

PAPEL FUNCIONAL DE microRNAs NA ARQUITETURA VEGETATIVA E RADICULAR DE PLANTAS

EDNA GICELA ORTIZ MOREA

Botucatu

2013

Instituto de Biociências – Departamento de Genética
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Botucatu SP Brasil
Tel 14 3811 6229/6016 fax 14 3815 3744 genetica@ibb.unesp.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

PAPEL FUNCIONAL DE microRNAs NA ARQUITETURA
VEGETATIVA E RADICULAR DE PLANTAS

Mestranda: EDNA GICELA ORTIZ MOREA

Orientador: Prof.Dr. FÁBIO TEBALDI SILVEIRA NOGUEIRA

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP,
para a obtenção do título de Mestre no
programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas área de concentração Genética

Botucatu

2013

Instituto de Biociências – Departamento de Genética
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Botucatu SP Brasil
Tel 14 3811 6229/6016 fax 14 3815 3744 genetica@ibb.unesp.br

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Morea, Edna Gicela Ortiz.

Papel funcional de microRNAs na arquitetura vegetativa e radicular de plantas / Edna Gicela Ortiz Morea. - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Fábio Tebaldi Silveira Nogueira

Capes: 20203004

1. Genética vegetal. 2. Morfologia vegetal. 3. Expressão gênica.
4. Plantas – Efeito da auxina. 5. Ácido ribonucleico.

Palavras-chave: Arquitetura radicular; Evolução; miR156; miR529; SPLs.

Dedico este trabalho a...

A Deus por sempre ficar do meu lado, por que me fortalece e me guia na realização dos meus sonhos.

Aos meus pais Luis Eduardo Ortiz Cuellar e Maria Angela Morea Toledo pelo imenso apoio e amor, pela minha formação pessoal e acadêmica.

A minha irmã Karen Johana Ortiz Morea porque sempre está comigo.

A Juan Diego Loaiza Medina e seus pais pelo amor, companhia e por ter-se aventurado comigo na realização de meus sonhos

A toda minha família pela ajuda psicológica durante várias fases deste trabalho, e especialmente minha querida avó Mercedes Toledo quem sempre me apoiou e ajudou.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Fábio T. S. Nogueira, pela competência, ensinamento e pela oportunidade de realizar pós-graduação, orientando durante a realização deste trabalho.

À profa. Dr. Claudia Rainho coordenadora do Programa de Genética pelo apoio e compreensão em cada etapa deste processo, e ao instituto de Biociências UNESP-Botucatu.

Ao colega Eder Silva, pelo aprendizado compartilhado, pelo apoio e a força no meu português, fico muito grata além disso tenho certeza que esta sempre torcendo por mim.

A todos os integrantes do laboratório de Genética Molecular do Desenvolvimento Vegetal (GMDV): Geraldo Silva, Cristiane de Santis, Mike corazón, Carlos Barrera, Debora Bidoia e Vitor Pinotti, pelo apoio, companheirismo e convívio.

Aos meus familiares e amigos

A Fausto Andres Ortiz Morea e Adriana Marcela Silva pelo apoio, conselhos e pela orientação no primeiro passo deste processo, agradeço muito a vocês.

A minhas amigas Natalia Echeverry e Kerly Andrade pela amizade além da distancia.

À colônia Colombiana por fazer-me sentir perto de casa, e pelos bons momentos, foi muito legal conhecer pessoas como vocês.

Aos membros do laboratório do prof. Ivan Godoy pelo material prestado e convívio.

Ao programa CAPES, pela concessão desta bolsa de estudos.

Ao programa de pós-graduação em Genética.

Ao Instituto de biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista
"Julho de Mesquita Filho" UNESP.

Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima.
Louis Pasteur

Pesquisa é ver o que toda a gente viu e pensar o que ninguém pensou.
Albert Szent Gyorgi

LISTA DE ABREVIações

miRNAs	microRNAs
mRNA	RNA mensageiro
RSA	Arquitetura do sistema radicular
LR	Raízes laterais
MZ	Zona meristemática
EZ	Zona de alongamento
DZ	Zona de diferenciação
PRL	Primórdio da raiz lateral
DAG	Dias apos a germinação
SPL	SQUAMOSA PROMOTER BINDIN PROTEIN-LIKE
IAA	Ácido indol acético
NPA	1-N- Ácido naftiltalâmico

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Modelo da biogênese e mecanismos de ação de miRNAs em plantas (retirado de Ortiz-Morea, 2011).....6
- Figura 1.2.** Modelo simplificado da evolução dos genes *MIR* e genes-alvo (Allen *et al.*, 2004). A duplicação invertida de uma porção ou fragmento do gene dá origem a um segmento que, quando transcrito, produz RNA com estrutura *hairpin*, tornando-o substrato para enzimas DICER-LIKE tais como a DCL1 e DCL4. Com o acúmulo de mutações (blocos em preto), ocorre perda da complementariedade em grande parte da sequência, com conservação somente de região que vem a ser o miRNA maduro (retirado de Zanca, 2009).....8
- Figura 1.3.** Filogenia simplificada e tempos de divergência entre plantas terrestres. A Figura mostra os quatro modelos de plantas com informações genômicas mais adequadamente anotadas em banco de dados de miRNAs, incluindo a eudicotiledônea "*core*" *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*), a monocotiledônea *Oryza sativa* (*O. sativa*), o leucopódio *Selaginella moellendorffii* (*S. moellendorffii*) e a briofita *Physcomitrella patens* (*P. patens*) (Figura retirada de Puzey e Kramer 2009).....10
- Figura 1.4.** Caracterização do sistema radicular de *arabidopsis*. **A)** Visão geral das zonas de desenvolvimento da raiz primária de *arabidopsis*. **B)** Esquemas de corte transversal e longitudinal da ponta da raiz primária. As cores indicam as camadas de células presentes (Figura modificada de Breakfield *et al.*, 2011 e Petricka *et al.*, 2012).....11
- Figura 1.5.** **A)** Esquema da zona de diferenciação, em corte longitudinal da raiz primária. As raízes laterais iniciam o periciclo (vermelho) quando as divisões anticlinais das células ocorrem num subconjunto de células nesta camada. **B)** Etapa de desenvolvimento das raízes laterais. (retirado de Petricka *et al.*, 2012).....13

- Figura 2.1.** miR156 e miR529 que são conservados entre famílias de plantas representadas no miRBase *release 16* (Griffiths-Jones *et al.*, 2008). Os quadros coloridos representam as famílias vegetais nas quais os miRNAs foram identificados (Figura modificada a partir de Cuperus *et al.*, 2011).....30
- Figura 2.2.** Esquema do *pulsed stem-loop* RT-PCR retirado de (Varkonyi-Gasic *et al.*, 2007). Iniciadores específicos *stem-loop* anelam na porção 3' das moléculas de miRNA maduro, iniciando sua transcrição reversa. Posteriormente, o miRNA maduro é amplificado utilizando-se iniciador direto específico e um iniciador reverso universal.....39
- Figura 2.3.** Análise do acúmulo de transcritos maduros do miR156 e miR529b (RT-PCR) em monocotiledôneas (*Saccharum spp.*, *Sorghum bicolor*, *Oryza sativa*, *Brachypodium distachyon*) e eudicotiledôneas (*Arabidopsis thaliana* e *Solanum lycopersicum*). Controle negativo: reação de RT-PCR sem cDNA RT (-).....42
- Figura 2.4.** Análise filogenética dos precursores do miR156 e miR529 de *Physcomitrella patens*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Aquilegia coruela* e *Arabidopsis thaliana*. Setas pretas indicam precursores do miR156 no grupo B e seta verde indica precursor do miR529 no grupo A.....43
- Figura 2.5. A)** Análise filogenéticas de genes *SPLs* que contém o sítio de reconhecimento do miR529b. Quadro vermelho indica as eudicotiledôneas, quadro azul indica as briófitas e quadro verde indica as monocotiledôneas. Setas indicam os únicos dois membros *SPL15* (AY086384) e *SPL9* (AJ011638) em *Arabidopsis thaliana* que contém o sítio conservado de reconhecimento do miR529b. **B)** Predição do sítio de reconhecimento das *SPL9* e *SPL15* em *arabidopsis* pelos miR529b e miR156.....45
- Figura 2.6. A)** Análises filogenéticas utilizando os alvos do miR529b de musgo, arroz, milho e seus possíveis alvos em *arabidopsis*. **B)** Estrutura de éxon e íntron. Caixas pretas indica a região dos éxons, enquanto as linhas indicam os íntrons. O comprimento das caixas e linhas são baseadas no comprimento dos genes.....47

- Figura 2.7.** Sequência e amplificação do *locus* correspondente ao *OsMIR529b* (1Kb). **(A)** iniciadores específicos (em vermelho), região do *OsMIR529b* (em amarelo) e do *miR529b* (em azul). **(B)** Gel de agarose 1% mostrando o *amplicon* gerado.....47
- Figura 2.8.** Estrutura em forma de *hairpin* do precursor do *OsMIR529b* de arroz (característica dos precursores dos microRNAs). Em destaque o *miR529b*.....48
- Figura 2.9.** Análise genotípica dos 15 eventos transgênicos obtidos. A banda de aproximadamente 1100pb corresponde ao *amplicon* gerado pelo iniciador direto posicionado no promotor CaMV35S e o iniciador reverso no final da sequência correspondente ao precursor *OsMIR529b*.....48
- Figura 2.10.** Análise fenotípica dos eventos transgênicos 529OE#1 **(D, J)**, 529OE#2 **(E, K)** 529OE#3 **(F, I)** comparadas com WT Col-0 **(A, G)**, 156OE **(B, H)**, e duplo mutante de perda de função *spl9/15* **(C, I)**. Fenótipo de plantas adultas (6 semanas de idade) **(A-F)** e rosetas de 25 DAG **(G-L)**. Plantas 529OE apresentaram fenótipo similar ao duplo mutante de perda de função *spl9/spl15*. A barra indica 1cm.....49
- Figura 2.11.** **(A)** e **(B)** tempo de florescimento de WT Col-0, 156OE, duplo mutante de perda de função *spl9/15* e 529OE (eventos de transformação #1, #2 e #3). O eixo X indica o número de folhas **(A)** ou número de dias após a germinação **(B)**, o eixo Y indica a porcentagem de plantas que floresceram. Dias após a germinação (DAG).....51
- Figura 2.12.** **(A)** Número de folhas em diferentes dias (15, 20 e 25 DAG). Foram utilizadas 12 plantas para cada genótipo (Col-0, 156OE, *spl9/15*, 529OE#1, 529OE#2 e 529OE#3). **(B)** Taxa de iniciação foliar. **(C-E)** Cortes histológicos do ápice vegetativo WT Col-0 **(C)**, *spl9/15* **(D)** e 529OE#2 **(E)**. Em destaque meristema (m) e primórdio foliar (P). Escala de 100µm.....53
- Figura 2.13.** **(A)** Folhas e meristemas regenerando a partir de calos transgênicos de *B. distachyon* Bd21 em meio de cultura suplementado com antibiótico *higromicina*. **(B)** Plantas

possivelmente transgênicas *OsMIR529b* de *B. distachyon* Bd21 em meio de cultura de enraizamento suplementado com antibiótico *higromicina*.....54

Figura 2.14. Análise de expressão via *pulsed stem-loop* RT-PCR de genes *SPL15*, *SPL9*, *SPL10* e *SPL13*, *OsMIR529b* (precursor) e os miRNAs maduros miR529b e miR156 em plantas *OsMIR529b-OE* (#1, #2, #3), *AtMIR156a-OE*, duplo mutante de perda de função *spl9/15* e WTCol-0. (C) número de ciclos realizados em cada RT-PCR.....55

Figura 2.15. Clivagem do transcrito *SPL15* em *Arabidopsis thaliana* guiado pelo miR529b nas plantas transgênicas 529OE. O número de clones clivados em cada posição sobre o total de clones analisados é indicado pela seta. Todos os transcritos analisados foram clivados no sítio de clivagem predito para o miR529b. Também é apresentado o sítio de clivagem guiado pelo miR156.....56

Figura 2.16. Análise de expressão gênica via *pulsed stem-loop* RT-PCR dos miRNAs miR156 e miR529b em diferentes tecidos/órgãos de arroz. (C) indica número de ciclos realizados em cada RT-PCR.....57

Figura 2.17. Valores normalizados (*transcripts per million* ou TPM) da abundância de microRNAs (eixo Y) enriquecidos das respectivas AGOs de arroz (eixo X).....58

Figura 3.1. **(A)** Foto de uma flor de *arabidopsis*, **(B)** Esquema da flor de *Arabidopsis*. Sépala (1), Filamento (2), Estilo (3), Pétala (4), Antera (5), Estigma (6), Pistilo (3 e 6). **(C)** Esquema da flor emasculada (sem anteras).....70

Figura 3.2. Plântulas de *arabidopsis* WT Col-0, *156OE*, *spl9/15* e *MIM156* 12 dias após a germinação em meio MS **(A)**, MS suplementado com 1µM IAA **(B)** ou 10µM NPA **(C)**.....72

Figura 3.3. Comprimento da raiz principal de *Arabidopsis thaliana* (Col-0, *156OE*, *spl9/15* e *MIM156*) germinadas em meio MS, com ou sem 1µM IAA ou 10µM NPA. (P <0,01, *Student's t-test*. As medidas seguidas da mesma letra não diferem significativamente). O erro

padrão é indicado. No eixo X são indicados os genótipos avaliados e o eixo Y indica o comprimento da raiz em milímetros.....73

Figura 3.4. Número de raízes laterais de arabidopsis (*Col-0*, *MIR156-OE*, *spl9/15* e *MIM156*) em meio MS, MS contendo 1µM IAA e 10µM NPA ($P < 0,01$, *Student's t-test*. As medidas seguidas da mesma letra não diferem significativamente). O erro padrão é indicado. No eixo X são indicados os genótipos avaliados e o eixo Y indica o número de raízes laterais.....74

Figura 3.5. Localização celular de auxina nos cruzamentos. Plântulas *pDR5:GFP* (A) comparadas com plântulas *156OE;pDR5:GFP* (B) e *MIM156;pDR5:GFP* (C). Nas duas fileiras da esquerda foi utilizado o aumento de 20 vezes e as duas fileiras da direita foi utilizado o aumento de 60 vezes. Procâmbio (Pc), centro quiescente (CQ), columela (C) e tecido vascular (TV).....75

Figura 3.6. Localização celular do transportador de exfluxo de auxina PIN1 nos cruzamentos. Plântulas transgênicas *pPIN1::PIN1:GFP* (A) comparadas com plântulas *156OE;pPIN1::PIN1:GFP* (B). Foi utilizado o aumento de 60 vezes. Periciclo (Pe), floema (Fl), metaxilema (Me) e procâmbio (Pc).....76

Figura 3.7. Localização de citocinina nos cruzamentos. Plântulas *pARR5:GUS* (A) comparadas com plântulas *156OE;pARR5:GUS* (B) e *MIM156;pARR5:GUS* (C). No lado esquerdo é apresentado o ápice radicular da raiz principal e do lado direito é apresentada a raiz principal junto com a emergência de raiz lateral. Em todas as figuras foi utilizado o aumento de 40 vezes. Zona meristemática primária (ZM1), zona meristemática tardia (ZM2), tecido vascular (TV), epiderme (Ep) e cortex (Co).....78

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 2.1.	Iniciadores específicos utilizados neste trabalho.....	34
Tabela 2.2.	Número de cópias dos miR156 e miR529 e número de seus respectivos alvos.....	44
Tabela 2.3.	Avaliação fenotípica dos eventos transgênicos 529OE (#1, #2 e #3), WT Col-0, linhagem transgênica 156OE e duplo mutante de perda de função <i>sp19/15</i>	50

Capítulo 3

Tabela 3.1	Cruzamentos.....	69
Tabela 3.3.	Comprimento da raiz principal e número de raízes laterais de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Col-0, 156OE, <i>sp19/15</i> e <i>MIM156</i>) 12 dias após a germinação, crescidas em meio MS. O erro padrão é indicado.....	71

Resumo

Os MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs endógenos não codantes de 20-22 nucleotídeos (nt) que regulam a expressão gênica de genes-alvos. Eles estão envolvidos em diversos aspectos de desenvolvimento da planta, tanto na parte aérea, quanto no sistema radicular. Os miRNAs e seus genes-alvos tem uma complementariedade quase perfeita em plantas, sendo que esta complementariedade está relacionada à origem dos genes de miRNAs (genes *MIRs*). A hipótese mais aceita para a origem dos genes de miRNAs é a "hipótese de duplicação invertida", a qual propõe que os genes de miRNAs surgiram a partir de duplicações invertidas do seus genes-alvos nos genomas vegetais. Muitos genes-alvos de miRNA em plantas codificam para fatores de transcrição, tais como os genes *SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like (SPLs)*. Alguns membros da família *SPL* são regulados por ambos os miRNAs, miR156 e miR529. O sítio de reconhecimento destes microRNAs em transcritos de genes *SPLs* é conservado e difere somente por sete nucleotídeos. Enquanto o miR156 é altamente conservado entre Angiospermas, incluindo *arabidopsis*, o miR529 aparentemente está presente somente em eudicotiledôneas basais, monocotiledôneas e no musgo *Physcomitrella patens*. Neste trabalho, foram realizadas duas abordagens para o estudo da via miRNAs/SPL. Na primeira abordagem, foi analisada a evolução e a possível função da via miR529/SPL em monocotiledôneas e eudicotiledôneas. Foi testado o sítio de reconhecimento do miR529b em dois genes *SPLs* (*SPL9* e *SPL15*) de *arabidopsis* encontrados bioinformaticamente via geração de plantas transgênicas de *arabidopsis* superexpressando o precursor de arroz *OsMIR529b*. As linhagens transgênicas de *arabidopsis* (*OsMIR529b-OE*) apresentaram fenótipos vegetativos e reprodutivos similares aos de plantas duplo mutantes de perda de função para os genes *SPL9* e *SPL15* de *arabidopsis* (denominado *spl9/spl15*). Estes resultados sugerem que o *OsmiR529b* é processado e funcional em eudicotiledôneas e que este miRNA foi possivelmente perdido na história evolutiva recente das eudicotiledôneas. Finalmente, na segunda abordagem foi avaliado o possível papel funcional da via miR156/SPL na formação de raízes laterais de *Arabidopsis thaliana*. Foram

comparados a comprimento da raiz principal e número de raízes laterais 12 dias após a germinação em plântulas de *arabidopsis* selvagem ecótipo Columbia (WT Col-0), duplo mutante Col-0 com perda de função dos genes *SPL9* e *SPL15* (*sp/9/15*) e plantas transgênicas Col-0 *156OE* e *MIM156* quando crescidas em meio MS e meio MS suplementado com 1 μ M de IAA (ácido indol acético) ou 10 μ M do inibidor do efluxo de auxina NPA (N-1-ácido naftilftalâmico). Foram observadas diferenças significativas no comprimento da raiz principal em plantas *156OE* quando comparadas aos outros genótipos analisados. Entretanto, foi observado aumento significativo do número de raízes laterais em plantas transgênicas superexpressando o miR156 (*156OE*) e no duplo mutante *sp/9/15*, quando comparadas as plantas WT. Interessantemente, este aumento foi similar em meio com ou sem a presença de IAA, sugerindo que essas plantas apresentam resposta diferenciada à aplicação de auxina. Dados preliminares de análise de distribuição de auxina e citocinina, bem como da localização da proteína PIN1 nos sistemas radiculares desses genótipos, sugerem um papel da via miRNA156/SPL no crescimento e desenvolvimento de raízes laterais em *arabidopsis* e uma possível relação desta via com sinalização e distribuição dos fitohormônios auxina e citocinina.

Palabras chaves: miR529, miR156, SPLs, evolução, arquitetura radicular, auxina e citocinina.

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are endogenous small non-coding RNAs of 20-22 nucleotides (nt) in length that regulate the gene expression transcriptionally and posttranscriptionally. They are involved in many aspects of plant development, both in the shoot and in the root systems. MiRNAs and their target genes have an almost perfect complementarity in plants, and this is related to the complementarity of genes origin of miRNAs genes (*MIR* genes). The most accepted hypothesis for the origin of miRNA genes is the "inverted duplication hypothesis," which proposes that genes of miRNAs arose from inverted duplications of their target genes in plant genomes. Many miRNA target genes in plants encode transcription factors such as *SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like* (*SPLs*). Some *SPL* family members *SPL* are regulated by both miRNAs, miR156 and miR529. The recognition site for these microRNAs in *SPL* transcripts is conserved and only differs by seven nucleotides. While miR156 is highly conserved among Angiosperms, including *Arabidopsis thaliana*, miR529 is apparently present only in basal eudicots, monocots and in the moss *Physcomitrella patens*. In this work, were performed two approaches to study miRNA-direct *SPL* gene regulation. In the first approach, we analyzed the evolution and possible function of the miR529/*SPL* pathway in monocots and eudicotyledonous. We searched for miR529b recognition sites in *SPL* genes from core eudicots, such as *Arabidopsis thaliana*. Interestingly, we found two miR529b-targeted *SPLs* (*SPL9* and *SPL15*) in *Arabidopsis* and showed that the recognition sites are functional via the generation of transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing *OsMIR529b*. *OsMIR529b*-OE overpressors are phenotypically and molecularly similar to the double mutant *spl9/spl15*. Our data suggest that miR529b is processed and functional in core eudicots and that this microRNA was recently lost in the evolutionary history of the eudicots. Finally, in the second approach, we evaluated the possible functional role of the miR156/*SPL* pathway in the formation of *Arabidopsis* root system. Twelve days after germination, we found significant differences in length of the primary root between miR156 overexpressors (156OE) and the other evaluated genotypes, including WT plants. In addition, we found a higher number of lateral roots in the

sp/9/15 double mutant when compared with WT and MIM156 transgenic plants. Interestingly, the many number of lateral roots in 156OE and *sp/9/15* did not differ significantly on the presence or absence of exogenous auxin, suggesting that these plants have different responses to the application of auxin. Preliminary analyzes of distribution of auxin and cytokinin as well as the location of PIN1 protein in root systems of these genotypes suggested a role of the miRNA156/SPL pathway in the growth and development of Arabidopsis lateral roots and a possible relationship of this pathway with signalin and distribution and homeostasis of the plant hormones auxin and cytokinin.

Keys words: miR529b, miR156, SPLs, Evolution, Root architecture and vegetative architecture.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

Resumo

Abstract

1.1 INTRODUÇÃO	1
1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
1.2.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo para estudos genéticos	4
1.2.2 Biogênese dos microRNAs em plantas	5
1.2.3 Considerações gerais relacionadas à evolução dos miRNAs e genes alvos em plantas.....	7
1.2.4 Arquitetura do sistema radicular em eudicotiledôneas	10
1.2.4.1 Formação da raiz primária.....	11
1.2.4.2 Formação de raízes laterais	12
1.2.5 Controle hormonal no desenvolvimento e crescimento das raízes	13
1.2.6 MicroRNAs e seus efeitos na formação do sistema radicular	16
Referências.....	18

2. O microRNA529b REGULA GENES ESPECÍFICOS DE *SQUAMOSA* *PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE* (SPL) EM EUDICOTILEDÔNEAS.....

Resumo

Abstract

2.1 INTRODUÇÃO.....	29
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
2.2.1 Material vegetal.....	32
2.2.2 Análises filogenéticas.....	32
2.2.2.1 Análises filogenéticas dos precursores dos miR156 e miR529.....	32
2.2.2.2 Análises filogenéticas dos genes <i>SPLs</i> com o sítio de reconhecimento do miR529b.....	32

2.2.3 Análise de estrutura Éxon/Íntron de genes <i>SPLs</i>	33
2.2.4 Construção do cassete de expressão para a superexpressão do <i>OsMIR529b</i>	33
2.2.5 Transformação genética de <i>Arabidopsis thaliana</i> pelo método <i>floral-dip</i>	35
2.2.6 Caracterização genotípica das plantas transgênicas	36
2.2.7 Análises estatísticas.....	36
2.2.8 Caracterização fenotípica das plantas transgênicas de <i>arabidopsis</i> contendo o transgene <i>p35S::OsMIR529b</i>	37
2.2.9 Análises histológicas do ápice vegetativo de plantas selvagens, transgênicas e mutantes.....	37
2.2.10 Isolamento, tratamento com DNaseI e quantificação do RNA total.....	37
2.2.11 Síntese de cDNA via <i>pulsed stem-loop</i> RT-PCR	38
2.2.12 Confirmação da clivagem de genes alvo de miRNAs por 5'-RACE.....	39
2.2.13 Análise <i>in silico</i> de incorporação dos miRNAs miR156 e miR529b nas Argonautas (AGOs) de arroz	40
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
2.3.1 Análises dos transcritos do miR529b em monocotiledôneas e em eudicotiledôneas.....	41
2.3.2 Análises filogenéticas.....	42
2.3.2.1 Análise filogenéticas dos precursores do miR156 e miR529.....	42
2.3.2.2 Análises filogenéticas dos genes <i>SPLs</i> com o sítio de reconhecimento para o miR529b.....	44
2.3.2.3 Relação da estrutura gênica entre os possíveis alvos do miR529b.....	46
2.3.3 Obtenção do transgene <i>p35S::OsMIR529b</i> e transformação genética de <i>Arabidopsis thaliana</i>	47
2.3.4 Análises fenotípicas das plantas transgênicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> superexpressando o transgene <i>p35S::OsMIR529b</i>	49
2.3.5 Análises de expressão gênica por RT-PCR.....	54
2.3.6 Análise <i>in silico</i> de incorporação dos miR156 e miR529b nas Argonautas em arroz.....	57

3. ESTUDO PRELIMINAR DO PAPEL DA VIA MICRORNA156/SPL NA FORMAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE RAÍZES LATERAIS EM <i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i>	62
---	----

Resumo

Abstract

3.1 INTRODUÇÃO.....	65
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	67
3.2.1 Material vegetal e condições de crescimento.....	67
3.2.2 Coleta das sementes.....	68
3.2.3 Tratamento com auxina, inibidor de auxina e observação de fenótipos da raiz.....	68
3.2.4 Cruzamentos	69
3.2.5 Análises dos cruzamentos.....	70
3.2.5.1 Determinação da localização e distribuição de auxina, citocinina e da proteína PIN1 no sistema radicular de <i>Arabidopsis thaliana</i>	70
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
3.3.1 Análise fenotípica do sistema radicular.....	71
3.3.2 Análises fenotípicas do sistema radicular em plantas crescidas em meio MS com e sem auxina ou inibidor de auxina.....	72
3.3.3 Análise da distribuição de auxina e citocinina.....	74
4 CONCLUSÕES GERAIS.....	80
Referências.....	81
ANEXOS.....	84



MicroRNAs (miRNAs) são uma classe de pequenos RNAs não codantes endógenos que possuem de 20 a 22 nucleotídeos e que regulam a expressão gênica pós-transcricional e transcricionalmente. Os miRNAs são codificados por genes *MIR*, os quais se encontram amplamente distribuídos no genoma de plantas e animais (Bartel, 2009; Chen, 2009). Em animais, os genes *MIR* estão localizados principalmente no interior de regiões intrônicas, enquanto que, em vegetais, estes são encontrados em regiões intergênicas, apresentando suas próprias unidades de transcrição, caracterizadas por regiões promotoras e terminadoras (Megraw *et al.*, 2006; Voinnet, 2009). Os miRNAs regulam a expressão de genes alvo atuando principalmente ao nível pós-transcricional, por meio de interações RNA–RNA (Ha *et al.*, 2008). Tanto a clivagem quanto o mecanismo de repressão da tradução requerem uma complementaridade de pares de bases entre o miRNA e o seu RNA mensageiro (mRNA) alvo. A inibição traducional é encontrada principalmente em animais, nos quais ocorre maior número de *mismatches* (não complementaridade entre os nucleotídeos) entre o miRNA e sua sequência alvo. Em plantas, os miRNAs e seus alvos apresentam alto grau de complementariedade (Voinnet, 2009) e a inibição ocorre, de um modo geral, via clivagem do mRNA, ocorrendo usualmente no centro da complementariedade, no resíduo que parecia-se com o décimo ou décimo primeiro nucleotídeo do miRNA (Yang *et al.*, 2007). A existência de uma complementaridade quase perfeita entre os miRNAs de plantas e seus respectivos mRNAs alvos tem facilitado a identificação de genes-alvo para muitos miRNAs já descritos (Rhoades *et al.*, 2002). Uma possível explicação para o alto grau de complementaridade entre os miRNAs e seus alvos em plantas é provavelmente a consequência da atuação de processos evolutivos nos genes *MIR*os quais ocorreram via a “hipótese de duplicação invertida”. Tal hipótese propõe que os genes de miRNAs surgiram a partir de duplicações invertidas do seus genes-alvos nos genomas vegetais (Allen *et al.*, 2004). Ao longo do tempo, estas duplicações invertidas acumulam mutações que tornaram-se altamente divergentes do seu ancestral, exceto nas regiões correspondentes às sequências do miRNA maduro e da sua sequência complementar, o miRNA* (Allen *et al.*, 2004). Desde que foram reportados em plantas em 2002, várias evidências sugerem que esses pequenos RNAs são

reguladores cruciais em diversos aspectos do desenvolvimento vegetal (Ori *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2009; Aukerman e Sakai, 2003, Nogueira *et al.*, 2007), tais como brotação de órgãos laterais e formação do sistema radicular. Um exemplo de miRNAs envolvidos no desenvolvimento vegetal são os miRNAs miR156 e miR529. Estes miRNAs regulam a família de fatores de transcrição do tipo *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE* (SPLs). Enquanto a família do miRNA156 possui dez membros descritos (*AtMIR156a-j*; miRbase release 17.0 <http://microma.sanger.ac.uk>), a família do microRNA529 possui geralmente apenas um ou dois membros dependendo da espécie (Barakat *et al.*, 2007). O sítio de reconhecimento destes miRNAs nos transcritos dos genes SPLs difere apenas por sete nucleotídeos. Interessantemente, enquanto o miR156 é altamente conservado entre Angiospermas, o miR529 está presente, somente entre monocotiledôneas, *Physcomitrella patens* e eudicotiledôneas basais (ex: aquilegia).

A expressão ectópica do miR156 em *arabidopsis* reduz a dominância apical, produzindo um maior número de ramos laterais, promove atraso na mudança de fase de desenvolvimento fazendo com que essas plantas permaneçam por mais tempo na fase juvenil e conseqüentemente, promove atraso no florescimento, aumento da produção de folhas e por conseguinte, aumento de biomassa, o qual se deve principalmente ao encurtamento do *plastochron*, que é o tempo decorrente entre a produção de um primórdio foliar e o próximo (Schwab *et al.*, 2005; Schwarz *et al.*, 2008). Fenótipo similar é encontrado também em milho (Chuck *et al.*, 2007) e tomateiro (Silva, 2012). Portanto, esses resultados sugerem que a regulação da formação de órgãos laterais pela via microRNA156/SPL é conservada entre linhagens que divergiram há aproximadamente 200 milhões de anos (Silva, 2012). Além disso, a via miR156/SPL também afeta a regulação do desenvolvimento do fruto em tomateiro (Silva, 2012).

