

ATIVAÇÕES DO MECANISMO DE CRESCIMENTO ÁCIDO VIA
PEPTÍDEOS RALF E GENES REGULADORES DO HÁBITO DE
CRESCIMENTO VEGETAL

SÁVIO BASTOS DE SOUZA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2020

ATIVAÇÕES DO MECANISMO DE CRESCIMENTO ÁCIDO VIA
PEPTÍDEOS RALF E GENES REGULADORES DO HÁBITO DE
CRESCIMENTO VEGETAL

SÁVIO BASTOS DE SOUZA

Tese apresentada ao Centro de
Ciências e Tecnologias Agropecuárias
da Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte
das exigências para obtenção do título
de Doutor em Produção Vegetal

Orientador: Prof. Arnaldo Rocha Façanha

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2020

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

S729

Souza, Sávio Bastos de.

ATIVAÇÕES DO MECANISMO DE CRESCIMENTO ÁCIDO VIA PEPTÍDEOS RALF E GENES REGULADORES DO HÁBITO DE CRESCIMENTO VEGETAL / Sávio Bastos de Souza. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2020.

115 f. : il.

Inclui bibliografia.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2020.

Orientador: Arnaldo Rocha Facanha.

1. Rapid Alkalinization Factor. 2. Teoria do Crescimento Ácido. 3. DIAGETROPICA. 4. SELF-PRUNING. 5. Bombas de H+. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

“Que os nossos esforços desafiem as impossibilidades. Lembrai-vos de que as grandes proezas da história foram conquistadas daquilo que parecia impossível.”

Charlie Chaplin

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por todas as bênçãos e por ter dado a oportunidade de aprender tanto!

Agradeço à minha mãe, Luciane Bastos de Souza e ao meu pai, José Carlos de Souza, por terem me apoiado durante toda a minha vida, até hoje! Tudo que sou hoje devo a vocês. Amo vocês! MUITO OBRIGADO!

Agradeço ao meu irmão, Saulo Bastos de Souza, mesmo longe sempre me dando atenção e conselhos. Você e nossos pais são os pilares que me sustentam e só tenho a agradecer por tudo isso! Sem vocês eu não chegaria aqui! Te amo irmão! MUITO OBRIGADO!

Agradeço aos meus primos irmãos! Fábio Arthur, Gustavo de Souza, Rafael Bermudes, Maria Bastos e Marcela Bastos! Obrigado por estarem comigo desde sempre!

Agradeço também à Marcelita França Marques, por todo companheirismo, paciência, força e por ter sido meu braço direito por todos estes anos. Sem você tudo teria sido mais difícil. MUITO OBRIGADO!

Agradeço ao meu orientador Arnaldo Rocha Façanha, pela paciência em me ensinar o valor da ciência. Obrigado por tudo professor! Tenho certeza de que sou o pesquisador de hoje graças ao senhor!

Agradeço ao Prof. Alessandro Coutinho Ramos, por me desafiar a ser um profissional melhor a cada dia, e por sempre estar me dando a oportunidade de melhorar. O profissional que sou hoje devo a você! Muito obrigado!

Agradeço ao Prof. Daniel Basílio Zandonadi, por ter me aceitado como IC desde o primeiro mês de graduação. Tenho certeza de que minha iniciação no mundo científico foi mais fácil graças a você. Obrigado por me dar oportunidades desde então! Muito obrigado!

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal - PGPV e ao Laboratório de Biologia Celular Tecidual - LBCT pela oportunidade de pesquisa e apoio logístico para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

Agradeço aos meus amigos Letícia Cespon, Juliana Couto, Brunna Xavier, Antônio Cogo, Frederico Figueira, Janiélio Gonçalves, Enrico Cossi, Heloísa Bouzada, por todo apoio! Muito obrigado meus amigos!

Agradeço às minhas amigas Amanda Bertolazi e Juliana Melo por todos os ensinamentos e conselhos! Muito obrigado!

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho! Muito obrigado!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Peptídeos sinalizadores	4
2.2 Peptídeo RALF e suas funções fisiológicas	5
2.3 Efeitos do RALF no sistema reprodutivo vegetal	7
2.4 Efeito sobre a nodulação de plantas leguminosas	8
2.5 Efeito do RALF sobre a expansão celular	8
2.6 Relação do peptídeo RALF com a via de sinalização do Brassinosteroide	10
2.7 Efeitos do peptídeo RALF sobre a acidificação do apoplasto e sinalização por cálcio	10
2.8 Participação do RALF em resposta aos estresses	11
2.9 Conhecendo o receptor do RALF - FERONIA	12
2.10 A Teoria do Crescimento Ácido: novas perspectivas e participação do peptídeo RALF no processo de expansão celular	14
2.10.1 A Teoria do Crescimento Ácido	14
2.10.2 Novos conceitos sobre a Teoria do Crescimento Ácido	17
2.11 Novos mecanismos relacionados ao transporte e sinalização auxínica	19
2.12 O hábito de crescimento de tomateiros e o gene SELF-PRUNING	20
2.13 O gene DGT controla a emissão de raízes laterais	22
3. REFERÊNCIAS	24

4. TRABALHOS _____	35
4.1 SINALIZAÇÃO DO PEPTÍDEO RALF1 SUBJACENTE À MODULAÇÃO DOS FLUXOS DE H ⁺ DE CÉLULAS EM EXPANSÃO NA ZONA DE ALONGAMENTO DE RAÍZES _____	35
INTRODUÇÃO _____	38
MATERIAL E MÉTODOS _____	39
Material experimental e condição de crescimento das plantas _____	39
Medição dos fluxos de H ⁺ _____	40
Determinação da espessura da parede celular _____	41
Análise estatística _____	42
RESULTADOS _____	42
Efeito de AtRALF1 e AtPEP1 nos fluxos de H ⁺ e pH da superfície radicular da zona de alongamento da raiz de <i>A. thaliana</i> _____	42
Medição do crescimento das raízes de diferentes ecótipos de <i>A. thaliana</i> expostos ao peptídeo AtRALF1 _____	44
Efeito do peptídeo AtRALF1 nos fluxos de H ⁺ e pH da superfície da zona de alongamento radicular de diferentes ecótipos de <i>A. thaliana</i> _____	46
Medições da espessura da parede celular dos diferentes ecótipos de <i>A. thaliana</i> _____	48
DISCUSSÃO _____	50
O peptídeo AtRALF1 apresenta efeito regulatório diferente do peptídeo AtPEP1 _____	50
Plantas Fer-4 e P35s:AtRALF1 apresentam insensibilidade à aplicação de AtRALF1 _____	51
Plantas Fer-4 e p35s:AtRALF1 apresentam diferenças quanto à estrutura da parede celular _____	53
CONCLUSÃO _____	55
REFERÊNCIAS _____	55
4.2 GENE SELF-PRUNING REGULA RESPOSTAS AUXÍNICAS EM PLANTAS DE TOMATE VIA MODULAÇÃO DAS BOMBAS DE H ⁺ _____	60
INTRODUÇÃO _____	63
MATERIAIS E MÉTODOS _____	66
Material vegetal e condição de crescimento, parâmetros de crescimento _____	66
Parâmetros de crescimento _____	67
Trocas gasosas e fluorescência da clorofila _____	67
Isolamento da fração microssomal _____	67
Determinação da atividade H ⁺ -ATPase de Membrana Plasmática _____	68
Determinação da atividade da V-ATPase e da H ⁺ -PPase _____	69
Atividade de bombeamento da H ⁺ -ATPase de Membrana Plasmática _____	69
Atividade de bombeamento da H ⁺ -ATPase e H ⁺ -PPase vacuolares _____	70

Medições dos fluxos de H ⁺ utilizando o sistema de eletrodos vibráteis íons-seletivos (SIET) _____	70
pH da rizosfera _____	72
Análises estatísticas _____	72
RESULTADOS _____	72
Efeitos do silenciamento dos genes SP e DGT no crescimento de plantas de tomate	72
Silenciamento do gene SP influencia o desenvolvimento dos tomates _____	74
Análise das trocas gasosas em plantas de tomate Micro-tom _____	74
Atividade hidrolítica das H ⁺ -ATPases e H ⁺ -PPases _____	75
Atividade de Bombeamento de H ⁺ das H ⁺ -ATPases e H ⁺ -PPases _____	77
Alterações no fluxo de H ⁺ na zona de alongamento e no pH de raízes dos genótipos de tomateiro Micro-tom decorrentes da aplicação do fitormônio auxina _____	81
Análise de componentes principais (PCA) _____	83
DISCUSSÃO _____	84
Os genes SP e DGT alteram o perfil de crescimento dos tomateiros cv. Micro-Tom_	84
Plantas SP apresentam maior taxa de assimilação de CO ₂ e conseqüentemente frutos maiores _____	85
Plantas SP e DGT apresentam modulações diferenciais das bombas de H ⁺ isoladas do tecido radicular _____	86
CONCLUSÃO _____	91
REFERÊNCIAS _____	92
5. RESUMO E CONCLUSÕES _____	100

RESUMO

SOUZA, Sávio Bastos; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro de 2020; Ativações do mecanismo de crescimento ácido via peptídeos RALF e genes reguladores do hábito de crescimento vegetal. Orientador: Prof. Arnaldo Rocha Façanha.

