula do BL ou da castasterona (CS), o precursor imediato do BL, gerando o 26-hidroxibrassinolídeo (26-OH-BL) ou 26-hidroxicastasterona (26-OH-CS), moléculas funcionalmente inativas (Clouse, 2011).

Assim como a presença do BL interfere na elongação e divisão celular, sua ausência pode afetar muitos processos do desenvolvimento (Friedrichsen e Chory, 2001). Mutações nos genes envolvidos na biossíntese, sinalização ou homeostase dos BRs, revelaram a importância destes no desenvolvimento vegetal. Por exemplo, mutação no gene *BRI1*, que codifica o receptor de membrana dos BRs, gera mutantes insensíveis aos BRs. Isto traz como consequência fenótipos alterados, principalmente caracterizados por folhas arredondadas e verdes escuras, fertilidade reduzida, desenvolvimento vascular alterado e, especialmente, nanismo extremo (Clouse *et al.*, 1996). Mutações nos genes envolvidos na biossíntese do BRs geram como consequências mutantes deficientes caracterizados por nanismo, desenvolvimento vascular anormal, folhas verde-escuras, floração atrasada, fertilidade masculina reduzida, germinação reduzida e de-estiolamento. Entretanto, o fenótipo selvagem nos mutantes deficientes pode ser resgatado pela aplicação exógena do BL (Clouse, 2011).

Além das mutações nos genes envolvidos na biossíntese ou na sinalização dos BRs, mutações nos genes envolvidos no metabolismo dos BRs demonstraram a importância deste grupo de fitohormônios no desenvolvimento vegetal (Neff *et al.*, 1999). No metabolismo ou homeostase dos BRs, o mutante com ganho de função *Bas1* acumula 26-hidroxi brassinolídeo. O fenótipo destas plantas é semelhante ao fenótipo dos mutantes insensíveis ou deficientes ao BL. O mecanismo molecular neste mutante é a superexpressão do gene *BAS1* e, portanto, a hidroxilação e inatividade dos BRs. No cenário oposto, o mutante com perda de função, para este gene (*bas1-2*), tem como consequências a não hidroxilação dos BRs e, portanto, a alteração nos níveis endógenos dos BRs. Estudos com os mutantes com ganho e perda de função do gene *BAS1* demonstraram a importância da homeostase dos BRs no desenvolvimento vegetal (Thornton *et al.*, 2010; Turk *et al.*, 2005).

#### **2.2.4 Os Brassinosteróides no desenvolvimento vegetal**

Dois mecanismos básicos dos BRs têm sido estudados como os mais importantes modos de ação dos BRs em *arabidopsis*: alongamento e divisão celular. O alongamento celular, um processo crítico no crescimento e diferenciação em todos os órgãos da planta, é controlado por mudanças coordenadas nas propriedades mecânicas da parede celular, na hidráulica celular, nos processos bioquímicos e de expressão gênica (Cosgrove, 1997). Um modelo proposto do mecanismo de ação dos BRs no alongamento celular é a regulação da síntese e atividade das enzimas que modificam a parede celular, tal como, endo-trasglicosilase/hidrolase (XTHs), gluconasas, expansinas, sacarose-sintase e celulose-sintase (Clouse, 2011). A promoção da expansão celular, através da expressão de genes regulados pelos BRs, e que estão envolvidos nas modificações da parede celular, biossíntese de celulose, transporte de água e íons, e rearranjos do citoesqueleto, tem sido demonstrada em estudos genéticos e

análises globais de expressão gênica por *microarrays* (Kim e Wang, 2010; Vert *et al.*, 2005). Muitos desses genes têm sido demonstrados como alvos diretos dos fatores de transcrição *BZR* e *BES1* (Xie *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2010). Além das alterações na configuração da parede celular, os BRs podem afetar o transporte de água, via aquaporinas, e a atividade de uma H<sup>+</sup>-ATPase do vacúolo, os quais estão associados com o alongamento celular (Morillon *et al.*, 2001). Outros estudos sugerem que os BRs promovem a hiperpolarização da membrana e o alongamento celular pela interação da *BRI1* com ATPase na membrana plasmática (Caesar *et al.*, 2011).

Durante a divisão celular foi demonstrado o efeito dos BRs em culturas de células de parênquima de *Helianthus tuberosus* (Clouse e Zurek, 1991), e de protoplastos do repolho chinês e de petúnia (Oh e Clouse, 1998). Um importante papel dos BRs foi observado em suspensão celular de plantas do mutante *det2* de *Arabidopsis*, quando a mesma foi tratada com 24-epibrasinolídeo. Observou-se incremento nos níveis de transcritos do gene que codifica para a proteína *CycD3* em *Arabidopsis* (Hu *et al.*, 2000). *CycD3* é uma proteína envolvida na regulação da transição G1/S durante o ciclo celular e, segundo Sun *et al.* (2010), este gene, junto com outros genes que codificam para ciclinas e quinases dependentes de ciclinas, são genes regulados por BRs e alvos diretos do fator de transcrição *BZR1*.

### **2.3 Interação miRNAs e fitohormônios**

Além dos miRNAs como moléculas endógenas de regulação da expressão gênica, e dos fitohormônios como reguladores do crescimento e desenvolvimento vegetal, um aspecto de grande importância é a interação entre esses grupos e sua ação nas plantas. Os fitohormônios controlam a maioria, se não todos, os estágios do desenvolvimento vegetal, e os miRNAs, especialmente os

conservados, controlam mais do que um processo do desenvolvimento (Curaba *et al.*, 2014). Evidência de uma conexão funcional entre miRNAs e fitohormônios é mostrada pelo fenótipo das plantas mutantes *hyll* (*HYPONASTIC LEAVES* ou *HYL1*). *HYL1* é um importante regulador da biogênese dos miRNAs, e a versão alterada deste gene exibe efeitos pleiotrópicos no desenvolvimento da planta, tais como níveis reduzidos dos miRNAs e sensibilidade anormal aos fitohormônios ácido abscísico (ABA), auxinas e citocininas (Han *et al.*, 2004).

Pesquisas visando entender a conexão miRNAs/fitohormônios têm demonstrado que vários miRNAs estão envolvidos nesta interação. Por exemplo, o miR396, regulador negativo da família de genes *GRF* (*GROWTH RESPONDING FACTOR*) (Liu *et al.*, 2008), foi identificado como repressor das vias de sinalização de ácidos giberélicos (GA) e de citocininas, e como promotor das respostas ao ABA (Hewezi *et al.*, 2012). Os miRNAs miR160 e miR167 participam nas vias de resposta a auxina, por meio da regulação de alguns genes *ARFs* (*Auxin Response Factors*) (Mallory *et al.*, 2005). Os miRNAs miR160 e miR167 e miR319, reguladores negativos dos fatores de transcrição *NAC* e *TCP*, respectivamente, estão envolvidos no desenvolvimento de órgãos laterais. O miR319 é um regulador positivo das sinais de auxina (Kant *et al.*, 2009; Tian, 2002), e um regulador negativo indireto da biossíntese de GA (Yanai *et al.*, 2011)

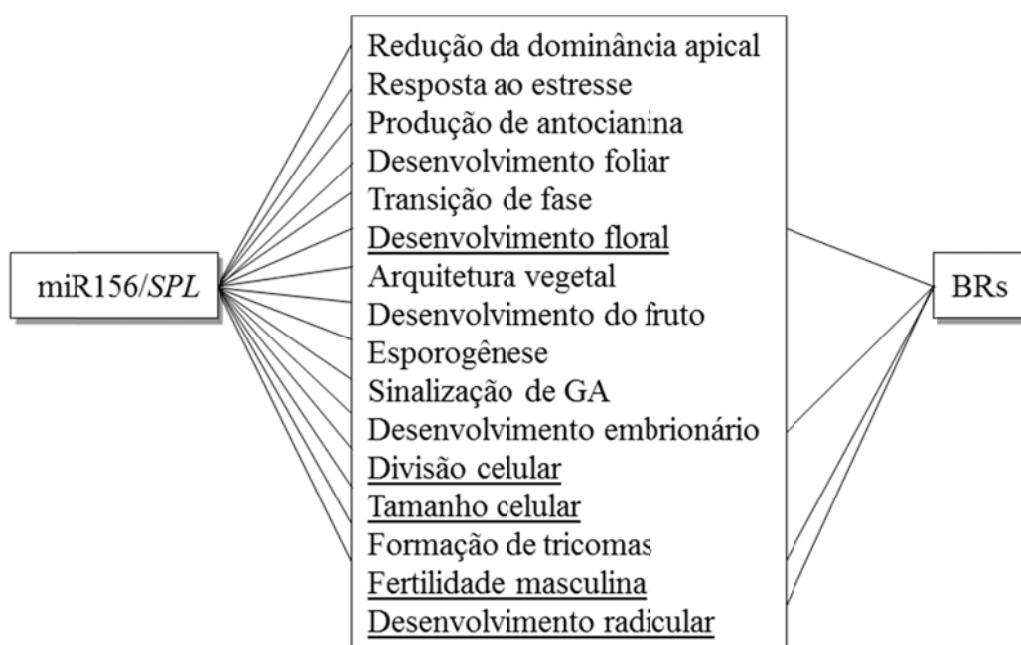
O miR390, ligado à sinalização de auxina, participa na biogênese de um grupo de pequenos de RNAs não codantes chamados de *Trans-actin small interferenceRNAs* ou *tasi-RNAs*. A interação entre o miR390 e os *tasi-RNAs*, especificamente o *TAS3*, define uma rede de sinalização da auxina, por meio da regulação dos genes *ARF2*, *ARF3* e *ARF4* (Nogueira *et al.*, 2009, 2007; Adenot *et al.*, 2006; Fahlgren *et al.*, 2006). Um dos miRNAs conservados, o miR159 que

regula negativamente a família de fatores de transcrição codificados pelos genes *MYB* ou *GAMYB-like*, constitui uma conexão entre os hormônios GA, ABA e etileno. Com GA, o miR159 afeta a expressão espaço-temporal dos genes *MYB* para controlar a extensão de tecidos; com o ABA regula a dormência e germinação das sementes (Reyes e Chua, 2007). Entretanto, com o etileno, ainda não é muito conhecida a interação com o miR159 (Curaba *et al.*, 2014).

Outros dois miRNAs altamente conservados e envolvidos num módulo que controla o tempo de transição da fase juvenil para a reprodutiva são o miR156 e o miR172. A regulação de ambos está intimamente ligada e sua expressão é afetada pela idade da planta, temperatura e luminosidade. No entanto, a interação desses miRNAs com fitohormônios ainda não é muito bem conhecida (Curaba *et al.*, 2014). Recentemente foi demonstrado que GA promove a floração em *arabidopsis* através de uma rota dependente do miR156. GA são conhecidos por promoverem a transição floral por meio da degradação dos repressores da transcrição como DELLA. Varias proteínas DELLA interagem com as *SPLs*, reprimindo-as. A degradação, mediada por GA, das proteínas DELLA permite a ativação, mediada pelas *SPLs*, do miR172 e de genes de identidade floral (Yu *et al.*, 2012). O controle das DELLA, regulado pela presença de GA afetando diretamente a atividade das *SPLs* e do miR172, não é o único exemplo da interação entre o módulo miR156/miR172 e os fitohormônios. O nível do miR156 diminui em resposta ao tratamento com auxina em raízes de *arabidopsis* (Marin *et al.*, 2010), e sua superexpressão em arroz gera maior número de raízes adventícias (Xie *et al.*, 2012). Isto sugere que os sinais de auxina podem afetar o desenvolvimento da raiz por meio da via genética miR156/*SPL*.

A interação do miR156/*SPL* com os brassinosteróides ainda não é conhecida. No entanto, o fato deles compartilharem alguns processos do

desenvolvimento vegetal (Figura 7) é uma possível evidência de sua interação. Tanto o miR156 quanto os BRs são reguladores centrais do desenvolvimento, e uma possível interação entre estas duas vias de regulação pode ocorrer. Para iniciar as investigações sobre a possível interação entre a via miR156/SPL e BRs, a formação do sistema radicular e crescimento do hipocótilo foram utilizados no presente trabalho como marcadores biológicos em *A. thaliana*.



**Figura 7.** Diferentes processos do desenvolvimento vegetal controlados pelo miR156/SPL e pelos BRs. Os processos que são compartilhados pelas duas vias genéticas estão sublinhados (Clouse, 2011; Chen *et al.*, 2010).



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a interação da via genética do miR156/*SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like* com os brassinosteróides (BRs) durante o desenvolvimento juvenil de *Arabidopsis thaliana*.

#### 3.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar a formação do sistema radicular e do hipocótilo em plântulas com a via do miR156/*SPL* alterada.
2. Avaliar a formação do sistema radicular e do hipocótilo em plântulas como a via genética miR156/*SPL* alterada, na presença e na ausência de BRs.
3. Identificar os possíveis genes da via dos BRs que são regulados pela via miR156/*SPL*
4. Identificar os possíveis genes da via miR156/*SPL* que são regulados pelo tratamento com BRs

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos e demais atividades, referentes ao desenvolvimento do presente trabalho, foram realizados no laboratório de Genética Molecular do Desenvolvimento Vegetal, no Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" UNESP, Campus de Botucatu (São Paulo, Brasil).

### 4.1 Material vegetal

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

**4.1.1 Plantas que expressam constitutivamente o precursor *AtMIR156a* (plantas *miR156-OE*).** Estas plantas foram modificadas geneticamente por Wu e Poethig (2006) e caracterizam-se por possuir inserido, dentro do genoma, o precursor do *AtMIR156a* sob o controle transcricional do promotor constitutivo do vírus do mosaico da couve flor (CaMV-35S). Em resposta à expressão constitutiva deste precursor, estas plantas, em comparação com o genótipo selvagem (Figure 8A), apresentam menor tamanho, maior número de folhas, *plastocron* mais curto, perda de dominância apical, e floração tardia (Figura 8B).

**4.1.2. Plantas com níveis reduzidos do *miR156* "livre" (Mimicry-156).** Estas plantas foram modificadas geneticamente por Franco *et al* (2007) e caracterizam-se por conter uma inserção, no seu genoma, do gene não-codante *IPS1* (*Induced by Phosphate Starvation1*) de *Arabidopsis* sob o controle do promotor CaMV-

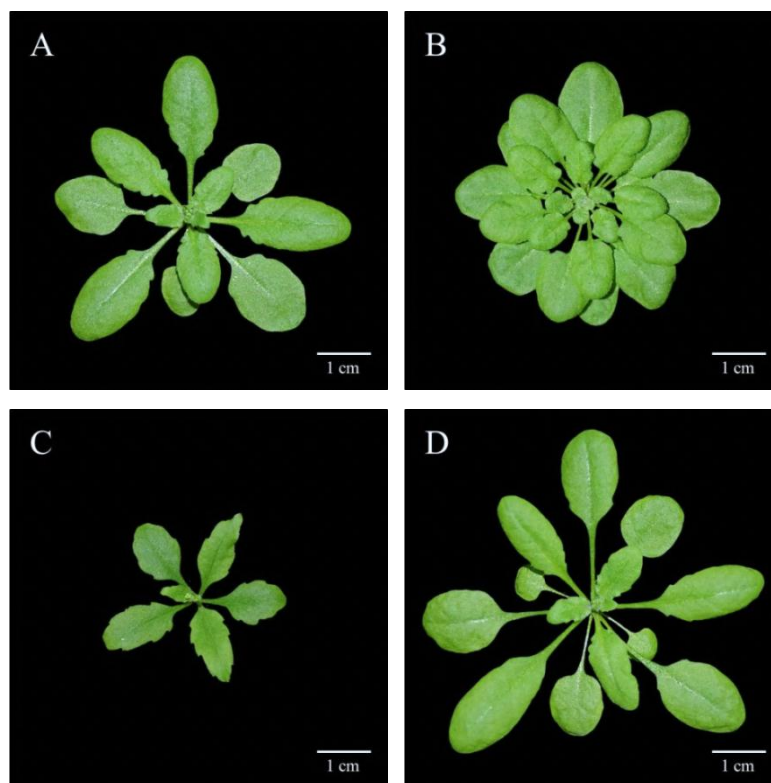
35S. Esse gene *IPSI* foi modificado e possui uma sequência complementar ao miR156. Entretanto, esta complementariedade é interrompida por um “*mismatched loop*” no sítio de clivagem da proteína AGO1, impedindo a clivagem do *IPSI* modificado, "sequestrando" assim a molécula do miR156 e, portanto, inibindo a função deste miRNA. O transcrito *IPSI* modificado funciona nestas plantas como uma "esponja", retendo moléculas de miR156 e consequentemente reduzindo sua disponibilidade de induzir o silenciamento pós-transcricional dos genes *SPLs*. Como resultado, os genes *SPLs* são dereprimidos nestas plantas. As plantas Mimicry-156 caracterizam-se por possuírem menor número de folhas e *plastocron* mais longo (Figura 8C).