Embora o papel da via de regulação genética miR156/SPL tenha sido muito bem estudado na parte aérea das plantas (Schwab *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2006; Chuck *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008; Schwarz *et al.*, 2008; Silva, 2012), até o momento não há estudos elucidando seu papel funcional na região radicular. As raízes, principal e lateral, são importantes para a ancoragem e seguridade dentro do solo, proporcionando suporte estrutural à parte aérea. A extensão

das raízes laterais contribui para a captura de água e facilita a extração de nutrientes requeridos para o desenvolvimento das plantas. Assim, para que as plantas tenham sucesso durante o desenvolvimento em seu ambiente natural, faz-se necessário o desenvolvimento apropriado do sistema radicular. Muitos fatores conhecidos, tais como, fitohormônios, respostas a fatores ambientais (Osmont *et al.*, 2007) e mudanças na expressão gênica, incluindo miRNAs (Meng *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2011), afetam o crescimento e desenvolvimento da raiz primária e raízes laterais.

O presente trabalho encontra-se organizado em três capítulos: O primeiro constitui uma introdução e revisão bibliográfica dos assuntos abordados; no segundo capítulo é analisada a evolução e a possível função da via miR529/SPL em monocotiledôneas e eudicotiledôneas e no terceiro capítulo foi realizado um trabalho preliminar visando avaliar a contribuição funcional da via miR156/SPL na formação de raízes laterais de *Arabidopsis thaliana*.

1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1 *Arabidopsis thaliana* como modelo para estudos genéticos

Arabidopsis thaliana (*A. thaliana*) é uma Angiosperma eudicotiledônea "core" pertencente ao grupo das plantas herbáceas e está classificada dentro da família *brassicaceae*. Ela teve sua origem nas regiões da Ásia, Europa e Norte de África e foi posteriormente introduzida em outras áreas como América do Norte e Austrália. (Strasburger *et al.*, 1994; Koornneef *et al.*, 2004). Esta espécie foi objeto de vários estudos no século XX e consequentemente tornou-se um modelo de pesquisa fitobiológico, tal como ocorreu com milho (*Zea mays*), tomateiro (*Solanum lycopersicum*), ervilha (*Pisum sativum*) e tabaco (*Nicotiana tabacum*). Embora não tenha valor econômico, suas características a converteram em um organismo modelo muito apropriado para diversos trabalhos de pesquisa (Anderson e Wilson, 2000). Dentre as características que contribuem para que *arabidopsis* seja utilizada com um ótimo modelo, destacam-se: seu tamanho reduzido, ciclo de vida curto (dois ou três meses), ser autógama (autopolinização), além de produzir número elevado de sementes (aproximadamente 5,000 sementes por planta), facilitando a propagação das diferentes linhagens que podem ser armazenadas durante elevado período de tempo à temperatura ambiente sem perder a viabilidade. (Somerville e Koornneef, 2002).

Em dezembro de 2000, o projeto AGI (*Arabidopsis Genome Initiative*) realizou o sequenciamento completo do genoma da planta (125Mb, vinte vezes maior que *E. coli*, 10 vezes maior que *S. cerevisiae* e similar ao tamanho de *Drosophila melanogaster*), tendo como resultado, o conteúdo dos cinco cromossomos. Além disso, devido à ampla disponibilidade de informação, *arabidopsis* é utilizada para estudos evolutivos e de genômica comparativa (Rutter *et al.*, 2012). Sua ampla utilização em pesquisas gerou bases de dados de domínio público que oferecem ferramentas bioinformáticas, informação de mutantes, polimorfismos de DNA, protocolos de laboratórios, etc. (Clough e Bent, 1998). Estima-se que o genoma de *arabidopsis* codifica mais de 33.000 genes, incluindo os genes não codificantes de proteínas (por exemplo os genes *MIR*).

Mediante técnicas de mutagênese, baseadas na inserção de transposons ou T-DNAs, foi gerado uma variada coleção de alelos mutantes de

quase todos os genes de *arabidopsis*. Além disso, existem numerosos ecótipos de acesso livre em bancos de sementes públicos de fácil transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* (Clough e Bent, 1998).

Finalmente a arquitetura vegetativa de *arabidopsis*, tanto na parte aérea quanto na radicular, possui organização celular simples, facilitando as mais diversas análises, além do fato de haver muita informação genômica disponível e possuir bancos de mutantes, os quais auxiliam no entendimento de muitas vias, incluindo as vias genéticas reguladas por microRNAs.

1.2.2 Biogênese dos microRNAs em plantas

A biogênese dos miRNAs é iniciada pela transcrição dos genes *MIR* pela RNA polimerase II (Pol II), gerando um transcrito primário ou precursor (pri-miRNA) cuja estrutura é semelhante a um mRNA fita-simples, possuindo um *cap 7-metilguanossina* na extremidade 5' e uma cauda poli-A na extremidade 3'. Além disso, o pri-miRNA forma uma estrutura secundária tipo "hairpin" (Lee *et al.*, 2004), e é processado via a ação de diferentes enzimas, incluindo a enzima do tipo RNase III DICER-LIKE1 (DCL1), gerando um precursor intermediário ou pré-miRNA (Vaucheret, 2006). O pré-miRNA é novamente clivado pela enzima DCL1, gerando um duplex imperfeito de RNA (20-22 nt) que contém tanto o miRNA maduro quanto sua fita complementar (denominado miRNA*). Nesta fase, a DCL1 atua junto com duas proteínas nucleares: HYL1 (*double-strandedRNA binding protein1*) e SERRATE (*zinc finger protein*) (Han *et al.*, 2004; Lobbes *et al.*, 2006). O duplex miRNA-miRNA* é metilado nas extremidades 3' por ação de uma metiltransferase nuclear (HEN1), conferindo-lhe maior estabilidade e evitando sua degradação (Yu *et al.*, 2005). O duplex é subsequentemente transportado para o citoplasma por meio da enzima HASTY (Park *et al.*, 2005). Já no citoplasma, a dupla fita é desfeita provavelmente pela ação de uma enzima helicase, ainda não identificada. Finalmente, o miRNA maduro é incorporado ao complexo de ribonucleoproteínas denominado RISC que contém a enzima ARGONAUTA1 (AGO1), enquanto que o miRNA* é excluído do RISC e consequentemente exposto para degradação (Jones-Rhoades *et al.*, 2006). A proteína AGO1, "guiada" pelo miRNA maduro, cliva mRNAs específicos ou promove a repressão da tradução de genes alvo (Voinnet, 2009) (Fig. 1.1). Tanto a

clivagem quanto o mecanismo de repressão da tradução requerem uma complementaridade de pares de bases entre o miRNA e o seu mRNA alvo.

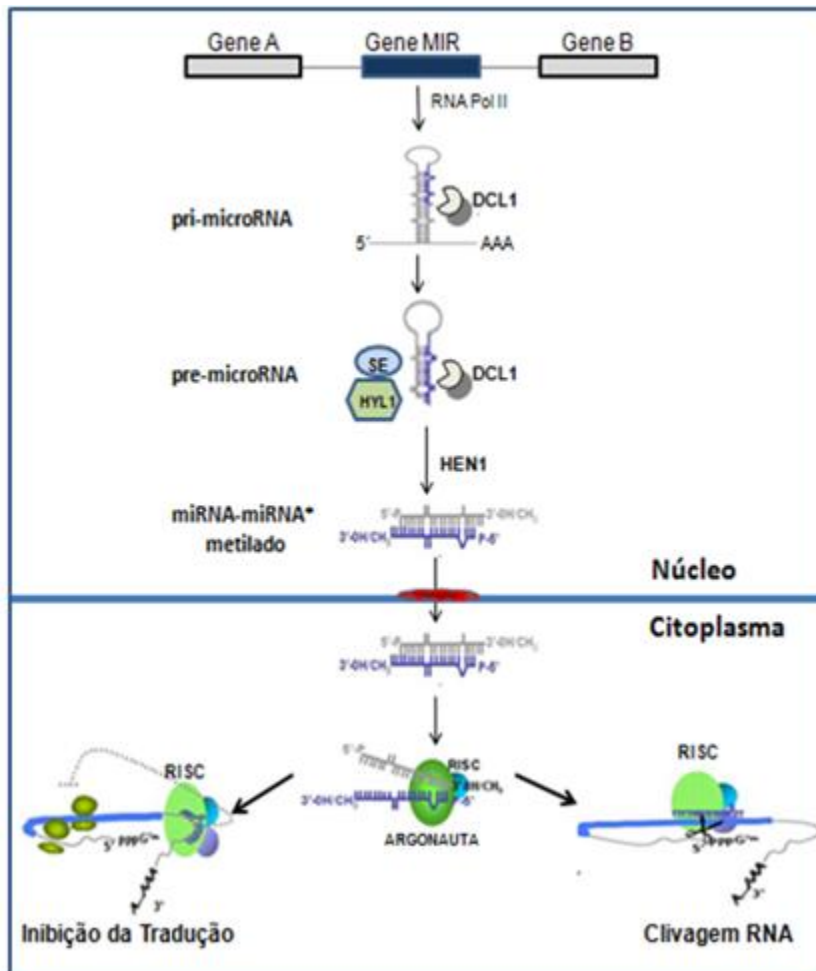


Figura 1.1. Modelo da biogênese e mecanismos de ação de miRNAs em plantas (retirado de Ortiz-Morea, 2011).

Em plantas, os miRNAs e seus alvos apresentam alto grau de complementariedade (Voinnet, 2009) e a inibição ocorre, de um modo geral, via clivagem do RNA mensageiro e acontece usualmente no centro da complementariedade, no resíduo que pareia com o décimo ou décimo primeiro nucleotídeo do miRNA (Yang *et al.*, 2007). A existência de uma quase perfeita complementariedade entre os miRNAs de plantas e seus mRNAs alvos tem facilitado a identificação de genes-alvo para muitos miRNAs já descritos (Rhoades *et al.*, 2002).

1.2.3 Considerações gerais relacionadas à evolução dos miRNAs e genes alvos em plantas

Muitos miRNAs de plantas tem sido identificados utilizando critérios que incluem: expressão, conservação evolutiva, estrutura secundária e recrutamentos genéticos para a biogênese (MIRBASE, release 8; Griffiths *et al.*, 2006). Além disso, alguns miRNAs são identificados pela similaridade com homólogos identificados a partir de genomas que foram mais explorados, tais como *arabidopsis* e arroz, as quais são espécies modelo para eudicotiledôneas e monocotiledôneas, respectivamente. No entanto, nem todos os genes de miRNAs são conservados entre espécies provenientes de linhagens diferentes, e alguns destes parecem ser espécies ou clado específicos (Axtell e Bartel, 2005).

Alguns trabalhos foram realizados na tentativa de elucidar questões relacionadas à origem, evolução e conservação de miRNAs (Axtell e Bartel, 2005; Zhang *et al.*, 2006; Axtell e Bowman, 2008). A hipótese mais aceita de origem e evolução dos miRNAs é relacionada aos eventos de duplicações invertidas dos genes alvos ancestrais. O modelo proposto por Allen e colaboradores (2004) para o surgimento dos genes *MIR* é a duplicação invertida de uma porção de um gene (que se torna, posteriormente, o gene-alvo para o miRNA em questão). A região invertida duplicada, quando transcrita, origina um RNA longo que forma um *harpin* devido a sua complementariedade de sequência. Alguns desses *harpins* tornam-se substratos para um membro da família de enzimas DICER-LIKE, a DCL4. Tal processamento gera pequenos RNAs de interferência (siRNAs) de 19-25 nt em comprimento. O aparecimento de mutações pontuais ao longo da sequência duplicada, durante a evolução, impede o processamento desses *harpins* pela enzima DCL4, mas não pela enzima DCL1. A DCL1 reconhece os precursores de miRNA (pri- e pré-miRNAs), gerando então os miRNAs maduros (Allen *et al.*, 2004). Para os miRNAs conservados (ou seja, "antigos evolutivamente"), geralmente apenas a região do miRNA maduro continua conservada. Em miRNAs específicos de algumas linhagens vegetais (evolutivamente "recentes"), existem mais regiões com similaridade ao gene alvo. Paralelamente, alguns membros de famílias gênicas contendo sítio de reconhecimento de miRNA "perdem" esse sítio durante eventos de duplicação e mutações, deixando de ser um gene-alvo. Um modelo simplificado da evolução de miRNAs está apresentado na Figura 1.2.

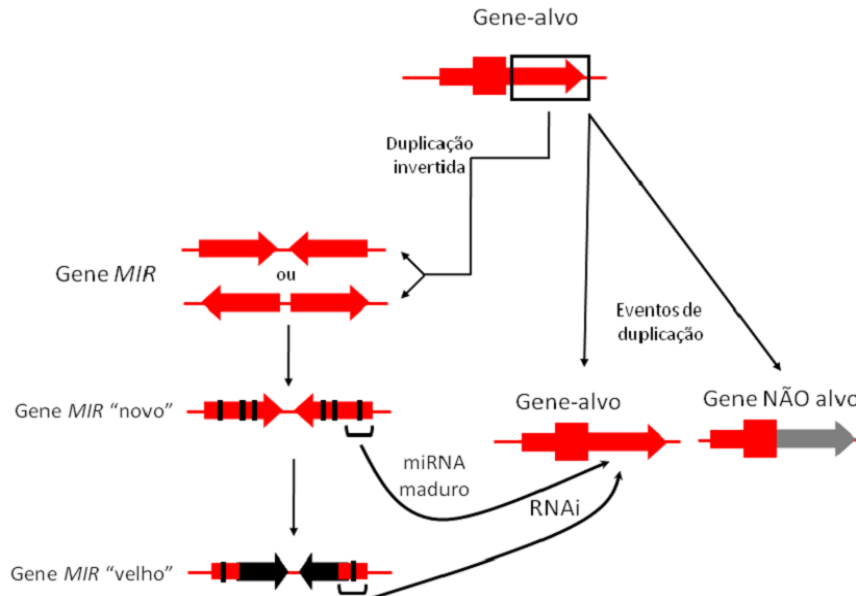


Figura 1.2. Modelo simplificado da evolução dos genes *MIR* e genes-alvo (Allen *et al.*, 2004). A duplicação invertida de uma porção ou fragmento do gene dá origem a um segmento que, quando transcrito, produz RNA com estrutura *harpin*, tornando-o substrato para enzimas DICER-LIKE tais como a DCL1 e DCL4. Com o acúmulo de mutações (blocos em preto), ocorre perda da complementariedade em grande parte da sequência, com conservação somente de região que vem a ser o miRNA maduro (retirado de Zanca, 2009).

Os miRNAs de plantas frequentemente possuem um limitado número de RNAs mensageiros (mRNA) alvos, devido à sua alta complementaridade de sequência (Voinnet, 2009). Não obstante, ferramentas de estudos tais como sequenciamento de RNA em larga escala, tem disponibilizado informações valiosas relacionando o controle do mesmo mRNA alvo por múltiplas famílias de miRNAs (Zheng *et al.*, 2011). Um intrigante exemplo é do miR156 e miR529, os quais possuem alvos em comum, sendo estes alvos alguns membros da família de fatores de transcrição do tipo *SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like* (*SPL*) (Cuperus *et al.*, 2011).

A comparação entre o número de alvos do miR529 e o do miR156 em arroz e milho tem sido considerado como um modelo de comparação de correspondência entre as famílias de miRNA, visando descrever processos co-evolutivos de interação entre miRNA “parceiros” (miR156 e miR529) durante a evolução de monocotiledôneas (Ling e Zhang, 2012b). Estudos da família de genes *SPLs* revelaram que eventos de duplicação contribuíram para um

aumento do número de membros desta família gênica em monocotiledôneas (Xie *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2008; Ling e Zhang, 2012a). Além disso, vários estudos demonstraram que a família do miR156 tende a se expandir pelos mesmos processos de duplicação (Maher *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007). No entanto, para os mesmos processos, o número de membros da família miR529 tende a ser menor, sugerindo que cópias do miR529 sofreram diferentes destinos durante a duplicação gênica, afetando sua existência em diferentes genomas e a extensão da interação com seus alvos (Ling e Zhang, 2012b). Em monocotiledôneas e musgo, os sítios de reconhecimento pelo miR156 residem tanto em regiões codificadoras como nas regiões não traduzidas dos mRNAs-alvo. Em contrapartida, os locais de reconhecimento do miR529 são localizados somente em regiões codificantes e sobreposto com o sítio de reconhecimento do miR156, sugerindo uma maior diversificação evolutiva dos genes-alvos do miR156 em comparação aos genes-alvos do miR529 (Ling e Zhang, 2012a,b).

O miR156 é conservado em todas as plantas terrestres avaliadas até o momento (Guo *et al.*, 2008), enquanto que a distribuição do miR529 no reino vegetal é mais restrita, sendo o mesmo presente, briófitas, monocotiledôneas e eudicotiledôneas basais. Interessantemente, esse miRNA está ausente em eudicotiledôneas "core", incluindo *Arabidopsis thaliana* (Griffiths-Jones *et al.*, 2006; Griffiths-Jones *et al.*, 2008; Barakat *et al.*, 2007). O fato do miR529 estar presente também em eudicotiledôneas basais fornece um ponto de referência importante para a comparação entre eudicotiledôneas e monocotiledôneas e gera informação que permite inferir melhor sobre a origem, diversificação e evolução deste miRNA. Estima-se que as linhagens de eudicotiledôneas e monocotiledôneas divergiram cerca de 140 milhões de anos, enquanto que as eudicotiledôneas basais (exemplo aquilegia) divergiram de eudicotiledôneas "core" há aproximadamente 100 milhões de anos (Chaw *et al.*, 2004; Sanderson *et al.*, 2004; Moore *et al.*, 2007) (Fig. 1.3). O fato do miR529 estar intimamente relacionado ao miR156 e que este último regula também todos os genes-alvos do miR529, gera a hipótese de que o miR529 possa ter sido perdido durante eventos de duplicação e perda genômica sem causar dano aparente (Puzey e Kramer, 2009) ou deletérios.

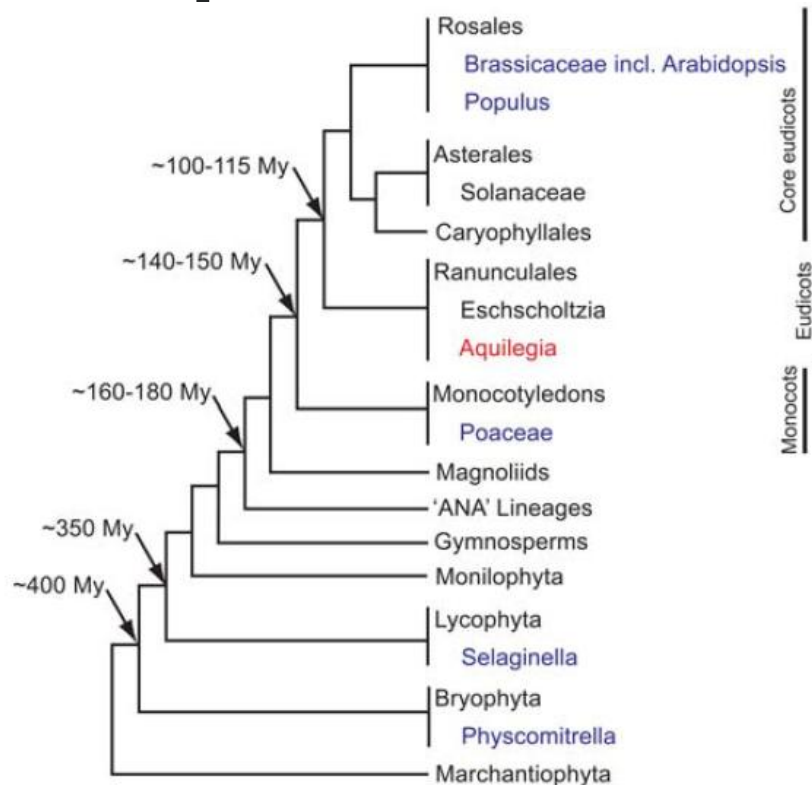


Figura 1.3. Filogenia simplificada e tempos de divergência entre plantas terrestres. A Figura mostra os quatro modelos de plantas com informações genômicas mais adequadamente anotadas em banco de dados de miRNAs, incluindo a eudicotiledônea “core” *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*), a monocotiledônea *Oryza sativa* (*O. sativa*), o leucopódio *Selaginella moellendorffii* (*S. moellendorffii*) e a briofita *Physcomitrella patens* (*P. patens*) (Figura retirada de Puzey e Kramer, 2009).

1.2.4 Arquitetura do sistema radicular em eudicotiledôneas

Em eudicotiledôneas, o sistema radicular inicia-se com a raiz primária e, posteriormente a formação de raízes laterais e suas ramificações, as quais podem exibir crescimento radial (Hodge *et al.*, 2009). A arquitetura do sistema radicular (RA) é a configuração espacial da forma e estrutura do sistema

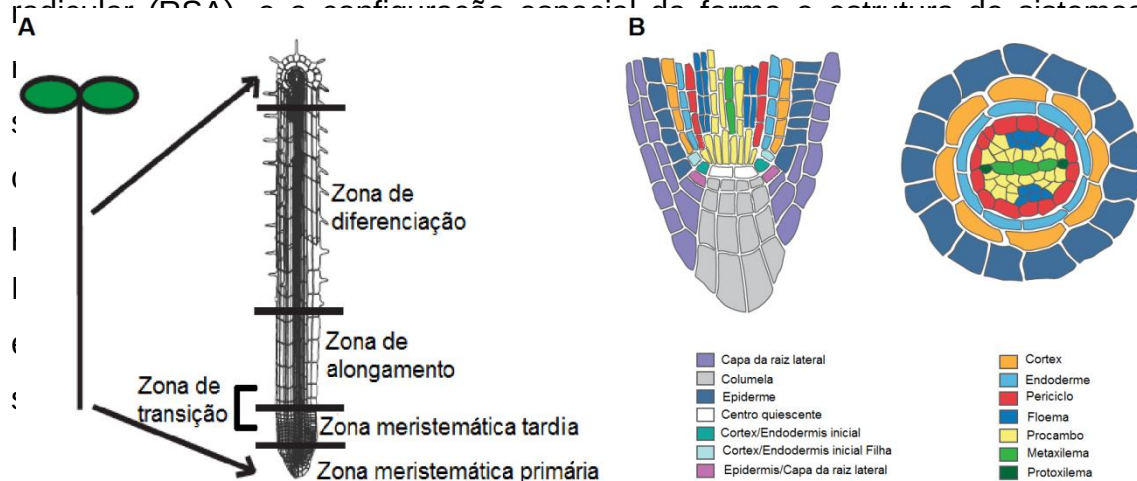


Figura 1.4. Caracterização do sistema radicular de *arabidopsis*. **A)** Visão geral das zonas de desenvolvimento da raiz primária de *arabidopsis*. **B)** Esquemas de corte transversal e longitudinal da ponta da raiz primária. As cores indicam as camadas de células presentes (Figura modificada de Breakfield *et al.*, 2011 e Petricka *et al.*, 2012).

1.2.4.1 Formação da raiz primária

A raiz primária é estabelecida durante a embriogênese, onde os tecidos da raiz são gerados pelo meristema apical radicular, o qual consiste de camadas celulares concêntricas da epiderme, córtex, endoderme e periciclo que circundam um cilindro vascular central com xilema e floema (Khan *et al.*, 2011). No núcleo do meristema radicular é encontrado o centro quiescente (QC) que possui a função de manter duas camadas celulares adjacentes com rápida divisão. As células meristemáticas funcionais servem como marcadores de base para o desenvolvimento da raiz (Berleth e Jurgens, 1993; Van den Berg *et al.*, 1997; Hamann *et al.*, 1999; Jiang e Feldman, 2005) (Fig. 1.4B), e são responsáveis pelo crescimento contínuo de todos os tipos de células da raiz (Jurgens, 2001).

As células meristemáticas produzem diferentes camadas de células mediante divisões mitóticas, as quais são seguidas por expansão e diferenciação das diferentes células em função de sua posição. Portanto, a raiz principal é formada e desenvolvida em três diferentes fases: 1) a zona meristemática (MZ), na qual as células dividem-se continuamente para gerar um conjunto de células que irão diferenciar-se e alongar-se, 2) a zona de alongamento (EZ), em que as células perdem a sua capacidade de se dividir e aumentar o seu comprimento e geralmente sua largura; e por fim 3) a zona de diferenciação (DZ), onde as células adquirem as suas características e funções especializadas (Petricka *et al.*, 2012) (Figura 1.4A).

1.2.4.2 Formação de raízes laterais

As raízes laterais (LRs) iniciam-se a partir de divisões anticlinais de células no periciclo, chamadas de células adjacentes aos pólos do xilema (Dolan *et al.*, 1993). Um subconjunto destas células, denominadas como "células fundadoras", são estimuladas a se dividir e formar o primórdio da raiz lateral (PRL). Estas divisões anticlinais das células fundadoras abrangem a

primeira fase (fase I) do desenvolvimento das LRs (Malamy e Benfey, 1997; Casimiro *et al.*, 2001; Dubrovsky *et al.*, 2001). Estudos recentes têm demonstrado que populações de células derivadas do periciclo estão intimamente relacionadas ao desenvolvimento parental de células subjacentes do xilema e floema (Ingram e Malamy, 2010). Na fase II, as células em divisão formam camadas para o exterior do periciclo, sendo que nas fases III e IV, as divisões anticlinais compõem quatro camadas celulares que conformam o PRL propriamente dito, o qual começa a sobressair-se através da raiz primária formada nas etapas seguintes (Fig. 1.5). Enquanto a PRL cresce, este atravessa a parede celular da raiz primária mediante modificações enzimáticas da parede celular. Finalmente a PRL emerge da raiz primária e ativa seu próprio meristema para atuar como uma raiz lateral autônoma (Perét *et al.*, 2009).

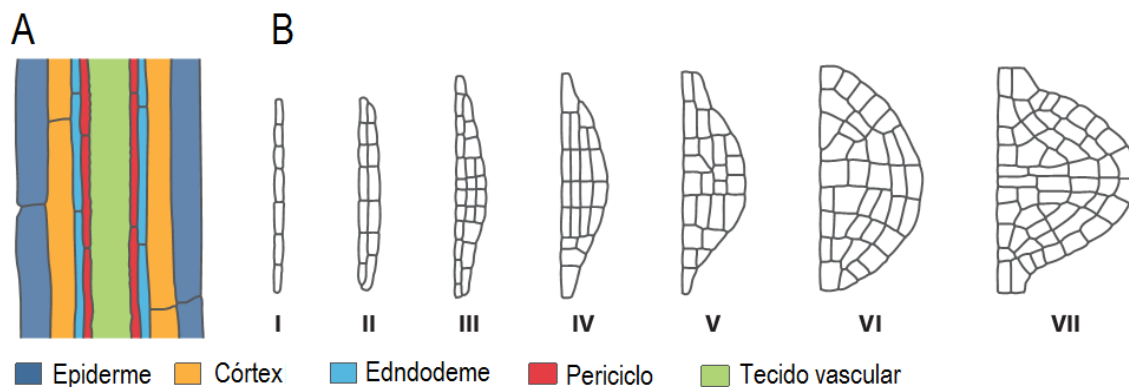


Figura 1.5. **A)** Esquema da zona de diferenciação, em corte longitudinal da raiz primária. As raízes laterais iniciam no periciclo (vermelho) quando as divisões anticlinais das células ocorrem num subconjunto de células nesta camada. **B)** Etapa de desenvolvimento das raízes laterais. (retirado de Petricka *et al.*, 2012).

Assim que a mudança na estrutura da raiz primária é estabelecida e os tipos de células individuais estão diferenciados, o resultado do crescimento das ramificações da raiz primária produz um sistema de raízes indeterminado e dinâmico. Estas raízes incrementam a eficiência da planta para absorver água e nutrientes, assim como, a sua fixação no solo (Ghazanfar *et al.*, 2011).

A organogênese da raiz lateral é um processo estreitamente controlado que envolve um número variável de genes reguladores (Osmont *et al.*, 2007;

Petricka e Benfey, 2008; Péret *et al.*, 2009), além de ser acompanhado por ação de fitohormônios, tais como a auxina (Boerjan *et al.*, 1995; Dubrovsky *et al.*, 2008) e citocinina (Werner *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006).

1.2.5 Controle hormonal no desenvolvimento e crescimento das raízes

Vários hormônios como o ácido abscísico (ABA), brassinosteróides, citocinina, etileno, ácido giberélico (GA), estrigolactonas e auxina, desempenham papéis importantes como reguladores e controladores no crescimento e desenvolvimento da raiz. A auxina desempenha o papel mais representativo, devido à sua interação nos mais diversos processos relacionados ao desenvolvimento de raiz, tanto na raiz principal quanto nas raízes laterais (Leyser, 2006; Hodge *et al.*, 2009; Ingram e Malamy, 2010; Petricka *et al.*, 2012).

A auxina regula o crescimento da raiz primária, iniciação e emergência da raiz lateral, provavelmente controlando componentes do ciclo celular e resposta ambiental (Benamins e Scheres, 2008; Malamy, 2010; Teale *et al.*, 2006; Vanneste *et al.*, 2005; Vanneste e friml, 2009). Estudos tem demonstrado que a aplicação de auxina na forma de ácido indol acético (IAA) estimula a iniciação de raízes laterais (promovendo a divisão celular no periciclo) (Blakely *et al.*, 1982; Casimiro *et al.*, 2001) e inibe o alongamento da raiz primária (Thimann 1936; Dello Ioio *et al.*, 2008). A aplicação de inibidores de transporte de auxina, tais como ácidos 1-N-naftilftalâmico (NPA) e triiodobenzóico (TIBA), reduz o crescimento da raiz primária. Tais resultados demonstram que mecanismos específicos da auxina no controle de formação do RSA, tanto via aumento da concentração desse hormônio como na interrupção do transporte e distribuição de auxina. Ambos os mecanismos regulam negativamente o crescimento de raiz primária (Rahman *et al.*, 2007).

A distribuição de auxina em níveis celulares pode ser visualizada pelo gene repórter *pDR5:GUS*. Tal gene quimérico é formado pelo promotor DR5 (*pDR5*) (responsivo à auxina), o qual está fusionado ao gene repórter β -glucuronidase (*GUS*) (Sabatinini *et al.*, 1999). O transporte basipetal de auxina, dirigido pela família de proteínas transportadoras PIN FORMED (PIN) (Sabatinini 1999; Friml *et al.*, 2003), estabelece o gradiente e a concentração máxima de auxina na ponta da raiz primária (Galweiler *et al.*, 1998; Blilou *et al.*, 2005;

Paponov *et al.*, 2005; Grieneisen *et al.*, 2007) e nas raízes laterais (Benkova *et al.*, 2003). Além disso, a interrupção do transporte polar da auxina leva a defeitos no desenvolvimento das raízes laterais (Geldner *et al.*, 2001; Benková *et al.*, 2003).