A auxina está envolvida em praticamente todos os processos e etapas do crescimento vegetal. Apesar deste fitormônio ter sido exaustivamente estudado, ainda restam muitas lacunas sem resposta quanto a vários mecanismos ao qual ele está envolvido, inclusive a interação do mesmo com outros sinalizadores e genes responsáveis pela determinação do hábito de crescimento das plantas. Dentre estes pode-se citar os peptídeos RALF e os genes SP e DGT, que parecem estar envolvidos em mecanismos em sinergia com a auxina. Desta forma, estudos que busquem entender como estes novos atores estão incluídos em mecanismos complexos do desenvolvimento vegetal são importantes, pois podem servir de base para a criação de novas estratégias de cultivo de plantas de interesse agrônômico.

Baseado nisso, este trabalho objetivou investigar o efeito dos peptídeos AtRALF1 na modulação dos fluxos de H^+ na zona de alongamento da raiz de *Arabidopsis*, em correlação com o mecanismo de crescimento ácido. Assim como, investigar como as mutações nos genes SP e DGT em plantas de tomateiro cv. Micro-tom modulam as bombas de H^+ , relacionando com as alterações ecofisiológicas de crescimento e frutificação observadas nestas plantas. Os resultados do presente estudo indicaram que os peptídeos RALF parecem participar de um dos mecanismos mais fundamentais do desenvolvimento vegetal, no processo de alongamento celular, regulando inclusive o desenvolvimento da parede celular. Já os genes SP e DGT parecem regular aspectos como o hábito de vida das plantas e o desenvolvimento radicular, a partir de uma regulação diferencial das bombas de H^+ . Estes estudos apresentam uma base de dados que contribui para o entendimento de etapas importantes do desenvolvimento das plantas, abrindo novas perspectivas de pesquisa para o entendimento de mecanismos ainda não elucidados.

ABSTRACT

SOUZA, Sávio Bastos; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; February 2020; Ativações do mecanismo de crescimento ácido via peptídeos RALF e genes reguladores do hábito de crescimento vegetal. Advisor: Prof. Arnaldo Rocha Façanha.

The discovery of phytohormones was essential for this process, mainly phytohormone auxin. Auxin is involved in virtually all plant growth processes and stages. Although this phytohormone has been extensively studied, many gaps remain unanswered as to the various mechanisms to which it is involved, including its interaction with other signaling factors and genes responsible for determining plant growth habits. Among these we can mention the RALF peptides and the SP and DGT genes, which seem to be involved in mechanisms in synergy with auxin. studies that seek to understand how these new actors are included in complex mechanisms of plant development are important, and this knowledge may serve as a basis for the creation of new strategies for cultivating plants of agronomic interest.

Based on this, this work aimed to investigate the effect of AtRALF1 peptides on the modulation of H⁺ fluxes in the *Arabidopsis* root elongation zone, in correlation with the acid growth mechanism. As well as investigating how mutations in the SP and DGT genes in tomato plants cv. Micro-toms modulate the H⁺ pumps, relating to the ecophysiological, growth and fruiting changes observed in these plants. Our results indicated that RALF peptides appear to participate in one of the most fundamental mechanisms of plant development, in the process of cell elongation, even regulating the development of the cell wall. The SP and DGT genes, on the other hand, seem to regulate aspects such as shoot determination and root development, based on a differential regulation of H⁺ pumps. These studies present a database that contributes to the understanding of important stages in the plant development, opening new perspectives of research for the understanding of mechanisms not yet elucidated.

1. INTRODUÇÃO

No último século houve grande evolução na compreensão de como as plantas se desenvolvem, desde os sinais que levam à formação dos frutos até os que promovem a morte celular controlada e a senescência das plantas. Esta compreensão tem sido fundamental para o aumento da produtividade de alimentos ao passar das décadas (Evenson e Gollin, 2003; Hedden, 2003). A Revolução Verde foi um marco para a agricultura, cujos resultados são percebidos até hoje. A intensificação do desenvolvimento e emprego de novas estratégias e tecnologias agroindustriais a partir dos anos 60, promoveu incrementos vertiginosos na produção de alimentos superando as sombrias perspectivas Malthusianas que previram a insustentabilidade do crescimento demográfico. Porém, tal revolução só foi possível a partir do entendimento progressivamente cada vez mais aprofundado do desenvolvimento das plantas, que se acelerou com uma sequência de descobertas seminais feitas no século XX. Como, por exemplo, a descrição molecular dos fitormônios e suas rotas metabólicas e de sinalização, que foi fundamental para o entendimento do desenvolvimento das plantas e contribuiu para a ampliação de várias técnicas que são utilizadas até os dias atuais. Dentre esses fitormônios, o ácido Indol-3-Acético (Auxina - AIA) se destaca devido à sua atuação

direta ou indireta nos mais diversos fenômenos desenvolvimentais e ecofisiológicos (Gallei et al., 2020).

De fato, o AIA e outras auxinas estão envolvidos em praticamente todos os processos e etapas do crescimento vegetal. Em meio às inúmeras funções designadas a esta classe de fitormônios, pode-se destacar: germinação de sementes, dominância apical, desenvolvimento radicular e crescimento vegetativo. Além disso, uma das funções mais bem descritas da auxina está na promoção da expansão celular. De acordo com a 'Teoria do Crescimento Ácido' proposta por Rayle e Cleland (1970; 1992), a auxina ativa as H⁺-ATPases da membrana plasmática, facilitando a expansão celular através da acidificação do apoplasto e do afrouxamento da parede celular.

A Teoria do Crescimento Ácido, apesar de contestada desde a época de seu surgimento, pavimentou um caminho para muitas pesquisas, e desde então, com a descrição de novas peças moleculares do mecanismo, essa teoria vem ganhando cada vez mais clareza e robustez ao longo dos anos (Cosgrove, 2000; Sampedro e Cosgrove, 2005; Spartz et al., 2017; Ren et al., 2018; Dünser et al., 2019). Outros novos agentes também foram descritos como partícipes no contexto de sinalização da auxina, em que este fitormônio funciona como um sinalizador central, que ativa uma gama de outros sinalizadores específicos para cada necessidade da planta, incluindo peptídeos sinalizadores (Leyser, 2017).

Pequenas cadeias polipeptídicas atuam em um contexto de sinalização entre as células de um mesmo tecido das plantas, conjuntamente aos fitormônios, controlando assim diversos aspectos do desenvolvimento celular (Dünser et al., 2019). Entretanto, apesar dos recentes avanços na compreensão de como esses sinalizadores estão conectados, por se tratar de um mecanismo extremamente novo e complexo, ainda há muitas lacunas a serem preenchidas para que se possa compilar todos os dados em um único sistema. Um exemplo de tal complexidade são os peptídeos RALF, que mesmo tendo sido descritos pela primeira vez no início dos anos 2000, estudos recentes estão descrevendo cada vez mais rotas de sinalização envolvendo este peptídeo, em que o mesmo apresenta atividades distintas de acordo com o tecido no qual é expresso na planta, fato fundamental para diversos aspectos do desenvolvimento vegetal (Pearce et al., 2001; Covey et al., 2010; Haruta et al., 2014; Murphy e De Smet, 2014; Haruta et al., 2018; Dünser et al., 2019; Loubert-Hudon et al., 2020; Su et al., 2020).

Segundo Eisenhut et al. (2019), entender os mecanismos que são essenciais ao desenvolvimento vegetal pode ser a chave para uma nova revolução verde. Por exemplo, um aspecto ainda não elucidado é como a auxina controla o hábito de crescimento das plantas. Recentemente foi descrito que plantas de tomate apresentam o hábito de crescimento controlado pelo gene SELF-PRUNING (SP) em uma sinalização complexa juntamente com a auxina, podendo esta ser a primeira evidência de que este fitormônio esteja envolvido nesse processo (Silva et al., 2018). Logo, é possível observar que houve um avanço no conhecimento de como a auxina coordena o desenvolvimento vegetal. Porém, esses dados ainda não são suficientes, devido à necessidade da descrição de outros agentes que atuam dentro dos mecanismos envolvendo este fitormônio e, ainda resta muito a entender neste mecanismo complexo de sinalização que envolve o mesmo, principalmente no que tange à sinalização celular e à regulação dos transportadores primários H^+ , como as bombas de H^+ , que são tão importantes na sinalização deste (Falhof et al., 2016).

Baseados nestes conceitos, este trabalho objetivou investigar o efeito dos peptídeos AtRALF1 na modulação dos fluxos de H^+ na zona de alongamento de raízes de *Arabidopsis*, em correlação com o mecanismo de crescimento ácido. Assim como, investigar como as mutações nos genes SELF-PRUNING (SP) e DIAGEOTRÓPICA (DGT) em plantas de tomateiro cv. Micro-tom modulam as bombas de H^+ , relacionando com as alterações ecofisiológicas, de crescimento e frutificação observadas nestas plantas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Peptídeos sinalizadores

Desde o século XX, com a descoberta dos fitormônios, a busca pelo entendimento da comunicação entre células dos tecidos vegetais parecia girar canonicamente no entorno destes sinalizadores (Vanstraelen e Benkova, 2012). Entretanto, nas últimas décadas as atenções foram mudando, voltando-se em parte para o estudo do papel de pequenos peptídeos sinalizadores na comunicação célula-célula, assim como a participação dos mesmos no desenvolvimento e funcionamento de tecidos vegetais (Murphy et al., 2012; Czyzewicz et al., 2013).