**4.1.3. Plantas com perda de função para o gene *BAS1* (*bas1-2*).** Este mutante foi gerado por Alonso *et al.* (2003) e caracteriza-se por conter uma inserção de T-DNA (SALK\_006781) no códon 387 do gene *BAS1*, causando a perda de função deste gene. Fenotipicamente, este mutante se diferencia em relação ao fenótipo selvagem por ter o hipocótilo mais comprido (Turk *et al.*, 2005) (Figura 8D).

## 4.2 Desinfecção de sementes e condições de crescimento

As sementes foram desinfetadas superficialmente em solução de hipoclorito de sódio 1% com Tween 20 por 10 minutos sob agitação constante, e lavadas três vezes com água destilada estéril. Após a desinfecção, as sementes foram colocadas em placas de Petri contendo meio MS (Murashige e Skoog, pH 5,75) sem vitaminas e sem sacarose, e com 0,8% de Agar. Posteriormente, as placas contendo as sementes foram incubadas a 4°C no escuro por 48 horas para quebrar a dormência e, transcorrido esse tempo, foram transferidas à câmara de crescimento. As condições do crescimento foram ajustadas segundo Weigel e Glazebrook (2002). Em resumo, 22°C +/- 1°C de temperatura, 16 horas-luminosidade de foto-período, 100 µmoles/m<sup>2</sup>/s de intensidade luminosa, e 50%

de umidade relativa. No escuro as placas foram embrulhadas em folha de alumínio.



**Figura 8.** Fenótipo das plantas com 30 dias após germinação. A) Planta selvagem (WT); B) miR156-OE; C) Mimicry-156, e D) Mutante com perda de função para o gene *BAS1* (*bas1-2*).

#### 4.3 Tratamentos com 24-Epibrassinolide (24-EBL)

Para o presente trabalho foram selecionadas as concentrações de 0,1 nM e 10 nM do 24-Epibrassinolídeo (24-EBL, PhytoTechnology). Tanto para as avaliações fenotípicas (ensaios do desenvolvimento da raiz e do hipocótilo), quanto para os ensaios de expressão gênica foi aplicado, com micropipeta, uma solução de 24-EBL no meio de cultura MS em estado líquido, na proporção volume/volume, garantindo as concentrações finais mencionadas acima. Depois de adicionado o 24-EBL, o meio foi vertido em placa Petri de 150 mm de

diâmetro para a polimerização. As placas foram mantidas em escuro a 4°C para garantir a estabilidade da molécula do 24-EBL.

#### **4.4 Avaliações**

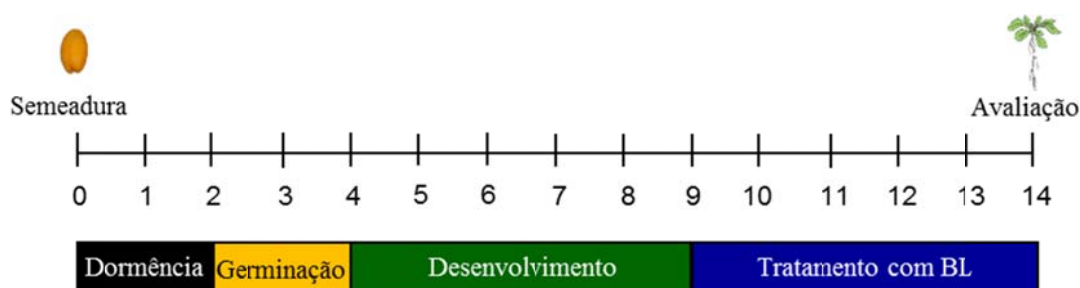
Foram realizados dois tipos de avaliações: avaliação fenotípica (formação do sistema radicular, e crescimento do hipocótilo), e avaliação da expressão gênica de genes das vias do miR156/*SPL* e do BL, nos diferentes experimentos realizados (que serão mencionados e descritos nos resultados). Para os dois tipos de avaliações, foram utilizadas as concentrações 0,1 e 10 nM do 24-EBL sob as condições de crescimento mencionadas acima.

##### **4.4.1 Avaliação fenotípica**

Como marcadores biológicos selecionados no presente trabalho, foram realizadas, separadamente, avaliações fenotípicas de dois aspectos do desenvolvimento vegetal: formação do sistema radicular e crescimento do hipocótilo; adicionalmente, foi medido o comprimento celular da raiz dos diferentes genótipos. Todas as avaliações foram feitas em três experimentos independentes.

**4.4.1.1 Formação do sistema radicular.** Neste ensaio foram avaliados o comprimento da raiz principal e o número de raízes laterais (emergentes) 10 dias após germinação (DAG) nas plântulas dos diferentes genótipos, na presença ou ausência de 24-EBL. As sementes foram colocadas nas placas Petri contendo meio MS e depositadas em câmara de crescimento até o momento da avaliação (Figura 9). O comprimento da raiz principal foi medido usando o programa *ImageJ* (*National Institutes of Health, Maryland-USA*) a partir das plântulas previamente

colocadas sob transparência e escaneadas. A contagem das raízes laterais foi realizada sob o microscópio óptico.



**Figura 9.** Esquema da avaliação do desenvolvimento da raiz. As sementes são colocadas em placas Petri contendo meio MS e mantidas a 4°C no escuro por 48 horas. Posteriormente, as placas são transferidas para câmara de crescimento e mantidas em posição vertical até as plântulas atingirem cinco dias após germinação (DAG). Depois, as plântulas são transferidas para meio MS com ausência (Mock) ou presença de 24-EBL (0,1 nM ou 10 nM) e mantidas por cinco dias adicionais até atingirem 10 DAG.

**4.4.1.2 Crescimento do hipocótilo.** Neste ensaio, foi avaliado o comprimento do hipocótilo dos diferentes genótipos na presença e ausência de 24-EBL, durante 5 DAG sob condições tanto de presença quanto de ausência de luminosidade. As sementes foram colocadas em placas Petri contendo meio MS (Mock) e MS contendo 24-EBL (0,1 nM ou 10 nM), tratadas a 4°C, embrulhadas em folha de alumínio e depositadas em câmara de crescimento até o momento da avaliação. O comprimento do hipocótilo foi medido usando o programa *ImageJ*, a partir das plântulas previamente colocadas sob transparência e escaneadas.

**4.4.1.3 Comprimento celular.** Além dos dois aspectos do desenvolvimento vegetal mencionados acima, foi feita uma avaliação adicional medindo o comprimento celular da raiz dos diferentes genótipos. Nesta avaliação, foram utilizadas plântulas dos diferentes genótipos crescidas verticalmente em placas Petri contendo meio MS durante 10 DAG. Após este tempo, as plântulas foram

tratadas com solução de iodeto de propídio (1 mg ml<sup>-1</sup> Sigma) por 15 minutos. Células da zona de maturação radicular foram fotografadas em microscópio confocal (Olympus) utilizando os comprimentos de onda de excitação e de emissão de 555 e 655nm respectivamente. Pelo menos 30 células por raiz e 10 plântulas por genótipo foram medidas usando o programa *ImageJ*.

#### 4.4.2 Avaliação da expressão gênica

Na avaliação da expressão gênica, foram realizadas análises de expressão do miR156 maduro, dos genes *SPLs* regulados pelo miR156, e de alguns genes envolvidos na biossíntese, sinalização e homeostase dos BRs (que serão apresentados nos resultados). Nestas análises, foram utilizadas plântulas WT, miR156-OE e Mimicry-156 com 5 DAG e tratadas durante 5 dias adicionais em MS (Mock) e MS contendo 10 nM de 24-EBL. As sequências dos iniciadores *Forward* e *Reverse* dos genes avaliados são indicadas na tabela de *primers* nos anexos.

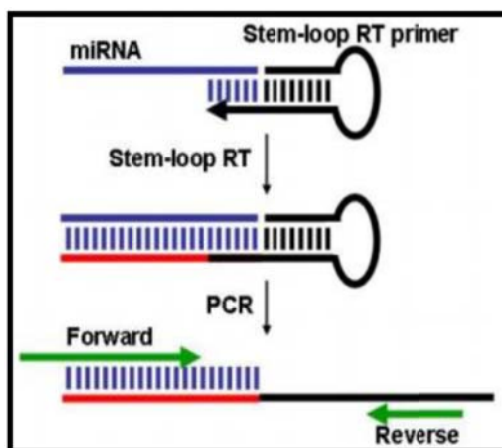
#### 4.5 Isolamento, tratamento com DNaseI e quantificação do RNA total

O isolamento do RNA foi realizado, a partir de plântulas com 10 DAG, utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), segundo o procedimento do fabricante. Após a extração, a integridade do RNA das amostras foi verificada por eletroforese em agarose 1,5% corado com 0,01% (v/v) de brometo de etídio. Posteriormente, as amostras foram tratadas com *DNaseI Amplification Grade* (Invitrogen) para a remoção do DNA genômico. A concentração e pureza do RNA foram avaliadas por espectrofotometria de absorção, utilizando o equipamento *Thermo NanoDrop 2000* (Uniscience). Finalmente, a ausência de DNA genômico nas amostras foi confirmada por meio da realização de PCR

convencional usando iniciadores específicos *Forward* e *Reverse* do gene endógeno *ACT2* (AT3G18780).

#### 4.6 Síntese de cDNA via *pulsed stem-loop* RT-PCR.

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



**Figura 10.** Esquema do *pulsed stem-loop* RT-PCR. Iniciadores específicos *stem-loop* anelam na porção 3' das moléculas do miRNA maduro, iniciando a transcrição reversa. O miRNA maduro é amplificado utilizando iniciador *Forward* específico para o miR156 e um iniciador *Reverse* universal (Kramer, 2011).



#### **4.7 Estabelecimento dos cruzamentos.**

No presente trabalho foram estabelecidos dois tipos de cruzamentos: no primeiro, plantas miR156-OE foram cruzadas com plantas *bas1-2* e, no segundo, plantas Mimicry-156 foram cruzadas com plantas *bas1-2*. Todas as gerações dos cruzamentos foram genotipadas mediante PCR convencional usando os iniciadores *Forward* e *Reverse* dos genes *AtMIR156a*, *BAS1*, *IPS1* e do promotor CaMV-35S.

#### **4.8 Análises estatísticas dos dados**

Para as análises estatísticas, primeiramente foram aplicados os testes de *Kolmogorov-Smirnov* ou *Shapiro-Wilk* para determinar a distribuição dos dados e, posteriormente, foi aplicado o teste de *Levene* para determinar se os dados cumprem o pressuposto de homoscedasticidade. As médias foram comparadas usando teste de Student ou ANOVA (uniou multi-fatorial) em conjunto com o teste de comparação múltipla de Tukey HSD (Pagano e Gauvreau, 2012).

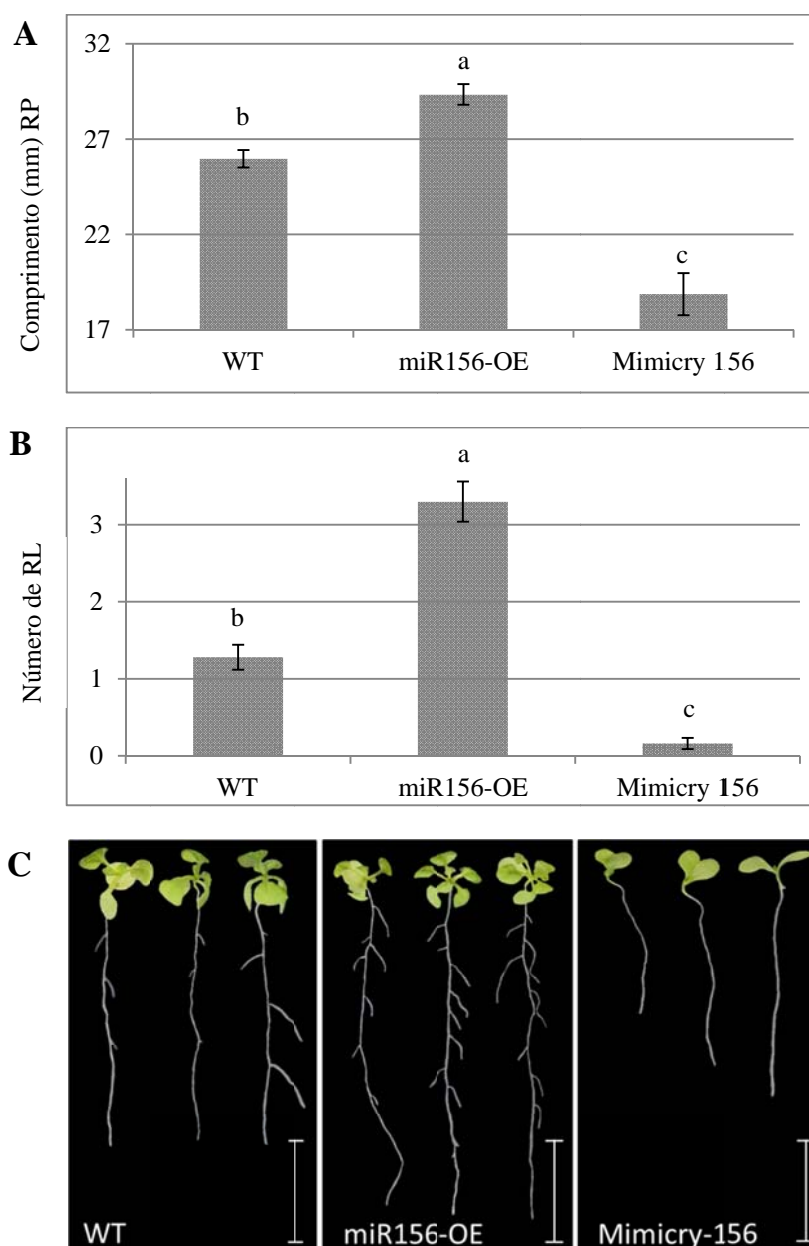
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o intuito de determinar se a via genética do miR156/*SPL* interage com a via dos BRs durante o desenvolvimento juvenil de *A. thaliana*, foram selecionados, como variáveis respostas, dois eventos do desenvolvimento desta espécie: 1) formação do sistema radicular, e 2) crescimento do hipocótilo. Além das duas variáveis avaliadas, foi avaliado, em microscópio confocal, o comprimento celular na raiz, e foram realizadas análises de expressão gênica mediante o método de *PCR* semi-quantitativo. Nas análises de expressão gênica foram avaliados o miR156 maduro, os genes da via do miR156/*SPL* e alguns genes da via de biossíntese, sinalização e homeostase do BL. Finalmente, foram estabelecidos cruzamentos entre as plântulas da via genética do miR156/*SPL* alterada e o mutante com perda de função para o gene *BASI* (*bas1-2*). No presente capítulo, serão apresentados nesta mesma ordem, os resultados destas duas variáveis avaliadas independentemente, das medições do comprimento celular, dos ensaios de expressão gênica e dos cruzamentos estabelecidos.