Em contraste com as atividades da auxina, os efeitos da citocinina no desenvolvimento da raiz lateral permanecem menos estudados. Citocinina exógena inibe a formação de raízes laterais, afetando o ciclo celular no periciclo (Li *et al.*, 2006). Além disso, citocinina exógena perturba o padrão de desenvolvimento do primórdio da raiz lateral, interferindo com a expressão dos genes *PIN*, impedindo a formação de gradiente de auxina (Laplaze *et al.*, 2007). O transporte basipetal e a distribuição lateral de auxina são necessários para a manutenção da zona meristemática. Por exemplo, plantas de *Arabidopsis* que possuem mutações em três membros da família de proteínas *PIN* têm o tamanho do seu meristema radicular reduzido (Blilou *et al.*, 2005). Tal observação indica que a citocinina inibe a formação de raízes laterais através da modulação da atividade das proteínas *PIN*. Plantas transgênicas de *Arabidopsis* com diminuição nos níveis de citocinina apresentam incremento na ramificação da raiz e aumento do crescimento da raiz primária (Werner *et al.*, 2003). Trabalhos anteriores, (Dello Iorio *et al.*, 2007) demonstraram que a citocinina endógena é necessária para controlar a divisão de células meristemáticas, como demonstrado em plantas defeituosas na biossíntese da citocinina, as quais apresentam fenótipos com meristemas radiculares expandidos. Este fenótipo é também observado em plantas que possuem mutações no gene *ARABIDOPSIS HISTIDINA KINASE3 (AHK3)* que codifica um receptor de citocinina, ou nos genes *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR (ARR1 e ARR12)*, reguladores do tipo B de resposta, que codificam fatores de transcrição que ativam especificamente genes responsivos a citocinina (Muller e Sheen, 2007). Além disso, o tamanho do meristema radicular é aumentado em diversos mutantes dos genes *ATP/ADP isopenteniltransferase (IPTs)* os quais catalisam o passo limitante da biossíntese da citocinina e dos receptores de citocininas *AHK3*. Estes dados sugerem que citocinina controla o tamanho meristema, agindo através da via *AHK3/ARR1 e ARR12* (Chapman e Estelle, 2009). Um estudo de microarranjos de DNA avaliando a expressão de genes nos tecidos radiculares

em plantas superexpressando o gene *ARR1* revelou que o gene *SHORT HYPOCOTYL2 (SHY2)/IAA3*, um regulador negativo de vários genes *PIN* é um alvo direto de *ARR1*, apontando para um mecanismo antagônico entre auxina e citocinina no crescimento radicular (Dello Ioio *et al.*, 2007; Dello Ioio *et al.*, 2008).

Estudos demonstram que a auxina induz a biossíntese da citocinina através do gene *IPT5*, o qual é simultaneamente ativado pelo gene *SHY2/IAA3*, para regular a biossíntese da citocinina que por sua vez ativa o gene *SHY2/IAA3*, resultando em uma regulação negativa e restrição da expressão dos genes *PIN1*, *3e7* (Dello Ioio *et al.*, 2008). Estes dados indicam a complexidade da interação entre os fitohormônios auxina e citocinina no desenvolvimento de raízes laterais (Dello Ioio *et al.*, 2008).

1.2.6 MicroRNAs e seus efeitos na formação do sistema radicular

Em *arabidopsis*, o miR160 é o mais significativo regulador do crescimento e gravitropismo da raiz primária, regulando negativamente três fatores de resposta a auxina (*ARF10*, *ARF16* e *ARF17*) (Chen, 2009). A superexpressão do miR160 e duplo mutante de perda de função de *arf10/arf16* mostraram o mesmo defeito na ponta da raiz que é a divisão descontrolada e bloqueio na diferenciação na região distal. Além disso, a superexpressão deste miRNA resultou em plantas transgênicas com aumento no número de raízes laterais (Wang *et al.*, 2005).

Outro miRNA importante para o desenvolvimento do sistema radicular em *arabidopsis* é o miR164. O miR164 é codificado por três genes nessa espécie vegetal: *MIR164A*, *MIR164B* e *MIR164C* (Bonnet *et al.*, 2004; Jones-Rhoades e Bartel, 2004; Reinhart *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004). Plantas mutantes para os genes *MIR164a* e *MIR164b* produzem mais raízes laterais que plantas selvagens (Guo *et al.*, 2005). Fenótipo similar foi observado em plantas superexpressando o gene do tipo *NAM/ATAF/CUC1 (NAC1)*, o qual codifica um fator de transcrição alvo do miR164 (Xie *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2005). O gene *NAC1* está envolvido na transmissão de sinal da auxina e, consequentemente, afeta a emergência e desenvolvimento das raízes laterais (Xie *et al.*, 2002). Plantas transgênicas superexpressando o miR164 apresentam alterações no número de órgãos florais e vegetativos sendo que

esses órgãos tornam-se fusionados. Em contraste, plantas transgênicas que expressam *CUC1* resistente ao miRNA164 (Mallory *et al.*, 2004) ou *CUC2* (Laufs *et al.*, 2004) são defeituosas no desenvolvimento foliar, e no caso do *CUC2*, as plantas possuem um limite alargado entre sépalas (Laufs *et al.*, 2004). Estes resultados sugerem que o miR164 contribui para o desenvolvimento floral (Peaucelle *et al.*, 2007; Sieber *et al.*, 2007) e atua no desenvolvimento de raízes laterais (Guo *et al.*, 2005). Os miRNAs 165 e 166 estão associados ao estabelecimento da identidade abaxial de órgãos laterais, por meio da regulação de transcritos dos genes *HD-ZIPIII* (Juarez, 2004; Nogueira *et al.*, 2007, 2009). Além disso, esta via é um mecanismo crucial para garantir a diferenciação do tecido vascular, pois as plantas transgênicas superexpressando o miR166 apresentaram fenótipos de desorganização dos tecidos vasculares da raiz o qual foi caracterizado por um aumento do número de pólos do xilema divergentes do estele característico de raízes de eudicotiledóneas (Khan *et al.*, 2011).

Outros pequenos RNAs, denominados *trans-actingsiRNAs* ou tasiRNAs também podem ter papel biológico na formação do sistema radicular. Esses pequenos RNAs atuam em *trans*, tal como microRNAs e são originados de genes não codantes chamados *TAS*, os quais são clivados por miRNAs específicos (Nogueira *et al.*, 2007). Em *arabidopsis*, por exemplo, transcritos do gene *TAS3* são clivados pelo miR390 para produzir tasiRNAs (Fahlgren *et al.*, 2006; Nogueira *et al.*, 2007). Alguns desses tasiRNAs são chamados de tasiARFs, pois "guiam" a clivagem de transcritos dos genes *AUXIN RESPONSE FACTORS ARF2*, *ARF3* e *ARF4*. Como estes três genes *ARFs* estão envolvidos na homeostase da auxina, esta via dos tasiRNAs tem sido reportada como regulando o crescimento e desenvolvimento da raízes laterais (Marin *et al.*, 2010; Yoon *et al.*, 2010).

Como visto anteriormente, alguns miRNAs estão envolvidos no desenvolvimento das plantas, tanto na parte aérea, quanto do sistema radicular. Alguns dos miRNAs que regulam processos na parte aérea poderiam ser potenciais reguladores da formação do sistema radicular. Khan e colaboradores (2011) sugerem, por exemplo, que o miR396 poderia afetar o crescimento radicular pela limitação da proliferação celular do meristema apical radicular. Outro exemplo de potencial miRNA que pode estar envolvido no

processo de formação e desenvolvimento do sistema radicular é o miR156. A superexpressão do miR156 em arábido, milho e tomateiro promove um fenótipo com severa redução na dominância apical, levando à maior produção de ramos laterais (Schwab *et al.*, 2005; Chuck *et al.*, 2007; Silva, 2012). Além disso, plantas transgênicas de arroz superexpressando este miRNA apresentam um maior número de raízes com menor tamanho (Xie *et al.*, 2012). Este miRNA poderia ser um possível regulador da ramificação e formação de raízes laterais, devido ao fato do mesmo estar envolvido em diversos processos de desenvolvimento da parte aérea. Além disso, fenótipo de elevada proliferação de raízes laterais foi observado em plantas transgênicas superexpressando o miR156 em arábido (ver resultados Capítulo 3).

Referências

- Allen, E.; Xie, Z.; Gustafson, A.M.; Sung, G.H.; Spatafora, J.W.; Carrington, J.C. (2004). Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics*, 36:1282-1290.
- ANDERSON, M. AND WILSON, F. (2000). Growth, maintenance, and use of *Arabidopsis* genetic resources in *Arabidopsis*: a practical approach, edited by Wilson, Z. A., Oxford University press. 1-26.
- AUKERMAN, M.J.; SAKAI, H. (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell*, 15:2730-2741.
- AXTELL, M.J. AND BARTEL, D.P. (2005). Antiquity of microRNAs and their targets in land plants. *Plant Cell*, 17:1658–1673.
- AXTELL, M. J.; BOWMAN, J. L. (2008). Evolution of plant microRNAs and their targets. *Trends in Plant Science*, London, 13:343-349.
- BARAKAT, A.; WALL, K.; LEEBENS-MACK, J.; WANG, YJ.; CARLSON, JE.; DEPAMPHILIS, CW. (2007). Large-scale identification of microRNAs from a basal eudicot (*Eschscholzia californica*) and conservation in flowering plants. *Plant Journal*, 51:991-1003.
- BARTEL, DP. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, Cambridge, 136:215-233.
- BENJAMINS, R. AND SCHERES, B. (2008). Auxin: The looping star in plant development. *Annual Review of Plant Biology* 59:443–465.
- BENKOVA, E.; MICHNIEWICZ, M.; SAUER, M.; TEICHMANN, T.; SEIFERTOVA, D.; JURGENS, G.; FRIML, J. (2003). Local, efflux-dependent

auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, 115:591–602.

BERLETH, T.; JURGENS, G. (1993). The role of the *monopteros* genes in organizing the basal body region of the *Arabidopsis* embryo. *Development* 118:575-587.

BLAKELY, L.M., DURHAM, M., EVANS, T.A., AND BLAKELY, R.M. (1982). Experimental studies on lateral root formation in radish seedling roots. I. General methods, developmental stages, and spontaneous formation of laterals. *Bot. Gaz.* 143:341–352.

BLILOU, I.; XU, J.; WILDWATER, M.; WILLEMSSEN, V.; PAPONOV, I.; FRIML, J.; HEID-STRÄ, R.; AIDA, M.; PALME, K.; SCHERES, B. (2005). **The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots.** *Nature*, **433**:39-44.

BOERJAN, W. et al. (1995) Superroot, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. *Plant Cell* 7:1405–1419

BONNET, E.; WUYTS, J.; ROUZE, P.; VAN DE PEER, Y. (2004). Detection of 91 potential conserved plant microRNAs in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* identifies important target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:11511–11516.

BREAKFIELD, N.W.; CORCORAN, D.L.; PETRICKA, J.J.; SHEN, J.; SAE-SEAW, J.; RUBIO-SOMOZA, I.; WEIGEL, D.; OHLER, U.; BENFEY, P.N. (2011). High-resolution experimental and computational profiling of tissue-specific known and novel miRNAs in *Arabidopsis*. *Genome Research*. 22:163-176.

CASIMIRO, I.; MARCHANT, A.; BHALLERAO, R.P.; BEECKMAN, T.; DHOOGHE, S.; SWARUP, R.; GRAHAM, N.; INZE, D.; SANDBERG, G.; CASERO, P.J.; BENNETT, M. (2001). Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *The Plant Cell* 13:843–852.

CHAPMAN, E.J.; ESTELLE, M. (2009). Cytokinin and auxin intersection in root meristems. *Genome Biology*, **10**:210.1-210.5.

CHAW, S.M.; CHANG, C.C.; CHEN, H.L.; LI, W.H. (2004). Dating the monocot-dicot divergence and the origin of core eudicots using whole chloroplast genomes. *J. Mol. Evol.* 58:424-441.

CHEN, X.M. (2009). Small RNAs and their roles in plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Palo Alto, 25:21-44.

CHUCK, G.; CIGAN, A.; SAETEURN, K.; HAKE, S. (2007). The heterochronic maize mutant *Corncross1* results from overexpression of a tandem microRNA. *Nature Genetics*, New York, 39:544-549.

CLOUGH, S. J., AND BENT, A. F. (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 16:735-743.

CUPERUS, J.T.; FAHLGREN, N.; CARRINGTON, J.C. (2011). Evolution and functional diversification of MIRNA genes. *Plant Cell* 23(2):431–442.

DE DORLODOT, S.; FORSTER, B.; PAGÈS, L.; PRICE, A.; TUBEROSA, R.; DRAYE, X. (2007). Root system architecture: opportunities and constraints for genetic improvement of crops. *Trends Plant Sci* 12:474–481.

DELLO IOIO, R.; LINHARES, FS.; SCACCHI, E.; CASAMITJANA-MARTINEZ, E.; HEID-STRA, R.; COSTANTINO, P.; SABATINI, S. (2007). **Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation.** *Curr Biol*, **17**:678-682.

DELLO IOIO, R.; NAKAMURA, K.; MOUBAYIDIN, L.; PERILLI, S.; TANIGUCHI, M.; MORITA, MT.; AOYAMA, T.; COSTANTINO, P.; SABATINI, S. (2008). A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science* 322:1380–1384.

DOLAN, L. et al. (1993) Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119:71–84

DUBROVSKY, J.G. et al. (2001) Early primordium morphogenesis during lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 214:30–36

DUBROVSKY, J.G. et al. (2008) Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:8790–8794

FAHLGREN, N.; MONTGOMERY, TA.; HOWELL, MD.; ALLEN, E.; DVORAK, SK.; ALEXANDER, AL.; CARRINGTON, JC. (2006). Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR3 by TAS3 ta-siRNA affects developmental timing and patterning in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 16:939–944.

FRIML, J.; VIETEN, A.; SAUER, M.; WEIJERS, D.; SCHWARZ, H.; HAMANN, T.; OFFRINGA, R.; JURGENS, G. (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical–basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* 426:147–153.

GALWEILER, L.; GUAN, C.; MULLER, A.; WISMAN, E.; MENDGEN, K.; YEPHREMOV, A.; PALME, K. (1998). Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* 282:2226–2230.

GELDNER, N.; FRIML, J.; STIERHOF, YD.; JURGENS, G.; PALME, K. (2001). Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* 413:425–428.

GHAZANFAR A. KHAN G.A., DECLERCK M., SORIN C., HARTMANN C., CRESPI M., LELANDIS-BRIERE C. (2011). MicroRNAs as regulators of root development and architecture. *Plant Mol Biol.* 77:47–58.

GRIENEISEN, VA.; XU, J.; MAREE, AF.; HOGEWEG, P.; SCHERES, B. (2007). Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature* 449:1008–1013.

GRIFFITHS-JONES, S.; GROCOCK, RJ.; VAN DONGEN, S.; BATEMAN, A.; ENRIGHT, A.J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 34:140–144.

GRIFFITHS-JONES, S.; SAINI, H.K.; VAN DONGEN, S.; ENRIGHT, A.J. (2008). miRBase: Tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.* 154-158.

GUO, HS.; XIE, Q.; FEI, JF.; CHUA, NH. (2005). MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for Arabidopsis lateral root development. *Plant Cell* 17:1376–1386.

GUO, AY.; ZHU, QH.; GU, X.; GE, S.; YANG, J.; LUO, J. (2008). Genome-wide identification and evolutionary analysis of the plant specific SBP-box transcription factor family. *Gene* 418(1–2):1–8.

HA, M.; PANG, M. X.; AGARWAL, V.; CHEN, Z. J. (2008). Interspecies regulation of microRNAs and their targets. *Biochimica et Biophysica Acta- Gene Regulatory Mechanisms*, Austin, 1779:735- 742.

HAMANN, T.; MAYER, U.; JURGENS, G. (1999). The auxin-insensitive bodenlos mutation affects primary root formation and apical-basal patterning in the Arabidopsis embryo. *Development* 126:1387–95.

HAN, MH.; GOUD, S.; SONG, L.; FEDOROFF, N. (2004). The Arabidopsis double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, 101:1093-1098.

HODGE, A.; BERTA, G.; DOUSSAN, C.; MERCHAN, F.; CRESPE, M. (2009). Plant root growth, architecture and function. *Plant soil*. 321:153-187.

INGRAM, P.A. and MALAMY, J.E. (2010). Root system architecture. In: Kader JC, Melsen M (eds) *Advances in botanical research*. Elsevier Science, Amsterdam, 55:75–117

JIANG, K. AND FELDMAN, L. J. (2005). Regulation of root apical meristem development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21:485–509.

JONES-RHOADES, M.; BARTEL, D. (2004). Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular Cell*, Cambridge, 14:787-799.

JONES-RHOADES, M.; BARTEL, D.; BARTEL, B. (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review of Plant Biology*, Palo Alto, Cambridge, 57:19-53.

JUAREZ, M.T.; KUI, J.S.; THOMAS, J.; HELLER, B.A.; TIMMERMANS M.C.P. (2004). MicroRNA mediated repression of rolled leaf1 specifies maize leaf polarity. *Nature* 428:84-88.

JURGENS, G. (2001). Apical-basal pattern formation in Arabidopsis embryogenesis. *The EMBO Journal* 20:3609–3616.

KHAN, GA.; DECLERCK, M.; SORIN, C.; HARTMANN, C.; CRESPI, M.; LELANDIS-BRIERE, C. (2011). MicroRNAs as regulators of root development and architecture. *Plant Mol Biol* 77:47–58.

KOORNNEEF, M., ALONSO-BLANCO, C., VREUGDENHIL, D. (2004). Naturally Occurring genetic variation in Arabidopsis thaliana. *Annual Review of Plant Biology* 55: 141-172.

LAUFS, P.; PEAUCELLE, A.; MORIN, H.; TRAAS, J. (2004). MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in Arabidopsis meristems. *Development* 131:4311-4322.

LAPLAZE, L.; BENKOVA, E.; CASIMIRO, I.; MAES, L.; VANNESTE, S.; SWARUP, R.; WEIJERS, D.; CALVO, V.; PARIZOT, B.; HERRERA-RODRIGUEZ, MB.; OFFRINGA, R.; GRAHAM, N.; DOUMAS, P.; FRIML, J.; BOGUSZ, D.; BEECKMAN, T.; BENNETT, M. (2007). Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *The Plant Cell* 19:3889–3900.

LEE, Y.; KIM, M.; HAN, J.J.; YEOM, K.H.; LEE, S.; BAEK, S.H.; KIM, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo Journal*, Seoul, 23:4051-4060.

LEYSER, O. (2006). Dynamic integration of auxin transport and signalling. *Curr Biol* 16:424–433.

LI, X., MO, X., SHOU, H., AND WU, P. (2006). Cytokinin-mediated cell cycling arrest of pericycle founder cells in lateral root initiation of Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 47:1112–1123.

LING, LZ. AND ZHANG, SD. (2012a) Unraveling the distribution and evolution of miR156-targeted *SPLs* in plants by phylogenetic analysis. *Plant Divers Resour* 34(1):33-46.

LING, LZ. AND ZHANG, SD. (2012b) Exploring the evolutionary differences of SBP-box genes targeted by miR156 and miR529 in plants. *Genetica* 140:317–324.

LOBBES, D.; RALLAPALLI, G.; SCHMIDT, D.D.; MARTIN, C.; CLARKE, J. (2006). Serrate: a new player on the plant microRNA scene. *Embo Reports*, Colney, 7:1052- 1058.

MAHER C, STEIN L, WARE D (2006) Evolution of Arabidopsis microRNA families through duplication events. *Genome Res* 16(4):510–519.

MALAMY, J.E. AND BENFEY, P.N. (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of Arabidopsis thaliana. *Development* 124:33–44

MALAMY, JE. (2005). Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant Cell Environ* 28:67–77.

MALLORY, AC.; DUGAS, DV.; BARTEL, DP.; BARTEL, B. (2004). MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. *Curr. Biol.* 14:1035–1046.

MARIN, E.; JOUANNET, V.; HERZ, A.; LOKERSE, A.S.; WEIJERS, D.; VAUCHERET, H.; NUSSAUME CRESPIE, MAIZEL, A. (2010). miR390, Arabidopsis TAS3 tasiRNAs, and their AUXIN RESPONSE FACTOR targets define an autoregulatory network quantitatively regulating lateral root growth. *Plant Cell* 22:1104–1117..

MEGRAW, M.; BAEV, V.; RUSINOV, V.; JENSEN, S. T.; KALANTIDIS, K.; HATZIGEORGIOU, A. G. (2006). MicroRNA promoter element discovery in Arabidopsis. *Rna-a Publication of the Rna Society*, Pennsylvania, 12:1612-1619.

MOORE, M.J.; BELL, C.D.; SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D.E. (2007). Using plastid genome-scale data to resolve enigmatic relationships among basal angiosperms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104:19363-19368.

NOGUEIRA, F.T.S.; MADI, S.; CHITWOOD D.; JUAREZ M.; TIMMERMANS, M. (2007). Two small regulatory RNAs establish opposing fates of a developmental axis. *Genes & Development*, 21:750-755.

NOGUEIRA, F.T.S.; CHITWOOD, D.H.; MADI, S.; OHTSU, K.; SCHNABLE, P.S.; SCANLON, M.J.; TIMMERMANS, M.C.P. (2009). Regulation of small RNA accumulation in the maize shoot apex. *Plos Genetics*, New York, 5:1-8.

ORI, N.; COHEN, A.R.; ETZIONI, A.; BRAND, A.; YANAI, O.; SHLEIZER, S.; MENDA, N.; AMSELLEM, Z.; EFRONI, I.; PEKKER, I.; ALVAREZ, J.P.; BLUM, E.; ZAMIR, D.; ESHED, Y. (2007). Regulation of LANCEOLATE by miR319 is required for compound-leaf development in tomato. *Nature Genetics*, New York, 39:787-791.

ORTIZ-MOREA, F.A. (2011). Análise da via de regulação gênica do miRNA156/SPL na brotação lateral e caracterização molecular do processo de emergência da gema axilar de cana de açúcar. Tese mestrado (fisiologia e bioquímica de plantas)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 171p.

OSMONT KS, SIBOUT R, HARDTKE CS. (2007). Hidden branches: developments in root system architecture. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58:93–113

PAPONOV, IA.; TEALE, WD.; TREBAR, M.; BLILOU, I.; PALME, K. (2005). The PIN auxin efflux facilitators: Evolutionary and functional perspectives. *Trends in Plant Science* 10:170–177.

PARK, W.; LI, J.; SONG, R.; MESSING, J.; CHEN, X. (2005). Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Madison, 102:3691-3696.

PEAUCELLE, A.; MORIN, H.; TRAAS, J.; LAUFS, P. (2007). Plants expressing a miR164-resistant CUC2 gene reveal the importance of post-meristematic maintenance of phyllotaxy in Arabidopsis. *Development* 134:1045-1050.

PERET, B.; DE RYBEL, B.; CASIMIRI, I.; BENKOVA, E.; SWARUP, R.; LAPLAZE, I.; BEECKMAN, T.; BENNETT, M.J. (2009). Arabidopsis lateral root development: an emergy story. *Trends Plant sci* 14:399-408.

PETRICKA, J.J.; BENFEY, P.N. (2008). Root leayers: complexbregulation of development patterning. *Curr opinion genet dev.* 18: 354-361.

PETRICKA, J.J.; WINTER, C.M.; BENFEY, P.N. (2012). Control of Arabidopsis Root development. *Plant biology.* 63:563-90.

PUZEY, JR.; KRAMER, EM. (2009). Identification of conserved Aquilegia coerulea microRNAs and their targets. *Gene* 448(1): 46-56.

RAHMAN, A.; BANNIGAN, A.; SULAMAN, W.; PECHTER, P.; BLANCAFLOR, EB.; BASKIN, TI. (2007). Auxin, actin and growth of the Arabidopsis thaliana primary root. *Plant Journal* 50:514–528.

REINHART, B.J.; WEINSTEIN, E.G.; RHOADES, M.W.; BARTEL, B.; BARTEL, D.P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes & Development*, Cold Spring Harbor, 16:2313-2313.

RHOADES, MW.; REINHART, BJ.; LIM, LP.; BURGE, CB.; BARTEL, BE.; BARTEL, DP. (2002). Prediction of plant microRNAs targets. *Cell* 110:513-520.

RUTTER MT, CROSS KV, VAN WOERT PA (2012) Birth, death and subfunctionalization in the Arabidopsis genome. *Trends Plant Sci.* 17(4):204-212.

SABATINI, S.; BEIS, D.; WOLKENFELT, H.; MURFETT, J.; GUILFOYLE, T. MALAMY, J.; BENFEY, P.; LEYSER, O.; BECHTOLD, N.; WEISBEEK, P.; SCHERES, B. (1999). An auxin- dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell* 99:463-72.

SANDERSON, MJ.; THORNE, JL.; WIKSTROM, N.; BREMER, K. (2004). Molecular evidence on plant divergence times. *American Journal of Botany* 91:1656-1665.

SCHWAB, R.; PALATNIK, JF.; RIESTER, M.; SCHOMMER, C.; SCHMID, ME.; WEIGEL, D. (2005). Specific Effects of MicroRNAs on the Plant Transcriptome. *Developmental Cell*, 8:517-527.

SCHWARZ, S.; GRANDE, AV.; BUJDOSO, N.; SAEDLER, H.; HUIJSER, P. (2008). The microRNA regulated SBP-box genes SPL9 and SPL15 Control shoot maturation in Arabidopsis. *Plant molecular biology*. 183-195.

SIEBER, P.; WELLMER, F.; GHEYSELINCK, J.; RIECHMANN, JL.; MEYEROWITZ, EM. (2007). Redundancy and specialization among plant microRNAs: role of the MIR164 family in developmental robustness. *Development* 134:1051-1060.

SILVA, G.F. (2012). Regulação do desenvolvimento e determinação do fruto de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) pela via microRNA156/ SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like (SPL). Tese mestrado (fisiologia e bioquímica de plantas)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 90p.

SOMERVILLE, C., KOORNNEEF, M. (2002). A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. *Natural Review Genetics* 3:883-889.

STRASBURGER, E., NOLL, F., SCHENCK, H., SCHIMPER, A.F.W. (1994). Tratado de Botânica. 8ª edição. Omega.

THIMANN, K.V. (1936). Auxins and the growth of roots. *Am. J. Bot.* 23:561-569.

VAN DEN BERG C, WILLEMSSEN V, HENDRIKS G, WEISBEEK P, SCHERES B. (1997). Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* 390:287-89.

VANNESTE, S.; MAES, L.; DE SMET, I.; HIMANEN, K.; NAUDTS, M.; INZE, D.; BEECKMAN, T. (2005). Auxin regulation of cell cycle and its role during lateral root initiation. *Physiologia Plantarum* 123:139-146.

VANNESTE, S. AND FRIML, J. (2009). Auxin: A trigger for change in plant development. *Cell* 136:1005–1016.

VAUCHERET, H. (2006). Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes & Development*, Cold Spring Harbor, 20:759-771.

VOINNET, O. (2009). Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, Cambridge, 113:669-687.

WANG, X.J.; REYES, J.L.; CHUA, N.-H.; GAASTERLAND, T. (2004). Prediction and identification of *Arabidopsis thaliana* microRNAs and their mRNA targets. *Genome Biol.* 5, R65.

WANG, J.W.; WANG, L.J.; MAO, Y.B.; CAI, W.J.; XUE, H.W.; CHEN, X.Y. (2005). Control of root cap formation by microRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17:2204–2216.

WANG, S.; ZHU, Q. H.; GUO, X. Y.; GUI, Y. J.; BAO, J. D.; HELLIWELL, C.; FAN, L. J. (2007). Molecular evolution and selection of a gene encoding two tandem microRNAs in rice. *Febs Letters*, Amsterdam, 581:4789-4793.

WANG, J.; SCHWAB, R.; CZECH, B.; MICA, E.; WEIGEL, D. (2008). Dual effects of miR156- targeted SPL genes and CYP78A5/KLUH on plastochron length and organ size in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell Online*, Rockville, 20:1231.

WERNER, T.; MOTYKA, V.; LAUCOU, V.; SMETS, R.; VAN ONCKELEN, H.; SCHMULLING, T. (2003). **Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity.** *Plant Cell*, **15**:2532-2550.

WU, G. ;PARK, M.Y.; CONWAY, S.R.; WANG, J.; WEIGEL, D.; POETHIG, R.S. (2009). The Sequential Action of miR156 and miR172 Regulates Developmental Timing in *Arabidopsis*. *Cell*, Cambridge, 138:750-759.

XIE, Q.; GUO, H.S.; DALLMAN, G.; FANG, S.; WEISSMAN, A.M.; CHUA, N.H. (2002). SINAT5 promotes ubiquitin-related degradation of NAC1 to attenuate auxin signals. *Nature* 419:167–170.

XIE, K.; WU, C. E XIONG L. (2006). Genomic organization, differential expression, and interaction of SQUAMOSA promoter-binding-like transcription factors and microRNA156 in rice. *Plant Physiol.* 142:280–293.

XIE, K.; SHEN, J.; HOU, X.; YAO, J.; LI, X.; XIAO, J.; XIONG, L. (2012). Gradual increase of miR156 regulates temporal expression changes of numerous genes during leaf development in rice. *Plant physiology*. 158:1382-1394.

YANG, T.; XUE, L.; AN, L. (2007). Functional diversity of miRNA in plants. *Plant Science*, Limerick, 172:423-432.

YOON, E.K.; YANG JH.; LIM, J.; KIM, SH.; KIM, S-K.; LEE, WS. (2010). Auxin regulation of the microRNA390- dependent transacting small interfering

RNA pathway in Arabidopsis lateral root development. *Nucleic Acids Res.* 38:1382–1391.

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

ZANCA, A.S. (2009). Identificação de microRNAs em cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) Universidade Estadual de Campinas UNICAMP, Campinas, 113p.

ZHANG, B.; PAN, X.; WANG, Q.; COBB, G.; ANDERSON, T. (2006). Computational identification of microRNAs and their targets. *Computational Biology and Chemistry*, Oxford, 30:395-407.

ZHENG, Y.; LI, Y.F.; SUNKAR, R.; ZHANG, W. (2011). SeqTar: an effective method for identifying microRNA guided cleavage sites from degradome of polyadenylated transcripts in plants. *Nucleic Acids Res.* 10.1093.