Atualmente, já se tem conhecimento da existência de muitos peptídeos sinalizadores, os quais podem ser agrupados em duas categorias principais: pequenos peptídeos modificados pós-transcricionalmente (PPMPT) e peptídeos ricos em cisteína. A primeira classe, PPMPT, ultrapassa o número de peptídeos ricos em cisteína conhecidos em *Arabidopsis*, e sabe-se que estão envolvidos em diversos processos do desenvolvimento vegetal (Brand et al., 2000; Stenvik et al., 2008; Murphy et al., 2012; Czyzewicz et al., 2013). Os peptídeos dessa classe também apresentam tamanhos reduzidos, estando sujeitos às diversas modificações em nível pós-transcricional, que alteram a conformação destes

peptídeos em modo ativo ou inativo (Amano et al., 2006; Kondo et al., 2006; Ohyama et al., 2008; Murphy et al., 2012).

A segunda classe de peptídeos, conhecidos como peptídeos ricos em cisteína, normalmente apresentam-se maiores (cerca de 160 aminoácidos) do que os PPMPT (cerca de 20 aminoácidos), além de serem também carregados positivamente e conterem geralmente entre quatro e 16 resíduos de cisteína. Estes resíduos parecem ser parte integrante da conformação correta do peptídeo maduro, porém ao contrário dos PPMPT, não demonstraram ser pós-transcricionalmente modificados (Pearce et al., 2001).

Até o momento, a família de peptídeos ricos em cisteína inclui Rapid Alkalinization Factor (RALF), Epidermal Patterning Factor1 (EPF1), Epidermal Patterning Factor2 (EPF2), Tapetum Determinant1 (TPD1), Stomagen/Epf-Like9 (EPFL9) e Early Nodulin (Pearce et al., 2001; Yang et al., 2003; Hara et al., 2007; Hunt et al., 2010; Murphy et al., 2012).

Dentre todos esses peptídeos, pode-se destacar a família RALF, que são conhecidos por gerar um impacto tanto na expansão celular quanto na acidificação do apoplasto durante o crescimento e desenvolvimento vegetal. Sabe-se que os peptídeos RALF apresentam um receptor específico na membrana plasmática denominado como FERONIA, cuja ativação tem como resposta a alcalinização do apoplasto, havendo indícios de que isso ocorra através da inibição das H⁺-ATPases de membrana plasmática. Entretanto, existem lacunas que impossibilitam o entendimento de como estes eventos estão relacionados, assim como todas as consequências fisiológicas dos mesmos (Murphy e De Smet, 2014).

2.2 Peptídeo RALF e suas funções fisiológicas

A família de peptídeos RALF foi citada pela primeira vez há mais de uma década, mas apesar disso, o conhecimento real de suas funções fisiológicas continua não elucidado por completo. Na Figura 1 é possível observar as principais funções fisiológicas conhecidas até o momento deste peptídeo.

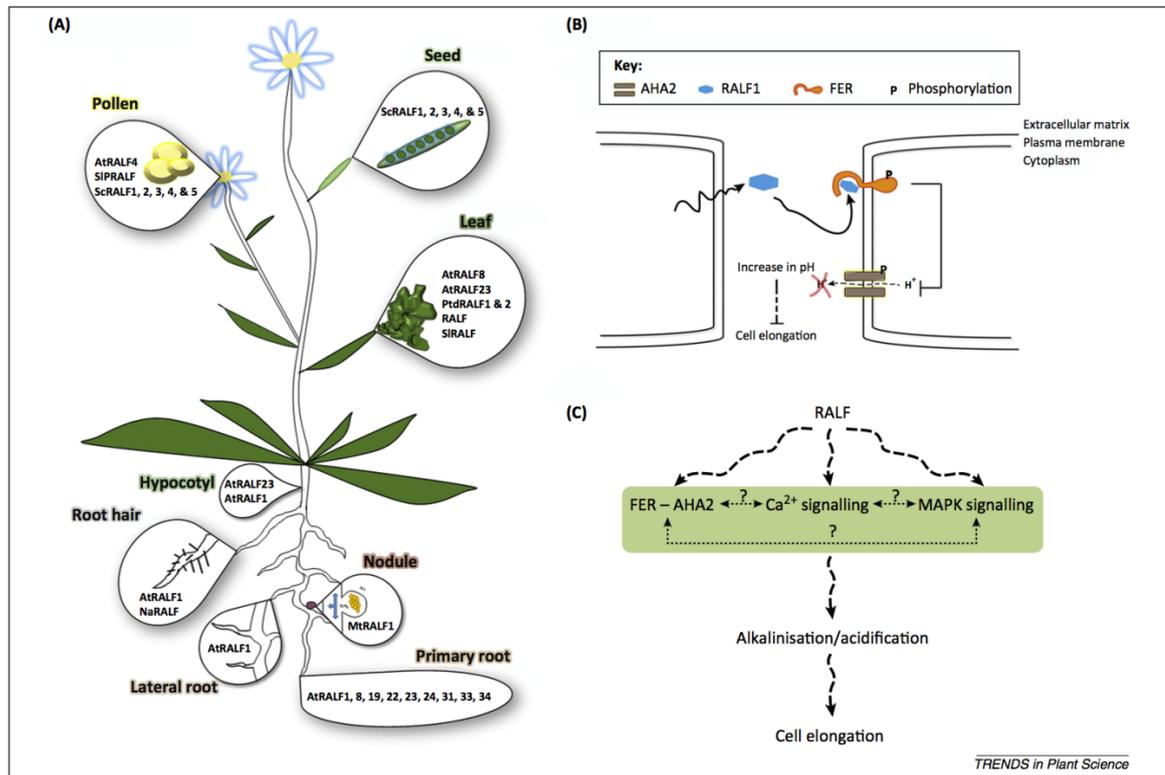


Figura 1. (A) Diversas atuações da família de peptídeos RALF no crescimento e desenvolvimento vegetal; (B) Mecanismo de inibição das H⁺-ATPases de membrana plasmática pelo peptídeo RALF; (C) Mecanismos de sinalização do peptídeo RALF no processo de expansão celular (Modificado a partir de Murphy e De Smet, 2014).

Os RALF foram inicialmente descobertos durante uma varredura em uma espécie de tabaco para identificar proteínas sistêmicas, neste caso, peptídeos indutores de alcalinização relacionados à defesa em células do tecido foliar de *Nicotiana tabacum* (Pearce et al., 2001). Segundo este trabalho, um dos peptídeos causou um rápido (5 min) e forte (cerca de uma unidade) aumento do pH do meio, com intensidade superior aos outros dois peptídeos sistêmicos isolados, e após alguns experimentos foi então identificado o RALF, um polipeptídeo de 5 kDa com 115 aminoácidos. Este novo peptídeo foi considerado não sistêmico, pois não induziu a síntese de inibidores de tripsina, quando aplicado exogenamente em plantas de tabaco, resposta comum em tratamentos com peptídeos sistêmicos nestas mesmas plantas, entendido como sinal defensivo. Este mesmo efeito foi observado em outros estudos, indicando então a descoberta de uma nova família de peptídeos não sistêmicos, cujos efeitos na fisiologia da planta ainda não haviam sido elucidados (Dong et al., 1991; Pearce et al., 2001; Haruta e Canstabel, 2003; Pearce e Ryan, 2003).

De início, por se tratar de um novo peptídeo e com funções ainda completamente desconhecidas, alguns estudos foram realizados com a intenção

de elucidar os possíveis processos fisiológicos nos quais os peptídeos RALFs poderiam estar envolvidos. Os primeiros indícios das funções fisiológicas do RALF foram identificados em experimentos utilizando-se plantas de tomate e peptídeos RALF sintéticos (Pearce et al., 2003). Estes resultados mostraram que quando estes peptídeos foram aplicados exogenamente em sementes de tomateiro, houve uma redução significativa do crescimento da raiz principal. Este mesmo peptídeo sintético foi então aplicado em sementes de *Arabidopsis* causando uma queda na taxa de crescimento da raiz principal semelhante ao ocorrido nas plantas de tomate, tanto a região meristemática quanto a zona de alongamento sofreram interferência devido aos efeitos do peptídeo, bem como houve uma inibição do crescimento de pelos radiculares. É importante ressaltar que os efeitos observados nestes experimentos foram revertidos assim que estas plantas foram colocadas em um meio em que o peptídeo não estava presente. Estes resultados sugeriram então que o peptídeo RALF apresentava um papel importante na regulação do crescimento e desenvolvimento radicular, porém, não havia indícios de como esse processo ocorria (Pearce et al., 2003).

2.3 Efeitos do RALF no sistema reprodutivo vegetal

Outros trabalhos estudaram os efeitos dos peptídeos RALF em diversos tecidos vegetais, na tentativa de verificar sua importância na fisiologia e desenvolvimento das plantas. Em *Solanum lycopersicum* o peptídeo S1PRALF foi identificado como específico de pólen e também apresentou um papel importante no alongamento celular, pois quando aplicado exogenamente inibiu o crescimento do tubo polínico (Covey et al., 2010). Todavia, a aplicação do S1PRALF em *Solanum peruvianum* não induziu a alcalinização, enquanto o peptídeo de outro tomate (S1RALF) e o RALF isolado de plantas de tabaco o fizeram. Quando o peptídeo S1PRALF foi aplicado em *Arabidopsis* foi observada a alcalinização, sugerindo que esse mecanismo regulatório pode variar de acordo com a espécie de planta (Covey et al., 2010).