### 5.1 miR156/*SPL* e formação do sistema radicular

Num estudo preliminar do efeito da via genética do miR156/*SPL* na formação do sistema radicular de arábido, Ortiz-Morea (2013) encontrou maior número de raízes laterais (RL) em plântulas miR156-OE e, em contraposição, menor número de RL nas plântulas Mimicry-156. Com esta informação preliminar, decidiu-se confirmar se esta via genética está envolvida na formação do sistema radicular de arábido. Para isto, foi realizado um experimento inicial avaliando o alongamento da raiz principal (RP) e a formação de RL em plântulas miR156-OE, Mimicry-156 e WT crescidas em meio MS sem sacarose durante 10 DAG.

Com relação ao comprimento da RP (Figura 11A e C), as plântulas miR156-OE têm uma média significativamente maior que a média das plântulas WT. Em contraste, as plântulas Mimicry-156 possuem uma média significativamente menor em relação às plântulas WT. Portanto, os dados sugerem que a viagenética do miR156/*SPL* age no alongamento da RP. Além do comprimento da RP, a segunda variável resposta avaliada correspondente ao número de RL, também evidenciou diferenças entre os distintos genótipos. As plântulas miR156-OE possuem uma média no número de RL significativamente maior em comparação com as plântulas WT. Em contraste, a média no número de RL das Mimicry-156 foi significativamente menor em comparação com as WT (Figura 11B e C). Estes dados demonstram que a via miR156/*SPL* age também durante o desenvolvimento de RL de arábido.



**Figura 11.** Média do comprimento (mm) da RP e do número de RL de WT, miR156-OE e Mimicry-156 crescidas em MS durante 10 DAG. **A:** raiz principal,  $n = 30$  réplicas ( $P$ -valor  $< 0,05$ ). **B:** raízes laterais,  $n = 50$  réplicas ( $P$ -valor  $< 0,05$ ). Valores das médias com mesma letra não diferem estatisticamente segundo Tukey HSD. **C:** fotografias dos genótipos avaliados (escala: 1 cm).

No presente trabalho observou-se que as plântulas miR156-OE apresentaram maior comprimento da RP em comparação com os outros genótipos. Este dado é diferente do reportado por Ortiz-Morea (2013), quem

encontrou uma diminuição no comprimento da RP nas plântulas miR156-OE. A diferença dos dados da RP entre estes dois trabalhos é possivelmente devido à presença de açúcar no meio de cultura empregado por Ortiz-Morea (2013). Foi observado que açúcar exógeno afeta a expressão de genes *AthMIR156* e genes *SPLs* (Yang *et al*, 2013), o qual pode interferir no desenvolvimento da raiz; além disso, dados preliminares, não apresentados neste trabalho, evidenciaram uma resposta positiva no alongamento da raiz dos diferentes genótipos (WT miR156-OE Mimicry-156) quando tratados com açúcar no meio de cultura. Por isto, decidiu-se avaliar a formação do sistema radicular sem açúcar com o intuito de observar o efeito direto da via do miR156/*SPL* na formação da raiz. Além do comprimento da RP, os dados do presente trabalho demonstram que as plântulas miR156-OE apresentam mais RL; estes dados concordam com o encontrado por Ortiz-Morea (2013), confirmando-se que a via genética do miR156/*SPL* age na formação de RL em arabidopsis.

O sistema radicular é tão plástico como a parte aérea da planta. Nesta plasticidade, fatores genéticos e regulatórios, como os miRNAs, agem numa complexidade de processos para a formação do sistema radicular (Rubio e Weigel, 2011). A RP em arabidopsis caracteriza-se por possuir três zonas, denominadas de zona meristemática, zona de alongamento e zona de maturação (Breakfield *et al.*, 2012). Dados computacionais e experimentais dos tecidos radiculares e das zonas do desenvolvimento da raiz de arabidopsis revelaram que as *SPLs* apresentam altos níveis de expressão na zona de alongamento e níveis baixos na zona de maturação da raiz, enquanto o miR156 tem padrões de expressão opostos; além da zona de maturação, o miR156 foi encontrado altamente expresso na endoderme, epiderme, córtex e columela (Breakfield *et al.*, 2012). A formação de raízes laterais ocorre na zona de maturação, local onde os níveis de expressão do miR156 são altos e das *SPLs* baixos. Possivelmente a

repressão acentuada da expressão das *SPLs* nesses locais em plântulas miR156-OE seja um fator determinante para o aumento da iniciação das raízes laterais.

Outros estudos, visando entender a ação dos miRNAs na raiz, encontraram vários miRNAs envolvidos em diferentes processos. Por exemplo, o miR160 age regulando os Fatores de Resposta a Auxina (*ARF*) -10 e -16 durante a divisão das células meristemáticas, a diferenciação celular da columela, e o desenvolvimento da coifa (Wang *et al.*, 2005). O miR164 regula o fator de transcrição *NAC1*, durante a emergência das RL (Guo *et al.*, 2005). O miR167 regula o *ARF8*, envolvido na formação de RL em resposta ao nitrogênio (Gifford *et al.*, 2008). O miR390 em conjunto com o *TAS3*, formam uma rede de regulação miR390/*TAS3*/*ARFs*-2, -3 e -4 que controlam quantitativamente o crescimento de RL (Marin *et al.*, 2010). Por último, o miR393 que regula o *AFB3*, receptor envolvido na inibição da RP e RL, controla a emergência e alongamento de RL em resposta ao nitrato (Vidal *et al.*, 2010). Esta informação revela a ação dos miRNAs durante a formação do sistema radicular de arábidoopsis.

O fato das plântulas miR156-OE apresentarem maior comprimento da RP e possuírem mais RL e, em contraposição, as plântulas Mimicry-156 terem menor comprimento da RP e menos RL sugere que a via genética do miR156/*SPL* age no desenvolvimento global do sistema radicular de arábidoopsis. A expressão constitutiva do gene *AtMIR156a* de arábidoopsis, se traduz numa regulação negativa dos fatores de transcrição *SPLs*, permitindo assim o alongamento da RP e o aumento do número de RL em arábidoopsis. Baseado no fato das *SPLs* serem menos expressas na região de maturação da raiz (Breakfield *et al.*, 2012), e segundo os dados obtidos por Ortiz-Morea (2013), junto com os resultados do presente trabalho, nós geramos a hipótese de que as *SPLs* agem

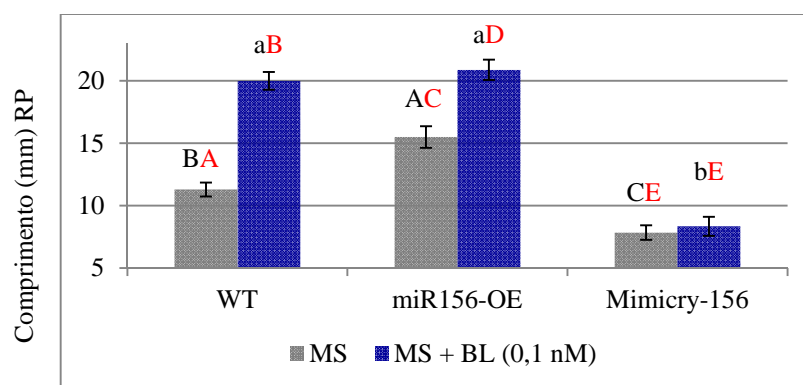
negativamente na formação do sistema radicular de *arabidopsis*, possivelmente como “regulador” no controle da alongação e/ou divisão celular nos tecidos radiculares. Os efeitos das SPLs no sistema radicular podem ocorrer por meio de alterações na síntese, sensibilidade ou distribuição de hormônios como auxinas, citocininas e/ou BRs.

### 5.1.1 Interação miR156/SPL-BRs no desenvolvimento radicular

Uma vez confirmado que a via genética do miR156/SPL age na formação do sistema radicular de *arabidopsis*, e baseado no fato dos BRs estarem envolvidos no desenvolvimento da raiz (Lin *et al.*, 2013; Bao *et al.*, 2004; Mussing *et al.*, 2003), decidiu-se avaliar se estas duas vias genéticas interagem neste processo do desenvolvimento. Para isto, foram escolhidas duas concentrações do 24-EBL que possuem efeito na formação do sistema radicular de *arabidopsis*. Segundo Mussing *et al.* (2003), 0,1 nM de 24-EBL promove incremento no comprimento da RP e, segundo Lin *et al.* (2013) e Bao *et al.* (2004), 10 nM de 24-EBL promove aumento do número de RL e diminuição do comprimento da RP. Com esta informação, foram estabelecidos dois ensaios independentes com estas duas concentrações. No primeiro, foi utilizada a concentração menor (0,1 nM) e foi avaliado o comprimento da RP. No segundo, foi utilizada a concentração maior (10 nM) e foi avaliado o comprimento da RP e o número de RL.

No primeiro ensaio, a média do comprimento da RP das plântulas miR156-OE e WT na presença de 0,1 nM de 24-EBL foi significativamente maior em relação com as plântulas miR156-OE e WT não tratadas (Figura 12). Mussig *et al.* (2003) avaliaram o alongamento da RP de plântulas WT de *arabidopsis* em diferentes concentrações de 24-EBL. Nas concentrações de 0,05 e 0,1 nM observaram uma resposta positiva no crescimento da raiz principal, sendo

a concentração de 0,1 nM a que induziu o maior efeito, enquanto nas concentrações  $\geq 1$  nM observaram inibição do crescimento. No presente trabalho, 0,1 nM de 24-EBL aplicado no meio de cultura promoveu aumento do comprimento da RP nas plântulas WT e miR156-OE. Em contraste, as plântulas Mimicry-156 tratadas não apresentaram diferenças no alongamento em relação com as não tratadas. O fato das plântulas miR156-OE apresentarem resposta ao tratamento com 24-EBL, e das plântulas Mimicry-156 não apresentarem resposta nesta concentração, sugere que a via genética do miR156/*SPL* interage com os BRs durante o crescimento da RP em arabidopsis.



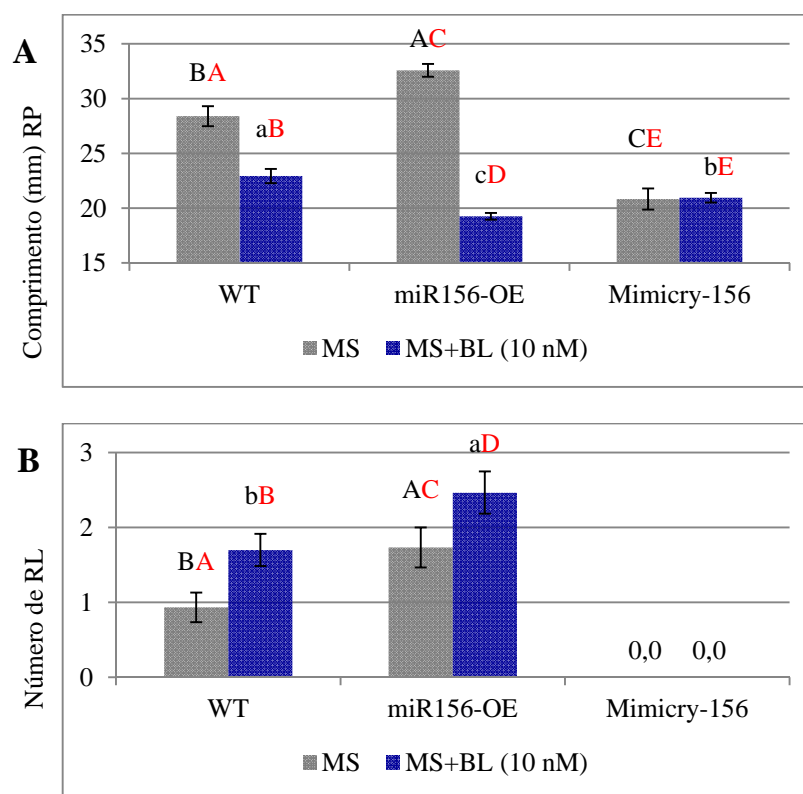
**Figura12.** Média do comprimento (mm) da RP de WT, miR156-OE e Mimicry-156 crescidas em MS (Mock) e MS + 24-EBL (0,1 nM) 10 DAG. n = 40 réplicas. Letras maiúsculas e minúsculas correspondem respectivamente às comparações entre controles e entre tratamentos e, em vermelho, quando comparado o mesmo genótipo tratado e não tratado.  $P < 0,05$  (interação), valores das médias com mesma letra não diferem estatisticamente segundo Tukey HSD.

No segundo ensaio (10 nM de 24-EBL), a média no comprimento da RP nas plântulas WT tratadas com 24-EBL foi significativamente menor em comparação com a média das não tratadas (Figura13A). Mussing *et al.* (2003) observaram que 10 nM de 24-EBL reduz significativamente o comprimento da RP. Esta informação foi conferida por Lin *et al.* (2013) e Bao *et al.* (2004), quem avaliaram o comprimento da RP em plântulas tratadas com esta concentração



observaram o mesmo efeito. Nossos dados de WT concordam com estes trabalhos e, além disso, foi observado que a média da RP das plântulas miR156-OE tratadas também foi significativamente menor em relação às não tratadas (Figura 13A). Interessantemente, a média do comprimento das plântulas Mimicry-156 tratadas e não tratadas não apresentaram diferenças significativas. Uma redução de 20% no comprimento da RP nas plântulas WT e de 40% nas plântulas miR156-OE tratadas com 10 nM de 24-EBL, comparado com as plântulas Mimicry-156, sugere que a repressão das *SPLs* torna as plântulas mais sensíveis ao tratamento e, no cenário oposto, a des-repressão, torna-as insensíveis ao tratamento com BL.

Além do comprimento da RP nas plântulas tratadas com a concentração maior, também foi avaliado o número de RL. Segundo Lin *et al.* (2013) e Bao *et al.* (2004), as plântulas WT tratadas com esta concentração aumentam significativamente o número de RL. No nosso ensaio, as plântulas WT tratadas apresentaram média significativamente maior em relação às não tratadas, confirmando o reportado na literatura (Figura 13B). Este comportamento também foi observado nas plântulas miR156-OE tratadas. No entanto, as plântulas Mimicry-156 tratadas e não tratadas não apresentaram resposta ao tratamento. Estes dados sugerem que a via genética do miR156/*SPL* age em conjunto com a via genética do BL durante a formação de RL em *Arabidopsis*.



**Figura 13.** Média do comprimento (mm) da RP e número de RL em WT, miR156-OE e Mimicry-156 crescidas em MS (Mock) e MS + 24-EBL (10 nM) 10 DAG. **A:** comprimento da RP, n = 24 réplicas. **B:** número de RL, n = 30 réplicas. Letras maiúsculas e minúsculas correspondem respectivamente às comparações entre controles e entre tratamentos e, em vermelho, quando comparado o mesmo genótipo tratado e não tratado.  $P < 0,05$ . Valores das médias com mesma letra não diferem estatisticamente segundo Tukey HSD (A) e Student T (B).