2. O microRNA529b regula genes específicos de *SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)* em eudicotiledôneas

Resumo

MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs endógenos não codantes de 20-22 nucleotídeos que regulam a expressão gênica. Muitos genes-alvos de miRNA em plantas codificam para fatores de transcrição associados com a determinação da arquitetura vegetativa, tal como os genes *SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like (SPLs)*. Os genes *SPLs* estão envolvidos na redução da dominância apical, padrão de crescimento da gema axilar, transição da fase juvenil-adulta e desenvolvimento de flores e frutos. Alguns membros dos genes *SPLs* são regulados por ambos os miRNAs miR156 e miR529. O sítio de reconhecimento destes microRNAs nos transcritos dos genes *SPLs* é conservado e difere somente em sete nucleotídeos. Enquanto o miR156 é altamente conservado entre Angiospermas, o miR529 aparentemente está presente somente em eudicotiledôneas basais, monocotiledôneas e no musgo *Physcomitrella patens*. Neste trabalho, foi

realizada uma busca de possíveis genes *SPLs* em eudicotiledôneas "*core*" que mantiveram o sítio de reconhecimento do miR529b. Posteriormente foi gerada uma árvore filogenética com as sequências obtidas. Interessantemente, foram encontrados vários membros de genes *SPLs* nessas eudicotiledôneas, incluindo os genes *SPL9* e *SPL15* de *Arabidopsis*, que contém o sítio de reconhecimento do miR529b, adicionalmente ao sítio de reconhecimento do miR156. Para testar se o sítio de reconhecimento do miR529b é funcional nessas *SPLs*, foram geradas plantas transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando o precursor de arroz *OsMIR529b*. As linhagens transgênicas de *Arabidopsis* (*OsMIR529b*-OE) apresentaram fenótipos vegetativos e reprodutivos similares aos de plantas duplo mutantes de perda de função para os genes *SPL9* e *SPL15* de *Arabidopsis* (*spl9/spl15*). Além disso, as plantas transgênicas apresentaram severa redução nos níveis de transcritos dos genes *SPL9* e *SPL5*, mas não de outras *SPLs*, tais como *SPL10* e *SPL13*. Estes resultados sugerem que o miR529b pode ser processado e funcional em eudicotiledôneas "*core*" e que este miRNA foi possivelmente perdido na história evolutiva recente das eudicotiledôneas.

Palabras chaves: miR529, miR156, *SPLs*, monocotiledônea e eudicotiledônea.

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are endogenous non-coding small RNAs (20-22nt) that regulate gene expression. It has been shown that many miRNA targets in plants are transcription factors associated with vegetative architecture determination, such as the *SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like (SPL)* genes. *SPLs* are associated with reduction of apical dominance, axillary bud outgrowth, transition from the juvenile to adult phase, and flower and fruit development. Some members of the *SPLs* are regulated by both miR156 and miR529b. The sites recognized by these microRNAs in *SPL* transcripts are conserved and differ only by seven nucleotides. While miR156 is highly conserved among Angiosperms, miR529b seems to be present only in monocots, *Physcomitrella patens* and basal eudicots. In this work, we sought to search for possible core eudicot *SPL* genes that retained miR529b binding sites during evolution. Interestingly, we found several members of core eudicot *SPL* genes, including *SPL9* and *SPL15* of *Arabidopsis*, that retained miR529b recognition site in addition to the well-known miR156 binding site. To test whether this binding site is functional in these eudicot *SPLs*, we generated transgenic lines of *Arabidopsis* overexpressing the rice *OsmiR529b* precursor

(OsMIR529b-OE). *OsMIR529b*-OE displayed similar phenotypes as the double mutant *spl9/spl15*, as well as a severe downregulation of *SPL9* and *SPL5* transcript levels, but not of other *SPLs* genes. Our data suggest that miR529b is processed and functional in core eudicots and that this microRNA was recently lost in the evolutionary history of eudicots.

Key words: miR529b, miR156, SPLs, monocots and eudicots.

2.1 INTRODUÇÃO

A brotação de ramos laterais e a produção de folhas são fatores importantes que determinam a arquitetura da parte aérea das plantas, sendo a arquitetura vegetal sujeita a uma série de controles regulatórios nos quais estão incluídos modificações na expressão gênica e alteração na produção e percepção de fito-hormônios (Ortiz-Morea, 2011). Dentro das redes de regulação, alguns microRNAs (miRNAs) estão envolvidos, regulando genes relacionados à brotação de gemas laterais e desenvolvimento foliar.

Um intrigante exemplo de ação de microRNAs na brotação lateral e formação de folhas é o envolvimento dos miRNAs miR156 e possivelmente miR529b. Por exemplo, a expressão ectópica do miR156 em *Arabidopsis*, tomateiro e milho promove severa redução na dominância apical, levando a uma maior produção de ramos laterais e aumento considerável do número de folhas (Schwab *et al.*, 2005; Chuck *et al.*, 2007; Silva, 2012). Interessantemente, os miR156 e miR529 possuem genes-alvo em comum que são membros da família de fatores de transcrição do tipo *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE* (SPLs) em monocotiledôneas e *Physcomitrella*. Em *Arabidopsis thaliana* existem 16 membros da família *SPL*,

dos quais dez são alvos do miR156 (Guo *et al.*, 2008). O fato de que um mesmo gene seja regulado por miRNAs diferentes oferece vantagens na modulação de sua expressão, já que um número maior de vias estão disponíveis. Os sítios de reconhecimento entre estes miRNAs (miR156 e miR529b) e os transcritos dos genes *SPLs* são conservados entre espécies distantes evolutivamente, o que facilita o uso de ferramentas computacionais para a identificação destas sequências em espécies ainda não estudadas.

Embora os microRNAs miR529b e miR156 sejam correlacionados em nível de sequência de nucleotídeos, compartilhando 14-16 nt (Cuperus *et al.*, 2011), o miR156 é conservado em todas as plantas avaliadas até o momento (Guo *et al.*, 2008), enquanto que o miR529b exibe distribuição taxonômica mais restrita, sendo identificado em eudicotiledôneas basais, monocotiledôneas e briófitas. Curiosamente, embora ambos os miRNAs possuam um ancestral comum em embriófitos, o miR529b parece ter sido perdido em eudicotiledôneas "core" (Cuperus *et al.*, 2011). Interessantemente, foi identificado bioinformaticamente alguns genes *SPL* de eudicotiledôneas "core" (Ver resultados) que possuem sítio de reconhecimento para o miR529b, incluindo *arabidopsis*, embora esse miRNA não esteja presente nos seus genomas ou em sequências transcritas de eudicotiledôneas identificadas até o momento. Este dado sugere que a relação regulatória entre o miR529b e seus alvos tenha sofrido uma reorganização ao longo da evolução das plantas (Fig. 2.1).

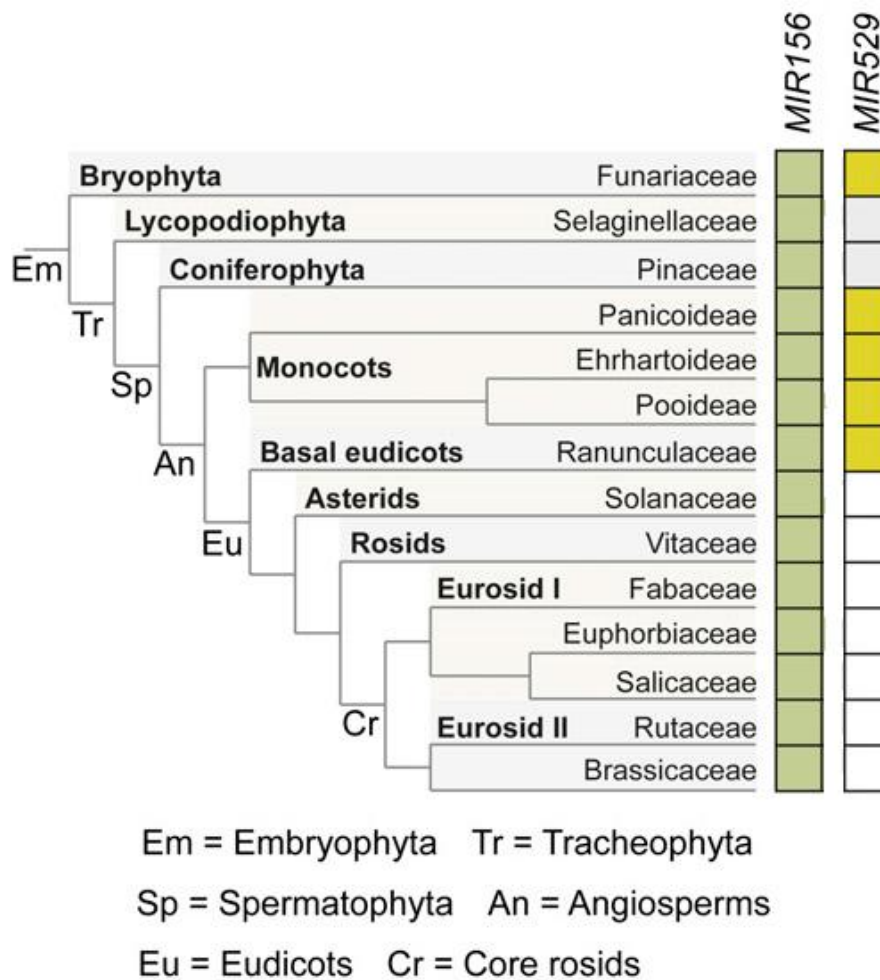


Figura 2.1. miR156 e miR529 que são conservados entre famílias de plantas representadas no miRBase release 16 (Griffiths-Jones *et al.*, 2008). Os quadros coloridos representam em qual famílias vegetais quais os miRNAs foram identificados (Figura modificada a partir de Cuperus *et al.*, 2011).

Até o momento, não há relatos de estudos constatando os possíveis papéis do miR529 no desenvolvimento vegetal. Portanto, torna-se importante estabelecer o papel funcional do miR529 no processo de brotação lateral e formação de folhas além de sua relação evolutiva e funcional com o miR156. O estudo de tais vias pode contribuir significativamente para o entendimento da formação da arquitetura vegetal e aumento de biomassa, o que pode ser aplicado para fins biotecnológicos e de melhoramento genético, principalmente em plantas de interesse comercial. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo geral contribuir para o esclarecimento do papel da via gênica

miR529/SPL durante o processo de brotação lateral e produção de folhas e avaliar a funcionalidade dos sítios do miR529 conservados em alguns genes *SPLs* de *Arabidopsis thaliana*.

Os objetivos específicos do trabalho foram (I) Gerar plantas transgênicas de *arabidopsis* superexpressando o *OsmiR529b* com o intuito de investigar se os sítios de reconhecimento conservados evolutivamente desse miRNA em *AtSPLs* são funcionais, (II) Caracterizar fenotipicamente e molecularmente plantas transgênicas de *arabidopsis* superexpressando o *OsmiR529b*, (III) comparar o padrão de expressão dos miRNAs miR156 e miR529b em arroz (IV) Entender qual o processo evolutivo teve por consequência a perda do miR529b e sua interação com os genes *SPLs* em eudicotiledôneas "core".

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos e demais atividades referentes ao presente trabalho foram desenvolvidos no laboratório de Genética Molecular do Desenvolvimento Vegetal (GMDV), no Departamento de Genética do Instituto de Biociências de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" (UNESP).

2.2.1. Material vegetal

Para todas as análises utilizando *Arabidopsis thaliana* foram avaliadas plantas WT ecótipo Columbia (Col-0), plantas transgênicas Col-0 superexpressando o gene *AtMIR156a* (sementes gentilmente cedidas pelo Dr. Scott Poethig da Universidade de Pensilvânia) (Wu *et al.*, 2009), plantas duplo mutantes Col-0 de perda de função dos genes *AtSPL9* e *AtSPL15*, *spl9/spl15* (gentilmente cedido pelo Dr. Peter Huijser do Instituto Max Planck) (Schwarz *et al.*, 2008) e plantas transgênicas Col-0 superexpressando o transgene *p35s:OsMIR529b* (ver abaixo). Foi também utilizado material vegetal de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*), arroz (*Oryza sativa* ssp. Japônica), *Brachypodium distachyon* (Bd21), cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) e tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom).

2.2.2 Análises filogenéticas

2.2.2.1 Análises filogenéticas dos precursores dos miR156 e miR529

As sequências dos precursores dos miRNAs foram obtidas no banco de dados miRBase (<http://www.mirbase.org/>). Estas sequências foram alinhadas usando o programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1997) e posteriormente foi gerada a árvore filogenética utilizando o método de análises neighbor-joining (NJ) no programa MEGA versão 5.05 (Tamura *et al.*, 2011).

2.2.2.2 Análises filogenéticas dos genes SPLs com o sítio de reconhecimento do miR529b

Inicialmente, sequências dos genes SPLs presentes em todas as plantas terrestres com sequência disponível foram obtidas no banco de dados públicos NCBI (*National Center For Biotechnology Information*), Phytozome v7.0 (<http://www.phytozome.net/>) e no TIGR (*The Institute for Genomic Research*) (ver número de acesso das sequências no anexo 1). Foi gerada árvore filogenética com as possíveis sequências que continham o sítio de reconhecimento para o miR529, utilizando o método de análises filogenética *Maximum-likelihood* (ML) no programa MEGA versão 5.05 (Tamura *et al.*, 2011). Foi realizado também uma árvore filogenética dos genes SPLs com o sítio de reconhecimento para o miR529b de *Physcomitrella patens*, *Oryza*

sativa, *Zea mays* e *Arabidopsis thaliana* utilizando o método de análises neighbor-joining (NJ) no programa MEGA versão 5.05 (Tamura et al. 2011).

2.2.3 Análises de estrutura Éxon/Íntron de genes *SPLs*

Foram utilizadas sequências de CDS e genômicas de genes *SPLs* de *Physcomitrella patens*, *Oryza sativa*, *Zea mays* e *Arabidopsis thaliana* para esquematizar a estrutura de éxon/íntron em cada um dos genes no GSDS (Gene Structure Display Server <http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>).

2.2.4 Construção do cassete de expressão para a superexpressão do *OsMIR529b*

Foi realizada a extração de DNA genômico de arroz (*Oryza sativa*) cultivar japônica, utilizando o protocolo CTAB (doyle e Doyle, 1987). Posteriormente foi realizada uma reação de PCR, com o kit comercial Platinum®*Taq* DNA Polymerase (Invitrogen), para amplificação do fragmento correspondente ao precursor do *OsmiRNA529b*. Todos os iniciadores utilizados neste trabalho encontram-se na Tabela 2.1. Os oligonucleotídeos utilizados para amplificação do gene *OsMIR529b* (Os529pre-F e OsMIR529pre-R) contém sítio para as enzimas de restrição BamHI e SacI.

O *amplicon* de 1000pb foi verificado através de eletroforese em gel de agarose 1%. O gel foi corado com brometo de etídeo 0,1µg/ml e visualizado através de um transluminador com luz ultravioleta.

Tabela 2.1. Iniciadores específicos utilizados neste trabalho.

Oligonucleotídeo	Gene.	Sequência	Acesso
AtSPL9-F	SPL9	GGTCGGGTCTCAGTCGGGTCTCAGATACC	AT2G42200.1
AtSPL9-R	SPL9	ACTGGCCGCCTCATCACTCTTGATCC	AT2G42200.1
AtSPL15-F	SPL15	AGAAGCAAGAACCGGGTCAATACC	AT3G57920.1
AtSPL15-RNested	SPL15	AGCCATTGTAACCTTATCGGAGAATGAG	AT3G57920.1
AtSPL15- R	SPL15	TCATCGAGTCGAAACCAGAAGAT	AT3G57920.1
AtSPL10-F	SPL10	GTGGGAGAATGCTCAGGAGGC	AT1G27370
AtSPL10-R	SPL10	GAGTGTGTTTGATCCCTTGTAATCC	AT1G27370
AtSPL13-F	SPL13	CCAATCTCTTCTCTCCAAACAGTACCAGAAGC	AT5G50570
AtSPL13-R	SPL13	GAAGCAAATGAGGGACTGACGACG	AT5G50570
Os529pre-F	MIR529	CTCCCTCTTCTTCTCTTAGC	MI0005804
Os529pre-R	MIR529	GGCTGCATGGACAGATAAGA	MI0005804
AtActina -F	ACTINA	GACCTTGCTGGACGTGACCTTAC	AT3G18780
AtActina -R	ACTINA	GTAGTCAACAGCAACAAAGGAGAGC	AT3G18780
OsSPL14 -F	SPL14	ATCTCCGGTGGTATCCAGTG	LOC_Os08g39890
OsSPL14 -R	SPL14	CACGATGGATTGGTCTCTGTA	LOC_Os08g39890
OsUbiquitina -F	UBIQUITINA	AGAAGGAGTCCACCCTCCACC	LOC_Os03g0234200
OsUbiquitina -R	UBIQUITINA	GCATCCAGCACAGTAAACACG	LOC_Os03g0234200
miR529-F	miR529	CCTGAGAGAAGAGAGAGAGTA	MIMAT0005015
Stem-loop miR529	miR529	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCAC TGGATACGACAGGCTG	MIMAT0005015
miR156-F	miR156	CCTGAGTGACAGAAGAGAGTG	MIMAT0000167
Stem-loop miR156	miR156	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCAC TGGATACGACTGCTCT	MIMAT0000167
Reverso universal		GTGCAGGGTCCGAGG	

Após a confirmação do *amplicom*, o mesmo foi utilizado para subclonagem no vetor pGEM T-Easy (Promega), seguindo as indicações do fabricante. Foram utilizadas células competentes da cepa DH5 α de *Escherichia coli* para transformação genética via eletroporação. Posteriormente, as bactérias foram plaqueadas em placa de Pertri contendo meio LB (Luria-Bertani) sólido contendo antibiótico ampicilina 50 μ g/ml. As colônias foram selecionadas através de reação de PCR com os oligonucleotídeos correspondentes ao fragmento inserido.

Posteriormente foi feita a extração do DNA plasmidial de duas colônias contendo o fragmento esperado, utilizando o kit comercial Quiaprep® Spin Miniprep (Qiagen), seguindo manual do fabricante. Após a extração, foi realizada outra reação de PCR para confirmação do fragmento. As amostras confirmadas foram enviadas ao Serviço de Sequenciamento LDM (Laboratório de Diagnóstico Molecular), situado no Departamento de Microbiologia do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB), utilizando a plataforma de

sequenciamento capilar ABI 3500 da AppliedBiosystems. As sequências foram avaliadas nos *software*Contig8, no programa MEGA 5.0, e submetidas à pesquisa junto ao banco de dados do NCBI, utilizando a ferramenta BLAST. Além disso, a sequência do *OsMIR529b* foi submetida ao site web mFOLD, para a confirmação de sua estrutura em *hairpin*.

Após a confirmação da clonagem no vetor *pGEM T-Easy*, foi realizada digestão com as enzimas BamH1 e SacI, liberando apenas o fragmento de interesse de 1Kb. O inserto liberado foi purificado e clonado sob o controle do promotor CaMV35S (p35S) no vetor binário pBI121 (Invitrogen), produzindo o vetor pGO529. A confirmação da clonagem foi realizada via digestão, utilizando-se as mesmas enzimas citadas anteriormente. Posteriormente, foi realizada a extração do DNA plasmidial (miniprep) de apenas um clone. Este miniprep foi utilizado para transformar a cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* via eletroporação.

Além do vetor pGO529, foi gerado o vetor pGO529m, sendo que este vetor foi produzido a partir do vetor pGO529. O vetor pGO529 foi digerido com as enzimas de restrição HindIII e EcoRI, liberando o fragmento de 2Kb, que contém o promotor 35s, o precursor do *OsmiRNA529b* e o terminador NOS. O fragmento liberado foi purificado e clonado no vetor pCambia 1381Z. A confirmação da clonagem foi realizada via digestão, utilizando-se as mesmas enzimas citadas anteriormente. Posteriormente, foi realizada a extração do DNA plasmidial (miniprep) de apenas um clone. Este miniprep foi utilizado para transformar a cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* via eletroporação para posterior transformação genética da monocotiledônea *Brachypodium distachyon*.

2.2.5 Transformação genética de *Arabidopsis thaliana* pelo método *floral-dip*

Foi utilizado o protocolo do manual de laboratório de *Arabidopsis thaliana* (Weigel and Glazebrook, 2002), o qual foi adaptado de Clough e Bent (1998). A cepa de GV3101 de *A. tumefaciens* foi transformada com o vetor pGO529 contendo o transgene quimérico *p35S:OsMIR529b*. A cepa foi multiplicada em 500ml de meio líquido LB contendo o antibiótico canamicina 50mg/μl a 28°C por 48 horas. Posteriormente a solução bacteriana foi

centrifugada a 4000g por 15 minutos à temperatura ambiente. As células foram então ressuspensas em 500ml de meio MS contendo 5% de sacarose e 0,02% de Silwet L-77 (100µl para 500ml). A parte aérea das plantas foram submersas na suspensão bacteriana por 30 segundos sob leve agitação; posteriormente, a solução foi adicionada nas inflorescências, com o auxílio de uma micropipeta, e em seguida drenadas por aproximadamente 5 segundos, a fim de retirar o excesso de solução. As plantas foram colocadas na posição horizontal em bandejas forradas com papel absorvente e cobertas com papel filme para manter a umidade por 24 a 36 horas. Após este período, o papel filme foi removido e as plantas foram levadas à câmara de crescimento nas mesmas condições de crescimento já descritas anteriormente, por aproximadamente um mês, até o momento adequado para a coleta das sementes.

2.2.6 Caracterização genotípica das plantas transgênicas

Após a colheita de sementes das plantas inoculadas com *Agrobacterium*, as sementes foram crescidas em placas contendo meio MS com canamicina 50mg/µl para a sua seleção. Plantas T1 (primeira geração de transformantes) foram transferidas para aclimação em câmara de crescimento. Foram coletadas folhas de seis plantas crescidas no meio de seleção e realizada extração de DNA genômico seguindo o método CTAB (Doyle e Doyle, 1987). Foi realizado posteriormente PCR com iniciadores específicos para o transgene. O iniciador direto se anela no promotor p35S enquanto que o iniciador reverso anela no final do *lôcus* *OsMIR529b*, para a confirmação da inserção do t-DNA nas plantas.

2.2.7 Análises estatísticas

Todos os dados fenotípicos foram sujeitos a análises estatísticas por análises de variância utilizado o programa *ASSISTAT* versão 7.6 beta (T-student $P < 0,01$).

2.2.8 Caracterização fenotípica das plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* contendo o transgene *p35S::OsMIR529b*

Foram avaliados fenotipicamente três eventos independentes, em todas as análises fenotípicas, utilizando a geração T3. Inicialmente foi contado o número de folhas na roseta em diferentes tempos (15, 20, 25 e 30 dias após a germinação). Foi medido o tempo de início da emergência do caule floral e da antese. Foi contado também o número de folhas juvenis. Tais folhas são caracterizadas pela ausência de tricomas abaxiais (Schwarz *et al.*, 2008). Os tricomas abaxiais foram observados com o auxílio de uma lupa. Foi obtido uma estimativa da taxa de florescimento por meio da contagem do número total de folhas da roseta ou dias após a germinação pelo número de plantas nas quais apareceu a primeira inflorescência. Outra estimativa adquirida foi a taxa de iniciação foliar da roseta, na qual dividiu-se o número de folhas da roseta que estivessem com pelo menos 0,5 cm, pelo número de dias após a germinação..

2.2.9. Análises histológicas do ápice vegetativo de plantas selvagens, transgênicas e mutantes

Regiões do ápice vegetativo foram isoladas de plantas com 25 dias após a germinação (DAG). O tecido foi fixado em solução de Karnovsky (Karnovsk, 1965), posteriormente desidratados em série etílica crescente (10% a 100%) e infiltrados em parafina. Foi obtido secções com espessura de 8 µm utilizando o micrótomo rotativo (LEYCA), e os tecidos foram posteriormente corados com azul de toluidina 0,05% (Sakai, 1973). Após a coloração, os cortes foram fotografados com o auxílio de um fotomicroscópio.

2.2.10. Isolamento, tratamento com DNase I e quantificação do RNA total

O isolamento de RNA total das diferentes amostras foi feito com trizol (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. Foi utilizada uma combinação de aproximadamente seis folhas da roseta de diferentes plantas de cada genótipo testado para maceração em tubo de 1,5 mL com auxílio de nitrogênio líquido.

Após a extração do RNA total, tratou-se as amostras com 1µl de *DNase I Amplification Grade* (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante para remoção total de DNA genômico das amostras. Para evitar possíveis interferências residuais da DNase I no processo de síntese de cDNA, as amostras de RNA foram purificadas por re-extração com Trizol, mas usando

somente $\frac{1}{4}$ do volume dos reagentes. Em seguida, a integridade das amostras de RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com 0,001% (v/v) de brometo de etídio, em tampão de corrida TAE 1x (40mM Tris-acetato; 1mM EDTA) com tensão constante de 120V. A concentração e pureza do RNA foi avaliada por espectrofotometria de absorção, utilizando o equipamento NanoDrop® ND-1000 and ND-8000 8-Sample. Finalmente, a ausência de DNA genômico nas amostras de RNA total foi confirmada por meio da realização de PCR usando iniciadores específicos para um gene endógeno (*Actina*).

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

O RNA total, tratado com enzima DNaseI tal como descrito anteriormente, foi utilizado para a síntese da primeira fita de cDNA por *pulsed stem-loop* RT-PCR (Figura 2.2, Varkony-Gasic *et al.*, 2007). Juntamente com o iniciador específico tanto para o miRNA529b quanto para o miR156 (iniciador RT), também foi adicionado oligodT para posterior normalização da quantidade de cDNA utilizado em cada reação de PCR. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada a partir de 1µg 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 miRNA529b e miR156 maduros. 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 MgCl₂ 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. Para inativação da enzima Improm-II *Reverse Transcriptase*, a reação foi incubada a 70 °C durante 15 minutos. Subsequentemente, as reações foram armazenadas a -80°C.

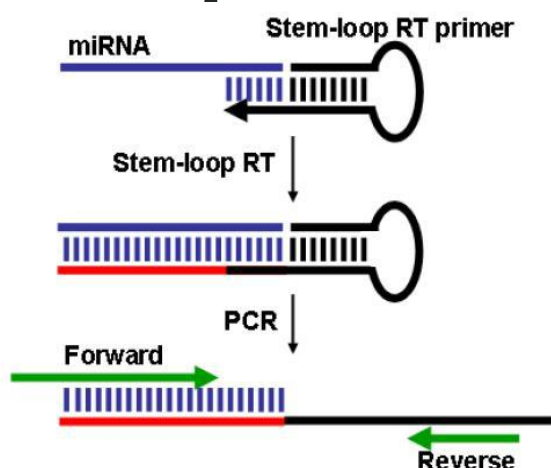


Figura 2.2. Esquema do *pulsed stem-loop* RT-PCR retirado de (Varkonyi-Gasic et al., 2007). Iniciadores específicos *stem-loop* anelam na porção 3' das moléculas de miRNA maduro, iniciando sua transcrição reversa. Posteriormente, o miRNA maduro é amplificado utilizando-se iniciador direto específico e um iniciador reverso universal.

2.2.12 Confirmação da clivagem de genes alvo de miRNAs por 5'-RACE

Baseado no fato de que a clivagem de mRNA-alvo é feita no complexo *RISC* guiada pelo miRNA maduro, foi usada a metodologia de 5'-RACE (*rapid amplification of cloned ends*) (Llave et al., 2002; Souret et al., 2004) modificada, para identificar o sítio de clivagem e comprovar a regulação do gene *AtSPL15* pelo miRNA529b.

RNA total de folha da roseta de plantas de *Arabidopsis* transformadas com o vetor pGO529 foi utilizado para o experimento, utilizando-se o kit *GeneRacer* (Invitrogen). O experimento seguiu as recomendações do fabricante, iniciando-se na etapa de ligação do oligo de RNA ao RNA total. Ao tubo contendo o oligo de RNA *GeneRacer* pré-aliquotado (0,25 µg), foram adicionados 5 µg de RNA total em 7 µL de água DEPC (DIETILPIROCARBONATO). O oligo foi ressuscitado na solução e então a mistura foi incubada a 65°C durante 5 minutos para desnaturação de estruturas secundárias. O tubo foi então colocado em gelo por 2 minutos, e posteriormente adicionou-se 1 µL de 10X *Ligase Buffer*, 1 µL de 10mM ATP, 1 µL de *RNAseOut* (40U/µL), *T4 RNA ligase* (5U/µL), para completar um volume final de 10 µL.

Posteriormente a reação foi incubada a 37°C por 1 hora, e depois colocada no gelo. O RNA total foi purificado com fenol:clorofórmio e precipitado com etanol, acetato de sódio e glicogênio. O *pellet* resultante foi então ressuscitado em 10 µL de água DEPC autoclavada.

Este RNA ligado ao oligo de RNA *GeneRacer* foi utilizado como molde para reação de transcrição reversa utilizando o *Kit Improm-II Reverse*

Transcriptase (Promega). Ao RNA foi adicionado 1 μ l de oligo dT, 1 μ l de dNTP mix 10mM. As amostras foram incubadas a 70°C por 10 minutos para desnaturação das estruturas secundárias e depois colocadas a 5°C por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 5 μ l Improm-II 5x Reaction Buffer, 2,4 μ l de MgC₂, RNase out 0,6 μ l e 1 μ l da enzima Improm-II *Reverse Transcriptase*. A reação foi incubada em termociclador com o seguinte programa: 25°C por 5 minutos, 42°C por 1 hora e 70°C por 15 minutos para inativação da enzima.

O cDNA foi utilizado para amplificações dos fragmentos clivados do gene *AtSPL15* usando um iniciador senso específico para a sequência do *oligo de RNA GeneRacer* e iniciador reverso específico para a sequência do mRNA-alvo (Tabela 2.1). Com o intuito de obter maior especificidade dos *amplicons*, alíquotas do produto de PCR da primeira reação foram utilizadas para realizar mais uma amplificação, mas usando um par de iniciadores mais internos (Tabela 2.1) aos usados na primeira reação de PCR (*Nested-PCR*). Posteriormente, o *amplicom* foi clonado no vetor pGEM T-Easy seguindo as indicações do fabricante. Foram utilizadas células competentes da cepa DH5 α de *E. coli* para transformação genética via eletroporação. Treze clones foram sequenciados como intuito de confirmar sua identidade e determinar o ponto exato em que o miR529b "guia" a clivagem do *AtSPL15*, permitindo inferir qual dos dois miRNAs (miR156 ou miR529b) tem maior participação na regulação deste alvo nas plantas transgênicas *p35S:OsmiR529b*.