Os peptídeos RALF parecem também apresentar um papel importante durante o desenvolvimento sexual em *Solanum chacoense*, onde novos genes de RALF foram identificados nos tecidos do ovário desta planta. No total, foram identificados cinco genes RALF (ScRALF1, 2, 3, 4 e 5), expressos durante a

reprodução sexuada e o desenvolvimento dos tomates (Germain et al., 2005). Um destes cinco peptídeos, ScRALF3, apresentou expressão apenas no tecido esporófito, tendo efeito no desenvolvimento do saco embrionário (Chevalier et al., 2013). Segundo estes autores, a perda de função deste peptídeo levou às deficiências no desenvolvimento do saco embrionário, gerando frutos pequenos e com poucas sementes. Os sacos embrionários aparentemente perderam o posicionamento polar do núcleo, apresentando-se como sacos embrionários imaturos, e aqueles frutos que chegaram à fase madura não eram saudáveis. Com a construção de um ScRALF3:GFP, foi possível observar a movimentação do peptídeo através da via secretora, sugerindo que o peptídeo é gerado no tecido esporófito e secretado no microambiente do gametófito feminino, agindo sobre este durante o desenvolvimento do óvulo. Com isso, foi possível evidenciar que os peptídeos RALF podem ser secretados e agir em tecidos vizinhos, semelhante às outras moléculas sinalizadoras do tipo hormonal (Chevalier et al., 2013).

2.4 Efeito sobre a nodulação de plantas leguminosas

Em *Medicago truncatula*, o peptídeo MtRALF1 foi regulado positivamente durante resposta ao fator ondulante (Combiér et al., 2008). Segundo estes autores, fatores ondulantes são moléculas sinalizadoras induzidas por bactérias fixadoras de nitrogênio (rizóbios) para facilitar o processo de nodulação na interação simbiótica descrita originalmente em leguminosas. Neste sentido, a superexpressão do MtRALF1 resultou em nodulação diferenciada nessas plantas, havendo diminuição no número e aumento do tamanho dos nódulos. Vale ressaltar que, esses autores não observaram nenhum efeito sobre o comprimento da raiz principal, assim como na arquitetura e desenvolvimento de pelos radiculares, sugerindo mais uma vez que a família de peptídeos RALF apresenta diversos papéis tanto entre tecidos da própria espécie de planta quanto entre espécies.

2.5 Efeito do RALF sobre a expansão celular

Um ensaio de alcalinização foi realizado utilizando-se dois peptídeos RALF, isolados a partir de culturas de células de cana-de-açúcar (Mingossi et al., 2010). De acordo com esses autores, a aplicação do peptídeo SacRALF1 purificado em

microcalos de cana-de-açúcar inibiu o crescimento dos mesmos, reduzindo o alongamento das células. De forma semelhante, a aplicação de AtRALF1 (extraído de *Arabidopsis* e que apresenta mais de 80% de similaridade com SacRALF1) também resultou em uma redução do crescimento e alongamento celular. Neste contexto, estes microcalos retomaram o crescimento e expansão celular quando foram transferidos para meios não contendo o peptídeo. Para analisar mais profundamente o papel do SacRALF no processo de alongamento celular, foi realizada uma análise de expressão do gene nas zonas de alongamento de folhas e raízes da cana-de-açúcar. Através de análises de PCR em tempo real de extratos de tecido, foi mostrado que o SacRALF1 apresentou expressão cerca de 20 vezes maior na zona de alongamento do que nos demais tecidos. Seguindo essa tendência, a expressão foi maior em folhas jovens e em crescimento, e baixa em tecidos velhos e folhas maduras.

Um outro exemplo para avaliar o efeito de RALF sobre o alongamento celular, plântulas de *Arabidopsis* foram germinadas no escuro para induzir o alongamento dos hipocótilos (Mingossi et al., 2010). Como esperado, plântulas crescidas na presença do peptídeo RALF1 tiveram o alongamento do hipocótilo inibido, sendo retomado quando foram removidas do meio contendo o peptídeo. Esses autores relatam que a inibição do hipocótilo foi também observada quando utilizados os peptídeos sintéticos RALF19, 22, 23, 24, 31, 33 e 34, ou quando o gene RALF1 foi superexpresso, onde este também exibiu uma inibição no alongamento celular e no crescimento da raiz principal, assim como redução da densidade de raízes laterais. Em contraste, quando o gene RALF1 foi silenciado, as linhagens exibiram o fenótipo oposto ao da superexpressão em relação ao alongamento do hipocótilo, crescimento da raiz principal e densidade de raízes laterais. Curiosamente, o peptídeo RALF4 aparenta não ter qualquer efeito sobre o alongamento das células do hipocótilo e crescimento da raiz principal (Mingossi et al., 2010; Bergonci et al., 2014; Morato do Canto et al., 2014). Com isso, estes resultados apoiaram a hipótese de que os RALF inibem a expansão celular e o alongamento da raiz de plantas *Arabidopsis*.

2.6 Relação do peptídeo RALF com a via de sinalização do Brassinosteróide

Semelhante às plantas com superexpressão do RALF1, a superexpressão do RALF23 fez com que houvesse uma redução no crescimento radicular (Bergonci et al., 2014; Morato do Canto et al., 2014). Curiosamente, observou-se que o RALF23 foi regulado negativamente na presença de brassinosteróide, um fitormônio envolvido na promoção do crescimento (Mitchell et al., 1970), e que as plantas, que superexpressavam o RALF23, eram resistentes ao tratamento com o brassinosteróide, que normalmente induziria o alongamento do hipocótilo em plantas do tipo selvagem (Srivastava et al., 2009). Da mesma maneira, o brassinosteróide aplicado exogenamente perdeu a eficácia em plantas que superexpressavam RALF1, e este peptídeo induziu a expressão de dois genes regulados negativamente por brassinosteróide, CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC DWARF (CPD) e DWARF4 (DWF4), sugerindo que o peptídeo RALF1 atua de forma antagonista à sinalização por brassinosteróide. Estes resultados sugeriram que o RALF1 e o fitormônio brassinosteróide atuam por meio de componentes de sinalização partilhada.

2.7 Efeitos do peptídeo RALF sobre a acidificação do apoplasto e sinalização por cálcio

O sistema radicular de plantas que superexpressam algumas isoformas do peptídeo RALF não foi capaz de acidificar eficazmente a rizosfera, sugerindo que o RALF tem a capacidade de neutralizar a acidificação do apoplasto que, por sua vez, reduz a capacidade de expansão celular (Hardtke et al., 2007; Srivastava et al., 2009). Neste contexto, foi sugerido que pelo menos, o AtRALF1 tenha um efeito sobre a H⁺-ATPase (AHA2) (Haruta et al., 2014). Segundo estes autores, análises de fosfoproteômica indicaram que a aplicação do peptídeo RALF promove a ativação de uma cascata de sinalização que culmina na fosforilação da H⁺-ATPase na Ser⁸⁹⁹, levando à inibição do transporte de H⁺. Assim, essa explicação é considerada a mais sólida para o aumento do pH em resposta a este peptídeo, assim como para a redução na expansão celular (Figura 1B) (Haruta et al., 2014). No entanto, é possível que nem todos os RALF afetem diretamente as bombas de

prótons, podendo a alteração do pH ser também uma resposta secundária à sinalização por Ca^{2+} e/ou à sinalização da MAP-Kinase.

Desta forma, os RALF também têm sido implicados na sinalização por Ca^{2+} em células de raiz de *Arabidopsis* (Haruta et al., 2008). Estes autores afirmam que o cálcio é conhecido por atuar como um mensageiro secundário em diversos processos do crescimento e desenvolvimento vegetal e também em respostas ambientais. Ainda, Haruta et al. (2008) aplicaram em uma única plântula extratos de várias frações de tecido de *Arabidopsis* e monitoraram utilizando o marcador fluorescente Aequorina, muito utilizado para identificar Ca^{2+} spikes. Através desse experimento, o AtRALF1 foi identificado dentre as substâncias que foram observadas por provocar sinalizações por Ca^{2+} . Estes resultados foram observados mais claramente quando este peptídeo foi aplicado em plantas que expressavam Aequorina, onde foram identificadas fortes sinalizações de Ca^{2+} como resposta (Figura 1C). Embora o AtRALF1 seja expresso principalmente na raiz, a sinalização de cálcio também foi identificada como fator crucial no crescimento do tubo polínico, sendo este um processo fisiológico no qual os peptídeos RALF são conhecidos como parte integrante (Haruta et al., 2008; Covey et al., 2010). Já foi demonstrado também que os peptídeos RALF induzem uma ativação de MAP kinases em plantas de tabaco, sendo esta outra forma de sinalização intercelular identificada poucos minutos após o tratamento com este peptídeo (Figura 1C, Murphy e De Smet, 2014). No entanto, em *Arabidopsis*, sinalizações por Ca^{2+} foram ativadas 40 segundos após o tratamento com o RALF, sendo este o indício de que o Ca^{2+} pode ser a resposta primária à indução por RALF e que a sinalização da MAP kinase e inevitavelmente a alcalinização, podem ser alvos de várias cascatas de sinalização (Haruta et al., 2008).

2.8 Participação do RALF em resposta aos estresses

Os peptídeos RALF também podem ser importantes na resposta aos estresses em *Arabidopsis* (Atkinson et al., 2013). Ao contrário dos estudos supracitados que identificaram o RALF em plantas de tabaco, e concluíram que o mesmo não estava envolvido com o sistema defensivo da planta, algumas evidências indicam que estes peptídeos podem estar envolvidos em resposta a alguns tipos de estresses. Sabe-se que as plantas respondem aos estresses de

diversas maneiras, dependendo do conjunto de fatores estressantes que estão atuando nas mesmas, sendo o perfil de genes expressos como resposta dependente das necessidades impostas por cada um. Atkinson et al. (2013) verificaram que os peptídeos RALF8, 23, 33 e 34 foram mais expressos quando a planta estava sofrendo algum tipo de estresse. De acordo com esses autores, em plantas de *Arabidopsis* que superexpressavam o RALF8, foi verificada uma significativa diminuição do crescimento, apresentando rosetas com diâmetro bastante reduzido e volume radicular cerca de 80% menor do que as plantas do tipo selvagem. As plantas que apresentavam a superexpressão deste peptídeo também foram altamente susceptíveis à seca, com taxas de sobrevivência de 91% menores do que as plantas do tipo selvagem. Estes resultados sugerem que o peptídeo RALF8 (e potencialmente os demais peptídeos desta família) é utilizado como moléculas sinalizadoras em resposta aos estresses, como um fino mecanismo de ajuste para equilibrar as taxas de crescimento, priorizando os requisitos mais urgentes para a sobrevivência da planta.