Estudos do efeito do BL na formação do sistema radicular demonstraram sua ação na RP e no número de RL de arábido. Baixas concentrações do BL ( $\leq 0,1$  nM) aplicado no meio de cultura promovem o alongamento da RP (Mussig *et al.*, 2003), enquanto altas concentrações ( $\geq 1$  nM) inibem o alongamento, porém promovem aumento do número de RL (Lin *et al.*, 2013; Bao *et al.*, 2004). A interação da via genética do miR156/SPL com os BRs ainda não é reportada, assim, os dados obtidos com as concentrações avaliadas no presente trabalho constituem um avanço no intuito de revelar o efeito da interação destas duas vias genéticas de regulação em arábido. Num estudo usando microarranjos de

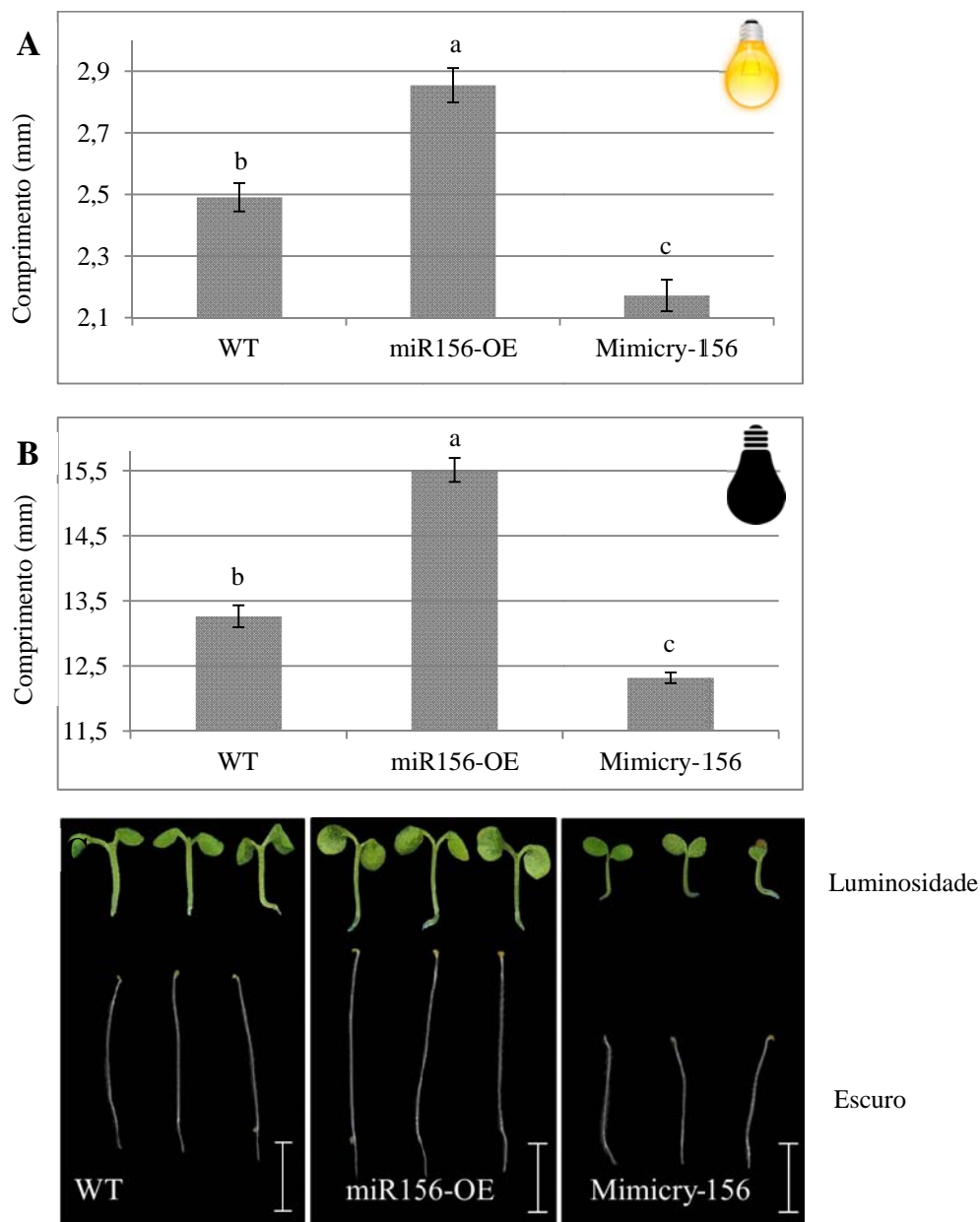
miRNAs, Lin *et al.* (2013) identificaram miRNAs de *A. thaliana* (Col-0) regulados pelo BL. Entre estes, foi observado aumento de expressão do *AthMIR156h*, sugerindo possível interação do miR156 com o BL que promove o crescimento e desenvolvimento vegetal. Os dados obtidos no presente trabalho, junto com o reportado por Lin *et al.* (2013) evidenciam, *in vitro*, uma possível interação entre a via genética do miR156/*SPL* e a via genética do BL durante a formação do sistema radicular de arabis.

## 5.2 miR156/*SPL* e crescimento do hipocótilo

O desenvolvimento vegetal é influenciado por diferentes sinais ambientais, entre estes a luminosidade, que desencadeia uma série de eventos que incluem maturação dos cotilédones e diferenciação e inibição do crescimento do hipocótilo. Na ausência de luminosidade, a plântula deve determinar o modo de ação apropriado para atingir a luz (Arsovski *et al.*, 2012). Em arabis, durante o período de tempo compreendido entre a germinação e o desenvolvimento das primeiras folhas verdadeiras, foi observado que mutações com perda-de-função nos genes *HYPONASTIC LEAVES1(HYL1)*, *HUA ENHANCER1(HEN1)* e *HASTY (HST)*, responsáveis pelo processamento do transcrito primário, estabilidade e transporte dos miRNAs, geram hipocótilos de menor comprimento tanto em condições de luminosidade quanto de escuro (Tsai *et al.*, 2014). Esta informação, junto com o fato do miR156 ser um miRNA central no desenvolvimento vegetal (Wu e Poethig, 2006), sugeriu a hipótese da via genética miR156/*SPL* estar envolvida no crescimento do hipocótilo de arabis. Para testar esta hipótese, foi avaliado o crescimento do hipocótilo em plântulas WT, miR156-OE, e Mimicry-156 semeadas em meio MS e mantidas em condições tanto de luminosidade quanto no escuro durante 5 DAG. No primeiro ensaio (condição de luminosidade), as plântulas que superexpressam o miR156 apresentaram média significativamente maior no

comprimento comparado com as plântulas WT. Em contraste, as plântulas Mimicry-156 têm uma média significativamente menor em comparação as WT (Figura14A). No segundo ensaio (condição de escuro), observa-se o mesmo comportamento nos diferentes genótipos (Figura14B).

Os dados da média do comprimento do hipocótilo sugerem que a via genética do miR156/*SPL* age durante o crescimento do hipocótilo em *arabidopsis*, alongando-o e contribuindo para as plântulas atingirem a luminosidade, conseqüentemente a fotossíntese. Na literatura não foi encontrada informação referente ao crescimento do hipocótilo em plântulas com a via genética do miR156 alterada, pelo qual os dados do presente trabalho constituem o primeiro estudo em mostrar o efeito da expressão constitutiva ou a repressão do miR156 no crescimento do hipocótilo em *arabidopsis*. Sendo o miR156 um miRNA importante no desenvolvimento vegetal e segundo o reportado por Tsai *et al.* (2014) se esperava que, sob as nossas condições de crescimento, as plântulas miR156-OE tivessem hipocótilos maiores e as Mimicry-156 menores comparado com WT. Neste primeiro ensaio foi observado este efeito tanto em condições de luminosidade quanto de escuro. Com esses dados sugerimos que os genes *SPLs* regulados pelo miR156 possuem papel biológico no desenvolvimento do hipocótilo. Este papel pode ser regulando negativamente o crescimento do hipocótilo, talvez via divisão celular ou modulando a elasticidade da parede celular. Tais efeitos podem estar associados à interação desses fatores de transcrição com a via dos BRs.



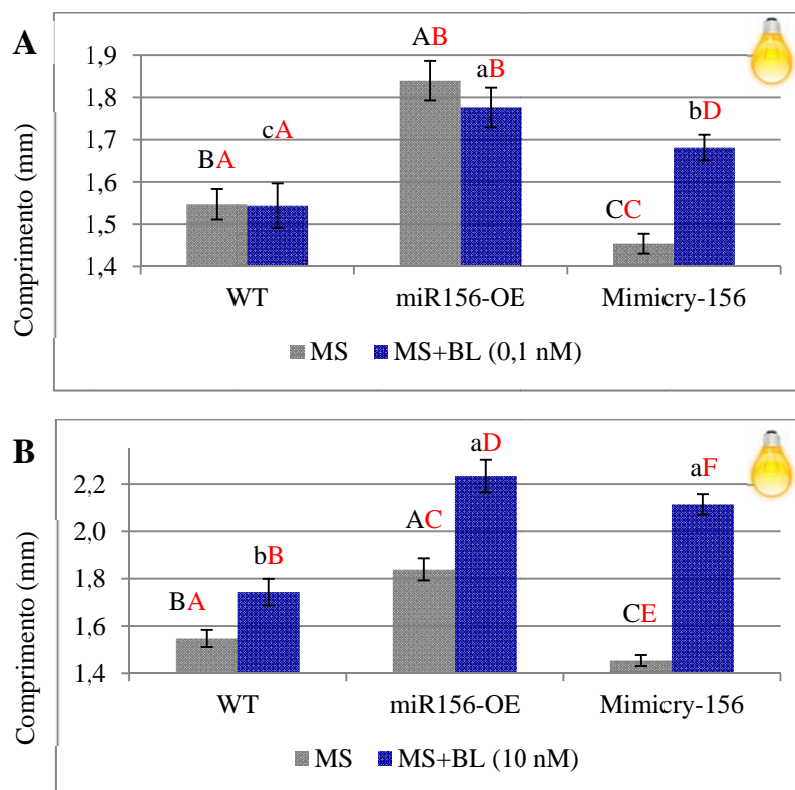
**Figura14.** Comprimento (mm) do hipocótilo de WT, miR156-OE e Mimicry-156 crescidas em MS 5 DAG. **A:** Média do comprimento crescido na luminosidade.  $n = 45$  réplicas. **B:** Média do comprimento crescido no escuro.  $n = 70$  réplicas.  $P < \alpha 0,05$ . Valores das médias com mesma letra não diferem estatisticamente segundo Tukey HSD. **C:** fotografias dos genótipos avaliados tanto na luminosidade (parte superior) quanto no escuro (parte inferior) (escala: 3 mm).

### 5.2.1 Interação miR156/SPL-BRs no crescimento do hipocótilo

Uma vez observado que a via do miR156/SPL influencia o crescimento do hipocótilo, procedeu-se a avaliar se ocorre interação entre a via do miR156/SPL e a via do BL. Para isto, foram estabelecidos dois ensaios independentes utilizando condições de presença e ausência de luminosidade. Tanto no primeiro quanto no segundo ensaio, foram utilizadas as concentrações 0,1 nM e 10 nM do 24-EBL e foi avaliado o comprimento do hipocótilo das plântulas miR156-OE, Mimicry-156 e WT crescidas durante 5 DAG.

No ensaio com luminosidade, o crescimento do hipocótilo não apresentou resposta ao tratamento com 24-EBL nas plântulas miR156-OE e WT, no entanto, as plântulas Mimicry-156 responderam ao tratamento, alongando significativamente o hipocótilo (Figura 15A). Neff *et al.* (1999) avaliaram a resposta do hipocótilo de WT (Col-0) submetidas a diferentes concentrações desde 0 até 1000 nM de BL. Às concentrações de 0,1 e 1 nM de 24-EBL não apresentaram diferenças comparado com o controle, e a partir de 10 nM de 24-EBL observaram resposta significativa ao tratamento (alongamento do hipocótilo) que aumentou junto com o aumento da concentração. As mesmas concentrações e o mesmo comportamento do comprimento do hipocótilo de plântulas tratadas com 24-EBL na presença de luminosidade foi observado nos trabalhos de Turk *et al.* (2005 e 2003). No nosso trabalho, não foi observada resposta ao tratamento à concentração de 0,1 nM de BL (Figura 15 A) confirmando os dados reportados (Neff *et al.*, 1999; Turk *et al.*, 2003; 2005). No entanto, as plântulas Mimicry-156 tratadas com 0,1 nM 24-EBL apresentaram diferenças significativas. Isto sugere que a des-repressão das SPLs favorece a resposta do alongamento do hipocótilo das plantas crescidas na presença de 0,1 nM de 24-EBL. Na concentração de 10 nM, todos os genótipos apresentaram resposta positiva ao tratamento com BL, aumentando o comprimento quando

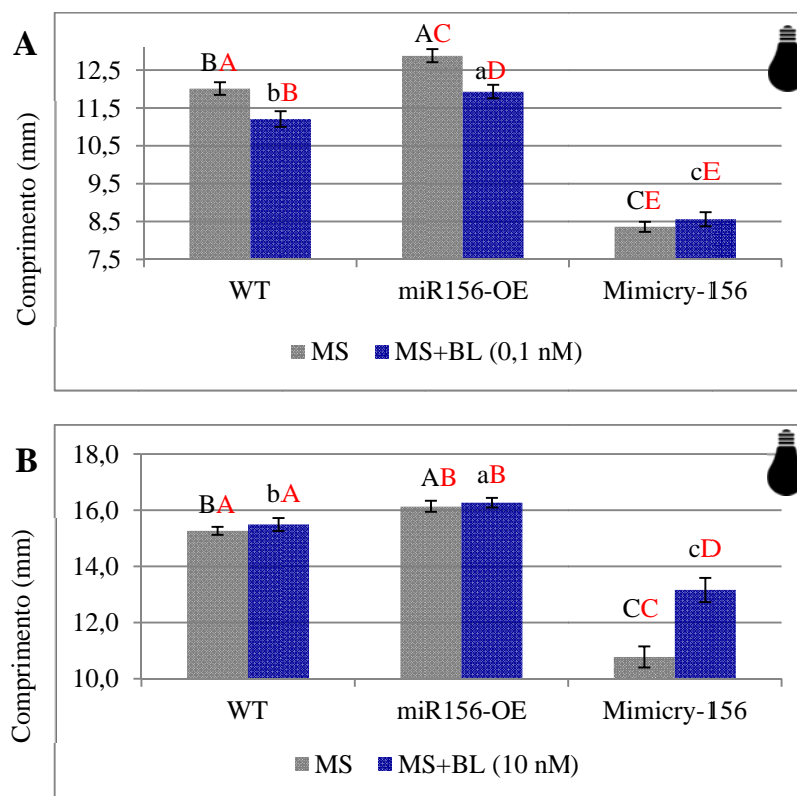
comparadas com os grupos não tratados (Figura 15B). Comportamento semelhante foi observado em plântulas WT tratadas com 10 nM 24-EBL (Turk *et al.* 2005; Neff *et al.* 1999).



**Figura 15.** Média do comprimento (mm) do hipocótilo de WT, miR156-OE e Mimicry-156 crescidos em condições de luminosidade 5 DAG. **A:** Ensaio número 1: meios MS e MS+24-EBL (0,1 nM), n = 30 réplicas. **B:** ensaio número 2: meios MS e MS+24-EBL (10 nM), n = 30 réplicas. Letras maiúsculas e minúsculas correspondem respectivamente às comparações entre controles e entre tratamentos e, em vermelho, quando comparado o mesmo genótipo tratado e não tratado.  $P < 0,05$ . Valores das médias com mesma letra não diferem estatisticamente segundo Tukey HSD.