2.2.13 Análise *in silico* de incorporação dos miRNAs miR156 e miR529b nas Argonautas (AGOs) de arroz

Para testar se os miR156 e miR529b são incorporados em diferentes enzimas AGOs em monocotiledôneas, foi feita avaliação *in silico* do número de sequências obtidas para o miR529b e miR156 a partir de bibliotecas de pequenos RNAs de arroz. Essas bibliotecas foram geradas a partir de RNAs enriquecidos em diferentes AGOs de arroz via experimentos de imunoprecipitação de cromatina. Os dados para nossa análise foram obtidos a partir de dados brutos de sequenciamento disponíveis publicamente (Wu *et al.*, 2009). Os dados foram re-analisados para os microRNAs em estudo.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Análises dos transcritos do miR529b em monocotiledôneas e em eudicotiledôneas

Locicapazes de gerar os miR529a ou b não foram detectados em eudicotiledôneas "core" até o momento, somente em monocotiledôneas, eudicotiledôneas basais (por exemplo *Aquilegia caerulea*) e no musgo *Physcomitrella patens* (miRBase v.15). Para confirmar a presença/ausência dos transcritos do miR529b em eudicotiledôneas "core", foi avaliado o acúmulo do transcrito do miR529b em plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum ssp.*), sorgo (*Sorghum bicolor*), arroz (*Oryza sativa*), *Brachypodium distachyon*, arabidopsis e *Solanum lycopersicum* via *pulsed stem-loop* RT-PCR (Fig. 2.3). Como controle, foi avaliado o acúmulo do miR156, o qual está presente em todas as Angiospermas estudadas até o momento (miRBase v.15). Foi avaliado o miR529b devido a sua alta conservação de sequência com o miR156 (Cuperus *et al.*, 2011). Esta análise demonstrou a ausência de transcritos do miR529b maduro em espécies de eudicotiledôneas "core" tais como arabidopsis e tomateiro, e presença de seus transcritos em várias espécies de monocotiledôneas, corroborando a hipótese de que o microRNA529 está ausente nesse grupo de eudicotiledôneas ou é produzido em níveis abaixo do nível de detecção da metodologia utilizada. Além disso, análises em banco de dados de sequenciamento em larga escala de pequenos RNAs e banco de dados genômicos de arabidopsis e tomateiro também apontam para a ausência do *locus* capaz de gerar o miR529 nestas espécies vegetais (dados não mostrados). Em conjunto, estes dados sugerem que a via miR529/miR156/SPL é conservada em monocotiledôneas mas não em eudicotiledôneas "core".

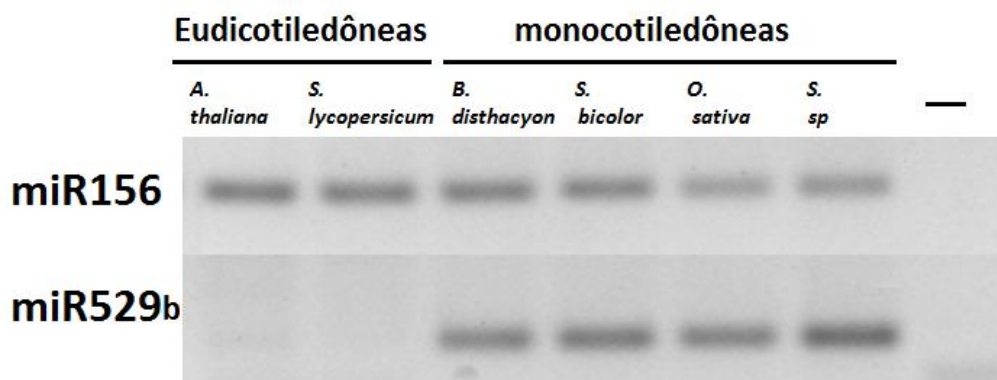


Figura 2.3. Análise do acúmulo de transcritos maduros do miR156 e miR529b (RT-PCR) em monocotiledôneas (*Saccharum spp.*, *Sorghum bicolor*, *Oryza sativa*, *B. distachyon*) e eudicotiledôneas (*A. thaliana* e *S. lycopersicum*). Controle negativo: reação de RT-PCR sem cDNA RT (-).

2.3.2 Análises filogenéticas

2.3.2.1 Análises filogenéticas dos precursores do miR156 e miR529

O miR156 é altamente conservado, estando presente em todas as espécies de plantas avaliadas até o momento enquanto que, o miR529 é encontrado em briófitas, monocotiledôneas e eudicotiledôneas basais. Nas briófitas e monocotiledôneas (*Oryza sativa* e *Zea mays*) os miR156 e miR529 possuem alvos em comum, mas, o número de cópias deste miRNA e de seus respectivos alvos difere em cada espécie (Tabela 2.2). Baseado no fato que estes dois microRNAs são correlacionados ao nível de sequência de nucleotídeos, compartilhando 14-16 nt (Cuperus *et al.*, 2011), foi feito análises filogenéticas entre os precursores de miR156 e miR529 em briófitas (*Physcomitrella patens*), monocotiledôneas (*Oryza sativa* e *Zea mays*) e a eudicotiledônea basal (*Aquilegia coruella*), além de utilizar os precursores do miR156 de eudicotiledônea "core" (*Arabidopsis thaliana*). Para explorar a relação destes miRNAs, foi gerada árvore filogenética a qual foi dividida em dois grupos, A e B (Fig. 2.4). No grupo A são encontrados a maioria dos precursores do miR156 além de um precursor do miR529 de *Aquilegia coruella* (Eudicotiledônea basal) (Fig. 2.4). No grupo B são encontrados a maioria dos precursores do miR529 além de ser encontrado um precursor do miR156 de eudicotiledônea "core" (*Arabidopsis thaliana*). Os resultados sugerem que o miR156 possivelmente é derivado do miR529, talvez via micromutações que

ocorreram ao longo do precursor do miR529. Essas micromutações podem ter afetado o processamento do miR529 maduro em espécies de eudicotiledôneas "core". OmiR156parece ser mais diversificado ao longo da história evolutiva das plantas,ou seja houve um aumento no número de cópias dos precursores do miR156 no genoma vegetalquando comparado com o miR529 (Tabela 2.2).

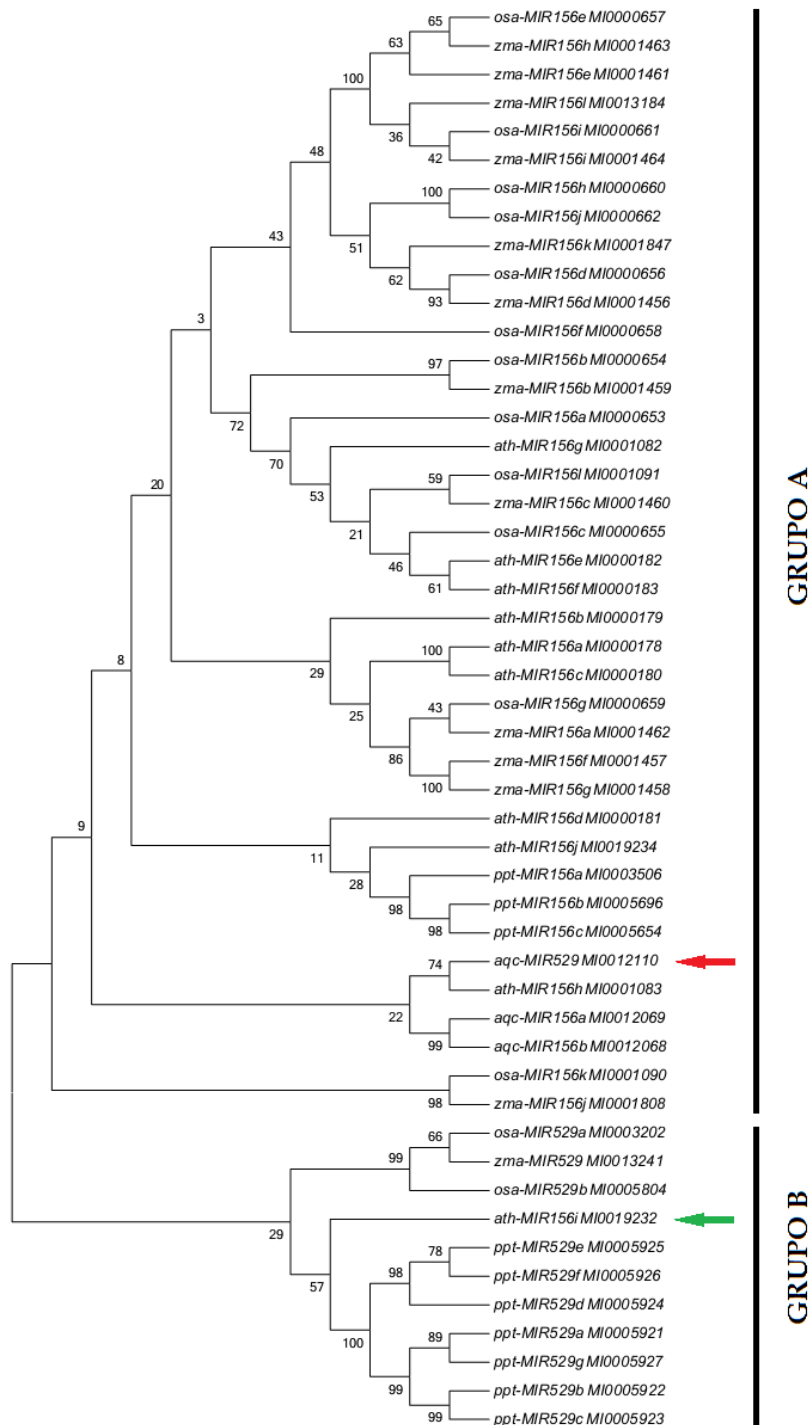


Figura 2.4. Análise filogenética dos precursores do miR156 e miR529 de *Physcomitrella patens*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Aquilegia coruela* e *Arabidopsis*

thaliana. Setas pretas indicam precursores do miR156 no grupo B e seta verde indica precursor do miR529 no grupo A.

Tabela 2.2. Número de cópias dos miR156 e miR529 e número de seus respectivos alvos

Espécie	miR156 Nº. Alvos <i>SPLs</i> / Nº. cópias	miR529b Nº. Alvos <i>SPLs</i> / Nº. cópias
Musgo	3/ 3	3 / 7
Arroz	12 / 12	4 / 2
Milho	12 / 12	4 / 1
Aquilegia	-/2	-/1
Arabidopsis	10/12	2 [*] /-

- Ausência de alvos ou cópias dos miRNAs

*Possível alvo (Ver abaixo)

2.3.2.2 Análises filogenéticas dos genes *SPLs* com o sítio de reconhecimento para o miR529b

Algumas espécies de musgo e monocotiledôneas, tais como arroz e milho, contém membros da família das *SPLs* que possuem sítio de reconhecimento tanto para o miR156 quanto para o miR529b. Após a confirmação da ausência do miR529b em eudicotiledôneas "core", foram realizadas análises de bioinformática dos genes *SPLs* que contém o sítio de reconhecimento do miR529b em todas as plantas terrestres com sequências genômicas disponíveis. A árvore filogenética foi dividida em dois grupos, A e B (Fig. 2.5A). No grupo B estão inclusos os alvos conhecidos do miR529b em briófitas e monocotiledôneas. No grupo A foram identificados vários genes de *SPLs* de eudicotiledônea "core" que surpreendentemente contém o sítio de ligação para o miR529b. Alguns dos genes *SPLs* identificados são pertencentes às espécies *Solanum lycopersicum*, *Arabidopsis lyrata* e *Arabidopsis thaliana*. Dentre os genes encontrados em eudicotiledôneas "core", estão os *SPL9* e *SPL15* de *Arabidopsis thaliana* (Fig. 2.5A), embora o miRNA529b não esteja presente nos seus genomas ou nas sequências transcritas identificadas até o momento para essa espécie.

Considerando que os miR156 e miR529b são similares em termos de sequência, e que os sítios de reconhecimento no transcriptoma dos seus genes-alvos em comum (*SPLs*) são conservados em monocotiledôneas, foi predito bioinformaticamente o sítio de reconhecimento nos genes *SPL9e SPL15* (Fig. 2.5B) de arabadopsis para ambos os miRNAs, mostrando sua similaridade com os sítios de monocotiledôneas (Ling e Zang, 2012b). Estes dados demonstram que embora miR529b tenha sido perdido ao longo da evolução das plantas, os seus respectivos alvos ainda conservam o sítio de regulação.

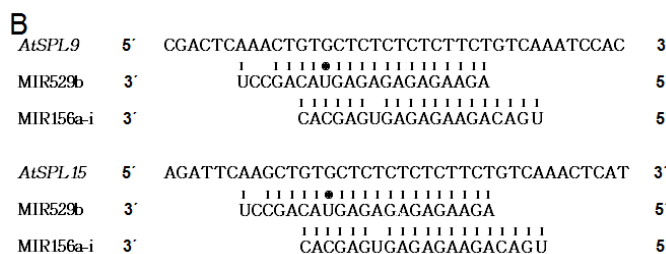
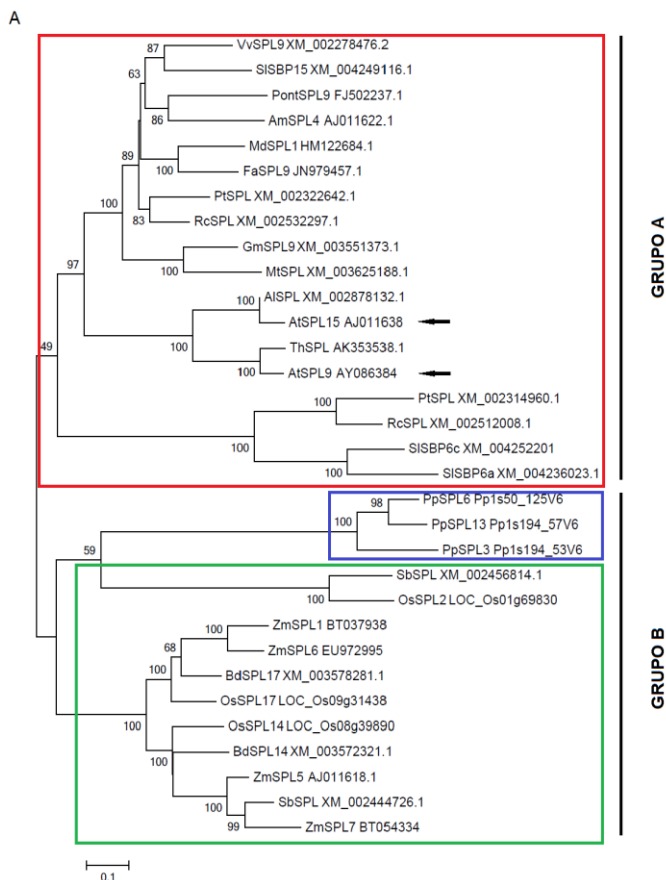


Figura 2.5. A) Análise filogenética de genes *SPLs* que contém o sítio de reconhecimento do miR529b. Quadro vermelho indica as eudicotiledôneas, quadro azul indica as briófitas e quadro verde indica as monocotiledôneas. Setas indicam os

únicos dois membros *SPL15* (AY086384) e *SPL9* (AJ011638) em *Arabidopsis thaliana* que contém o sítio conservado de reconhecimento do miR529b. **B)** Predição do sítio de reconhecimento das *SPL9* e *SPL15* em *arabidopsis* pelos miR529b e miR156.

2.3.2.3 Relação da estrutura gênica entre os possíveis alvos do miR529b

Para explorar a relação dos alvos do miR529b de musgo e monocotiledôneas com os possíveis alvos deste miRNA em *arabidopsis* que foram identificadas bioinformaticamente, foram realizadas análises filogenéticas que resultaram em uma árvore com topologia similar entre as sequências analisadas (Fig. 2.6A). A árvore foi organizada em dois grupos (grupo A e B). No grupo B foram classificados todos os genes *SPLs* de *Physcomitrella patens*. No grupo A estão incluídos os genes *SPLs* de monocotiledôneas e os possíveis alvos do miR529b de *Arabidopsis thaliana*. Estes resultados demonstram que os genes *SPLs* de *arabidopsis* estão classificados juntos com as *SPLs* de monocotiledôneas no grupo A.

Para confirmar as evidências da árvore filogenética e a possível conservação dos genes *SPLs* de *arabidopsis*, foram esquematizadas as estruturas destes genes baseadas na distribuição éxon/íntron das sequências analisadas. Na Figura 2.6B é evidente a relação entre as estruturas dos genes e os grupos formados na filogenia (Fig. 2.6A). No grupo A, todos os genes *SPLs* de monocotiledôneas e *arabidopsis* mostram um padrão de *splicing* conservado de três éxons e dois íntrons, no grupo B, por sua vez, é apresentado um padrão na estrutura com quatro éxons e três íntrons. Estes resultados demonstram claramente que a estrutura dos genes *SPLs* alvos também do miR529b é conservada em monocotiledôneas e eudicotiledôneas e difere da estrutura de outros genes *SPLs* não alvos do miR529b em monocotiledôneas (Ling *et al.*, 2012) e eudicotiledôneas (Anexo 2). Ambos os resultados demonstram uma relação entre os possíveis alvos do miR529b em *arabidopsis* e os alvos do miR529b em musgo e monocotiledôneas, sugerindo uma conservação restrita destes genes. Portanto, embora não seja identificado o miR529b em *arabidopsis*, os possíveis alvos ainda estão presentes.

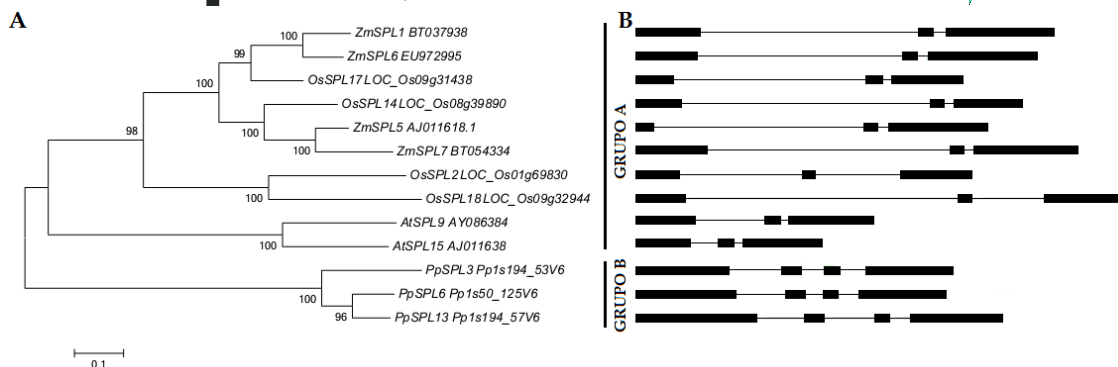


Figura 2.6. A) Análises filogenéticas utilizando os alvos do miR529b de musgo, arroz, milho e seus possíveis alvos em arabis. **B)** Estrutura de éxon e íntron. Caixas pretas indicam a região dos éxons, enquanto as linhas indicam os íntrons. O comprimento das caixas e linhas são baseadas no comprimento dos genes.

2.3.3 Obtenção do transgene *p35S:OsMIR529b* e transformação genética de *Arabidopsis thaliana*

Com o intuito de verificar se os sítios conservados nos transcritos dos genes *SPL9* e *SPL15* de arabis são funcionais, foram geradas plantas transgênicas de arabis superexpressando o gene *MIR OsMIR529b* de arroz (Fig. 2.7) sob o controle do promotor CaMV35S (doravante denominado de 529OE). Para isso, foi gerado o vetor pGO529 como descrito em Materiais e Métodos.



Figura 2.7. Sequência e amplificação do locus correspondente ao *OsMIR529b* (1Kb). **(A)** iniciadores específicos (em vermelho), região do *OsMIR529b* (em amarelo) e do miR529b (em azul). **(B)** Gel de agarose 1% mostrando o amplicon gerado.

Após a geração do vetor pGO529, transformação em *Escherichia coli* cepa DH5 α , e confirmação da clonagem via restrição do DNA, dois clones de

bactéria foram enviados para sequenciamento. Um dos genes sequenciados apresentou 100% de identidade com a sequência depositada no NCBI correspondente ao gene *MIR529b* de arroz, o qual apresenta a estrutura em *hairpin* (Fig. 2.8), sendo portanto selecionado para as etapas posteriores. O DNA plasmidial do clone selecionado foi inserido em *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 via eletroporação. A presença do transgene foi confirmada via PCR e este clone foi utilizado para a transformação de *Arabidopsis* pelo método *floral-dip* utilizando o protocolo do manual de laboratório de *Arabidopsis thaliana* (Weigel and Glazebrook, 2002) adaptado de Clough e Bent (1998).

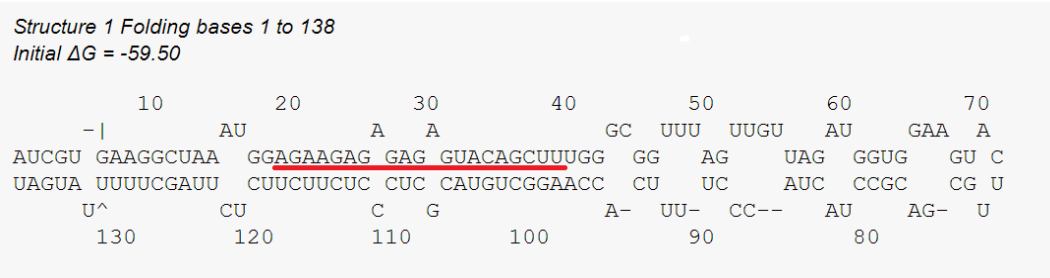


Figura 2.8. Estrutura em forma de *hairpin* do precursor do *OsMIR529* de arroz (característica dos precursores dos microRNAs). Em destaque o *miR529b*.

Após a transformação, as sementes foram crescidas em placas contendo meio MS com canamicina 50mg/μl para a sua seleção. Na Figura 2.9 observa-se que todas as linhagens testadas foram positivas para a presença do transgene *p35S::OsMIR529b*. A reação de PCR utilizou iniciador direto capaz de se anelar ao promotor CaMV35S e o reverso na extremidade 3' do gene *MIR529b* de arroz. Dessa forma, o produto desta amplificação é de aproximadamente 1.1kb. Foram escolhidos três eventos pelo fenótipo apresentado para posteriores análises.

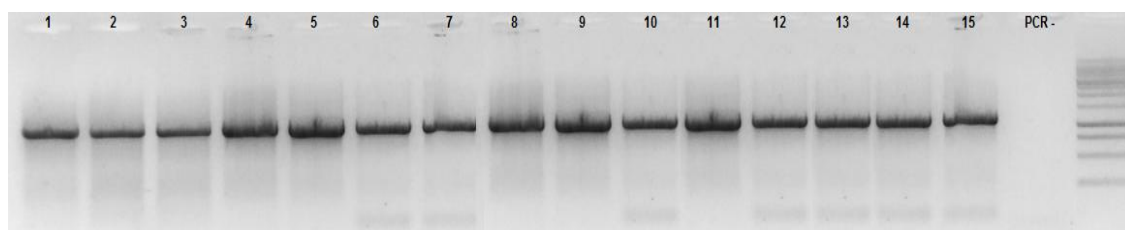


Figura 2.9. Análise genotípica dos 15 eventos transgênicos obtidos. A banda de aproximadamente 1100pb corresponde ao *amplicon* gerado pelo iniciador direto

posicionado no promotor CaMV35S e o iniciador reverso no final da sequência correspondente ao precursor *OsMIR529b*.

2.3.4 Análises fenotípicas das plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* superexpressando o transgene *p35S::OsMIR529b*

Como controles das análises fenotípicas das plantas transgênicas de *Arabidopsis* descritas anteriormente, foram utilizadas plantas duplo mutantes de perda de função *sp19/15*, linhagem transgênica expressando o transgene *p35S:MIR156a* (denominada 156OE), bem como plantas selvagens (WT Col-0). Um interessante aspecto dos eventos transgênicos 529OE é o similar fenótipo com as plantas duplo mutante de perda de função *sp19/sp15*, tal como aumento do número de folhas da roseta, em combinação com um pequeno atraso no florescimento, resultando em maior densidade das plantas adultas, embora estes fenótipos sejam menos pronunciados que nas plantas 156OE (Fig. 2.10), tal como publicado anteriormente (Schwarz *et al.*, 2008).

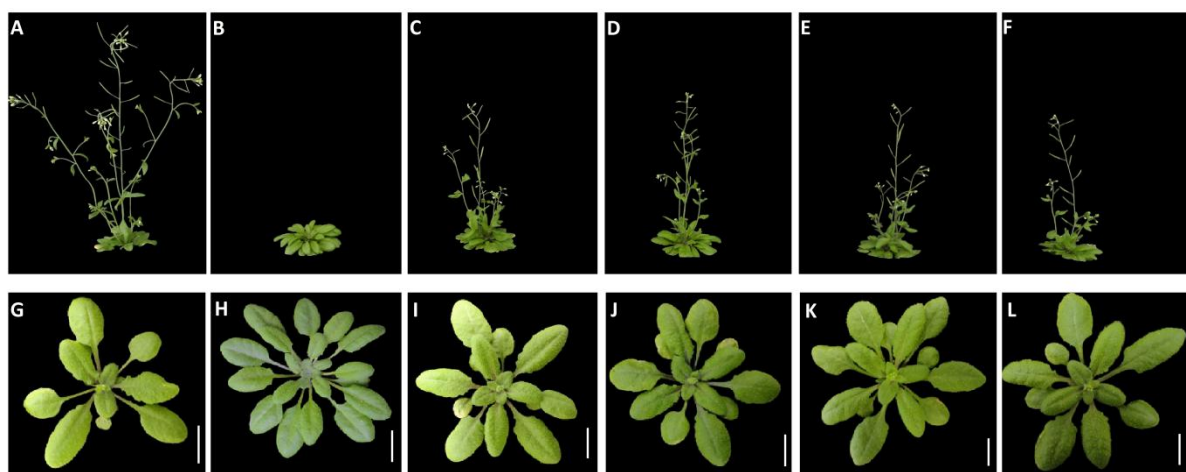


Figura 2.10. Análise fenotípica dos eventos transgênicos 529OE#1 (D, J), 529OE#2 (E, K) 529OE#3 (F, I) comparadas com WT Col-0 (A, G), 156OE (B, H), e duplo mutante de perda de função *sp19/15* (C, I). Fenótipo de plantas adultas (6 semanas de idade) (A-F) e rosetas de 25 DAG (G-L). Plantas 529OE apresentaram fenótipo similar ao duplo mutante de perda de função *sp19/sp15*. A barra indica 1cm.

Para confirmar a similaridade fenotípica das plantas transgênicas 529OE quando comparado às plantas duplo mutante de perda de função, foi comparado o número de folhas na roseta (Tabela 2.3). Os eventos transgênicos 529OE produziram maior número de folhas na roseta, obtendo

resultado similar às plantas duplo mutante de perda de função *sp19/sp15*, quando comparadas com as plantas selvagens WT.

Com o objetivo de determinar o momento da mudança de fase vegetativa para a reprodutiva, foi utilizada a característica ausência/presença de tricomas abaxiais nas folhas da roseta como marcador morfológico para folhas formadas durante a fase juvenil/adulta, respectivamente (Telfer *et al.*, 1997). Em média, o primeiro tricoma abaxial a desenvolver-se nas plantas WT foi com 6,8 folhas. A linhagem transgênica 156OE exibiu os primeiros tricomas abaxiais com 19,4 folhas, enquanto que o duplo mutante de perda de função *sp19/sp15* exibiu os primeiros tricomas abaxiais com 10,3 folhas, apresentando-se de forma similar aos eventos transgênicos 529OE #1 (10,3 folhas), 529OE#2 (10 folhas) e 529OE#3 (9,8 folhas) (Tabela 2.3).

Foi determinado também, para as mesmas plantas, o tempo de início da emergência do caule floral, assim como da antese (Tabela 2.3), além da taxa de florescimento e da iniciação foliar. Como esperado, o início da emergência do caule floral e a antese na linhagem transgênica 156OE apresentou um aberrante atraso (28 dias) (Schwab *et al.*, 2005; Schwarz *et al.*, 2008), enquanto que as plantas duplo mutante de perda de função *sp19/sp15* (3,5 dias) e os eventos transgênicos 529OE (3,5 dias) mostraram um pequeno atraso quando comparadas a WT Col-0 (Tabela 2.3). Em relação à taxa de florescimento - número total de folhas da roseta ou dias após a germinação pelo número de plantas nas quais apareceu a primeira inflorescência-, o duplo mutante de perda de função *sp19/sp15* e os eventos transgênicos 529OE #1, #2 e #3 não apresentaram diferenças quando comparadas as plantas WT Col-0 (Fig.2.11).

Tabela 2.3. Avaliação fenotípica dos eventos transgênicos 529OE (#1, #2 e #3), WT Col-0, linhagem transgênica 156OE e duplo mutante de perda de função *sp19/sp15*.

		Início da		
	Folhas juvenis ¹	Folhas da roseta	emergência do caule floral (DAG)	Antese ² (DAG)
WT Col-0	6,8 ± 0,5 c	14,3± 0,9 c	16,5± 1,2 d	23,6± 1,6 c
156OE	19,4± 1,8 a	52,9± 2,6 a	45,0± 1,8 a	54± 3,3 a
<i>sp19/sp15</i>	10,3± 0,7 b	29,4± 2,2 b	20,0± 0,7bc	25,8± 1,9 b
529OE #1	10,3± 0,5 b	26,8± 2,0 b	19,4± 0,7 c	24,8± 1,5bc
529OE#2	10,0± 1,1 b	27,5± 1,6 b	18,9± 0,9 c	23,4± 1,3 c
529OE#3	9,8± 0,7 b	26,5± 1,9 b	20,9± 1,2 b	26,8± 2,2b

DAG, dias após germinação; DP, Desvio padrão;

¹Número de folhas na roseta antes da primeira folha com tricomas abaxiais;

²Dias após a germinação em que abriu a primeira flor.

($P < 0,01$, Student's *t*-test. As medidas seguidas da mesma letra não diferem significativamente).