Desta forma, pode-se sugerir que estes peptídeos apresentam papéis de destaque nos processos essenciais da planta, como a expansão celular e a resposta aos estresses ambientais, indicando o motivo pelo qual essa numerosa família de peptídeos RALF é conservada dentro do reino vegetal.

2.9 Conhecendo o receptor do RALF - FERONIA

Existem mais de 600 receptores tipo kinase e mais de 1000 genes que potencialmente codificam pequenos peptídeos a partir do genoma de *Arabidopsis*, no entanto, poucas interações entre peptídeos e seus receptores foram identificadas (Shiu e Bleecker, 2001; Lease e Walker, 2006; Hirakawa et al., 2008; Murphy et al., 2012; Haruta et al., 2014). Isso se deve principalmente ao fato de a identificação do peptídeo ligante e seu receptor requerer uma combinação de estratégias para superar as limitações quando se trata de interações potencialmente pequenas e fracas, sendo, por sua vez, desafiador tecnicamente. Porém, em meados de 2005 estudos começaram a elucidar como seria a percepção do RALF em células vegetais (Scheer et al., 2005).

Os primeiros ensaios neste sentido indicaram que os peptídeos RALF atuavam através da ligação a um receptor específico na membrana plasmática de

células vegetais, a partir de um ensaio com suramina, um conhecido inibidor de diversas interações receptor-ligante (Stratmann et al., 2000; Scheer et al., 2005). Quando a suramina foi adicionada a um meio contendo células vegetais e peptídeo RALF, o processo de alcalinização promovido por esse peptídeo foi inibido. Posteriormente, um análogo sintético do RALF em plantas de tomate que apresentava fotoafinidade (chamado LeRALF) foi então adicionado às células de tomateiro cultivadas *in vitro*, para identificar qualquer proteína ligante através da técnica de fotoafinidade. Neste experimento, usando luz UVB, o LeRALF foi colocalizado com duas proteínas nestas células, uma proteína de 120 kDa e outra marcada mais fortemente de 25 kDa. Assim, o local de ligação do RALF na célula foi identificado através de uma lavagem destas células com ácido, dissociando completamente o RALF de seu receptor. Este estudo sugeriu que os peptídeos agiam na superfície da célula, não sendo internalizados posteriormente à ligação. Mesmo após a realização de fracionamento, solubilização, aplicação de sal e uso de pH extremo (que liberam proteínas periféricas), as proteínas de 120 kDa e 25 kDa não solubilizaram, assim sendo, foram identificadas como proteínas integrais da membrana plasmática (Scheer et al., 2005).

Utilizando a técnica de fosfoproteômica, Haruta et al. (2014) identificaram cinco proteínas de membrana que diferiram em abundância quando submetidas a tratamento com o peptídeo AtRALF1. Dentre essas proteínas, destacou-se a proteína FERONIA (Fer) como responsável por um incremento de fosforilação da ordem de 20 vezes quando exposta ao peptídeo. Outras proteínas que aumentaram seus níveis de fosforilação quando expostas ao AtRALF1 foi a H⁺-ATPase (AHA2), uma proteína quinase dependente de cálcio, um transportador ABCG36 e uma RLK relacionada ao FER, que foi regulada negativamente. Porém, a proteína FERONIA pode não ser o único receptor responsável pelo reconhecimento do peptídeo AtRALF1, uma vez que mutantes *fer4*, plantas cujas proteínas FERONIA não estão presentes na membrana plasmática, foram pouco sensíveis ao AtRALF1 em ensaios de inibição do crescimento de raízes em doses acima de 1 µM. Estes resultados indicam que os peptídeos RALF apresentam outros prováveis receptores na membrana plasmática das células. Morato do Canto et al. (2014) demonstraram, ao usar diversas isoformas deste peptídeo, que mesmo plantas de *Arabidopsis* que apresentavam perda de função do receptor FER, apresentaram-se mais sensíveis a algumas isoformas do RALF, corroborando com outros estudos

que indicam que a percepção deste peptídeo é mais complexa do que se tem conhecimento até então (Haruta et al., 2014).

2.10 A Teoria do Crescimento Ácido: novas perspectivas e participação do peptídeo RALF no processo de expansão celular

À medida que a parede celular parece unir as células vegetais, torna-se óbvio que a regulação do crescimento dos tecidos ou mesmo dos órgãos das plantas está além de células individuais. No início da década de 90 a Teoria do Crescimento Ácido ganhou forma, descrevendo o papel, assim como toda a importância da auxina no processo de expansão celular (Rayle e Cleland, 1992). Este fitormônio também tem importância central no crescimento supracelular, ou seja, a sua percepção nas células e nos tecidos é suficiente para impactar o crescimento de órgãos inteiros (Leyser, 2018). Mesmo com toda sua importância, a auxina não é o único hormônio a controlar o crescimento das plantas, existem outros que também parecem orientar o crescimento e desenvolvimento dos tecidos vegetais. Por exemplo, a epiderme, em particular, parece controlar o tamanho dos órgãos a partir de uma rota dependente de auxina e brassinosteróide (Swarup et al., 2005; Savaldi-Goldstein et al., 2007; Hacham et al., 2011), enquanto a endoderme parece determinar a taxa de crescimento dos órgãos a partir de uma rota dependente de giberelina (Ubeda e Tomás, 2008; Ubeda e Tomás, 2009; Shani et al., 2013).

Apesar da Teoria do Crescimento Ácido explicar o mecanismo pelo qual as células das plantas expandem, estudos mais recentes estão indicando que este processo pode ser mais complexo do que foi previamente descrito, devido principalmente a participação de outros fitormônios e de pequenos peptídeos sinalizadores neste processo, sugerindo a existência de mecanismos ainda não elucidados (Minami et al., 2019).

2.10.1 A Teoria do Crescimento Ácido

Devido à parede celular de células vegetais apresentar certa rigidez e determinar seu tamanho e formato, a maneira com que estas células expandiam era desconhecida por muitos anos. Um estudo com o hormônio auxina, há cerca

de 45 anos, abriu caminho para uma melhor compreensão do mecanismo por trás desse processo de expansão celular. Desde então, o mecanismo foi pouco a pouco sendo melhor elucidado, até ser criada a chamada Teoria do Crescimento Ácido, que tem servido como um modelo para explicar a expansão celular (Rayle e Cleland, 1970; Hager et al., 1971; Rayle e Cleland, 1992) e, em grande parte, resistiu ao longo do tempo. De acordo com esta hipótese, a auxina ativa as H^+ -ATPases de membrana plasmática e como resultado, os H^+ são transportados para a região do apoplasto e, conseqüentemente, acidificam a matriz extracelular. Esta acidificação, por sua vez, ativa as expansinas e outras enzimas de remodelação da parede celular. Através de sua ação, a rede de celulose e componentes adicionais da parede celular é afrouxada e juntamente com a absorção de água pela célula, que gera a pressão de turgescência necessária, faz com que as células se expandam (Rayle e Cleland, 1992; Hager, 2003; Perrot-Rachenmann, 2010) (Figura 2).

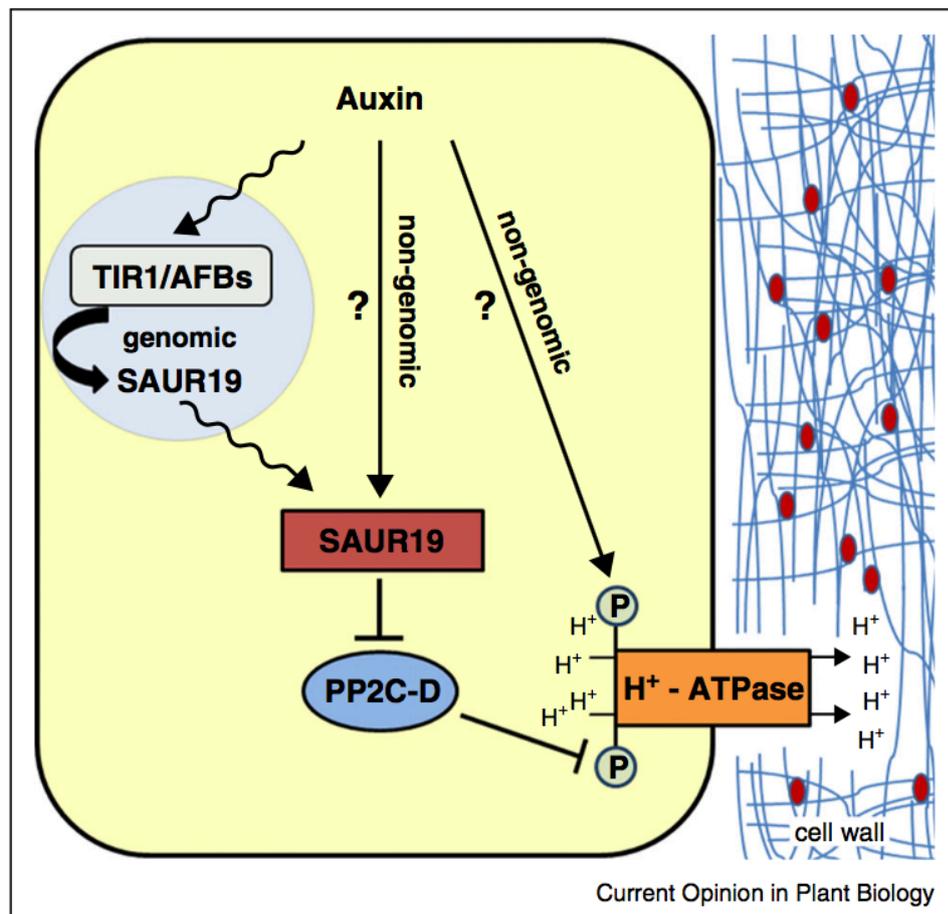


Figura 2. Esquema mostrando as vias genômicas, não genômicas na modulação das H^+ -ATPases de membrana plasmática em resposta ao fitormônio auxina (Fonte: Dünser e Kleine-Vehn, 2015).