No segundo ensaio, em ausência de luminosidade, os genótipos miR156-OE e WT responderam negativamente ao tratamento de 0,1 nM de BL. No entanto, as plântulas Mimicry-156 não apresentaram resposta ao tratamento (Figura 16). Neff *et al.* (1999) e Turk *et al.* (2003) observaram que, em condições

de escuro, quando a concentração do BL aumenta, o comprimento do hipocótilo diminui. No nosso trabalho, 0,1 nM do 24-EBL no meio de cultura promoveu diminuição significativa no comprimento do hipocótilo em plântulas WT e miR156-OE; porém, fenótipo oposto foi observado para o crescimento de hipocótilo das plântulas Mimicry-156 (Figura 16A). Na concentração de 10 nM, não foi observada resposta de crescimento de hipocótilo ao tratamento nas plântulas WT e miR156-OE, porém, as plântulas Mimicry-156 responderam positivamente, aumentando significativamente o comprimento do hipocótilo nesta concentração (Figura 16B).



**Figura 16.** Média do comprimento (mm) do hipocótilo de plântulas WT, miR156-OE e Mimicry-156 crescidas em condições de escuro 5 DAG. **A:** Ensaio número 1: meio MS e MS+24-EBL (0,1 nM), n = 60 réplicas. **B:** ensaio número 2: meio MS e MS+24-EBL (10 nM), n = 45 réplicas. Letras maiúsculas e minúsculas correspondem respectivamente às comparações entre controles e entre tratamentos e, em vermelho, quando comparado o mesmo genótipo tratado e não tratado.  $P < 0,05$ . Valores das médias com mesma letra não diferem estatisticamente segundo Tukey HSD.



Em condições do escuro, o crescimento do hipocótilo é impulsionado pela expansão celular (Wu *et al.*, 2010), permitindo ao meristema da plântula alcançar os sinais de luminosidade na superfície do solo (Turk *et al.*, 2005). Este mecanismo é uma estratégia para assegurar que o ápice das plântulas atinja a luz antes das reservas das sementes se esgotarem (Arsovski *et al.*, 2012). A expansão celular é um processo do desenvolvimento regulado pela luminosidade e pelos fitohormônios (Azpiroz *et al.*, 1998). Diferentes processos do desenvolvimento vegetal que são controlados pelo miR156/SPL também são controlados pelos BRs. Entre esses processos, a divisão e o tamanho celular podem ser pontos de convergência entre as duas vias genéticas durante o desenvolvimento de *Arabidopsis*. No nosso trabalho, se observou resposta diferencial no comprimento do hipocótilo entre as plântulas miR156-OE e Mimicry-156 sob as nossas condições, possivelmente pelo alongamento ou pelas taxas de divisão celular. Nossos dados reforçam a ideia de que a luminosidade e os BRs são antagônicos em relação ao crescimento do hipocótilo e sugere que BRs tem um papel de regulação negativa no estiolamento de *Arabidopsis*. Porém, esta regulação não é afetada nas plântulas com as SPLs desreguladas. Os dados do comprimento do hipocótilo de plântulas crescidas tanto em condições de luminosidade quanto de escuro sugerem que a via genética do miR156/SPL interage de forma complexa com a via dos BRs e que, pelo menos uma das dez SPLs reguladas pelo miR156 está envolvida no crescimento do hipocótilo em *Arabidopsis*.

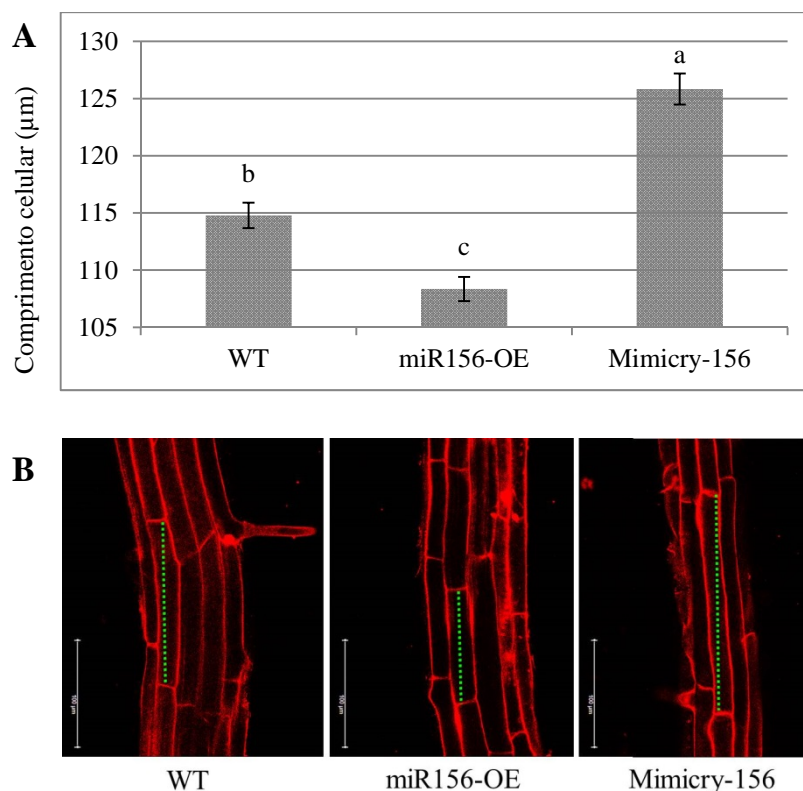
Em *Arabidopsis*, mutantes com perda-de-função de genes envolvidos na biossíntese (*det2/cpd*) ou sinalização (*bri1*) do BL exibem hipocótilos menores; em contraste, mutantes envolvidos na homeostase (*bas1-2*) apresentam comprimento maior comparados com WT; isto demonstra que os BRs são necessários no alongamento do hipocótilo (Turk *et al.*, 2003). Um fenômeno aparentemente contraditório é a capacidade do BL exógeno de inibir o alongamento do hipocótilo no escuro em concentrações que tem um efeito

estimulador na luminosidade (Turk *et al.*, 2003). No nosso trabalho foi observado que, na luminosidade, a resposta do hipocótilo ao tratamento com BL foi positiva; no escuro, essa resposta foi negativa na concentração de 0,1nM de 24-EBL. Entretanto, a concentração de 10 nM de 24-EBL não teve efeito. Nossos dados confirmam o reportado na literatura (Turk *et al.*, 2003; Neff *et al.*, 1999) e indicam que a resposta ao 24-EBL é saturada no escuro (Turk *et al.*, 2003) e, como consequência, o aumento na concentração deste fitohormônio tem efeito inibitório. Estas respostas contraditórias (luminosidade-escuro) podem ser devidas à sensibilidade ao BL entre os dois ambientes diferentes. Com base em observações similares, Turk *et al.*(2003) propuseram um modelo no qual as plântulas crescidas no escuro são mais sensíveis aos BRs comparadas com as plântulas crescidas na luminosidade. O comportamento das plântulas no nosso trabalho concorda com este modelo, porém as plântulas Mimicry-156 tiveram um comportamento diferente. Este comportamento é, possivelmente, consequência direta da desregulação das *SPLs* que, em condições de escuro, favorece o crescimento do hipocótilo.

### **5.3 miR156/*SPL* e tamanho celular**

Com o intuito de avaliar em termos de crescimento celular como a via miR156/*SPL* influencia a formação do sistema radicular em arábido, primeiramente foi realizado um experimento para determinar o comprimento celular em raízes das plântulas WT, miR156-OE e Mimicry-156 crescidas em meio MS durante 10 DAG. Neste experimento, foi avaliado o comprimento de células da epiderme da zona de maturação. A média do comprimento celular foi significativamente maior nas plântulas Mimicry-156 e significativamente menor nas miR156-OE em comparação com WT (Figura 17) ( $P < 0,05$ ). As diferenças do comprimento celular observado nos diferentes genótipos evidenciam que a via miR156/*SPL* influencia o comprimento celular na RP de arábido. A expressão constitutiva do miR156 reduz o comprimento celular, enquanto a des-

repressão das SPLs promove o aumento desse comprimento. Esses dados sugerem que pelo menos uma das SPLs está envolvida no processo de alongamento celular.



**Figura 17.** Comprimento celular da raiz de WT, miR156-OE e Mimicry-156 crescidas em MS durante 10 DAG. **A:** média do comprimento celular (µm) de células da zona de maturação da raiz principal, n = 400. Valores das médias com mesma letra não diferem estatisticamente segundo teste de Tukey HSD ( $P < 0,05$ ). **B:** fotografias obtidas no microscópio confocal dos diferentes genótipos (Escala 100 µm).

Num estudo realizado por Usami *et al.* (2009), foi observado que a via miR156/SPL está envolvida na regulação da alongação e divisão celular da folha. Nesse estudo foi demonstrado que os genes *SPL3*, *-4*, *-5* e *-6* controlam o número e tamanho das células foliares. Em raiz, pesquisas relacionadas com o comprimento e as taxas de divisão celular reguladas pela via miR156/SPL não

foram feitas, pelo qual, o presente trabalho constitui o primeiro estudo em revelar o efeito da expressão constitutiva ou a repressão do miR156 e seu efeito na alongação do sistema radicular de arabidopsis. Os dados do comprimento celular observados neste experimento, junto com o fato das plântulas miR156-OE terem maior comprimento da raiz principal e as plântulas Mimicry-156 menor comprimento (observado no experimento da raiz descrito anteriormente), nos permite sugerir o seguinte: a) as plantas miR156-OE apresentam menor tamanho celular e maior número de células; b) as plantas Mimicry-156 apresentam menor número de células e, em compensação, maior tamanho celular. Estes dados contrastam com o que é observado no desenvolvimento foliar (Usami *et al.*, 2009) e contribuem para desvendar o papel da via miR156/SPL durante a formação do sistema radicular em arabidopsis e da interação com os BRs. Análises de expressão gênica advindas de dados públicos (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) sugerem que os genes *SPL2*, *-9*, *-10*, *-11*, *-13* são altamente expressos em tecidos radiculares de arabidopsis (dados não mostrados). É possível que algumas ou todas essas SPLs sejam importantes para o controle do alongamento celular em tecidos do sistema radicular. No entanto, confirmação desta hipótese bem como experimentos mais detalhados avaliando as taxas de divisão celular e alongamento celular, especialmente com tratamentos com BRs, necessitam ser realizados.

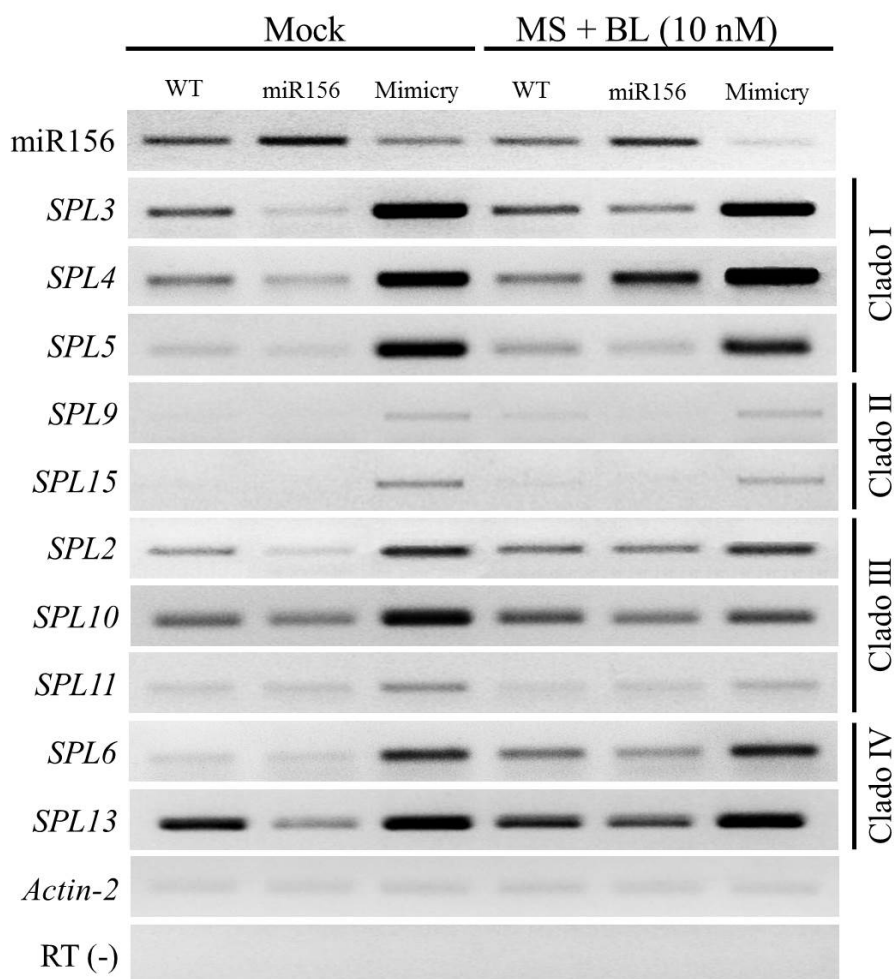
#### **5.4 Análises de expressão gênica**

Para determinar se a via genética do miR156/SPL interage molecularmente com a via genética do BL, foram realizadas preliminarmente análises de expressão gênica (via RT-PCR) do miR156, dos genes *SPLs* regulados por este miRNA, e de alguns genes de interesse que fazem parte da rota de biossíntese, sinalização e homeostase do BL. Foram usadas plântulas miR156-EO, Mimicry-156 e EW crescidas durante 5 DAG em meio MS

e posteriormente tratadas, durante 5 dias adicionais, em meio MS (Mock) e meio MS suplementado com 24-EBL na concentração final de 10 nM. Esta concentração foi selecionada porque, além de promover incremento no número de raízes laterais, tem um efeito negativo no comprimento da RP de arabidopsis (Bao *et al.*, 2004; Mussing *et al.*, 2003).

Como esperado, a expressão do miR156 nas plântulas WT apresentou nível intermediário entre o nível de expressão das plântulas miR156-OE (alto) e das plântulas Mimicry (nível baixo) na ausência de 24-EBL (Mock) (Figura 18). Os níveis de expressão do miR156 nestes três genótipos não tratados com 24-EBL foram utilizados como controle positivo do experimento. Nas análises, foi observado que a expressão do miR156 diminuiu nas plântulas WT, miR156-OE e Mimicry tratadas com 24-EBL. A diminuição nos níveis de expressão do miR156 tem como consequência aumento na expressão dos genes *SPLs* regulados por este miRNA. Entre estes, foi observado que, em resposta ao tratamento com 24-EBL, o *SPL5* e *SPL6* aumentaram a expressão nas WT; o *SPL2*, *SPL3* e *SPL4* aumentaram a expressão nas miR156-OE (Figura 18).

Os dados da expressão do miR156 em plântulas tratadas sugerem que BL exógeno de alguma forma desestabiliza o acúmulo de transcritos do miR156 e, portanto, a expressão das *SPLs*. Essa desestabilização pode por meio de alteração da expressão de genes envolvidos na biogênese do miR156, tal como o *HYL1*, que também funciona como regulador central do miR156 na manutenção da fase juvenil (Li *et al.*, 2012). No entanto, esta hipótese será conferida em estudos posteriores nos quais será avaliada a expressão do gene *HYL1* em plântulas tratadas com BL e também será avaliado o desenvolvimento radicular e do hipocótilo do mutante *hyl1* (germoplasma que possuímos no laboratório) crescido em diferentes concentrações de BL.



**Figura 18.** Análise de expressão gênica via *pulsed stem-loop* RT-PCR do miR156 e dos genes *SPLs* regulados por este miRNA em plântulas WT, miR156-OE e Mimicry-156 não tratadas (Mock) e tratadas com 24-EBL.