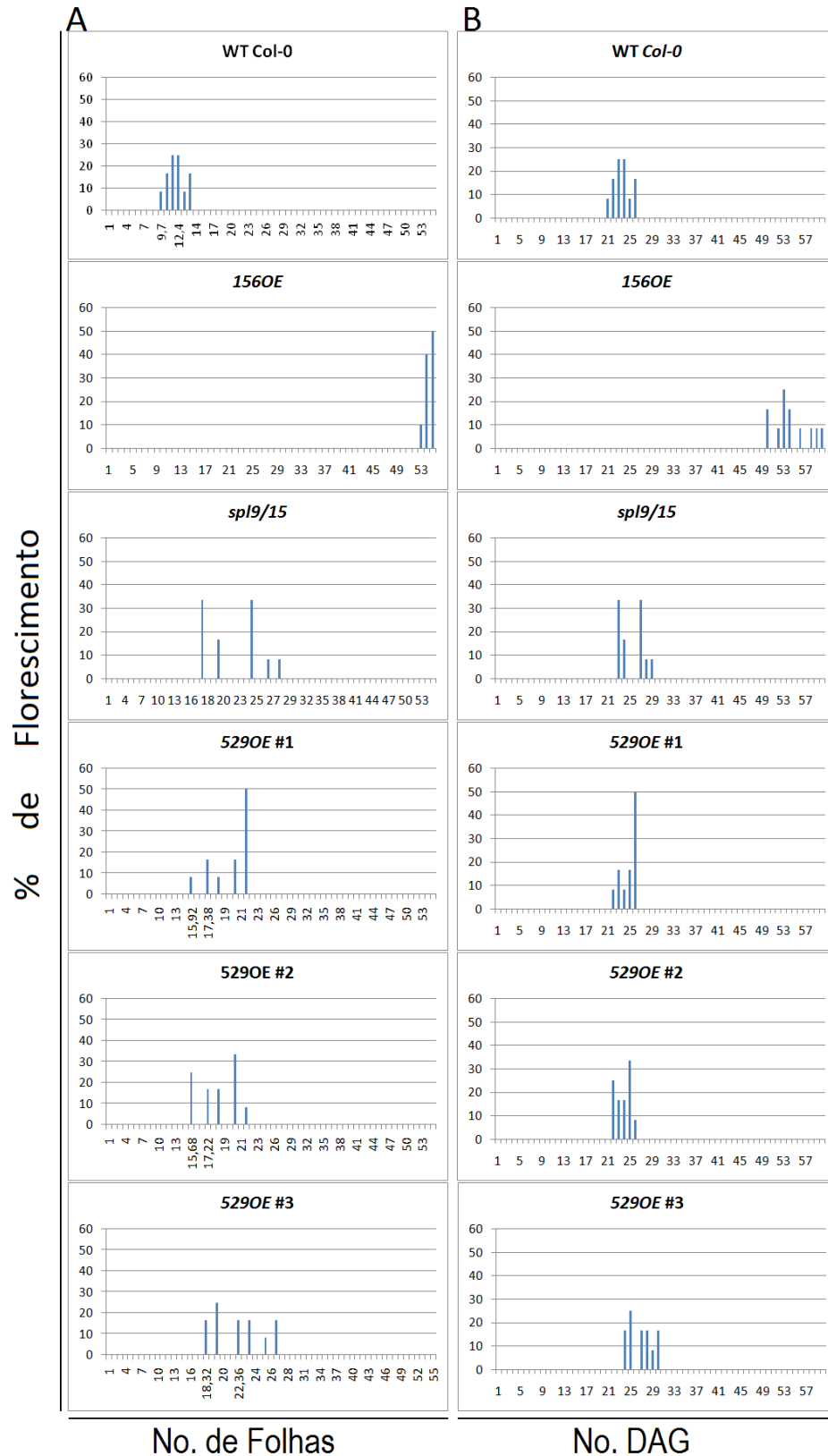


Figura 2.11. (A) e (B) tempo de florescimento de WT Col-0, 156OE, duplo mutante de perda de função *spl9/15* e 529OE (eventos de transformação #1, #2 e #3). O eixo X

indica o número de folhas **(A)** ou número de dias após a germinação **(B)**, o eixo Y indica a porcentagem de plantas que floresceram. Dias após a germinação (DAG).

A taxa de iniciação foliar por dia foi de 1,8 versus 0,5 para 156OE e WT *Col-0* respectivamente, enquanto que foi de 1, 0,9, 0,9 e 0,9 para as plantas duplo mutante de perda de função e os eventos transgênicos 529OE #1, #2 e #3, respectivamente (Fig. 2.12B). Para descobrir a possível causa ou consequência do incremento da taxa de iniciação foliar nos eventos transgênicos 529OE, foram examinados microscopicamente cortes histológicos transversais do ápice vegetativo, para determinar a filotaxia do ápice vegetativo (dimensão e padrão de emergência de folhas a partir do ápice caulinar) de plantas duplo mutante de perda de função *spl9/spl15* e dos eventos transgênicos 529OE, quando comparados aos ápices de plantas WT *Col-0*, sendo que o padrão de emergência de folhas a partir do ápice caulinar em *arabidopsis* é espiralada. Após os cortes dos tecidos, não se observou diferenças na forma e tamanho do meristema apical dos genótipos avaliados, corroborando com os dados já publicados onde se comparou cortes histológicos do ápice vegetativo de plantas duplo mutante de perda de função *spl9/spl15* e plantas WT (Schwarz *et al.*, 2008) (Fig. 2.1C e D). A partir destas observações, demonstrou-se que a diminuição observada do *plastocron* não é nem efeito e nem causa de uma alteração na filotaxia do duplo mutante de perda de função *spl9/spl15* (Schwarz *et al.*, 2008) e dos eventos transgênicos 529OE #1, #2, #3. Sabe-se que a forma e outras características das folhas recém-formadas alteram-se progressivamente em correlação com a transição da fase vegetativa (Telfer *et al.*, 1997). Porém, provavelmente devido a um *plastocron* alterado, a correlação entre o número de folhas e a floração parece diferir entre o tipo selvagem e os demais genótipos, como já demonstrado para duplo mutante de perda de função *spl9/spl15* (Schwarz *et al.*, 2008). Portanto, é provável que as diferenças observadas estejam relacionadas com a alteração relativa da transição de fase vegetativa (Schwarz *et al.*, 2008), a qual é fortemente diferenciada nos genótipos avaliados em comparação ao selvagem, identificados pela presença/ausência de tricomas abaxiais (Tabela 2.3).

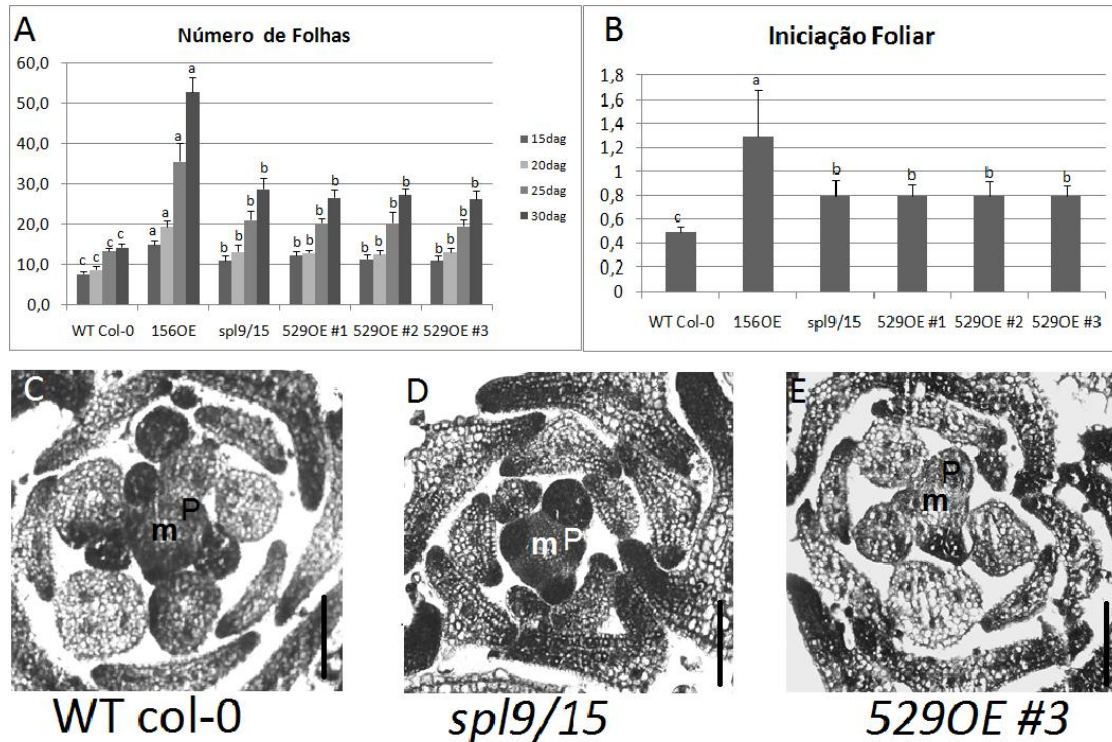


Figura 2.12. (A) Número de folhas em diferentes dias (15, 20 e 25 DAG). Foram utilizadas 12 plantas para cada genótipo (Col-0, 156OE, *spl9/15*, 529OE#1, 529OE#2 e 529OE#3). (B) Taxa de iniciação foliar. (C-E) Cortes histológicos do ápice vegetativo WT Col-0 (C), *spl9/15* (D) e 529OE#2 (E). Em destaque meristema (m) e primórdio foliar (P). Escala de 100µm.

A similaridade de diversos fenótipos do duplo mutante de perda de função *spl9/spl15* e os eventos transgênicos expressando o transgene *p35S::OsMIR 529b* sugerem claramente uma redundância, possivelmente por haver uma regulação negativa dos genes *SPL9* e *SPL15* nas plantas transgênicas. Embora outros fenótipos mais sutis possam existir nas plantas transgênicas 529OE, todos os fenótipos relacionados à via genética dos genes *AtSPL9* e *AtSPL15* estão presentes nos eventos transgênicos. Portanto, os sítios conservados do miR529b nos transcritos desses genes parecem ser funcionais.

Como demonstrado nas plantas de *arabidopsis* transgênicas *p35S::OsMIR529b*, o número de folhas aumenta significativamente em relação as plantas selvagens, além das plantas transgênicas reterem por um maior

tempo suas características juvenis (Figs 2.10, 2.11 e 2.12 e Tabela 2.3). O aumento do número total de folhas pode contribuir significativamente com o aumento de biomassa desses genótipos. Para testar se estas modificações fenotípicas ocorrem também em monocotiledôneas, estão sendo geradas plantas transgênicas de *Brachypodium distachyon* superexpressando o *OsMIR529b* sob o controle do promotor 35S com o vetor *pGO529m*, em colaboração com o grupo do prof. Wagner Otoni (UFV). No momento, várias plântulas potencialmente transgênicas estão regenerando e enraizando em meio de cultura seletivo (Fig. 2.13). Posteriormente as plantas transgênicas de *B. distachyon* serão avaliadas fenotípica e molecularmente.

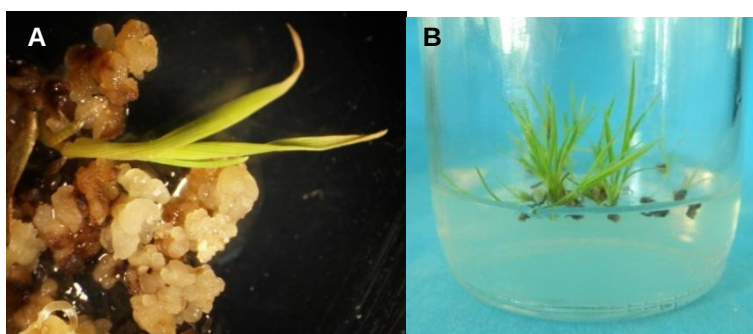


Figura 2.13. **A)** Folhas e meristemas regenerando a partir de calos transgênicos de *B. distachyon* Bd21 em meio de cultura suplementado com antibiótico *higromicina*. **B)** Plantas possivelmente transgênicas *OsMIR529b* de *B. distachyon* Bd21 em meio de cultura de enraizamento suplementado com antibiótico *higromicina*.

2.3.5 Análises de expressão gênica por RT-PCR

Para determinar molecularmente se a expressão dos genes *AtSPL9* e *AtSPL15* é reprimida nas plantas transgênicas de *arabidopsis* expressando o transgene *p35S::OsMIR529b*, foram realizadas análises de expressão gênica via RT-PCR. Também foi avaliada a presença de transcritos do precursor *OsMIR529b*, dos miRNAs maduros *OsmiR529b* e *miR156* (Fig 2.14). Corroborando com os dados de análises filogenéticas (Fig 2.5A) e com os dados fenotípicos descritos anteriormente, as plantas transgênicas 529OE mostraram severa redução dos níveis de transcritos dos genes *AtSPL9* e *AtSPL15*, sugerindo que os genes-alvos do *miR529b* em *arabidopsis* conservam o sítio de reconhecimento e que o *miR529b* é capaz de fazer seu papel de regulação desses genes (Fig 2.14). Para confirmar se a regulação destas *SPLs* (*SPL9* e *SPL15*) está sendo pelo *miR529* e não pelo *miR156*, foi

avaliada a expressão do miR156 (Fig. 2.14). O resultado confirma que nas plantas 529OE não há variação da expressão do miR156, sugerindo que a regulação negativa dos genes *SPL9* e *SPL15* é predominantemente realizada pelo miR529b nesses genótipos. Também foram analisados, como controles, outros genes de *SPLs* (*SPL10* e *SPL13*) os quais são alvos do miR156, mas não do miR529b. Como mostrado na Figura 2.14, as duas *SPLs* (*SPL10* e *SPL13*) foram reguladas somente nas plantas superexpressando o miR156, sugerindo que o sítio de reconhecimento do miR529b é funcional somente nos genes *SPL9* e *SPL15*.

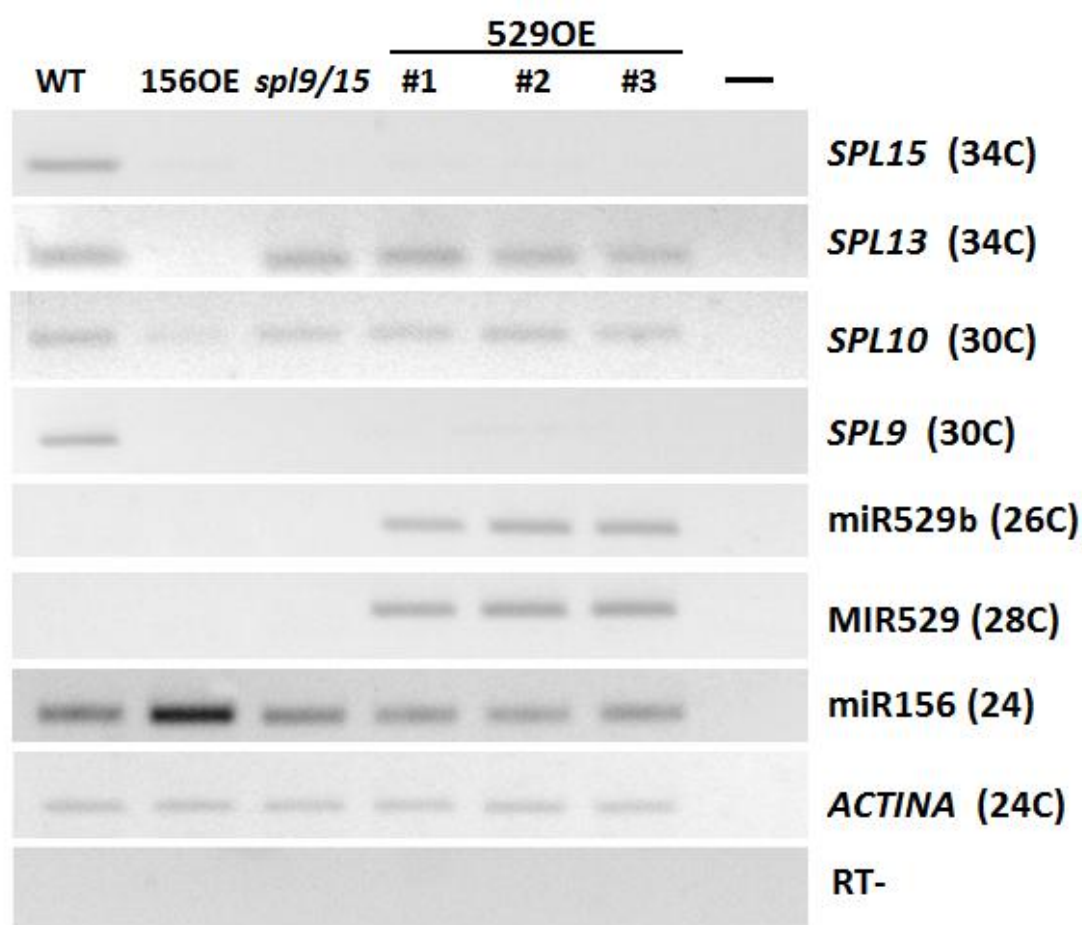


Figura 2.14. Análise de expressão via *pulsed stem-loop* RT-PCR de genes *SPL15*, *SPL9*, *SPL10* e *SPL13*, *OsMIR529b* (precursor) e os miRNAs maduros miR529b e miR156 em plantas *OsMIR529b*-OE (#1, #2, #3), *AtMIR156a*-OE, duplo mutante de perda de função *spl9/15* e WT- Col-0. (C) número de ciclos realizados em cada RT-PCR.

Para confirmar a regulação pós-transcricional do gene *AtSPL15* em folhas de plantas transformadas com o vetor pGO529, foi utilizada a técnica 5'-RACE (ver material e métodos). A análise dos transcritos mostrou que a clivagem ocorre entre a base 10 e 11 do miR529b (Fig.2.15), de maneira semelhante ao que está descrito para monocotiledôneas (Chuck *et al.*, 2010). Esses resultados mostram de maneira robusta que o miR529b nas plantas contendo o vetor pGO529 regula o gene *AtSPL15*.



Figura 2.15. Clivagem do transcrito *SPL15* em *Arabidopsis thaliana* guiado pelo miR529b nas plantas transgênicas 529OE. O número de transcritos clivados em cada posição sobre o total de clones analisados é indicado pela seta. Todos os transcritos analisados foram clivados no sítio de clivagem predito para o miR529b. Também é representado o sítio de clivagem guiado pelo miR156.

Visando responder questões importantes para a biologia dos microRNAs, tal como: por que monocotiledôneas possuem dois miRNAs (miR529 e miR156) para regular a expressão dos mesmos genes-alvo? Será determinado o padrão de expressão do miR529b, miR156 e um dos seus alvos em comum (*OsSPL14*) no ápice vegetativo de arroz via hibridação *in situ*. Para determinar o padrão de expressão espaço-temporal dos miR529b miR156 e o gene alvo em comum, inicialmente foi realizado um perfil de expressão em diferentes órgãos/tecidos de arroz (ápice vegetativo, folha juvenil (3ª e 4ª folhas) e inflorescência) utilizando *pulsed stem-loop* RT-PCR para os miR529b e miR156. Tanto o miR529b quanto o miR156 foram expressos em todos os órgãos/tecidos avaliados, embora estejam principalmente expressos no ápice vegetativo e folhas (Xie *et al.*, 2012) respectivamente (Fig. 2.16), o que

confirma os resultados obtidos anteriormente em ápice vegetativo e inflorescência de arroz (Jeong *et al.*, 2011). O gene alvo em comum (*OsSPL14*) foi expresso somente no ápice vegetativo. Como os iniciadores utilizados para detectar os transcritos do gene *OsSPL14* flaqueiam os sítios de reconhecimento do miR156 e miR529b (Tabela 2.1), sugere-se que o gene *OsSPL14* é pós-transcricionalmente silenciado pelos miRNAs nas folhas e inflorescências de arroz. Baseado nestes resultados será realizado experimento de hibridização *in situ* no ápice vegetativo, sendo que tanto os miRNAs quanto o gene alvo a ser avaliado estão expressos neste tecido. No momento, estamos iniciando a obtenção dos dados de hibridização *in situ* para esses miRNAs e o gene alvo. Esse experimento pode demonstrar se o padrão de expressão dos dois miRNAs é diferente no ápice vegetativo de arroz quando comparado entre eles e ao padrão de expressão de seu gene-alvo.

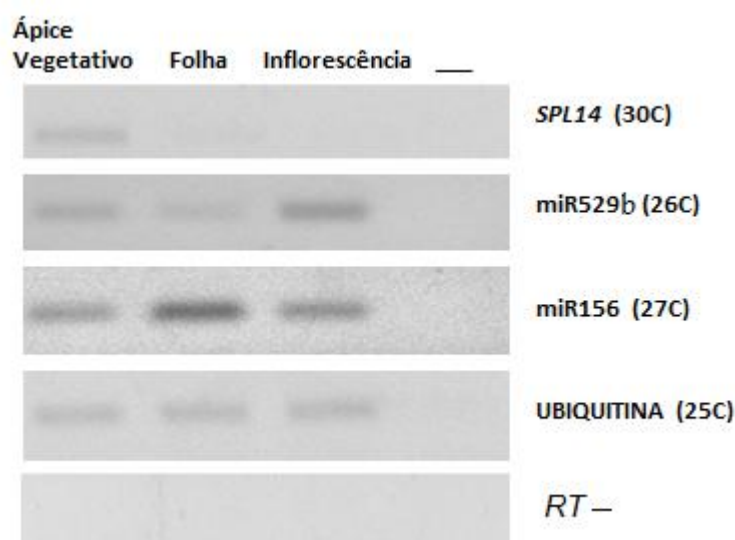


Figura 2.16. Análise de expressão gênica via *pulsed stem-loop* RT-PCR dos miRNAs miR156 e miR529b em diferentes tecidos/órgãos de arroz. (C) número de ciclos realizados em cada RT-PCR.

2.3.6 Análise *in silico* de incorporação dos miR156 e miR529b nas Argonautas em arroz

Baseado no fato de que as enzimas AGO incorporam pequenos RNAs dependendo do primeiro ribonucleotídeo da extremidade 5' (Mi *et al.*, 2008), e que o miR529b inicia-se com o ribonucleotídeo A (AGAAGAGAGAGAGUACAGCUU) e o miR156 inicia com o ribonucleotídeo U (UGACAGAAGAGAGUGAGCAC), é possível que esses microRNAs sejam

incorporados em diferentes enzimas AGOs em monocotiledôneas. Para testar tal hipótese, foi realizada análise *in silico* da incorporação dos miR156 e miR529b nas argonautas de arroz (Fig. 2.17).

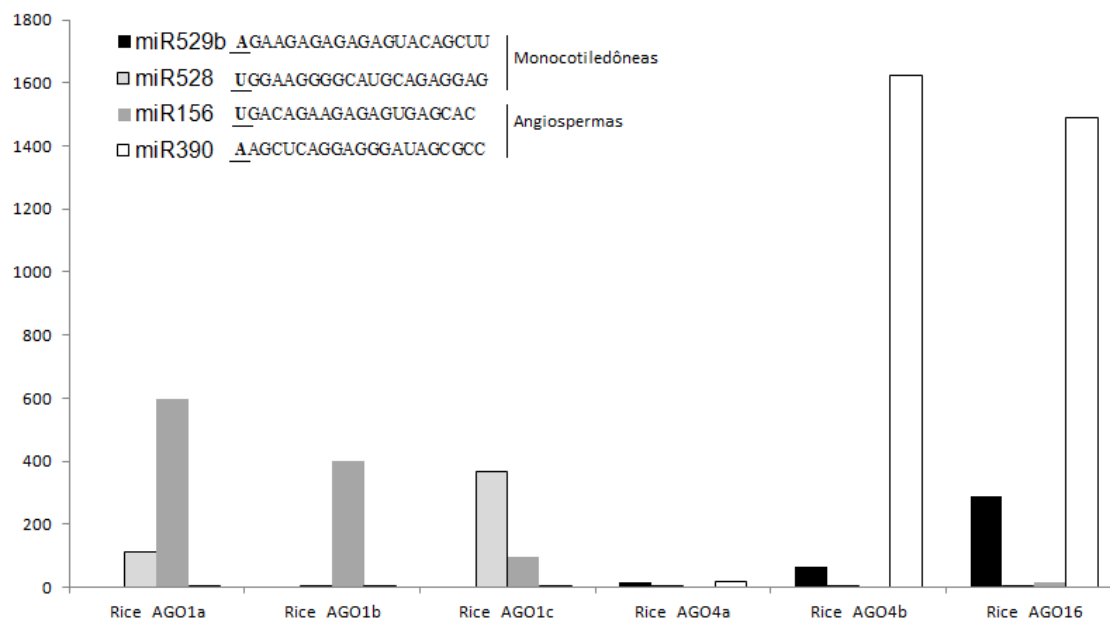


Figura 2.17. Valores normalizados (*transcripts per million* ou TPM) da abundância de microRNAs (eixo Y) enriquecidos das respectivas AGOs de arroz (eixo X).

Foi avaliado, como controles, outros miRNAs enriquecidos nas respectivas Argonautas. O miR528 é específico de monocotiledôneas e inicia-se com o ribonucleotídeo U (UGGAAGGGGCAUGCAGAGGAG), enquanto o miR390 é conservado em todas as Angiospermas avaliadas até o momento e inicia-se com o ribonucleotídeo A (AAGCUCAGGAGGGGAUAGCGCC). Interessantemente, miR529b e miR390 acumulam-se especificamente nas Argonautas AGO4b e AGO16, mas não nas AGO1a, b ou c de arroz. Tanto em arroz, como em arábida, já foi relatado a distribuição não aleatória de pequenos RNAs em diferentes Argonautas. Por exemplo, foi demonstrado que o miR390 é incorporado especificamente na AGO7 de arábida (Montgomery *et al.*, 2008).

Os resultados filogenéticos, fenotípicos, de expressão gênica e dados moleculares demonstram que o miR529b pode ser processado e funcional em eudicotiledôneas "core" e que este miRNA foi provavelmente perdido na história evolutiva recente de eudicotiledôneas "core", além do fato de que seus

genes alvos ainda possuem o sítio de reconhecimento nesse grupo de eudicotiledôneas. Estes genes alvo possivelmente foram submetidos às fortes pressões de seleção e que têm evoluído lentamente desde a sua origem, corroborando com análises feitas de genes alvo do miR529b em briófitas e monocotiledôneas, sugerindo que estes genes sofreram pressão de seleção diferente dos alvos do miR156 (Ling e Zang, 2012b).

Devido ao fato de o miR156 ser conservado em todas as plantas avaliadas até o momento (Guo *et al.*, 2008) e que o mesmo possua alvos em comum com o miR529b em monocotiledôneas, musgo, e dicotiledôneas basais foi gerado a hipótese de que o possivelmente o miR156 foi derivado do miR529b e que este último foi perdido em eudicotiledôneas "core" sem efeitos prejudiciais ou deletérios para o desenvolvimento dos organismos que o possuíam (Puzey e Kramer, 2009). Possivelmente a evolução do miR529 ocorreu via micromutações ou perda de porções genômicas contendo precursores do miR529a e b. Com o intuito de gerar dados mais robustos e consistentes capazes de descrever o processo evolutivo do miR529b, serão realizadas análises filogenéticas de regiões genômicas destes miRNAs em várias espécies vegetais.

Referências

CHUCK, G.; CIGAN, A.; SAETEURN, K.; HAKE, S. (2007). The heterochronic maize mutant Corngrass1 results from overexpression of a tandem microRNA. *Nature Genetics*, New York, 39:544- 549.

CLOUGH, S. J., AND BENT, A. F. (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 16:735-743.

CUPERUS JT, FAHLGREN N, CARRINGTON JC. (2011). Evolution and functional diversification of MIRNA genes. *Plant Cell*. 23(2):431–442

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin*, London, 19:11-15.

FENG, J.; WANG, K.; LIU, X.; CHEN, S.; CHEN, J. (2009). The quantification of tomato microRNAs response to viral infection by stem-loop real-time RT-PCR. *Gene*, Amsterdam, 437:14-21.

GUO AY, ZHU QH, GU X, GE S, YANG J, LUO J. (2008). Genome-wide identification and evolutionary analysis of the plant specific SBP-box transcription factor family. *Gene*. 418(1–2):1–8.

GRIFFITHS-JONES, S.; SAINI, H.K.; VAN DONGEN, S.; ENRIGHT, A.J. (2008). miRBase: Tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*. 154-158.

HA, M.; PANG, M. X.; AGARWAL, V.; CHEN, Z. J. (2008). Interspecies regulation of microRNAs and their targets. *Biochimica et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms*, Austin, 1779:735-742.

JEONG, D.H.; PARK, S.; ZHAI, J.; GURAZADA, S.G.R.; DE PAOLI, E.; MEYERS, B.C. AND GREEN, P.J. (2011). Massive Analysis of Rice Small RNAs: Mechanistic Implications of Regulated MicroRNAs and Variants for Differential Target RNA Cleavage. *The Plant Cell*, 23:4185–4207.

KARNOVSKY, M.J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, New York, 27:A137.

LING, L. AND ZHANG, S. (2012b) Exploring the evolutionary differences of SBP-box genes targeted by miR156 and miR529 in plants. *Genetica* 140:317–324.

LLAVE, C.; KASSCHAU, K.; RECTOR, M.; CARRINGTON, J. (2002) Cleavage of Scarecrow-like mRNA target detected by a class of Arabidopsis miRNA. *Science*, 297:2053-

MI, S.; CAI, T.; HU, Y.; CHEN, Y.; HODGES, E.; NI, F.; WU, L.; LI, S.; ZHOU, H.; LONG, C.; CHEN, S.; HANNON, G.J.; QI, Y. (2008). Sorting of Small

RNAs into *Arabidopsis* Argonaute Complexes Is Directed by the 5' Terminal Nucleotide. *Cell*. 133(1): 116–127.

MONTGOMERY TA, HOWELL MD, CUPERUS JT, LI D, HANSEN JE, ALEXANDER AL, CHAPMAN EJ, FAHLGREN N, ALLEN E, CARRINGTON JC (2008) Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell* 133:128-141.

ORTIZ-MOREA, F.A. (2011). Análise da via de regulação gênica do miRNA156/SPL na brotação lateral e caracterização molecular do processo de emergência da gema axilar de cana de açúcar. Tese mestrado (fisiologia e bioquímica de plantas)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 171p.

PUZEY J.R. e KRAMER E.M. (2009). Identification of Conserved *Aquilegia Coerulea* MicroRNAs and Their Targets. *Gene* 448:46-56.

SAKAI, W.S. (1973). Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue o. *Stain Technology*, Baltimore, 48:247-249.

SCHWAB, R.; PALATNIK, J.F.; RIESTER, M.; SCHOMMER, C.; SCHMID, M.E.; WEIGEL, D. (2005). Specific Effects of MicroRNAs on the Plant Transcriptome. *Developmental Cell*, 8:517–527.

SCHWARZ S., GRANDE A. V., BUJDOSO N., SAEDLER H., HUIJSER P. (2008). The microRNA regulated SBP-box genes SPL9 and SPL15 Control shoot maturation in *Arabidopsis*. *Plant molecular biology*. 183-195.

SILVA, G.F. (2012). Regulação do desenvolvimento e determinação do fruto de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) pela via microRNA156/ SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like (SPL). Tese mestrado (fisiologia e bioquímica de plantas)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 90p.

SOURET, F.; KASTENMAYER, J.; GREEN, P. (2004). AtXRN4 degrades mRNA in *Arabidopsis* its substrates include selected miRNA targets. *Molecular cell*. 15:173-183

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28(10):2731–2739.

TELFER, A.; BOLLMAN, K.M.; POETHIG, R.S. (1997). Phase change and the regulation of trichome distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Development*. 124:645–654.

VARKONYI-GASIC, E.; WU, R.; WOOD, M.; WALTON, E.F.; HELLENS, R.P. (2007). Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*, New York, 3:1-12.