Inicialmente, dois receptores de auxina foram descritos como ativadores da via do crescimento ácido. O primeiro é o AUXIN BINDING PROTEIN1 (ABP1) que se liga à auxina e, foi indicado como o responsável por mediar as respostas rápidas, não genômicas (não transcricionais) a este hormônio, bem como contribuindo para a ativação da TIR1/AFB, que controla as respostas genômicas a este hormônio (transcricional) em *Arabidopsis* (Thomas et al., 2013; Chen et al., 2014). A Auxina rapidamente induz o crescimento e, portanto, mecanismos não genômicos ABP1-dependentes foram assumidos como os atores principais para explicar a Teoria do Crescimento Ácido (Sauer e Kleine-Vehn, 2011). Porém, estudos mais recentes em contraste com a suposta importância do ABP1, demonstraram que o *knock-out* completo da ABP1 não afeta o desenvolvimento de *A. thaliana* sob condições normais de crescimento, colocando em risco a importância da ABP1 no desenvolvimento das plantas (Gao et al., 2015). A acidificação apoplástica ainda não foi experimentalmente abordada nos novos estudos com essas plantas que apresentam *knock-out* da proteína ABP1, mas sugere-se que a mesma apresenta apenas um papel modulatório, mas não essencial neste processo.

Ao contrário da situação atualmente pouco clara para a ABP1, as proteínas TRANSPORT INHIBITOR RESISTANT1/AUXIN SIGNALING F-BOX (TIR1/AFBs) mostraram que ao se ligarem à auxina promovem as respostas genômicas relacionadas a este hormônio (Dharmasiri et al., 2005; Kepinski e Leyser, 2005). A ligação da auxina ao TIR1/AFB promove a degradação do proteossoma 26S, causando a liberação dos fatores de transcrição das AUXIN RESPONSE FACTORS (ARFs) e controlando assim a expressão gênica dependente de auxina. Spartz et al. (2014) mostraram que os genes SMALL AUXIN UP-RNA (SAURs) foram induzidos rapidamente por auxina, e estes estimularam a atividade da H⁺-ATPase de membrana plasmática, promovendo assim a expansão celular. O mecanismo proposto compreende a regulação negativa das fosfatases PP2C-D pelos genes SAURs induzidos pela auxina, modulando assim o estado de fosforilação da H⁺-ATPase e subsequentemente a sua atividade. Entretanto, este modelo se baseia em experimentos com mutantes que apresentavam superexpressão do gene SAUR e possivelmente, a caracterização de mutantes que apresentem a perda de função do SAUR definirá sua real importância para o desenvolvimento vegetal (Dünser e Kleine-Vehn, 2015).

No entanto, um estudo sugere que o aumento da fosforilação da H⁺-ATPase não requer transcrição, desta forma, as respostas da TIR1/AFB dependente de auxina não seriam tão importantes nesta fase (Takahashi et al., 2012). Este modelo, no entanto, ignora a fase secundária de alongamento, que ocorre mais lentamente, requerendo a expressão de genes dependentes da auxina (Spartz et al., 2014). Desta maneira, é concebível que a auxina ative a H⁺-ATPase tanto diretamente através de uma cascata de sinalização não genômica (não transcripcional), assim como indiretamente, pela indução da expressão gênica (Figura 2).

2.10.2 Novos conceitos sobre a Teoria do Crescimento Ácido

Nas plantas, o espaço extracelular consiste em paredes celulares e o espaço entre as mesmas, sendo esta região conhecida como apoplasto, no qual água e solutos podem se mover livremente (Sattelmacher, 2001). O apoplasto desempenha um papel central no desenvolvimento da planta, controlando as concentrações iônicas na interface da membrana plasmática e regulando a estrutura da parede celular. Apesar de toda evolução e formulação da Teoria do Crescimento Ácido, uma questão ainda permanece em grande parte, sem solução, que é como as mudanças na homeostase do apoplasto podem mediar as alterações nas propriedades mecânicas das paredes celulares e como isso pode, por sua vez, afetar o crescimento e o desenvolvimento da planta. Nesse contexto, a compreensão da comunicação entre os componentes da parede celular, as enzimas de remodelação, as concentrações iônicas e a modulação do pH se fazem necessárias (Hocq et al., 2017).

O que se sabe é que o remodelamento constante das paredes celulares é fundamental para moldar o corpo da planta através de modificações da extensibilidade da parede celular e, finalmente, do crescimento das células vegetais (Löffke et al., 2015; Dünser et al., 2019). A parede celular primária é uma estrutura complexa, composta principalmente por cerca de 90% de polissacarídeos (Albersheim et al., 2010), em que a rede de celulose e hemicelulose está incorporada em uma matriz de proteínas e pectinas. Entre essas proteínas, as expansinas ou endotransglicosilases/hidrolases foram descritas como agentes-chave na regulação da expansão celular, promovendo alterações na rede celulose-hemicelulose (Perrot-Rechenmann, 2010). As pectinas, que podem ser definidas

como polissacarídeos ricos em ácidos galacturônicos (Gal-A), são componentes principais da parede celular primária (até 35% de peso seco). Essas pectinas são compostas de quatro domínios macromoleculares principais, homogalacturonans (HGs), rhamnogalacturonans tipo I (RG-I), rhamnogalacturonans tipo II (RG-II) e xylogalacturonans. Desses domínios macromoleculares, as HGs foram notadamente relatadas em desempenhar um papel central na regulação da viscosidade da matriz da parede celular, controlando assim as interações dos polissacarídeos (Caffall e Mohnem, 2009). Nos últimos anos, as pectinas do tipo HG foram relatadas como atores principais que medeiam alterações nas propriedades mecânicas da parede celular que podem alterar o crescimento das células (Levesque-Tremblay et al., 2015).

Estudos mais recentes indicam que as pectinas do tipo HG são moduladas na parede celular devido à atividade de dois atores principais, a Pectinmetilesterase (PME) e sua forma inativa (PMEI). A PME, assim como as expansinas, são enzimas que atuam diretamente nessas pectinas, com o objetivo de tornar a parede celular mais flexível. Estudos relataram que a superexpressão da PMEI em plantas de *Arabidopsis* retardou o crescimento destas plantas, sugerindo que a importância de PME e PMEI para o desenvolvimento da planta é maior do que se acreditava (Hocq et al. 2017).

Pensando nisso, Hocq et al. (2017) revisitaram a Teoria do Crescimento Ácido, sugerindo um novo mecanismo para o processo de expansão celular. Sabendo que a enzima PME é ativada em pH mais alcalino, foi proposta uma releitura do mecanismo de expansão celular. Quando a célula faz a percepção da auxina, o pH do apoplasto começa a acidificar, devido à ativação das H⁺-ATPases, que por consequência, ativa outras enzimas que começam a atuar no afrouxamento da parede celular. Este processo inicial ocorreria em um pH próximo a 6, sendo conhecido como a etapa lenta da expansão celular. Após isso, os peptídeos RALF se ligariam aos seus receptores FERONIA na membrana plasmática e por consequência inibiriam as H⁺-ATPases, fazendo com que o pH do apoplasto chegue a 7, sendo assim ideal para o funcionamento das PMEs. A ativação destas enzimas culmina na degradação de algumas pectinas, este processo tem como resultado o afrouxamento da parede celular e a liberação de metanol e H⁺, que ao serem liberados no apoplasto voltariam a acidificar o pH, chegando a 4,5, desfazendo o complexo RALF/FERONIA e ativando H⁺-ATPases, que manteriam o

pH ácido. Assim, esta seria a etapa rápida da expansão celular, onde as expansinas e outras enzimas trabalhariam no afrouxamento da parede celular em seu pH ideal.

Segundo o novo mecanismo proposto, estes processos de expansão celular ocorreriam em microdomínios da parede celular, sendo necessária a alcalinização do pH por curtos espaços de tempo para que a expansão celular possa ocorrer em sua totalidade. Todavia, ainda são necessários mais estudos para entender melhor como ocorrem estas etapas, assim como obter dados que comprovem este novo mecanismo.