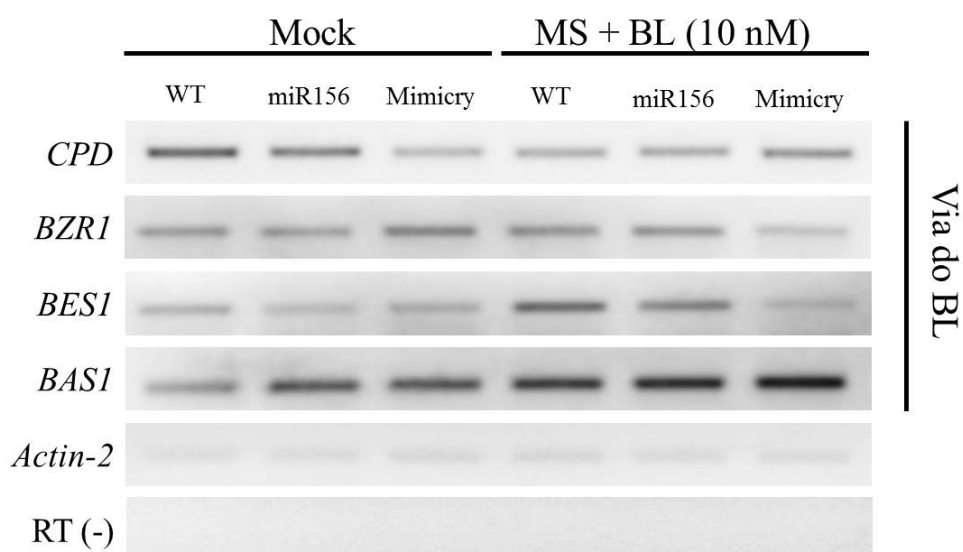
Como transcritos de alguns genes *SPLs* acumulam nas plântulas miR156-OE na presença de 10 nM de 24-EBL, é possível que o BL desestabilize o miR156, reduzindo sua atividade no silenciamento de alguns genes *SPLs*. Este fato é observado pela diminuição na expressão do miR156 nas plântulas miR156-OE, e pelo aumento de expressão dos *SPLs* -2, -3 e -4. Entretanto, alguns genes *SPLs* são induzidos pelo 24-EBL (*SPL5* e -6), indicando que ocorre também regulação transcricional das *SPLs* pelo BL. Portanto, novos experimentos avaliando o acúmulo de transcritos desses genes (via RT-qPCR) precisam ser

realizados para confirmar essa hipótese. Além disso, experimentos utilizando plantas transgênicas contendo promotores de alguns desses genes *SPLs* fusionados a genes repórteres como *GFP* e/ou *GUS*, podem auxiliar a elucidar esta questão.

De acordo com os dados de expressão dos genes da via genética do BL (Figura 19), no presente trabalho foi utilizado o gene *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC DWARF (CPD)* como controle positivo do experimento. *CPD* é um membro da família das citocromo P-450 que converte a 6-deoxocatasterona em 6-deoxoteasterona durante a biossíntese do BL (Clouse, 2011), e na presença de BL exógeno é regulado negativamente (Mathur *et al.*, 1998). Os níveis de expressão do *CPD* no nosso trabalho diminuíram nas plântulas WT e nas miR156-OE, e aumentaram nas plântulas Mimicry-156 tratadas com 24-EBL (Figura 19). Interessantemente, nas plântulas Mimicry-156 (Mock) observa-se expressão menor de *CPD* em comparação com plântulas WT e miR156-OE (Mock). Estes dados indicam que, possivelmente, a desregulação das *SPLs* afeta a expressão deste gene envolvido na biossíntese do BL, ou que a concentração endógena do BL nas Mimicry-156 é maior quando comparada com WT, pelo qual a expressão dos genes de biosíntese do BL é menor como mecanismo de regulação da homeostase do BL.

Genes *BRASSINAZOLE-RESISTANT 1 (BZR1)* e *BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1 (BES1)* que codificam fatores de transcrição que respondem à presença do BL e agem como reguladores de genes de resposta aos BRs (Clouse, 2011) foram avaliados. Foi observado que *BZR1* e *BES1* apresentaram mudanças no nível de expressão gênica nas plantas tratadas com 24-EBL; por exemplo, *BZR1*, e *BES1*, aumentaram a expressão nas plântulas WT e miR156-OE tratadas com 24-EBL; no entanto, o nível de expressão destes genes diminuiu nas plantas Mimicry-156

submetidas ao tratamento com 24-EBL. *BZR1* e *BES1*, por serem dois fatores de transcrição envolvidos na sinalização do BL, que se ligam ao promotor dos genes alvo regulados pelos BRs (Clouse, 2011), representam um dado interessante no presente trabalho e podem ser o foco de novas pesquisas visando o entendimento da interação miR156/*SPL*-Brassinosteroides.



**Figura19.** Análise de expressão gênica via *pulsed stem-loop* RT-PCR dos genes da via genética do BLEM plântulas WT, miR156-OE e Mimicry-156 não tratadas (Mock) e tratadas com 24-EBL.

Outro gene de interesse avaliado no presente trabalho codifica para a proteína BAS1. Como foi mencionado na revisão bibliográfica, esta proteína, membro da família das Citocromo P450, é responsável direto pela inativação dos BRs (Neff *et al.*, 1999), e na presença de BL exógeno ocorre aumento da sua expressão (Goda *et al.*, 2002). Nas nossas análises de expressão foi observado que os níveis de *BAS1* aumentaram em todos os genótipos tratados com BL. Este aumento pode ser devido ao fato do *BAS1* ser expresso no momento e no lugar em resposta a incrementos dos níveis de BRs. Esta mudança na expressão de *BAS1* é um mecanismo de *feedback* para controlar os níveis dos BRs para os



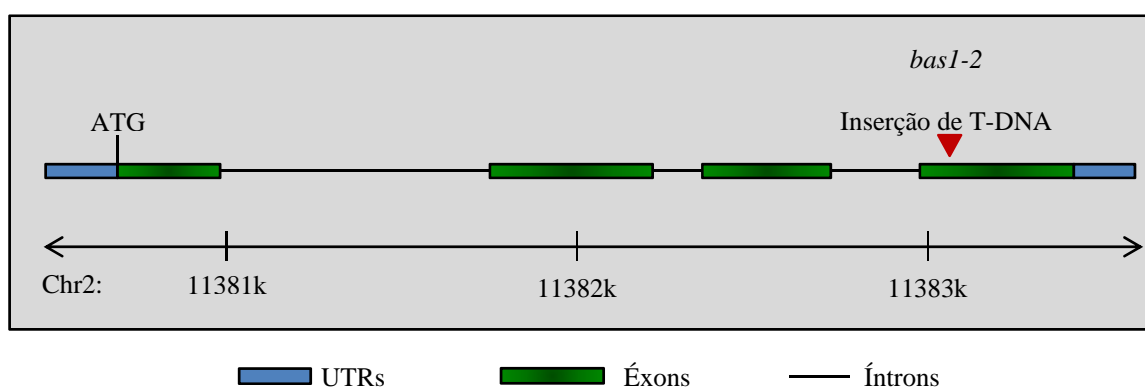
tecidos terem uma resposta durante o desenvolvimento vegetal (Turk *et al.*, 2003).

Várias possibilidades podem ocorrer entre a possível interação das vias genéticas de estudo: 1) A via genética do miR156/*SPL* interfere, ativando ou reprimindo, a expressão dos genes de biossíntese, sinalização e homeostase do BL, 2) a via genética do BL interfere na expressão do miR156 ou dos genes regulados por este miRNA e, 3) existe um *feedback* entre as duas vias genéticas que garante níveis apropriados tanto dos genes da via do miR156/*SPL* quanto dos genes da via do BL no desenvolvimento de arábido. Nossas análises moleculares iniciais nos permitem sugerir a hipótese que algumas *SPLs* são reguladas positivamente pelo BL e, por sua vez, estas regulam a biossíntese dos BRs como um mecanismo de *feedback* entre as duas vias genéticas; no entanto, novos experimentos avaliando o acúmulo de transcritos da via genética do miR156 em plantas com a via genética do BL alterada precisam ser realizados para confirmar essa hipótese. Além dos dados moleculares obtidos, os dados do comprimento da raiz principal, número de raízes laterais e comprimento do hipocótilo evidenciam interação entre a via genética do miR156/*SPL* e os BRs. De acordo com isto, novos experimentos, que são mencionados posteriormente, serão realizados para confirmar esta possível interação e desvendar como a mesma ocorre.

### **5.5 Interação genética miR156/*SPL*-BRs**

Com o intuito de analisar se a via genética do miR156/*SPL* interage geneticamente com a via do BL, foram geradas plantas miR156-OE/*bas1-2* e plântulas Mimicry-156/*bas1-2* a partir do cruzamento entre as plantas com a via genética do miR156/*SPL* alterada (miR156-OE, Mimicry-156) e as plantas da via do BL alterada (*bas1-2*). Neste caso, foi escolhido o gene *BAS1* que codifica um

membro da família das Citocromo-P450, uma proteína envolvida no metabolismo dos brassinosteróides (Turk *et al.*, 2005). Uma vez escolhido este gene, foi obtido o mutante com perda de função *bas1-2* (Alonso *et al.*, 2003). Este mutante caracteriza-se por conter uma inserção de T-DNA no códon 387 (Figura 20) causando a perda da função deste gene. Assim, as plantas mutantes para este gene não podem metabolizar os brassinosteróides, trazendo como consequência alteração nos níveis endógenos dos BRs BL e CS (Turk *et al.*, 2005).

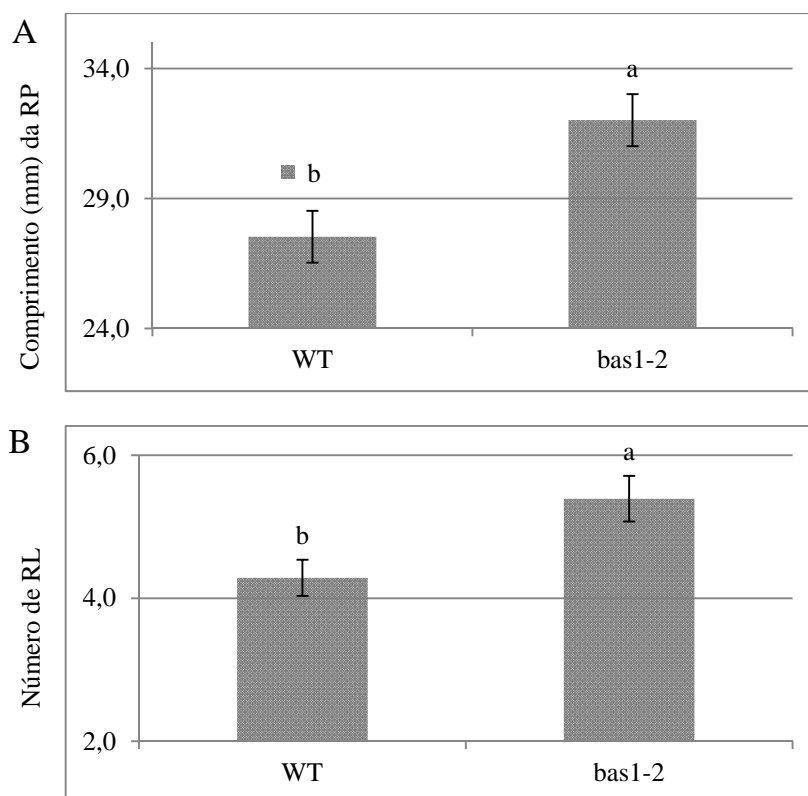


**Figura 20.** Modelo do gene *BAS1* (3107 bp) de *A. thaliana* indicando o códon de início da tradução (ATG) e o sítio de inserção de T-DNA (indicado por ▼) que gera a perda de função do *BAS1*.

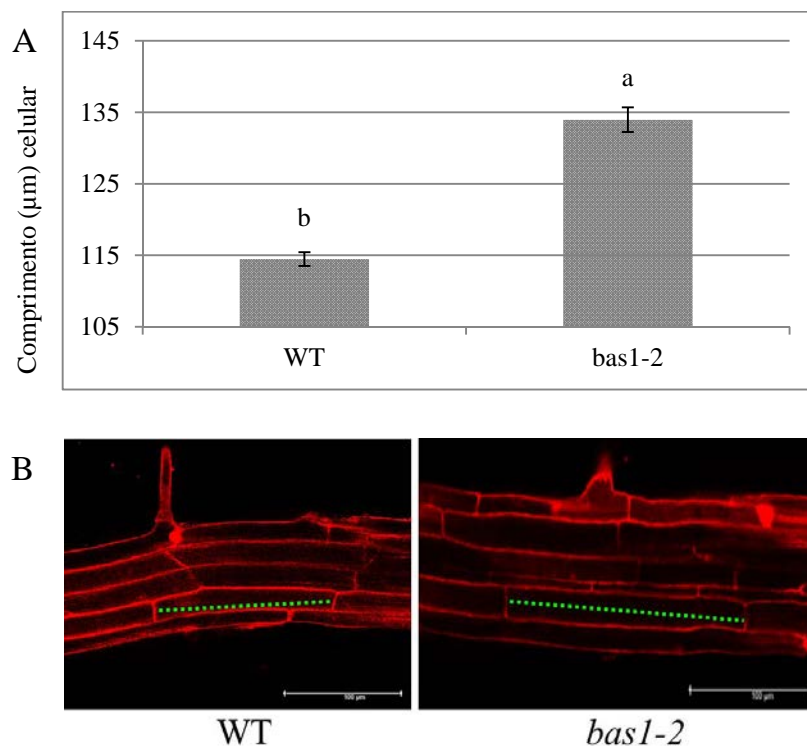
### 5.5.1 Caracterização fenotípica da formação do sistema radicular e do comprimento celular no mutante *bas1-2*

Uma vez obtido o mutante *bas1-2* foi genotipado mediante PCR, usando os iniciadores *Forward* e *Reverse* do gene *BAS1* que flanqueiam a inserção do T-DNA e *Reverse* do SALK LBb.1 para identificar e confirmar esta inserção. Adicionalmente, foi realizada uma caracterização fenotípica da formação do sistema radicular deste mutante. Para isto, foi avaliado o comprimento da RP e o número de RL em plântulas com 10 DAG crescidas em meio MS. Com relação ao comprimento da RP (Figura 21A), o mutante *bas1-2* tem uma média significativamente maior que WT, bem como a média do número de RL é

significativamente maior no mutante (Figura 21B). Além dos dados da raiz, foi medido o comprimento celular em plântulas crescidas com 10 DAG. Neste experimento, foi avaliado o comprimento das células da epidermis da zona de maturação da RP. A média do comprimento celular foi significativamente maior no mutante quando comparado com WT (Figura 22 A e B). Estes dados sugerem que a perda de função do gene *BAS1* promove a formação do sistema radicular em arábido, e promove o alongamento celular. Uma vez confirmado que a perda de função do gene *BAS1* influencia no desenvolvimento da raiz e tem efeito no alongamento celular, procedeu-se a estabelecer os cruzamentos com intuito de avaliar a possível interação genética entre as duas vias genéticas durante o desenvolvimento de arábido.