WEIGEL, D. AND GLAZEBROOK, J. (2002). *Arabidopsis a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press.

WU, G. ; PARK, M.Y.; CONWAY, S.R.; WANG, J.; WEIGEL, D.; POETHIG, R.S. (2009). The Sequential Action of miR156 and miR172

Regulates Developmental Timing in Arabidopsis. *Cell*, Cambridge, 138:750-759.

WU L, ZHANG Q, ZHOU H, NI F, WU X, QI Y (2009) Rice MicroRNA effector complexes and targets. *Plant Cell*21:3421-3435.

3 Estudo preliminar do papel funcional da via microRNA156/SPL na formação e desenvolvimento de raízes laterais em *Arabidopsis thaliana*

Resumo

O sistema radicular desempenha papel importante na ancoragem e seguridade dos vegetais no solo. A arquitetura das raízes principal e laterais contribui para a captura de água, além de facilitar a extração de nutrientes necessários para o crescimento e desenvolvimento da planta. Diversos fatores que podem afetar o desenvolvimento do sistema radicular são conhecidos, tais como: resposta a fatores ambientais, produção, sinalização e transporte de fitohormônios (principalmente auxina e citocinina), e mudanças globais na expressão gênica. Muitas dessas mudanças na expressão gênica podem ser reguladas por microRNAs (miRNAs). Os miRNAs são pequenos RNAs endógenos não codantes de 20-22 nucleotídeos (nt) que regulam a expressão de genes-alvo pós-transcricional e transcricionalmente. Neste trabalho preliminar, foi avaliado o possível papel da via miR156/SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE PROTEINS (SPLs) no crescimento e desenvolvimento do sistema radicular de *Arabidopsis thaliana*. Plantas de *Arabidopsis* selvagem ecótipo Columbia (WT Col-0), duplo mutante Col-0 com perda de função dos genes *SPL9* e *SPL15* (*sp/9/15*) e plantas transgênicas Col-0 156OE e *MIM156* foram crescidas em meio MS e meio MS suplementado com 1µM de IAA (ácido indol acético) ou 10µM do inibidor do efluxo de auxina NPA (N-1-Naphthylphthalamic Acid), sob fotoperíodo de 16h/luz e 8h/escuro). Doze dias após a germinação, foram observadas diferenças significativas no comprimento da raiz principal das plantas 156OE quando comparadas com os outros genótipos avaliados. Além disso, foi observado aumento significativo do número de raízes laterais em plantas transgênicas superexpressando o miR156 (156OE) e no duplo mutante *sp/9/15*, quando comparadas as plantas WT e o *MIM156*. Intrigantemente, o aumento no número de raízes laterais nas plantas 156OE e *sp/9/15* foi similar em meio MS com ou sem a presença de

IAA, sugerindo que essas plantas tem resposta diferenciada à aplicação de auxina. Dados preliminares de análise de distribuição de auxina e citocinina, bem como da localização da proteína PIN1 nos sistemas radiculares desses genótipos, sugerem um papel da via miRNA156/SPL no crescimento e desenvolvimento de raízes laterais em arabidopsis e uma possível relação desta via com sinalização e distribuição dos fitohormônios auxina e citocinina.

Palavras chaves: Arquitetura radicular, desenvolvimento, miR156, auxina e citocinina

Abstract

The root system plays a key role in plant anchorage and security into the soil. In addition, both primary and lateral roots contribute to water uptake, and facilitate the extraction of nutrients required for the plant growth and development. Multiple factors are known to affect plant primary and lateral root growth and formation, such as, the response to environmental factors, perception, signaling, production and transport of phytohormones (mainly auxin and cytokinin) and global changes in gene expression. In addition, some microRNAs also are involved in this latter process. MicroRNAs (miRNAs) regulate the gene expression transcriptionally and post-transcriptionally. In this preliminary work, we evaluated the possible role(s) of the miR156/*SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE PROTEINS* (SPLs) pathway in the root system formation and development in *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis* seeds of WT, *miR156* overexpressors (156OE), *SPL9* and *SPL15* double mutant (*sp9/15*) and MIMCRY for 156 (*MIM156*) were plated onto MS medium with or without auxin (indole-3-acetic acid -IAA- 1 μ M) or auxin transport inhibitor (N-1-Naphthylphthalamic Acid -NPA- 10 μ M) under photoperiod of long days (16-h-light/8-h-dark). Twelve days after germination, we found significant differences in length of the primary root between 156OE and the other evaluated genotypes. Importantly, we found several differences in the number of lateral roots among the genotypes. For example, *sp9/15* double mutant and 156OE plants displayed a higher number of lateral roots when compared with WT and *MIM156*. Intriguingly, the number of lateral root is similar in *sp9/15* double mutant and 156OE plants in the presence or absence of exogenous auxin, suggesting that these plants have different responses to the application of auxin. Preliminary analyses of the distribution of auxin and cytokinin as well as the cellular location of PIN1 protein in root systems of these genotypes suggest a role of miRNA156/SPL pathway in the growth and development of lateral

roots in *Arabidopsis* and a possible relationship of this pathway with signalin and homeostasis of the plant hormones auxin and cytokinin.

Key words: Root system architecture, development, miR156, auxin and cytokinin.

3.1 INTRODUÇÃO

MiRNAs são uma classe de pequenos RNAs não codantes de 20 a 22 nucleotídeos codificados por genes *MIR*, os quais se encontram amplamente distribuídos no genoma de animais e plantas e regulam a expressão de seus genes alvos, atuando principalmente ao nível pós-transcricional, por meio de interações RNA–RNA (Ha *et al.*, 2008). miRNAs são fatores importantes que integram vias de percepção de fitohormônios, percepção de condições ambientais e expressão gênica. Além de estarem envolvidos em vários processos do desenvolvimento da parte aérea das plantas (Chuck *et al.*, 2009), também estão envolvidos no crescimento e desenvolvimento do sistema radicular (Meng *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2011).

Em plantas, o sistema radicular desempenha um papel essencial na ancoragem ao solo, assim como na absorção de água e nutrientes. Tais fatores dependem diretamente da arquitetura do sistema radicular, que está relacionado tanto à raiz principal, quanto a raízes laterais e adventícias. A formação da arquitetura do sistema radicular é controlada por várias vias de sinalização, as quais são notavelmente ligadas à ação de vários fitohormônios (Osmontet *et al.*, 2007).

Os fitohormônios possuem papel importante no controle da divisão celular e alongamento no meristema apical da raiz. Dentre estes, podemos destacar: auxina, citocinina, etileno, ácido giberélico (GA), (Benkova e Hejatko, 2009), ácido abscísico (ABA) e brassinosteróides (Petricka *et al.*, 2012). A auxina, por exemplo, estimula a iniciação das raízes laterais e inibe a elongação da raiz primária. Porém, tanto a auxina quanto o ABA e brassinosteróides, atuam promovendo ou inibindo o crescimento da raiz dependendo da sua concentração (Barrero *et al.*, 2005; Clouse *et al.*, 1996; Dello Ioio *et al.*, 2008; Ephritikhine *et al.*, 1999; Finkelstein *et al.*, 2002; Mussig, *et al.*, 2003; Vartanian *et al.*, 1994; Zeevaart e Creelman, 1988). Por sua vez, a citocinina inibe a divisão celular (Dello Ioio *et al.*, 2007; Miyawaki *et al.*, 2004),

mas pode promover a diferenciação e identidade celular no meristema radicular (Dello Ioio *et al.*, 2007).

Embora existam relatos demonstrando que alguns microRNAs (por exemplo: miR160, miR390, miR164, miR166) podem atuar como reguladores do desenvolvimento e arquitetura da raiz e interagir com vários fitohormônios descritos acima, ainda não está claro se outros microRNAs poderiam também estar envolvidos nestes processos. A via miR156/SPLs por exemplo, atua nos processos de determinação da arquitetura vegetativa da parte aérea de várias espécies vegetais (Schwab *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2006; Chuck *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008; Schwarz *et al.*, 2008; Silva, 2012) e plantas de arroz superexpressando o miR156 geram maior número de raízes, (Xie *et al.*, 2012), sugerindo que este miRNA poderia também regular o desenvolvimento e estabelecimento do sistema radicular. Portanto, cogitou-se a hipótese de que esta via poderia estar envolvida na regulação da formação do sistema radicular de *Arabidopsis thaliana*. Estudos que constatem o papel da via miR156/SPL na formação do sistema radicular, e demonstrem sua interação com alguns fitohormônios na raiz, forneceriam uma grande contribuição ao entendimento da formação da estrutura radicular das plantas.

Diante do exposto acima, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar preliminarmente o possível papel da via miR156/SPL na formação e estabelecimento do sistema radicular em *Arabidopsis thaliana*, e como objetivos específicos: (I) identificar o papel da via miR156/SPL na arquitetura e desenvolvimento do sistema radicular, (II) avaliar a possível interação da via miR156/SPL com os principais fitohormônios responsáveis pela formação do sistema radicular em *arabidopsis*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos e demais atividades referentes ao presente trabalho preliminar foram desenvolvidos no laboratório de Genética Molecular do Desenvolvimento Vegetal (GMDV), no Departamento de Genética do Instituto de Biociências de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" (UNESP).

3.2.1 Material vegetal e condições de crescimento

Para todos os experimentos, foram utilizados os seguintes genótipos de *Arabidopsis thaliana*: plantas selvagens WT ecótipo Columbia (Col-0), linhagem transgênica Col-0 156OE (descrita no capítulo 2), planta Col-0 duplo mutante de perda de função *spl9/spl15* (descrita no capítulo 2) e linhagem transgênica Col-0 MIMICRY para o miR156 (doravante denominada MIMI156). As sementes dessa última linhagem foram gentilmente cedidas pelo Dr. Detlef Weigel do Instituto Max Planck, Alemanha. Esta linhagem transgênica contém o transgene que mimetiza o mRNA-alvo do miR156, com *mismatches* adicionais. Nestas plantas, o nível de transcritos do miR156 é reduzido e este encontra-se indisponível para atuar na regulação dos mRNAs dos genes *SPLs*. Tal metodologia foi desenvolvida por Franco-Zorrilla e colaboradores (2007).

Para a realização dos cruzamentos, além dos genótipos descritos anteriormente, foram também utilizadas plantas transgênicas com marcadores para análise de distribuição e transporte de auxina e citocinina. Foram utilizadas plantas transgênicas contendo gene quimérico contendo o promotor de resposta a auxina (pDR5), fusionado ao gene repórter *GFP* (*green fluorescence protein*) (doravante denominada *pDR5::GFP*), plantas transgênicas com o gene quimérico contendo o promotor de resposta a citocinina (pARR5) fusionado com o gene repórter *GUS* (β -glucuronidase) (doravante denominada *AtARR5::GUS*) e plantas transgênicas contendo o gene quimérico *PIN1* e o mesmo fusionado tradicionalmente com o gene repórter *GFP* (doravante

denominadas *pPIN1::PIN1:GFP*). Sementes das plantas transgênicas *pDR5::GFP* e *pPIN1::PIN1:GFP* foram gentilmente cedidas pela Dra. Marja Timmermans (Cold Spring Harbor Labs, EUA) e pelo Dr. Peter Marhavy do Instituto Max Planck, respectivamente. O vetor de transformação contendo o gene quimérico *pARR5::GUS* foi gentilmente cedido pelo Prof. Lázaro Péres (ESALQ/USP). Plantas transgênicas de *arabidopsis pARR5::GUS* foram obtidas conforme metodologia descrita no capítulo 2.

Para a descontaminação das sementes, foi utilizado aproximadamente 1ml de uma solução contendo 50% de água sanitária, 50% de água destilada e 0,02% de Tween. Na solução foram adicionadas aproximadamente 50 sementes, em tubos de 1,5ml e permaneceram sob agitação constante por 10 minutos, posteriormente as sementes foram lavadas três vezes com água destilada e autoclavada e posteriormente foram ressuspensas em 1ml de agarose 0,1% estéril e colocadas em placas de Petri contendo meio MS (Murashige&Skoog) sólido com vitaminas.

Para a quebra da dormência e germinação das sementes, as placas foram deixadas a 4°C por 2 dias (Weigel and Glazebrook, 2002), posteriormente foram levadas à estufa incubadora onde permaneceram por 15 dias e então foram transferidas para o solo e cobertas com uma película de plástico por aproximadamente 5 dias, com a finalidade de aclimatar as plântulas, em casa de vegetação com temperatura variando de 19 a 24°C. Foi mantido um fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas de escuro.

3.2.2 Coleta das sementes

Após as siliquas (frutos secos) secarem, as sementes foram coletadas com o auxílio de uma peneira comum, armazenadas em tubos de 1,5ml e permaneceram de 12 a 16 horas a 37°C. Posteriormente foram estocadas a 4°C com sílica, a fim de evitar a proliferação de microorganismos.

3.2.3 Tratamento com auxina, inibidor de auxina e observação de fenótipos da raiz

Cinco dias após a germinação, plantas de *arabidopsis* WT Col-0, duplo mutante de perda de função *sp19/15*, e plantas transgênicas 156OE e MIM156 foram transferidas para placas de petri contendo meio MS com presença ou

ausência de 1 μ M de IAA (ácido indolacético) ou 10 μ M NPA (N-1-ácido naftiltalâmico), os quais são: auxina e um inibidor do transporte de efluxo de auxina, respectivamente. As placas foram colocadas na posição vertical, para observação dos fenótipos da raiz. Foi medido o comprimento da raiz principal utilizando-se o programa ImageJ (NIH; <http://rsb.info.nih.gov/ij>) e as raízes laterais foram contadas com o auxílio de microscópio binocular 12 dias após a germinação. Foram utilizadas 12 plantas para cada linhagem. Para as análises estatísticas, foi utilizado o teste de t-Student's (P <0,01).

3.2.4 Cruzamentos

Os genótipos mostrados na Tabela 3.1 foram cruzados por métodos convencionais. As plantas transgênicas 156OE e MIM156 foram emasculadas com o auxílio de um estereoscópio e pinças. É necessária a retirada das anteras das plantas que vão atuar como parental fêmea, para evitar a autopolinização. Após a emasculação, as plantas foram isoladas para não ocorrer o recebimento de pólen indesejado.

Tabela 3.1 Cruzamentos

Fêmeas	Doadoras de pólen
156OE	<i>pARR5::GUS</i>
156OE	<i>pDR5::GFP</i>
156OE	<i>pPIN1::PIN1:GFP</i>
MIM156	<i>pARR5::GUS</i>
MIM156	<i>pDR5::GFP</i>
MIM156	<i>pPIN1::PIN1:GFP</i>

Após dois dias da emasculação, no momento em que o estigma estava receptivo, as plantas foram polinizadas, transferindo o pólen das plantas doadoras para as receptoras (Tabela.3.1). A transferência do pólen foi realizada com o auxílio de pinças, utilizando as anteras maduras com o pólen (Fig. 3.1A) e posicionando-as sobre o estigma, até, este ficar cheio de pólen. Finalmente, cada planta foi marcada com uma fita para registrar o cruzamento.

Assim que as siliquas secaram, foram coletadas as sementes (como já descrito).

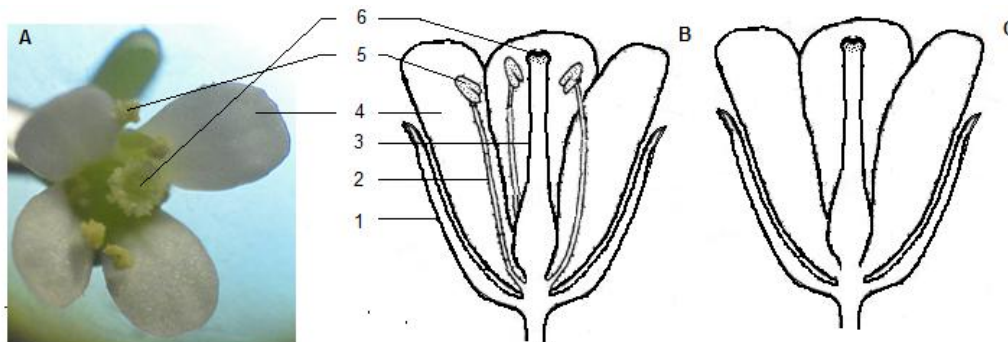


Figura 3.1. (A) Foto de uma flor de *arabidopsis*, (B) Esquema da flor de *arabidopsis*. Sépala (1), Filamento (2), Estilo (3), Pétala (4), Antera (5), Estigma (6), Pistilo (3 e 6). (C) Esquema da flor emasculada (sem anteras).

3.2.5 Análises dos cruzamentos

3.2.5.1 Determinação da localização e distribuição de auxina, citocinina e da proteína PIN1 no sistema radicular de *arabidopsis*

Plântulas de *arabidopsis* da geração F1 dos cruzamentos descritos anteriormente foram utilizadas para avaliar a localização e distribuição dos fitohormônios auxina e citocinina, bem como a localização da proteína PIN1. Plântulas transgênicas com GFP foram avaliadas sob microscopia confocal (Olympus FV1000, localizado no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas ESALQ/USP). Plântulas transgênicas com *GUS* foram avaliadas em teste histoquímico tal como descrito no manual de laboratório de *Arabidopsis thaliana* (Weigel and Glazebrook, 2002) e fotografadas em microscópio de luz branca. Como controles, foram utilizadas plantas selvagens e os parentais dos cruzamentos crescidas nas mesmas condições.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Análises fenotípicas do sistema radicular

Para as análises de fenótipos do sistema radicular, foram utilizadas plantas de *arabidopsis* WT Col-0, duplo mutante de perda de função *spl9/15*, e plantas transgênicas *156OE* e *MIM156*. Inicialmente foram avaliados o comprimento e o número de raízes laterais em meio MS (Fig. 3.2a). No comprimento da raiz, foi encontrada uma diminuição nas plantas transgênicas *156OE*, sendo esta diferença significativa quando comparada com os outros genótipos. Além disso, observou-se aumento significativo no número de raízes laterais nas plantas *156OE* e no duplo mutante de perda de função *spl9/spl15*, quando comparados às plantas WT e *MIM156*. Interessantemente, observou-se uma pequena redução do número de raízes laterais nas plantas transgênicas *MIM156* (Tabela 3.3), embora esta diferença não tenha sido significativa. Estes dados sugerem que a via miR156/SPL possivelmente está envolvida no estabelecimento da arquitetura radicular. Considerando que plantas submetidas a altas concentrações de auxina inibem o comprimento da raiz principal (Thimann 1936; Dello Iorio *et al.*, 2008) e concomitantemente promovem a iniciação de raízes laterais (Blakely *et al.*, 1982; Casimiro *et al.*, 2001) e que as plantas *156OE* apresentaram fenótipos similares a essas plantas, cogitou-se a hipótese de que a via miR156/SPL poderia regular a homeostase de auxina durante a formação do sistema radicular de *arabidopsis*.

Tabela 3.2. Comprimento da raiz principal e número de raízes laterais de *Arabidopsis thaliana* (Col-0, *156OE*, *spl9/15* e *MIM156*) 12 dias após a germinação, crescidas em meio MS. O erro padrão é indicado.

	COMPRIMENTO DA RAIZ (mm)	Nº. DE RAÍZES LATERAIS
WT	62,7 ±1,7a	13,1±1,9c
156OE	59,8 ±1,9b	26,05±2,2a
SPL9/15	62,1± 2,7a	18±2,1b

MIM156

61,5 ± 3,2a

12,3 ± 1,3c

($P < 0,01$, *Student's t-test*. As medidas seguidas da mesma letra não diferem significativamente)

3.3.2 Análises fenotípicas do sistema radicular em plantas crescidas em meio MS com e sem auxina ou inibidor de auxina

Com o intuito de iniciar o estudo do possível papel da via miR156/SPL na arquitetura radicular em *arabidopsis* e sua relação com o fitormônio auxina, plantas dos genótipos descritos anteriormente foram crescidas em meio MS com presença ou ausência de 1 μ M de IAA ou 10 μ M NPA (Fig. 3.2).

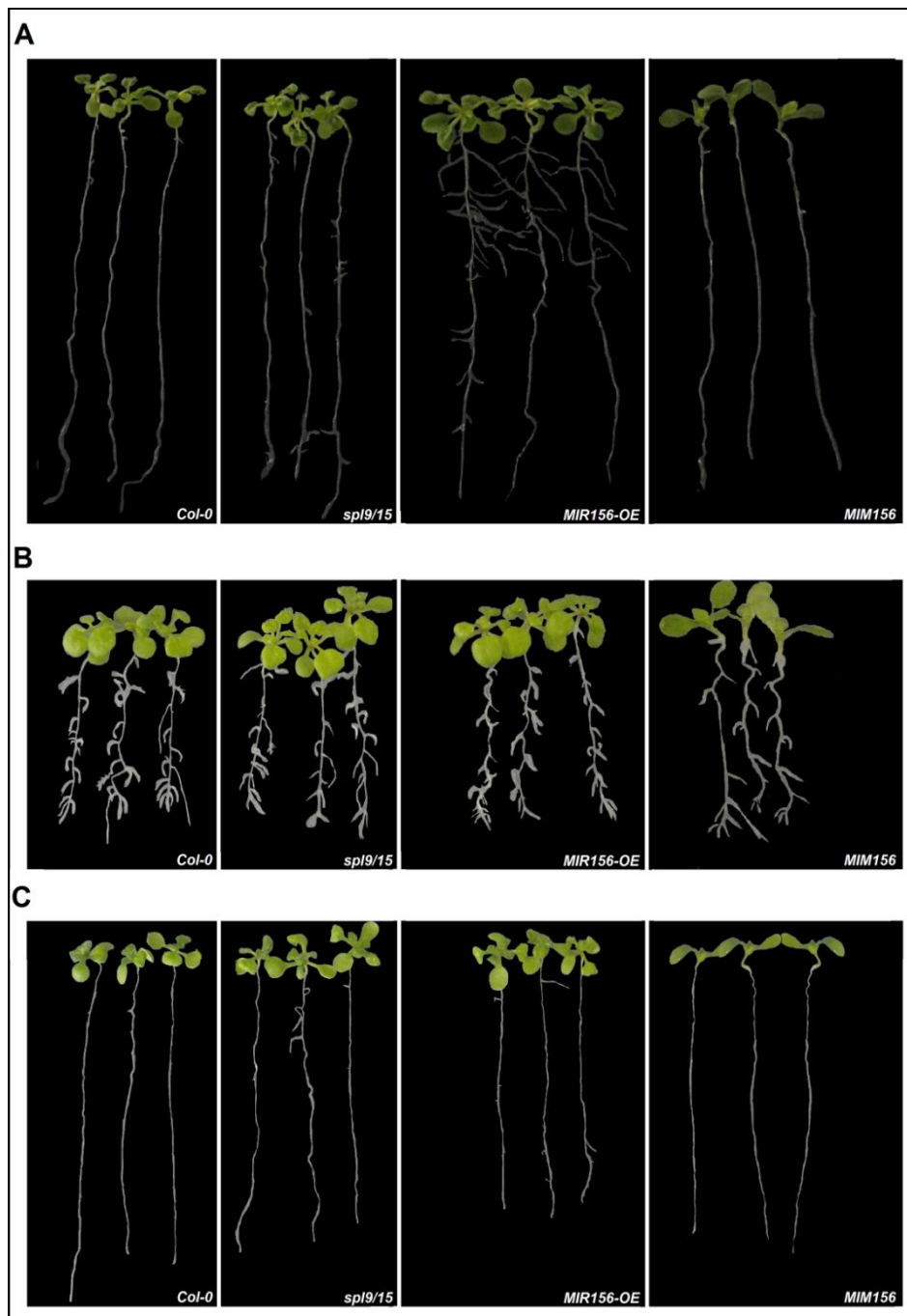


Figura 3.2. Plântulas de *arabidopsis* WT Col-0, *156OE*, *spl9/15* e *MIM156* 12 dias após a germinação em meio MS (A), MS suplementado com 1 μ M IAA (B) ou 10 μ M NPA (C).

Para o comprimento da raiz principal, os resultados demonstraram que os efeitos no tratamento com auxina em plantas selvagens diminuiu drasticamente quando comparados aos efeitos dos outros genótipos analisados. Para o tratamento com o inibidor do transporte de auxina (NPA) não há efeito do genótipo, ou seja, os efeitos no desenvolvimento radicular é similar em todos os genótipos avaliados. A redução do crescimento radicular, devido a presença de IAA e/ou NPA, foi devido à alterações no transporte e concentração de auxina, o qual foi similar entre os genótipos e já foi detalhadamente descrito na literatura. Os dados sugerem que a via miR156/SPL parece estar envolvida com o crescimento da raiz principal de *arabidopsis*. Entretanto, a via miR156/SPL não parece afetar o transporte de auxina durante o processo de crescimento da raiz primária (Fig. 3.3).

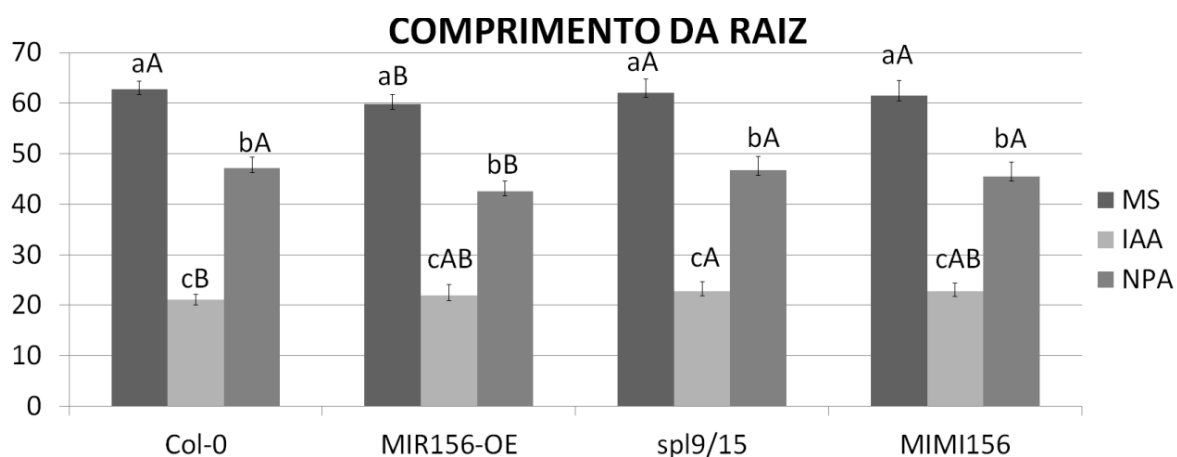


Figura 3.3. Comprimento da raiz principal de *Arabidopsis thaliana* (Col-0, *156OE*, *spl9/15* e *MIM156*) germinadas em meio MS, com ou sem 1 μ M IAA ou 10 μ M NPA. (P < 0,01, *Student's t-test*. As medidas seguidas da mesma letra não diferem significativamente). O erro padrão é indicado. No eixo X são indicados os genótipos avaliados e o eixo Y indica o comprimento da raiz em milímetros.

O tratamento com NPA diminuiu significativamente o número de raízes laterais em todos os genótipos analisados. No tratamento com IAA, como esperado, houve aumento do número de raízes laterais nas plantas WT (Blakely *et al.*, 1982; Casimiro *et al.*, 2001). Entretanto, nas plantas

transgênicas *156OE* e no duplo mutante de perda de função *spl9/spl15*, não houve diferenças significativas quando estes genótipos foram crescidos em meio MS com presença ou ausência de IAA, indicando que estas plantas apresentam resposta diferenciada a suplementação de auxina (Fig. 3.4). Estes resultados sugerem que a *viamiR156/SPL* pode afetar a homeostase e resposta celular à auxina e consequentemente contribuir com o aumento da formação de raízes laterais

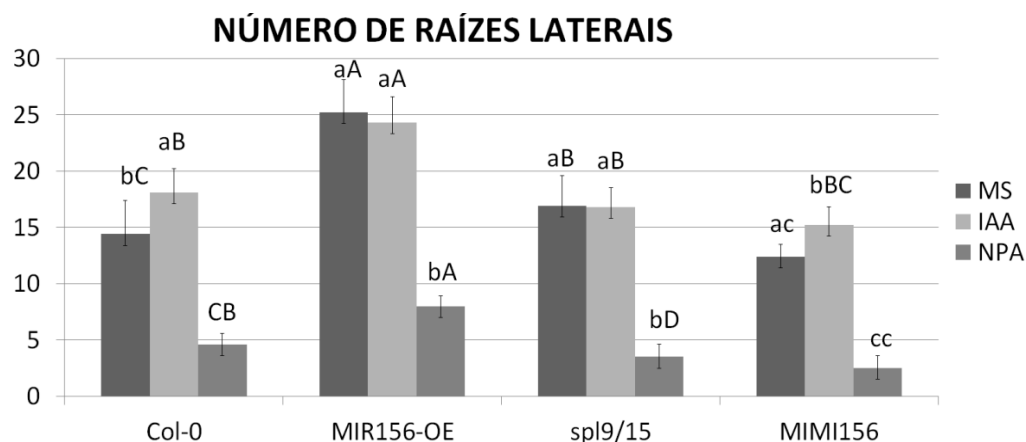


Figura 3.4. Número de raízes laterais de *Arabidopsis* (*Col-0*, *MIR156-OE*, *spl9/15* e *MIMI156*) em meio MS, MS contendo 1 μ M IAA e 10 μ M NPA ($P < 0,01$, *Student's t-test*. As medidas seguidas da mesma letra não diferem significativamente). O erro padrão é indicado. No eixo X são indicados os genótipos avaliados e o eixo Y indica o número de raízes laterais.

3.3.3 Análise da distribuição de auxina e citocinina

Com o intuito de caracterizar detalhadamente a possível relação entre auxina e a via *miR156/SPL*, foram realizados cruzamentos das plantas transgênicas *156OE* e *MIMI156* com plantas transgênicas *pDR5::GFP*. Ensaios preliminares da distribuição celular de auxina nos cruzamentos realizados (Tabela 3.1) foram visualizados em microscópio confocal. Após cinco dias de germinação, foi observado nas plântulas F1 fluorescência emitida pela expressão do gene repórter *GFP* na zona meristemática (região apical das raízes principais) e raízes laterais avaliadas (Fig. 3.5). Embora seja um dado preliminar, observou-se restrição da distribuição de auxina na zona meristemática de plantas *156OE;pDR5GFP* quando comparada a distribuição em plântulas *pDR5:GFP*, a qual já foi descrita (Grieneisen *et al.*, 2007). Estes

resultados em conjunto com a hipótese de que a auxina no meristema radicular regula o posicionamento das raízes laterais ao longo da raiz primária (De Smet *et al.*, 2007), sugerem que o aumento de raízes laterais nas plantas 156OE poderia ser devido à redistribuição da auxina no meristema radicular.