2.11 Novos mecanismos relacionados ao transporte e sinalização auxínica

A auxina é um fitormônio crucial para as plantas, que regula quase todos os aspectos de seu crescimento e desenvolvimento (Enders e Strader, 2015; Paque e Weijers, 2016). A principal auxina, o ácido indol-3-acético (AIA), é uma molécula simples que consiste em um anel indol e uma cadeia lateral de ácido carboxílico, estruturalmente semelhante ao aminoácido triptofano. Até o momento sabe-se que existem outras três auxinas endógenas de ocorrência natural em plantas, o ácido indol-3-butírico (IBA), ácido 4-cloroindol-3-acético (4-Cl-AIA) e o ácido fenilacético (AFA), que apresentaram atividades semelhantes ao AIA em bioensaios (Simon e Petrášek, 2011). Entretanto, no sentido mais amplo, o fitormônio auxina pode ser compreendido por uma classe de compostos que podem provocar uma resposta análoga à do AIA (Paque e Weijers, 2016).

Dentre as inúmeras atribuições relacionadas à auxina pode-se destacar: o alongamento celular, o crescimento radicular e de raízes laterais, a germinação de sementes e a dominância apical (Gallei et al., 2020). Muitos dos efeitos deste fitormônio na regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas são amplamente determinados pelo efeito coordenado de três processos: o metabolismo, o transporte e a sinalização (Leyser, 2006). Apesar do transporte e sinalização da auxina serem alvos de diversos estudos e o mecanismo descritivo de como estes processos ocorrem já estar muito bem descrito, ainda restam lacunas a serem exploradas (Leyser, 2018).

Sabe-se que a auxina é produzida predominantemente nos meristemas apicais, sendo transportadas de maneira basípeta até os tecidos mais distantes, em um processo conhecido como transporte polar da auxina (Shi et al., 2018). Este

processo é um importante coordenador do crescimento vegetal, logo, qualquer mudança no padrão de transporte deste fitormônio pode provocar mudanças drásticas no comportamento de crescimento das plantas. Apesar disso, como este fitormônio está relacionado com o hábito de crescimento das plantas, permanece pouco elucidado (Silva et al., 2018). Neste sentido, uma família de genes denominada CETS [CENTRORADIALIS (CEN), TERMINAL FLOWER1 (TFL1), SINGLE FLOWER TRUSS (SFT) e SELF-PRUNING (SP)], vem despontando cada vez mais como importantes reguladores do hábito de crescimento das plantas (Silva et al., 2018). Apesar do avanço considerável no entendimento deste aspecto fundamental para as plantas, informações sobre as vias de sinalização ativadas por estes genes permanecem escassas.

Recentemente, Silva et al. (2018) sugeriram que os efeitos do gene SP podem estar relacionados com outros dois atores, o fitormônio auxina e o gene DGT (DIAGEOTROPICA), que é uma ciclofilina A. Nesta proposição, SP e DGT guiam as respostas auxínicas para que o crescimento das plantas ocorra da forma adequada. No entanto, mais estudos são necessários para que se possa entender de fato como SP e DGT regulam as respostas auxínicas nas plantas, principalmente no que tange à sinalização celular. Se feito, pode-se elevar muito o conhecimento sobre como o hábito de crescimento das plantas é regulado e quais os principais genes e fitormônios estão relacionados, sendo de extrema importância para o processo de melhoramento de plantas.

2.12 O hábito de crescimento de tomateiros e o gene SELF-PRUNING

A arquitetura das plantas é uma característica que apresenta grande importância agrícola e influencia diretamente na produtividade. Durante o processo de domesticação e melhoria das culturas agrícolas, a arquitetura desejável das plantas foi a principal direção de seleção para a obtenção de variedades com um melhor rendimento. Esta característica morfológica influencia diretamente no porte das plantas, o que pode facilitar muitas vezes o processo de colheita no campo, sobretudo, uma maior sincronização na maturação dos frutos. Esta arquitetura é resultante, principalmente, de modificações no padrão de ramificação do crescimento lateral, conhecidas como crescimento monopodial e simpodial (Figura 3; Jones et al., 2007).

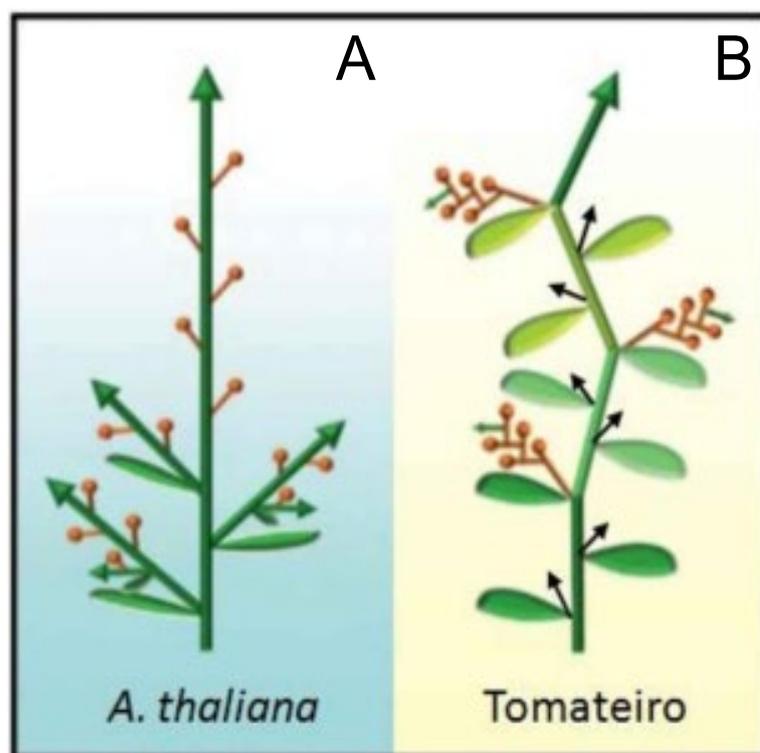


Figura 3. Comparação do hábito de crescimento em *Arabidopsis thaliana* (A - monopodial) e tomateiro (B – simpodial) (modificado de Teo et al., 2014).

Em plantas com o crescimento monopodial, como a *Arabidopsis thaliana*, o meristema apical dá origem às folhas, e devido às sinalizações específicas, ocorre a transição do crescimento vegetativo para o crescimento reprodutivo com o desenvolvimento de uma inflorescência. Durante esta fase, o meristema apical continua a produção de inflorescências e flores isoladas, resultando em um ciclo que consiste nas fases vegetativa e reprodutiva, promovendo o crescimento da planta (Figura 3A) (Pnueli et al., 1998).

Em plantas com crescimento simpodial, como exemplo o tomateiro, após o crescimento de algumas folhas (6 a 12 folhas compostas), o meristema apical caulinar diferencia-se em uma inflorescência terminal e, em seguida, retoma o crescimento vegetativo a partir de um meristema caulinar simpodial, produzido na axila da folha mais jovem (Figura 3B). Após este processo, outras três folhas são produzidas, denominadas unidade simpodial; novamente, o meristema caulinar simpodial reitera o padrão do meristema apical, para terminar em uma segunda inflorescência composta e iniciar a geração de um novo meristema simpodial. Esse hábito de crescimento resulta em uma planta com crescimento indeterminado e com uma produção contínua de inflorescências espaçadas entre três folhas, ou

seja, a fase reprodutiva e a vegetativa se alternam regularmente (Jiang et al., 2013; Teo et al., 2014). Apesar das diferenças entre os sistemas monopodial e simpodial, os genes que mantêm o estado indeterminado permanente do meristema apical em *Arabidopsis* e os genes que controlam a troca vegetativa/reprodutiva regular de meristemas em tomateiros são na verdade membros da mesma família.

O gene TERMINAL FLOWER 1 (TFL1), que é um repressor floral expresso no meristema da inflorescência, previne a expressão de genes da identidade meristemática floral, mantendo o desenvolvimento vegetativo de *A. thaliana* (Iwata et al., 2012). Mutações que acarretem uma menor expressão deste gene resultam em um florescimento precoce (Bradley et al., 1997; Ohshima et al., 1997).

O gene SELF-PRUNING (SP) do tomate também pertence à mesma família de genes (Pnueli et al., 1998). Uma mutação recessiva em SP (Yeager, 1927) confere o término do desenvolvimento vegetativo, dependente da idade, das três unidades nodais, de modo que, eventualmente, o crescimento da unidade simpodial é terminado por duas inflorescências consecutivas. Diferentemente do TFL1, o SP não afeta a arquitetura da inflorescência ou mesmo o tempo da primeira inflorescência. No entanto, ao conferir o término precoce dos meristemas vegetativos na parte aérea, o seu efeito geral na arquitetura da planta é altamente substancial.

A superexpressão do SP resulta em um número crescente de folhas entre inflorescências e um aumento da frondosidade da própria inflorescência (Pnueli et al., 1998). Assim, como o TFL1, o SP é necessário para manter, embora de modo cíclico, o estado vegetativo do meristema apical. Já o silenciamento do gene SP promove o fim do desenvolvimento simpodial, apresentando uma planta com um hábito de crescimento do tipo determinado, que resulta em uma aparência mais robusta (Pnueli et al., 2001). Aparentemente, este processo ocorre através de uma sinalização do fitormônio auxina guiado conjuntamente com o gene DIAGEOTROPICA (DGT); mas, ainda é difícil definir como este processo ocorre, uma vez que o mecanismo de ação ainda não foi descrito (Silva et al., 2018).