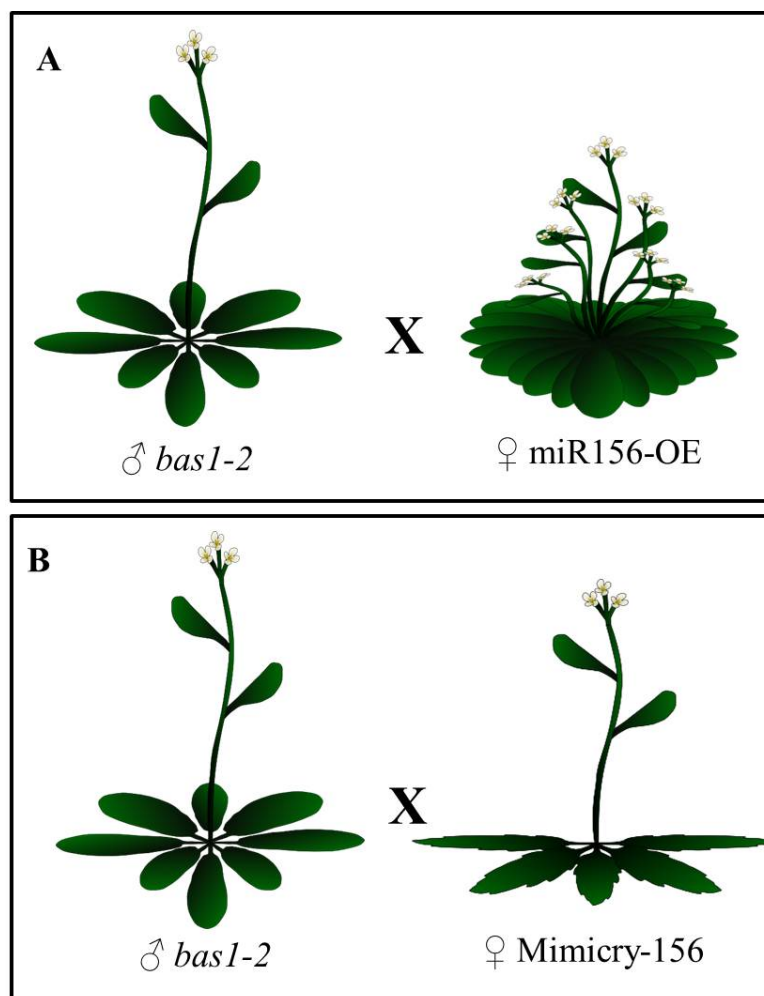
**Figura 21.** Média do comprimento (mm) da RP e do número de RL de plântulas WT e *bas1-2* crescidas em MS durante 10 DAG. **A:** raiz principal, n = 30. **B:** raízes laterais, n = 28. Valores das médias com mesma letra não diferem estatisticamente segundo Student T ( $P < 0,05$ ).



**Figura 22.** Comprimento celular da raiz de *bas1-2* e WT crescidas em MS durante 10 DAG. **A:** média do comprimento celular ( $\mu\text{m}$ ) de células da epidermis da zona de maturação da raiz principal,  $n = 300$  células (10 plântulas/genótipo). Valores das médias com mesma letra não diferem estatisticamente segundo teste de Student ( $P < 0,05$ ). **B:** fotografias obtidas com objetivo de 40x no microscópio confocal (Escala 100  $\mu\text{m}$ ).

### 5.5.2 Estabelecimento dos cruzamentos

Uma vez confirmadas as plântulas que contêm a inserção de T-DNA em homozigose, e caracterizado o desenvolvimento da raiz e o comprimento celular no mutante *bas1-2*, foram realizados dois tipos de cruzamentos. No primeiro, como é indicado na Figura 23A, plantas miR156-OE (♀) foram cruzadas com plantas *bas1-2* (♂); e no segundo, plantas Mimicry-156 (♀) foram cruzadas com plantas *bas1-2* (♂), como observado na Figura 23B.



**Figura 23.** Cruzamentos estabelecidos no presente trabalho. O mutante *bas1-2* foi utilizado como doador de pólen nos cruzamentos realizados com as plantas *miR156-OE* ♀ (A) e com as plântulas *Mimicry-156* ♀ (B).

### 5.5.3 Obtenção e caracterização genotípica das plantas F1 e F2.

As plantas F1, obtidas a partir do cruzamento realizado entre as plantas *miR156-OE* x *bas1-2* e *Mimicry-156* x *bas1-2*, foram genotipadas para o *bas1-2* como se descreve na seção 4.7 de Material e Métodos. Nesta genotipagem, foi confirmada a presença da inserção do T-DNA nas F1 dos cruzamentos (Anexo 2). As plantas F2, obtidas a partir da autofecundação das F1 tanto para o cruzamento A quanto para o B, e por serem segregantes, foram genotipadas tanto para o *p35S::AtMIR156a* quanto para o *bas1-2* (Anexo 3). Nas plantas F2,

segundo as proporções mendelianas, plantas hemizigotas *miR156-OE/+ bas1-2/bas1-2* e plântulas homozigotas *miR156-OE/miR156-OE bas1-2/bas1-2* foram obtidas. Para identificar as plantas homozigotas *miR156-OE/miR156-OE bas1-2/bas1-2*, estão sendo realizados testes de progênie na geração F4 deste cruzamento (Figura 25 B). No caso das plantas F2 do cruzamento com plantas Mimicry-156, não é possível obter plantas homozigotas Mimicry-156, as quais são inviáveis (dados não mostrados). Portanto, as análises serão realizadas nas plantas Mimicry-156/+ *bas1-2/bas1-2*.

Uma vez obtidas as plântulas *miR156-OE/bas1-2* em homozigose tanto para o *miR156* quanto para o *bas1-2*, e junto com as plântulas Mimicry-156/+ *bas1-2/bas1-2*, serão utilizadas para avaliar a formação do sistema radicular e do hipocótilo na presença e na ausência do BL, em condições de luminosidade e de escuro, tal como descrito anteriormente. Também serão feitas análises de expressão gênica dos genes das vias do *miR156/SPL* e do BL em plântulas com 10 DAG. Além disso, serão avaliados outros processos do desenvolvimento, entre estes, tamanho celular, fertilidade masculina e desenvolvimento da flor que, como foi mencionado na revisão bibliográfica, são processos compartilhados pelas duas vias genéticas (Clouse, 2011; Chen *et al.*, 2010), estas avaliações serão realizadas durante os meus estudos de doutorado.

## 6. CONCLUSÕES

A via genética do miR156/*SPL* influencia a formação do sistema radicular em *arabidopsis*. Repressão constitutiva das *SPLs* promove aumento do comprimento da raiz principal e do número de raízes laterais e, em contraste, desregulação das *SPLs* afeta tanto o comprimento quanto a formação de raízes laterais.

A via genética do miR156/*SPL* interage com a via dos BRs durante a formação do sistema radicular de *arabidopsis*. As plântulas miR156-OE apresentam sensibilidade aos tratamentos com 24-EBL enquanto as plântulas Mimicry-156 são insensíveis.

A via genética do miR156/*SPL* influencia o crescimento do hipocótilo em *arabidopsis*. Superexpressão do *AtMIR156a* promove o alongamento do hipocótilo tanto em condições de luminosidade quanto de escuro; porém, repressão deste miRNA afeta negativamente o comprimento do hipocótilo.

A via genética do miR156 afeta o comprimento celular na raiz. Células da epidermis da zona de maturação da raiz principal têm menor comprimento nas plântulas miR156-OE e, em contraste, nas plântulas Mimicry-156 o comprimento celular é maior.

O BL exógeno afeta os níveis de expressão de alguns genes *SPLs*. Entre estes, *SPL2*, -3, -4, -5, e -6 respondem ao tratamento com 24-EBL.

A via genética do miR156/*SPL* contribui na biossíntese e na sinalização do BL. Nas plantas Mimicry-156 (Mock) se observou redução na expressão do gene *CPD* quando comparadas com WT, e nas plântulas tratadas com BL, os genes *BZR1* e o *BES1* apresentaram aumento no nível de expressão em miR156-OE, enquanto em Mimicry-156, essa expressão é reduzida. Estas variações de expressão são evidência da interação molecular entre as duas vias genéticas.

## 7. ANEXOS

### Anexo 1.

Tabela de iniciadores utilizados no presente estudo

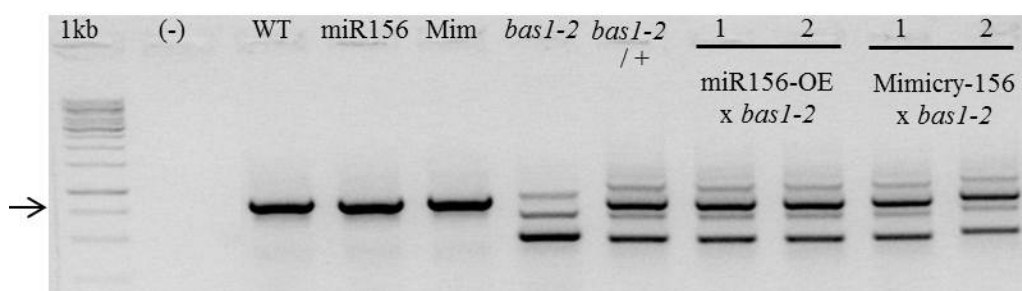
GENE	SENTIDO*	SEQUÊNCIA
<i>SPL2</i>	F	CCGACGTCTCTCAGATCACA
	R	TGGTACGTGCTTCGAACTTG
<i>SPL3</i>	F	CTTAGCTGGACACAACGAGAGAAGG
	R	GAGAAACAGACAGAGACACAGAGGA
<i>SPL4</i>	F	CCAAAATGGAGGGTAAGAGA
	R	GCCTCTTTCATATCAGCTGTGC
<i>SPL5</i>	F	ATGCAGCAGGTTTCATGAGC
	R	GCCTGACCCTTCTCCAAAAC
<i>SPL6</i>	F	CTTGGAGCTACGGGAGAAGC
	R	TCCATTGGAGTTACCAGCCA
<i>SPL9</i>	F	GGTCGGGTCAGTCGGGTCAGATAACC
	R	ACTGGCCGCCTCATCACTCTTGTATCC
<i>SPL10</i>	F	GTGGGAGAATGCTCAGGAGGC
	R	GAGTGTGTTTGATCCCTTGTGAATCC
<i>SPL11</i>	F	GTCCAAGTTTCAACTTCATGGCG
	R	GAACAGAGTAGAGAAAATGGCTGCAC
<i>SPL13</i>	F	CCAATCTCTTCTTCTCCAAACAGTACC
	R	GAAGCAAATGAGGGACTGACGACG
<i>SPL15</i>	F	TGAATGTTTTATCACATGGAAGCTC
	R	TCATCGAGTCGAAACCAGAAGAT
<i>CPD</i>	F	ATGAAAAGGAGGGAGGAGGA
	R	GAGAAATTTGACGGCGAGAG
<i>BZR1</i>	F	TCATCATTCCCGAGTCCTTC
	R	AATGGCCATGGATTGCTTAG
<i>BES1</i>	F	TCGAGCAACTCCTTACTCTTCC
	R	GAAGGAATACCACCATTCTGA
<i>BAS1</i>	F	TTGGCTTCATACCGTTTGGC
	R	TTACAGCGAGTGTC AATTTGGC
<i>ACTIN-2</i>	F	GACCTTGCTGGACGTGACCTTAC
	R	GTAGTCAACAGCAACAAAGGAGAGC
<i>miR156</i>	F	CCTGAGTGACAGAAGAGAGTG
<i>Stem-loop miR156</i>	--	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTAT TCGCACTGGATACGACTGCTCT
Reverse universal	R	GTGCAGGGTCCGAGG
SALK LBb.1	R	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT

\*F: Forward. R:Reverse



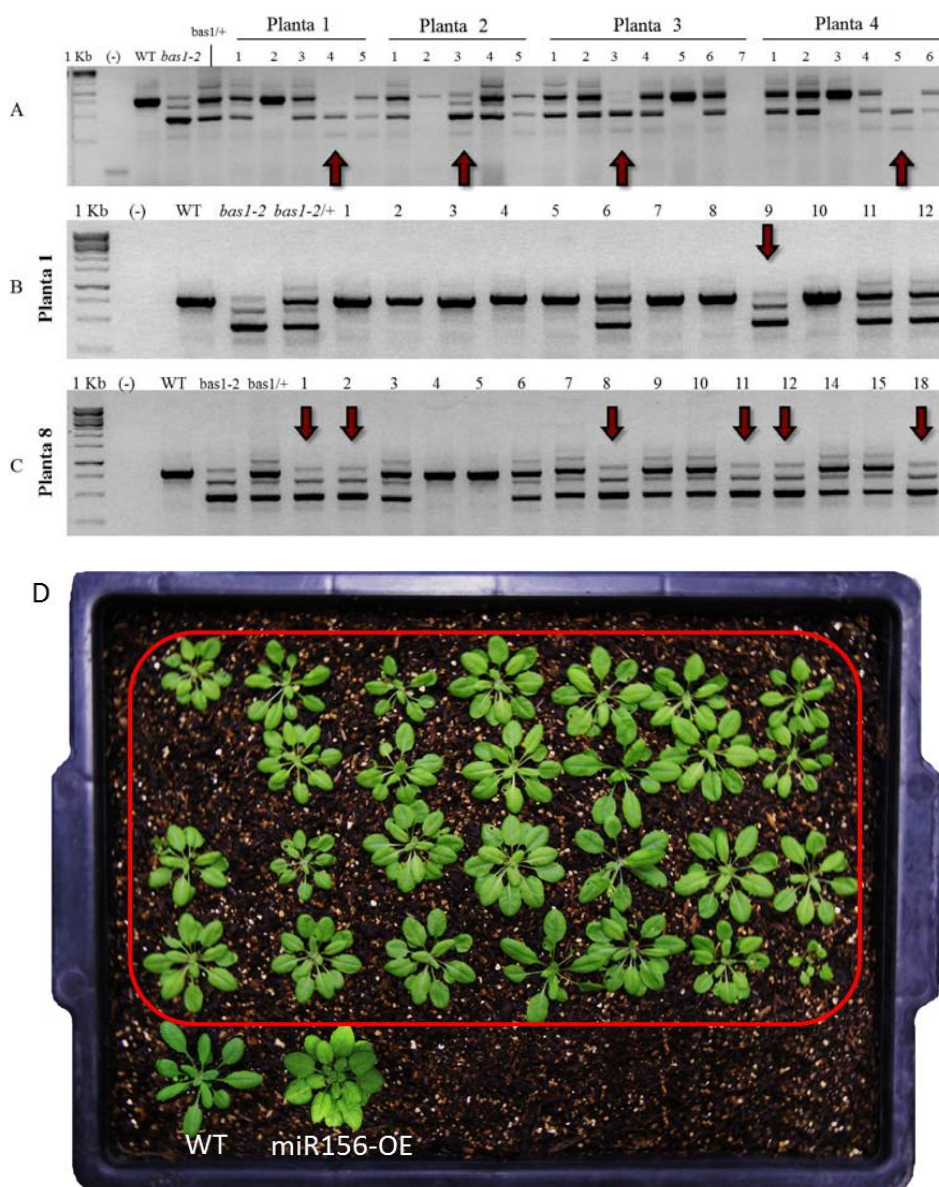
**Anexo 2.**

Genotipagem dos cruzamentos A e B para a presença da inserção do T-DNA nas plantas F1. A seta indica o tamanho esperado do fragmento amplificado, correspondente a 831pb.



### Anexo 3

Genotipagem da F3 e F4 dos cruzamentos miR156-OE x *bas1-2* (A) e Mimicry-156 x *bas1-2* (B e C) para a presença da inserção do T-DNA. A seta vermelha indica homozigose para *bas1-2*. **D**: Teste de progênie na geração F4 para a identificação das plântulas homozigotas miR156-OE/miR156-OE *bas1-2/bas1-2*. As plântulas dentro da linha vermelha correspondem às F4 segregantes para o miR156-OE (foto ilustrativa).