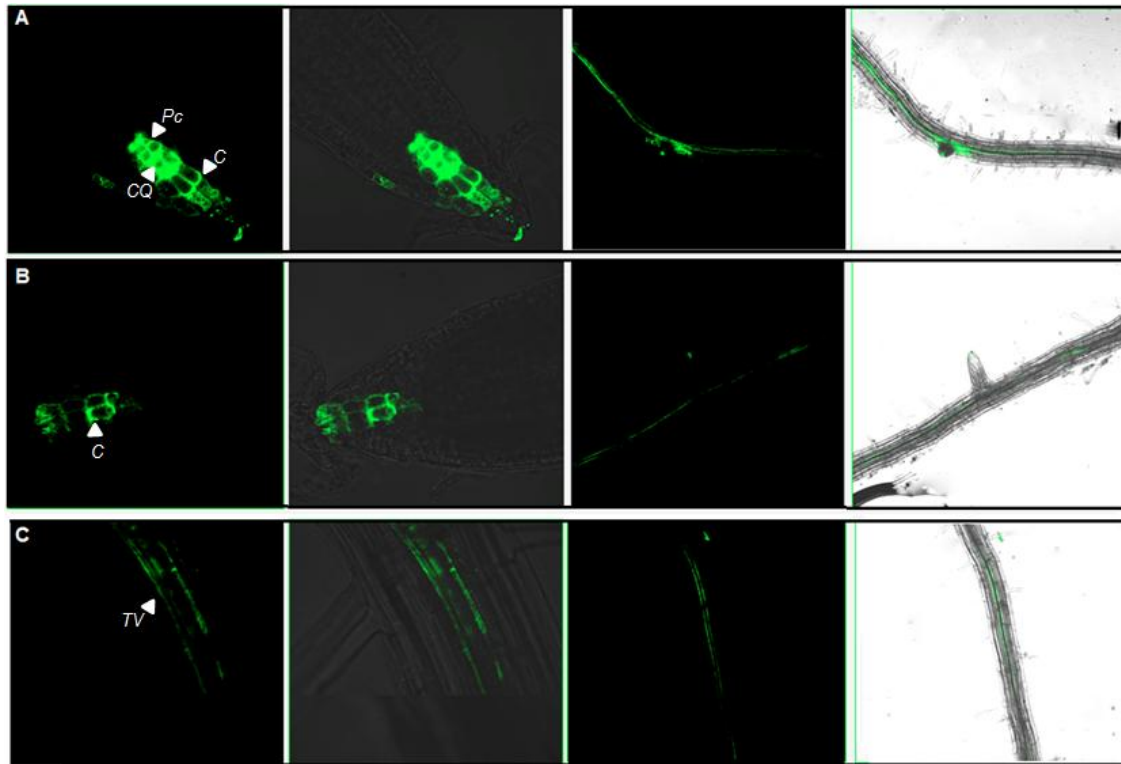


Figura 3.5. Localização celular de auxina nos cruzamentos. Plântulas *pDR5:GFP* (A) comparadas com plântulas *156OE;pDR5:GFP* (B) e *MIM156;pDR5:GFP* (C). Nas duas fileiras da esquerda foi utilizado o aumento de 20 vezes e nas duas fileiras da direita foi utilizado aumento de 60vezes. Procâmbio (Pc), Centro quiescente (CQ), Columela (C) e tecido vascular (TV).

A morfologia de uma planta depende do movimento da auxina através do sistema de transporte polar e não somente da presença desse fitormônio nos tecidos em desenvolvimento. Tal transporte polar depende em parte das proteínas PIN e o efluxo de auxina regulado pela proteína PIN é crucial para o desenvolvimento de raízes laterais (Benkova *et al.*, 2003). Portanto, foi realizado o cruzamento das plantas *156OE* e *pPIN1::PIN1:GFP* (Tabela 3.1). A localização da proteína PIN1 3 dias após a germinação mostrou-se mais restrita no procâmbio e metaxilema (tecido vascular primário) nas raízes das

plântulas *156OE;pPIN1::PIN1:GFP*, em comparação com as plantas *pPIN1::PIN1:GFP*. Nesse último genótipo, a proteína PIN1 foi detectada no periciclo, floema, procâmbio e metaxilema (Fig. 3.6), tal como descrito anteriormente (Zadníková *et al.*, 2010). Baseado no fato de que o controle da iniciação de raízes laterais depende do sistema vascular da raiz primária que transmite informação espacial para a nova formação do primórdio (Parizot *et al.*, 2008), sugere-se que a realocização da proteína PIN1 no meristema vascular primário (procâmbio) no cruzamento *156OE;pPIN1::PIN1:GFP* seja crucial para o aumento da iniciação das raízes laterais nas plantas superexpressando o miR156.

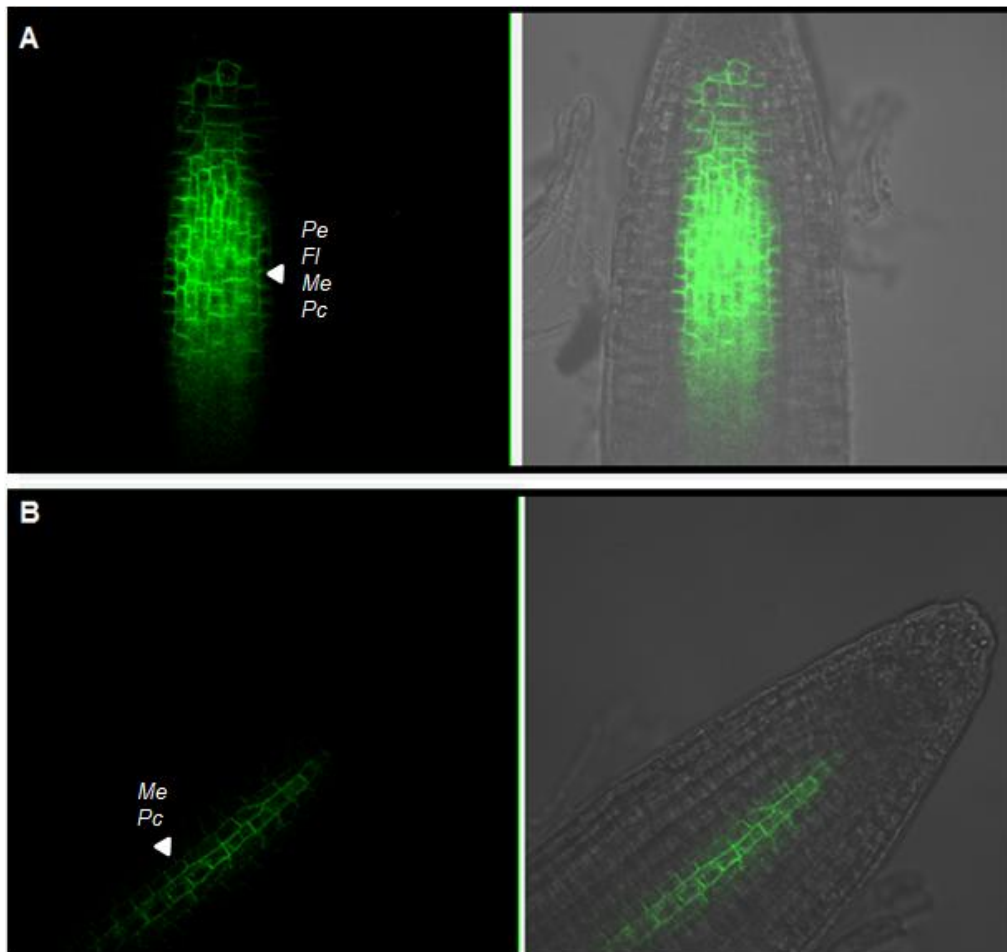


Figura 3.6. Localização celular do transportador de exfluxo de auxina PIN1 nos cruzamentos. Plântulas transgênicas *pPIN1::PIN1:GFP* (A) comparadas com plântulas *156OE;pPIN1::PIN1:GFP* (B). Foi utilizado o aumento de 60 vezes. Periciclo (Pe), floema (Fl), metaxilema (Me) e procâmbio (Pc).

Embora a auxina tenha papel central no controle do crescimento e desenvolvimento radicular, outros hormônios modulam a ação da auxina e consequentemente afetam o desenvolvimento e arquitetura radicular, além de também ser requeridos para proporcionar estabilidade e manutenção da proliferação celular e elongação da raiz, um desses hormônios é a citocinina. Portanto, foram cruzadas plantas transgênicas *156OE* e *MIM156* com plantas transgênicas *pARR5::GUS*, um marcador de distribuição de citocinina. Nos três genótipos avaliados, a atividade do promotor *ARR5* foi detectada na zona meristemática e nas raízes laterais (Fig. 3.7). Também se observou restrição da atividade do promotor *ARR5* nas plântulas *156OE;pARR5::GUS* (zona meristemática primária, no tecido vascular e raízes laterais) e *MIMI156;pARR5::GUS* (zona meristemática primária e tardia, epiderme e córtex da raiz primária e raízes laterais) (embora com padrões de distribuição diferentes), quando comparada a atividade do promotor *ARR5* nas plântulas *pARR5::GUS*. Entretanto, os resultados obtidos até o momento são da primeira geração dos cruzamentos (F1), e análises mais detalhadas na geração F2, com os transgenes em homozigose, são fundamentais para caracterizar o papel da via *miR156/SPL* no controle da distribuição de auxina e citocinina no sistema radicular.

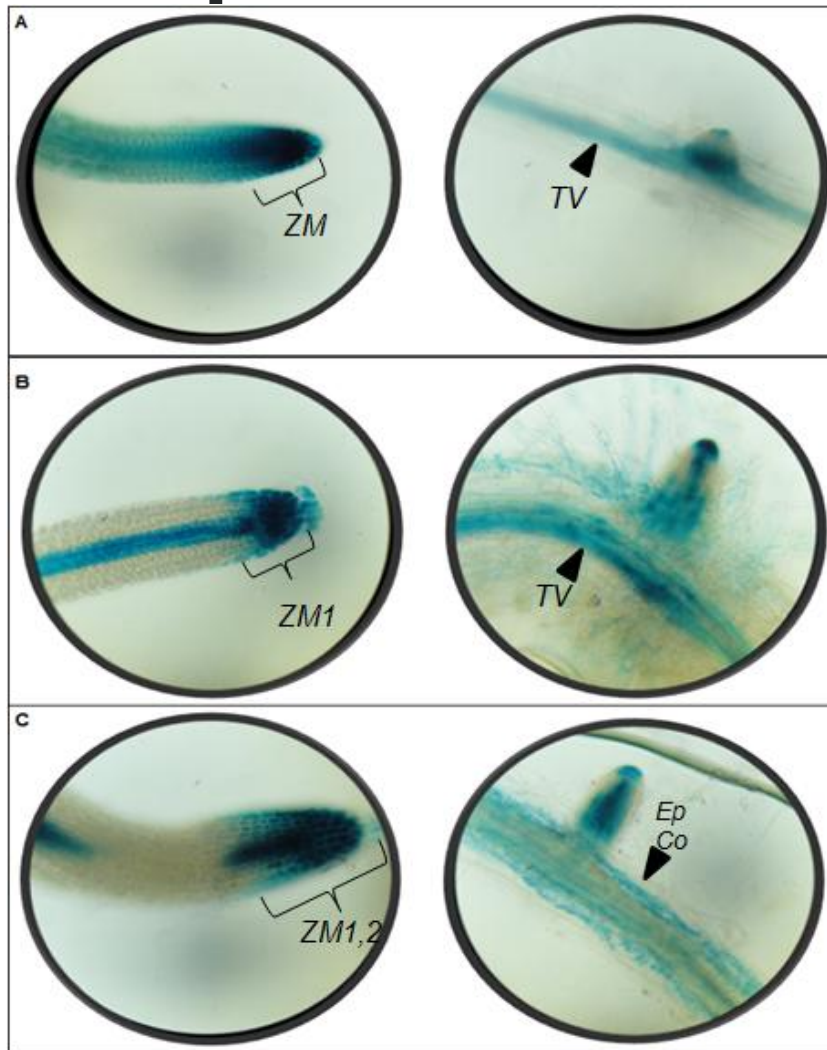


Figura 3.7. Localização de citocinina nos cruzamentos. Plântulas *pARR5:GUS* (A) comparadas com plântulas *156OE;pARR5:GUS* (B) e *MIM156;pARR5:GUS* (C). No lado esquerdo é apresentada a ponta da raiz principal e do lado direito é apresentado o ápice radicular da raiz principal junto com a emergência de raiz lateral. Em todas as figuras foi utilizado o aumento de 40 vezes. Zona meristemática primária (ZM1), zona meristemática tardia (ZM2), tecido vascular (TV), epiderme (Ep) e cortex (Co).

Em conjunto, os dados sugerem um papel adicional da via miR156/SPL no desenvolvimento da arquitetura radicular, e uma possível relação desta via com a distribuição de auxina e citocinina. Estudos recentes mostram a expressão de genes alvos do miR156 no tecido vascular (Breakfield *et al.*, 2012) e possivelmente a regulação destes genes nesses locais em plantas *156OE* seja um fator determinante para o aumento da iniciação das raízes laterais. Estudos feitos com plantas de arroz superexpressando o miR156 revelam que, nessas plantas, o miR164 é reprimido em diferentes estágios de

desenvolvimento de folhas (Xie *et al.*, 2012), possivelmente por ser um alvo direto dos SPLs. Similar resultado foi observado em ovários pré-antese de plantas transgênicas de tomateiro superexpressando o miR156 (Silva em preparação). O miR164 regula negativamente a emergência das raízes laterais via a regulação negativa do gene *NAC1* e, conseqüentemente, a emergência de raízes laterais. A hipótese de "*microRNA networks*" (ou seja, interação entre as vias miR156/SPL e miR164/NAC1) regulando o estabelecimento e desenvolvimento de raízes laterais será futuramente testada nos genótipos descritos no início deste capítulo.

Também será avaliada a expressão do gene *PIN1*, e genes de famílias de fatores de transcrição envolvidos na sinalização de auxina e citocinina. Interessantemente, o gene *PIN1* parece ser reprimido em tecidos de inflorescência de plantas superexpressando o miR156b. Além disso, será abordada a hipótese de Moreno-Risueno e colaboradores (2010) que sugerem que auxina não é suficiente para especificar os sítios de iniciação de raízes laterais ao longo da raiz primária e que os genes *SHATTERPROOF* e *SEEDSTICK* possivelmente estariam envolvidos neste processo. Intrigantemente, a expressão destes genes é aumentada no ápice floral de plantas 156OE de *arabidopsis* (dados não mostrados).

Finalmente, com o intuito de confirmar as hipóteses levantadas com os resultados preliminares do presente trabalho, bem como visando confirmar de maneira mais robusta a correlação funcional da via miR156/SPL com auxina e citocinina e outros hormônios, além de mais genes relacionados que possam estar relacionados, serão elaborados experimentos mais complexos durante o meu trabalho de Doutorado.

4 CONCLUSÕES GERAIS

Com base nos resultados apresentados conclui-se que:

- miR156 possivelmente foi derivado do miR529b, já que o miR156 é mais diversificado (maior número de cópias do precursor) ao longo da história evolutiva das plantas quando comparado com o miR529b, embora estes miRNAs sejam correlacionados em nível de sequência de nucleotídeos e regulem alvos em comum (genes *SPLs*). Além disso, alguns genes *SPLs* em eudicotiledôneas "core" ainda conservam o sítio de reconhecimento para o miR529b, embora este miRNA não esteja presente em seus genomas. A inserção deste miRNA em *arabidopsis* tem por consequência a regulação dos genes *AtSPL9* e *AtSPL15* que ainda conservam o sítio de reconhecimento para o mesmo, sugerindo que o miR529b foi perdido na história evolutiva recente de eudicotiledôneas "core".
- A via miR156 está envolvida no desenvolvimento da arquitetura radicular, tanto da raiz principal quanto das raízes laterais em *arabidopsis*, e possivelmente esta via esteja relacionada com distribuição de hormônios e homeostase tais como auxina e citocinina.

Referências

BARRERO, J.M.; PIQUERAS, P.; GONZALEZ-GUZMAN, M.; SERRANO, R.; RODRIGUEZ, P.L. et al. (2005). A mutational analysis of the *ABA1* gene of *Arabidopsis thaliana* highlights the involvement of ABA in vegetative development. *J. Exp. Bot.* 56:2071–83

BENKOVA, E.; HEJATKO, J. (2009). Hormone interactions at the root apical meristem. *Plant Mol. Biol.* 69:383–96

BLAKELY, L.M., DURHAM, M., EVANS, T.A., AND BLAKELY, R.M. (1982). Experimental studies on lateral root formation in radish seedling roots. I. General methods, developmental stages, and spontaneous formation of laterals. *Bot. Gaz.* 143:341–352.

BREAKFIELD, NW.; CORCORAN, DL.; PETRICKA, JJ.; SHEN, J.; SAESEAW, J.; RUBIO-SOMOZA, I.; WEIGEL, D.; OHLER, U.; BENFEY, PN. (2012). High-resolution experimental and computational profiling of tissue-specific known and novel miRNAs in *Arabidopsis*. *Genome Research.* 22:163-176

CASIMIRO, I.; MARCHANT, A.; BHALERAO, RP.; BEECKMAN, T.; DHOOGHE, S.; SWARUP, R.; GRAHAM, N.; INZE, D.; SANDBERG, G.; CASERO, P.J.; BENNETT, M. (2001). Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *The Plant Cell* 13:843–852.

CHUCK, G.; CIGAN, A.; SAETEURN, K.; HAKE, S. (2007). The heterochronic maize mutant *Corngrass1* results from overexpression of a tandem microRNA. *Nature Genetics*, New York, 39:544- 549.

CLOUSE, S.D.; LANGFORD, M.; MCMORRIS, T.C. (1996). A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiol.* 111:671–678.

DELLO IOIO, R.; LINHARES, FS.; SCACCHI, E.; CASAMITJANA-MARTINEZ, E.; HEID-STRÄ, R.; COSTANTINO, P.; SABATINI, S. (2007). **Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation.** *Curr Biol*, 17:678-682.

DELLO IOIO R, NAKAMURA K, MOUBAYIDIN L, PERILLI S, TANIGUCHI M, et al. (2008). A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science* 322:1380–84.

DE SMET, I.; TETSUMURA, T.; DE RYBEL, B.; FREY, NF.; LAPLAZE, L.; CASIMIRO, I.; SWARUP, R.; NAUDTS, M.; VANNESTE, S.; AUDENAERT, D.; INZÉ, D.; BENNETT, AJ.; BEECKMAN, T. (2007). Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*. *Development* 134:681–90

EPHRITIKHINE, G.; FELLNER, M.; VANNINI, C.; LAPOUS, D.; BARBIER-BRYGOO, H. (1999). The *sax1* dwarf mutant of *Arabidopsis thaliana* shows altered sensitivity of growth responses to abscisic acid, auxin,

gibberellins and ethylene and is partially rescued by exogenous brassinosteroid. *Plant J.* 18:303–314

FINKELSTEIN, R.R.; GAMPALA, S.S.L.; ROCK, C.D. (2002). Absciscic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell.* 14:S15–45

FRANCO-ZORRILLA1, J.M.; VALLI, A.; TODESCO, M.; MATEOS, I.; PUGA, M.I.; RUBIO-SOMOZA, I.; LEYVA, A.; WEIGEL, D.; GARCÍA, J.A. AND PAZ-ARES, J. (2007). Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nature genetics.* 39:1033-1037.

GRIENEISEN, V.A.; XU, J.; MARÉE, A.F.M.; HOGEWEG, P.; SCHERES, B. (2007). Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature.* 449:1008–1013.

HA, M.; PANG, M. X.; AGARWAL, V.; CHEN, Z. J. (2008). Interspecies regulation of microRNAs and their targets. *Biochimica et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms*, Austin, 1779:735-742.

KHAN, GA.; DECLERCK, M.; SORIN, C.; HARTMANN, C.; CRESPI, M.; LELANDAIS-BRIERE, C. (2011). MicroRNAs as regulators of root development and architecture. *Plant Mol Biol* 77:47–58.

MENG, Y.; MA, X.; CHEN, D.; WU, P.; CHEN, M. (2010). MicroRNA-mediated signaling involved in plant root development. *Biochem Biophys Res Commun.* 393:345–349.

MIYAWAKI, K.; MATSUMOTO-KITANO, M.; KAKIMOTO, T. (2004). Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant J.* 37:128–38.

MORENO-RISUENO, MA.; VAN NORMAN, JM.; MORENO, A.; ZHANG, J.; AHNERT, SE.; BENFEY, PN. (2010). Oscillating gene expression determines competence for periodic *Arabidopsis* root branching. *Science* 329:1306–11

MÜLLER B, SHEEN J. (2007). Advances in cytokinin signaling. *Science.* 318:68–69.

MUSSIG, SHINGH, ALTMANN. (2003). Brassinosteroids promote root growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 133:1261–71

OSMONT, K.S.; SIBOUT, R.; HARDTKE, C.S. (2007). Hidden branches: developments in root system architecture. *Annu Rev Plant Biol.* 58:93–113.

PETRICKA, J.J.; WINTER, C.M.; BENFEY, P.N. (2012). Control of *Arabidopsis* Root Development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63:563–90.

PARIZOT, B.; LAPLAZE, L.; RICAUD, L.; BOUCHERON-DUBUISSON, E.; BAYLE, V.; BONKE, M.; DE SMET, I.; POETHING, SR.; HELARIUTTA, Y.; HASELOFF, J.; CHRIQUI, D.; BEECKMAN, T.; NUSSAUME, L. (2008). Diarch symmetry of the vascular bundle in *Arabidopsis* root encompasses the pericycle and is reflected in distich lateral root initiation. *Plant Physiol* 146:140-148

SCHWAB, R.; PALATNIK, JF.; RIESTER, M.; SCHOMMER, C.; SCHMID, ME.; WEIGEL, D. (2005). Specific Effects of MicroRNAs on the Plant Transcriptome. *Developmental Cell*, 8:517–527.

SCHWARZ, S.; GRANDE, AV.; BUJDOSO, N.; SAEDLER, H.; HUIJSER, P. (2008). The microRNA regulated SBP-box genes SPL9 and SPL15 Control shoot maturation in *Arabidopsis*. *Plant molecular biology*. 183-195.

SILVA, G.F. (2012). Regulação do desenvolvimento e determinação do fruto de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) pela via microRNA156/ SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like (SPL). Tese mestrado (fisiologia e bioquímica de plantas)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 90p.

TEALE, W. D., PAPONOV, I. A. AND PALME, K. (2006). Auxin in action: Signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews* 7:847–859.

VARTANIAN, N.; MARCOTTE, L.; GIRAUDAT, J. (1994). Drought rhizogenesis in *Arabidopsis thaliana*: differential responses of hormonal mutants. *Plant Physiol.* 104:761–67.

WANG, J.; SCHWAB, R.; CZECH, B.; MICA, E.; WEIGEL, D. (2008). Dual effects of miR156- targeted SPL genes and CYP78A5/KLUH on plastochron length and organ size in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell Online*, Rockville, 20:1231.

WEIGEL, D. AND GLAZEBROOK, J. (2002). *Arabidopsis a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press.

XIE, K.; WU, C. E XIONG L. (2006). Genomic organization, differential expression, and interaction of SQUAMOSA promoter-binding-like transcription factors and microRNA156 in rice. *Plant Physiol.* 142:280–293.

XIE, K.; SHEN, J.; HOU, X.; YAO, J.; LI, X.; XIAO, J.; XIONG, L. (2012) Gradual increase of miR156 regulates temporal expressin changes of numerous genes during leaf development in rice. *Plant physiology*. 158:1382-1394.

ZADNÍKOVÁ, P.; PETRÁSEK, J.; MARHAVY, P.; RAZ, V.; VANDENBUSSCHE, F.; DING, Z.; SCHWARZEROVÁ, K.; MORITA, M.T.; TASAKA, M.; HEJÁTKO, J.; VAN DER STRAETEN, D.; FRIML, J.; BENKOVÁ, E. (2010). Role of PIN-mediated auxin efflux in apical hook development of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 137:607-617.

ZEEVAART, J.A.D.; CREELMAN, R.A. (1998). Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39:439–73.

Anexo 1. Análise de genes *SPLs* alvos para o miR529

No. acesso do alvo	E	UPE	Alinhamento	Descrição do alvo	Mismatches	Nº. éxons	Nº. introns	Família/
AY086384	0.5	12.527	miRNA 21 UUCGACAUGAGAGAGAAGA 1 Target840 AAGCUGUGCUCUCUCUCUCUCU 860	<i>Squamosa promotor binding like 15 (SPL15) Arabidopsis thaliana</i>	1	3	2	Brassicaceae/ Eudicotiledônea
XM_002878132.1	0.5	14.504	miRNA 1 UUCGACAUGAGAGAGAAGA 1 Target790 AAGCUGUGCUCUCUCUCUCUCU 810	<i>Squamosa promotor binding like Arabidopsis lyrata</i>	1	3	2	Brassicaceae/ Eudicotiledônea
XM_002278476.2	0.5	15.697	miRNA 1 UUCGACAUGAGAGAGAAGA 1 Target1164 AAGCUGUGCUCUCUCUCUCUCU 1184	<i>Squamosa promotor binding like 9 (SPL9) Vitis vinifera</i>	1	3	2	Vitaceae/ Eudicotiledônea
HM122684.1	0.5	20.039	miRNA 1 UUCGACAUGAGAGAGAAGA 1 Target865 AAGCUGUGCUCUCUCUCUCUCU 885	<i>Squamosa promotor binding like 1 (SPL1) Malus domestica</i>	1	3	2	Rosaceae/ Eudicotiledônea
XM_004252201.1	1	11.568	miRNA 20 UCGACAUGAGAGAGAAGA 1 Target967 GGCUGUGCUCUCUCUCUCUCU 986	<i>Squamosa promotor binding like 6c (SBP6c) Solanum lycopersicum</i>	1	3	2	Solanaceae/ Eudicotiledônea
XM_004249116.1	2.0	23.326	miRNA 21 UUCGACAUGAGAGAGAAGA 1 Target759 AAGUGUGCUCUCUCUCUCUCU 779	<i>Squamosa promotor binding like 15 (SBP15) Solanum lycopersicum</i>	1	3	2	Solanaceae/ Eudicotiledônea
EU972995	0.5	15.565	miRNA 20 UCGACAUGAGAGAGAAGA 1 Target997 AGCUGUGCUCUCUCUCUCUCU 1016	<i>Squamosa promotor binding like 6 (SPL6) Zea mays</i>	2	3	2	Panicoideae/ Monocotiledônea
XM_003578281.1	0.5	17.618	miRNA 20 UCGACAUGAGAGAGAAGA 1 Target811 AGCUGUGCUCUCUCUCUCUCU 830	<i>Squamosa promotor binding like 17 (SPL17) Brachypodium distachyon</i>	2	3	2	Pooideae/ Monocotiledônea
XM_002322642.1	0.5	17.528	miRNA 21 UUCGACAUGAGAGAGAAGA 1 Target774 GAGCUGUGCUCUCUCUCUCUCU 794	<i>Squamosa promotor binding like. Populus trichocarpa</i>	2	3	2	Salicaceae/ Eudicotiledônea
XM_003578281.1	0.5	17.618	miRNA 20 UCGACAUGAGAGAGAAGA 1 Target811 AGCUGUGCUCUCUCUCUCUCU 830	<i>Squamosa promotor binding like 17 (SPL17) Brachypodium distachyon</i>	2	3	2	Pooideae/ Monocotiledônea
LOC_Os09g31438	0.5	19.996	miRNA 20 UCGACAUGAGAGAGAAGA 1 Target805 AGCUGUGCUCUCUCUCUCUCU 824	<i>Squamosa promotor binding like 17 (SPL17) Oryza sativa</i>	2	3	2	Ehrhartoideae/ Monocotiledônea
XM_003572321.1	0.5	19.816	miRNA 20 UCGACAUGAGAGAGAAGA 1 Target769 AGCUGUGCUCUCUCUCUCUCU 788	<i>Squamosa promotor binding like 14 (SPL14) Brachypodium distachyon</i>	2	3	2	Pooideae/ Monocotiledônea
BT054334	0.5	20.315	miRNA 20 UCGACAUGAGAGAGAAGA 1 Target1134 AGCUGUGCUCUCUCUCUCUCU 1153	<i>Squamosa promotor binding like 7 (SPL7) Zea mays</i>	2	3	2	Panicoideae/ Monocotiledônea
LOC_Os08g39890	0.5	21.803	miRNA 21 UUCGACAUGAGAGAGAAGA 1 Target864 GAGCUGUGCUCUCUCUCUCUCU 884	<i>Squamosa promotor binding like 14 (SPL14) Oryza sativa</i>	2	3	2	Ehrhartoideae/ Monocotiledônea
AJ011618.1	0.5	22.123	miRNA 20 UCGACAUGAGAGAGAAGA 1 Target591 AGCUGUGCUCUCUCUCUCUCU 610	<i>Squamosa promotor binding like 5 (SPL5) Zea mays</i>	2	3	2	Panicoideae/ Monocotiledônea
XM_002314960.1	0.5	24.139	miRNA 20 UCGACAUGAGAGAGAAGA 1 Target1171 AGCUGUGCUCUCUCUCUCUCU 1190	<i>Squamosa promotor binding like. Populus trichocarpa</i>	2	5	4	Salicaceae/ Eudicotiledônea

86

ANEXO 2. Membros dos genes *SPLs* de *Arabidopsis thaliana* *Solanum lycopersicum*

No. acesso do alvo	Nº. éxons	Nº. íntrons	Descrição do alvo
AT5G643270	4	3	Squamosa promotor binding like 2 (SPL2) <i>Arabidopsis thaliana</i>
AT2G33810	2	1	Squamosa promotor binding like 3 (SPL3) <i>Arabidopsis thaliana</i>
AT1G53160	2	1	Squamosa promotor binding like 4 (4) <i>Arabidopsis thaliana</i>
AT1G27370	4	3	Squamosa promotor binding like 10 (SPL10) <i>Arabidopsis thaliana</i>
AT3G60030	10	9	Squamosa promotor binding like 12 (SPL12) <i>Arabidopsis thaliana</i>
AT5G50570	3	2	Squamosa promotor binding like 13 (SPL13) <i>Arabidopsis thaliana</i>
AT1G20980	10	9	Squamosa promotor binding like 14 (SPL14) <i>Arabidopsis thaliana</i>
Solyc04g045560	4	3	Squamosa promotor binding like 2 (SBP2) <i>Solanum lycopersicum</i>
Solyc07g053810	2	1	Squamosa promotor binding like 4 (SBP4) <i>Solanum lycopersicum</i>
Solyc08g0670	10	9	Squamosa promotor binding like 7 (SBP7) <i>Solanum lycopersicum</i>
Solyc05g015510	4	3	Squamosa promotor binding like 10 (SBP10) <i>Solanum lycopersicum</i>
Solyc01g068100	10	9	Squamosa promotor binding like 10 (SPL10) <i>Solanum lycopersicum</i>