## REFERÊNCIAS

- ADENOT, X. *et al.* DRB4-dependent TAS3 trans-acting siRNAs control leaf morphology through AGO7. **Curr. Biol.**, v. 16, p. 927-932, 2006.
- ALONSO, J. *et al.* Genome wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. **Science**, v. 301, p. 653-657, 2003.
- ARSOVSKI, A. *et al.* Photomorphogenesis. **Arabidopsis Book**, v. 10, p. e0147, 2012.
- AXTELL, M. Classification and Comparison of Small RNAs from Plants. **Annual Review of Plant Biology**. V, 64:137–59, 2013.
- AZPIROZ, R. *et al.* An Arabidopsis brassinosteroid-dependent mutant is blocked in cell elongation. **Plant Cell**, v. 10, 219–230. 1998.
- BAO, F. *et al.* Brassinosteroids Interact with Auxin to promote lateral root development in Arabidopsis. **Plant Physiology**. V, 134:1624–1631, 2004.
- BARTEL, D. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, V. 116:281-297, 2004.
- BENLLOCH, R. *et al.* Floral initiation and inflorescence architecture: a comparative view. **Annals of Botany**. V, 100:659–676, 2007
- BREAKFIELD, N. *et al.* High-resolution of experimental and computational profiling of tissue-specific known and novel miRNAs in Arabidopsis. **Genome Research**. 2012 22: 163-176, 2012.
- CAESAR, K., *et al.* A fast brassinolide-regulated response pathway in the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**. V, 66:528-540, 2011.
- CARDON, G. *et al.* Molecular characterisation of the Arabidopsis *SBP*-box genes. **Gene**. V, 237(1): 91, 1999.
- CHEN, X. Small RNAs and their roles in plant development. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**. V, 25:21-44, 2009.
- CHEN, X. *et al.* SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-like Transcription Factors: Star Player Growth and development. **Journal Integrative Plant Biology**. V, 52(11):946-951, 2010.

CHUCK, G. *et al.* The heterocronic maize mutante Corngrass1 results from overexpression on a tandem microRNA. **Nature Genetics**. V, 39(4):544-549, 2007.

CLOUSE, S. Brassinosteroids. The Arabidopsis Book. **The American Society of Plant Biologists**, USA. Doi: 10.1199/tab.0151, 2011.

CLOUSE, S. *et al.* A brassinosteroids-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. **Plant Physiology**. V, 111:671-678, 1996

CLOUSE, S., ZUREK, D. Molecular analysis of brassinolide action in plant growth and development. En: Brassinosteroids Chemistry, Bioactivity, & Applications, H.G. Cutler, T. Yokota, and G. Adam, eds (Washington, D.C.: American Chemical Society), pp. 122-140, 1991.

COSGROVE, D. Relaxation in a high-stress environment: the molecular basis of extensible cell walls and enlargement. **Plant Cell**. V, 9:1031-1041, 1997.

CUI, L. *et al.* The miR156-SPL9-DFR pathway coordinates the relationship between development and abiotic stress tolerance in plants. **Plant Journal**. DOI: 10.1111/tpj.12712, 2014.

CURABA, J. *et al.* miRNAs in the crosstalk between phytohormone signalling pathways. **Journal of Experimental Botany**, V, 65(6):1425–1438, 2014.

FRANCO, J. *et al.* Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. **Nature Genetics**. V, 39:1033-1037, 2007.

FRIDMAN, Y., SAVALDI, S. Brassinosteroids in growth control: How, when and where. **Plant Science**, V. 209:24-31, 2013.

FRIEDRICHSEN, D., CHORY, J. Steroid signalling in plants: from the cell surface to the nucleus. **BioEssays**, V 23:1028-1036, 2001.

FUJIOKA, S., SAKURAI, A. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Physiol. Plant*, V 100: 710-715, 1997.

FUJIOKA, S., YOKOTA, T. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. **Annual Review of Plant Biology**. 54, 137-164, 2003.

GANDIKOTA, M. *et al.* The miRNA156/157 recognition element in the 3'UTR of the Arabidopsis SBP box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. **Plant Journal**. 49, 683–693, 2007.

GIFFORD, M. *et al.* Cell-specific nitrogen responses mediate developmental plasticity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, V. 105: 803–808, 2008.

GODA, H. *et al.* Microarray Analysis of Brassinosteroid-Regulated Genes in Arabidopsis. **Plant Physiology**, V. 130: 1319–1334, 2002.

GOU, H. *et al.* Negative Regulation of Anthocyanin Biosynthesis in Arabidopsis by a miR156-Targeted SPL Transcription Factor. **The Plant Cell**, V. 23:1512–1522, 2011.

GROVE, M. *et al.* Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. **Nature**, V. 281:216–217, 1979.

GUO, H. *et al.* MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for Arabidopsis lateral root development. **Plant Cell**, V. 17:1376–1386, 2005.

HAN, M. *et al.* The Arabidopsis doublestranded RNA-binding protein *HYL1* plays a role in microRNA-mediated gene regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, V. 101:1093–1098, 2004.

HAO, J. *et al.* Brassinosteroid signaling network: implications on yield and stress tolerance. **Plant Cell Rep.** DOI 10.1007/s00299-013-1438-x, 2013.

HEWEZI, T. *et al.* The Arabidopsis microRNA396-GRF1/GRF3 regulatory module acts as a developmental regulator in the reprogramming of root cells during cyst nematode infection. **Plant Physiology**, V. 159:321–335, 2012.

HU, Y. *et al.* Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in Arabidopsis. **Plant Journal**, V. 24:693–701, 2000.

JIAO, Y. *et al.* Regulation of OsSPL14 by OsmiR156 defines ideal plant architecture in rice. **Nature Genetics**, V. 42:541–544, 2010.

KANT, S. *et al.* SAUR39, a small auxin-up RNA gene, acts as a negative regulator of auxin synthesis and transport in rice. **Plant Physiology**, V. 151:691–701, 2009.

KIM, T., WANG, Z. Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors. **Annual Review of Plant Biology**, V. 61:681–704, 2010.

KRAMER, M. STEM-LOOP RT-qPCR for miRNAs. **Curr Protoc Mol Biol.** Chapter 15: Unit 15.10.doi: 10.1002/0471142727.mb1510s95, 2011.

- LEE, R. *et al.* The C-elegans heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, V 5:843-854, 1993
- LI, S. *et al.* HYL1 controls the miR156-mediated juvenile phase of vegetative growth. **Journal of Experimental Botany**, V. 63(7):2787–2798, 2012
- LIN, L. *et al.* Identification of microRNA395a in 24-epibrassinolide-regulated root growth of *Arabidopsis thaliana* using microRNA arrays. **International Journal of Molecular Sciences**. V. 14:14270-14286, 2013.
- LIU, H. *et al.* Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. **RNA**, V. 14:836–843, 2008.
- LIU, Q., CHEN, Y. Insights into the mechanism of plant development: interactions of miRNAs pathway with phytohormone response. **Biochemical and biophysical research communications**, V. 384(1):1-5, 2009.
- MALLORY, A. *et al.* MicroRNA-directed regulation of Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. **The Plant Cell**., V. 17:1360–1375, 2005.
- MARIN, E. *et al.* miR390, Arabidopsis TAS3 tasiRNAs, and their AUXIN RESPONSE FACTOR targets define an autoregulatory network quantitatively regulating lateral root growth. **Plant Cell**., V. 22:1104–1117, 2010.
- MATHUR, J. *et al.* Transcription of the Arabidopsis CPD gene, encoding a steroidogenic cytochrome P450, is negatively controlled by brassinosteroids. **Plant Journal**. 1998. Vo. 14(5):593-602, 1998.
- MORILLON, R. *et al.* Brassinolide may control aquaporin activities in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, V. 212:199-204, 2001.
- MUSSIG, C. *et al.* Brassinosteroids Promote Root Growth in Arabidopsis. **Plant Physiology**, V. 133: 1261–1271, 2003.
- NEFF, M. *et al.* BAS1: A gene regulating brassinosteroid levels and light responsiveness in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 96,15316-15323, 1999.
- NODINE, M., BARTEL, D. MicroRNAs prevent precocious gene expression and enable pattern formation during plant embryogenesis. **Genes and Development**, V. 24:2678–2692, 2010.

NOGUEIRA, F. *et al.* Regulation of Small RNA Accumulation in the Maize Shoot Apex. **PLoS Genet.** V, 5(1):e1000320, 2009.

NOGUEIRA, F. *et al.* Two small regulatory RNAs establish opposing fates of a developmental axis. **Genes Development**, V. 21:750-755, 2007.

OH, M.H., CLOUSE, S.D. Brassinolide affects the rate of cell division in isolated leaf protoplasts of *Petunia hybrida*. **Plant Cell Reports**, V. 17:921-924, 1998.

ORTIZ-MOREA, E. Papel funcional de microRNAs na arquitetura vegetativa e radicular de **Plantas**. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu (SP-Brasil), 2013.

PAGANO, M., GAUVREAU, K. Princípios de bioestatística, **Câmara brasileira do livro**. ISBN: 978-85-221-0344-7, 2012.

PILLAI, R. MicroRNA function Multiple mechanisms for a tiny RNA? **RNA**, V. 11 (12): 1753-1761, 2005.

REINHART, B. *et al.* MicroRNAs in plants. **Genes and Development**, V. 16:2313-2313, 2002.

REYES, J., CHUA, N. ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during *Arabidopsis* seed germination. **The Plant Journal**, V. 49:592–606, 2007.

RIESE, M. *et al.* SBP-domain transcription factors as possible effectors of cryptochrome-mediated blue light signalling in the moss *Physcomitrella patens*. **Planta**, V. 227(2):505–515, 2008.

RUBIO, I., WEIGEL, W. MicroRNA networks and developmental plasticity in plants. **Trends in Plant Science**, V. 16 (5): 258-264, 2011.

SAUMET, A., LECCELLIER, C. Anti-viral RNA silencing: do we look like plants? **Retrovirology**, V. 3(3):1-11, 2006.

SCHWAB R. *et al.* Specific effects of MicroRNAs on the plant transcriptome. **Developmental Cell**, V. 8 (5):517-525, 2005.

SHIKATA, M. *et al.* *Arabidopsis* SBP-Box Genes *SPL10*, *SPL11* and *SPL2* Control Morphological Change in Association with Shoot Maturation in the Reproductive Phase. **Plant Cell Physiol**, V. 50(12):2133–2145, 2009.

SHIMADA, Y. *et al.* Organ-specific expression of brassinosteroid-biosynthetic genes and distribution of endogenous brassinosteroids in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, V. 131:287-297, 2003.

SILVA, G. *et al.* microRNA156-targeted SPL/SBP box transcription factors regulate tomato ovary and fruit development. **Plant Journal**. V. 78(4):604-18, 2014.

STIEF, A. *et al.* Arabidopsis miR156 Regulates Tolerance to Recurring Environmental Stress through SPL Transcription Factors. **Plant Cell**. V. 26(4):1792-1807, 2014.

SUN, Y. *et al.* Integration of Brassinosteroid Signal Transduction with the Transcription Network for Plant Growth Regulation in Arabidopsis. **Developmental Cell**, v. 19:765–777, 2010.

SUNKAR, R. MicroRNAs in plant development na stress responses. Oklahoma State University. Springer Heidelberg Dordrecht London, New York, USA. ISBN: 978-3-642-27384-1 (Online), 2012.

TAIZ , L., ZEIGER, T. Fisiologia Vegetal. 4. Ed. Págs: 682-699. Porto Alegre, Brasil, 2006.

THORNTON, L. *et al.* Arabidopsis CYP72C1 is an atypical cytochrome P450 that inactivates brassinosteroids. **Plant Mol Biol**, V. 74:167–181, 2010.

TIAN, Q. Arabidopsis SHY2/IAA3 inhibits auxin-regulated gene expression. **The Plant Cell Online** 14, 301–319, 2002.

TSAI, H. *et al.* HUA ENHANCER1 Is Invved in Posttranscriptional Regulation of Positive and Negative Regulators in Arabidopsis Photomorphogenesis. **The Plant Cell**, V. 26(7):2858-2872, 2014.

TURK, E. *et al.* BAS1 and SOB7 act redundantly to modulate Arabidopsis photomorphogenesis via unique brassinosteroid inactivation mechanisms. **Plant Journal**. V. 42:23-34, 2005.

TURK, E. *et al.* CYP72B1 Inactivates Brassinosteroid Hormones: Na Intersection between Photomorphogenesis and Plant Steroid Signal Transduction. **Plant Physiology**, V. 133:1643–1653, 2003.

USAMI, T. *et al.* The more and smaller cells mutants of *Arabidopsis thaliana* identify novel roles for SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE genes in the control of heteroblasty. **Development** 136, 955-964, 2009.



VARKONYI, E. *et al.* Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. **Plant Methods**, V. 3(12):1-12, 2007.

VERT, G. *et al.* Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, V. 21:177-201, 2005.

VIDAL, E. *et al.* Nitrate-responsive miR393/AFB3 regulatory module controls root system architecture in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, V. 107:4477–4482, 2010.

WANG, J. *et al.* Control of Root Cap Formation by MicroRNA-Targeted Auxin Response Factors in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, V. 17(8): 2204–2216, 2005.

WANG, J. *et al.* miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. **Cell** 138: 738–749, 2009.

WEIGEL, D., GLAZEBROOK, JANE. *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1st edition. **CSHL Press**. 354 páginas ISBN-13: 978-0879695736, 2002.

WU, G. *et al.* The Sequential Action of miR156 and miR172 Regulates Developmental Timing in *Arabidopsis*. **Cell**, V. 138:750-759, 2009.

WU, G., POETHIG, S. Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3. **Development**, V. 133:3539-3547, 2006.

XIE, K. *et al.* Gradual increase of miR156 regulates temporal expression changes of numerous genes during leaf development in rice. **Plant Physiology**, V. 158(3):1382-1394, 2012.

XIE, L. *et al.* Brassinosteroids can regulate cellulose biosynthesis by controlling the expression of CESA genes in *Arabidopsis*. **J. Exp. Bot.** V. 62:4495-4506, 2011

XING, S. *et al.* miR156-targeted and nontargeted SBP-box transcription factors act in concert to secure male fertility in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, V. 22:3935–3950, 2010.

XUE, X. *et al.* Interaction between two timing microRNAs controls trichome distribution in *Arabidopsis*. **PLoS Genet.** V. 10(4):e1004266, 2014.

YAMAGUCHI, A. *et al.* The microRNA-regulated SBP-Box transcription factor SPL3 is a direct upstream activator of LEAFY, FRUITFULL, and APETALA1. **Dev. Cell**, V. 17, 268–278, 2009.

YANAI, O. *et al.* Gibberellin partly mediates LANCEOLATE activity in tomato. **The Plant Journal**, V. 68:571–582, 2011.

YANG, L. *et al.* Sugar promotes vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana* by repressing the expression of MIR156A and MIR156C. 26;2:e00260. doi: 10.7554/eLife.00260, 2013.

YU, S. *et al.* Gibberellin regulates the *Arabidopsis* floral transition through miR156-targeted SQUAMOSA promoter binding-like transcription factors. **The Plant Cell**, V. 24:3320-3332, 2012.

YU, N. *et al.* Temporal Control of Trichome Distribution by MicroRNA156-Targeted SPL Genes in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell**, 22(7):2322-35, 2010.

YU, X. *et al.* A brassinosteroid transcriptional network revealed by genome-wide identification of *BESI* target genes in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**. V. 65:634-646, 2011.

ZHANG, B. *et al.* Conservation and divergence of plant microRNA genes. **Plant Journal**., V. 46:243–259, 2006.

ZHAO, C. *et al.* Deep sequencing identifies novel and conserved microRNAs in peanuts (*Arachis hypogaea* L.). **BMC Plant Biology**, V. 5(10):1382-1394, 2010