2.13 O gene DGT controla a emissão de raízes laterais

O gene DGT codifica uma ciclofilina, LeCYP1, que é uma proteína envolvida na sinalização auxínica. Sabe-se que plantas mutantes com menor taxa de expressão do gene DGT exibem fenótipos pleiotrópicos, incluindo a redução da

dominância apical e das respostas gravitrópicas, folhas hiponásticas, retardo no desenvolvimento vascular, níveis elevados de antocianina e clorofila, menor atividade das bombas de H^+ de membrana plasmática em resposta à auxina e ausência de raízes laterais. Apesar destas plantas serem conhecidas por apresentarem baixa sensibilidade à auxina, os níveis de produção e transporte desse fitormônio são semelhantes às plantas com expressão normalizada de DGT (Rice e Lomax, 2000; Zandonadi et al., 2016).

Sabe-se que a expressão do gene DGT é fundamental para que o transporte polar de auxina (TPA) ocorra normalmente, sendo esta ação essencial para a formação de raízes laterais nas plantas (Daniel et al., 1989; Muday et al., 1995; Ivanchenko et al., 2015). Logo, em plantas DGT, o TPA ocorre de maneira anormal, havendo aumento do nível de auxina e distribuição diferenciada ao longo da ponta da raiz nestas plantas (Ivanchenko et al., 2006). Embora em plantas DGT uma quantidade maior de auxina se mova das partes aéreas para a raiz, este fitormônio é distribuído de forma anormal, comprometendo suas repostas e promovendo defeitos quanto à iniciação da emissão de raízes laterais. Acredita-se que isso se deva a uma alteração na localização das proteínas PIN na membrana plasmática das células destas plantas, fazendo com que o transporte lateral da auxina fique comprometido (Ivanchenko et al., 2006; Retzer e Luschnig, 2015).

Segundo Spiegelman et al. (2017), as ciclofilinas são transportadas da parte aérea para a raiz, guiando as respostas da auxina para a emissão de raízes laterais, atuando como um coordenador deste processo. Apesar destes estudos já terem demonstrado a importância destas proteínas para as repostas da auxina nas raízes, ainda existem poucos dados em relação à parte aérea. Como citado anteriormente, Silva et al. (2018) demonstraram que existe uma relação entre o gene SP e DGT nas respostas deste fitormônio no desenvolvimento da parte aérea, regulando as transições entre meristema apical e meristema de florescimento. Logo, as ciclofilinas parecem atuar como transportadores de informação durante a sinalização auxínica, porém mais estudos são necessários para que se comprove esta afirmativa, principalmente para entender os mecanismos celulares das plantas que são ativados em resposta a estas proteínas.

3. REFERÊNCIAS

Albersheim, P.; Darvill, A.; Roberts, K.; Sederoff, R. & Staehelin, A. (2010). *Plant cell walls*. New York: Garland Sciences, 430 p.

Amano, Y.; Tsubouchi, H.; Shinohara, H.; Ogawa, M. & Matsubayashi, Y. (2007). Tyrosine-sulfated glycopeptide involved in cellular proliferation and expansion in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(46): 18333-18338.

Atkinson, N. J.; Lilley, C. J. & Urwin, P. E. (2013). Identification of genes involved in the response of *Arabidopsis* to simultaneous biotic and abiotic stresses. *Plant Physiology*, 162(4): 2028-2041.

Bergonci, T.; Ribeiro, B.; Ceciliato, P. H. O.; Guerreiro-Abad, J. C.; Silvafilho, M. C. & Moura, D. S. (2014). *Arabidopsis thaliana* RALF1 opposes brassinosteroid effects on root cell elongation and lateral root formation. *Journal of Experimental Botany*, 65: 2219-2230.

Bradley, D.; Carpenter, R.; Copsey, L.; Vincent, C.; Rothstein, S. & Coen, E. (1996). Control of inflorescence architecture in *Antirrhinum*. *Nature*, 379: 791-797.

- Bradley, D.; Ratcliffe, O.; Vincent, C.; Carpenter, R. & Coen, E. (1997). Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*. *Science*, 275: 80-83.
- Brand, U.; Fletcher, J. C.; Hobe, M.; Meyerowitz, E. M. & Simon, R. (2000). Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science*, 289(5479): 617-619.
- Caffall, K. H. & Mohnen, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344(14): 1879-1900.
- Chen, X.; Grandont, L.; Li, H.; Hauschild, R.; Paque, S.; Abuzeineh, A. & Friml, J. (2014). Inhibition of cell expansion by rapid ABP1-mediated auxin effect on microtubules. *Nature*, 516(7529): 90-93.
- Chevalier, E.; Loubert-Hudon, A. & Matton, D. P. (2013). ScRALF3, a secreted RALF-like peptide involved in cell–cell communication between the sporophyte and the female gametophyte in a solanaceous species. *The Plant Journal*, 73(6): 1019-1033.
- Combiér, J. P.; Küster, H.; Journet, E. P.; Hohnjec, N.; Gamas, P. & Niebel, A. (2008). Evidence for the involvement in nodulation of the two small putative regulatory peptide-encoding genes MtRALFL1 and MtDVL1. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(8): 1118-1127.
- Cosgrove, D. J. (2000). Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*, 407(6802): 321-326.
- Covey, P. A.; Subbaiah, C. C.; Parsons, R. L.; Pearce, G.; Lay, F. T.; Anderson, M. A.; Ryan, C. A.; & Bedinger, P. A. (2010). A pollen-specific RALF from tomato that regulates pollen tube elongation. *Plant Physiology*, 153(2): 703-715.
- Czyzewicz, N.; Beeckman, T & De Smet, I. (2013). Message in a bottle: small signalling peptide outputs during growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 64(17): 5281-5296.
- Daniel, S. G.; Rayle, D. L. & Cleland, R. E. (1989). Auxin of physiology of the tomato mutant *diageotropica*. *Plant Physiology*, 91: 804-807.

Dharmasiri, N.; Dharmasiri, S. & Estelle, M. (2005). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, 435(7041): 441-445.

Dong, X.; Mindrinos, M.; Davis, K. R. & Ausubel, F. M. (1991). Induction of *Arabidopsis* defense genes by virulent and avirulent *Pseudomonas syringae* strains and by a cloned avirulence gene. *The Plant Cell*, 3(1): 61-72.

Dünser, K. & Kleine-Vehn, J. (2015). Differential growth regulation in plants - the acid growth balloon theory. *Current Opinion in Plant Biology*, 28: 55-59.

Dünser, K.; Gupta, S.; Herger, A.; Feraru, M. I.; Ringli, C. & Kleine-Vehn, J. (2019). Extracellular matrix sensing by FERONIA and leucine-rich repeat extensins controls vacuolar expansion during cellular elongation in *Arabidopsis thaliana*. *The EMBO Journal*, 38(7): e100353.

Eisenhut, M.; Roell, M. S. & Weber, A. P. (2019). Mechanistic understanding of photorespiration paves the way to a new green revolution. *New Phytologist*, 223(4): 1762-1769.

Enders, T. A. & Strader, L. C. (2015). Auxin activity: Past, present, and future. *American Journal of Botany*, 102: 180-196.

Evenson, R. E. & Gollin, D. (2003). Assessing the impact of the Green Revolution, 1960 to 2000. *Science*, 300(5620): 758-762.

Gallei, M.; Luschnig, C. & Friml, J. (2020). Auxin signalling in growth: Schrödinger's cat out of the bag. *Current Opinion in Plant Biology*, 53: 43-49.

Gao, Y.; Zhang, Y.; Zhang, D.; Dai, X.; Estelle, M. & Zhao, Y. (2015). Auxin binding protein 1 (ABP1) is not required for either auxin signaling or *Arabidopsis* development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(7): 2275-2280.

Germain, H.; Chevalier, E.; Caron, S. & Matton, D. P. (2005). Characterization of five RALF-like genes from *Solanum chacoense* provides support for a developmental role in plants. *Planta*, 220(3): 447-454.

Hacham, Y.; Holland, N.; Butterfield, C.; Ubeda-Tomas, S.; Bennett, M. J.; Chory, J. & Savaldi-Goldstein, S. (2011). Brassinosteroid perception in the epidermis controls root meristem size. *Development*, 138(5): 839-848.

Hager, A.; Menzel, H. & Krauss, A. (1971). Experiments and hypothesis concerning the primary action of auxin in elongation growth. *Planta*, 100: 47-75.

Hager, A. (2003). Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *Journal of Plant Research*, 116(6): 483-505.

Hara, K.; Kajita, R.; Torii, K. U.; Bergmann, D. C. & Kakimoto, T. (2007). The secretory peptide gene EPF1 enforces the stomatal one-cell-spacing rule. *Genes & Development*, 21(14): 1720-1725.

Hardtke, C. S.; Dorcey, E.; Osmont, K. S. & Sibout, R. (2007). Phytohormone collaboration: zooming in on auxin-brassinosteroid interactions. *Trends Cell Biology*, 17: 485-492.

Haruta, M. & Constabel, C. P. (2003). Rapid alkalization factors in poplar cell cultures. Peptide isolation, cDNA cloning, and differential expression in leaves and methyl jasmonate-treated cells. *Plant Physiology*, 131(2): 814-823.

Haruta, M.; Monshausen, G.; Gilroy, S. & Sussman, M. R. (2008). A cytoplasmic Ca²⁺ functional assay for identifying and purifying endogenous cell signaling peptides in *Arabidopsis* seedlings: identification of AtRALF1 peptide. *Biochemistry*, 47: 6311-6321.

Haruta, M.; Sabat, G.; Stecker, K.; Minkoff, B. B. & Sussman, M. R. (2014). A peptide hormone and its receptor protein kinase regulate plant cell expansion. *Science*, 343(6169): 408-411.

Haruta, M.; Gaddameedi, V.; Burch, H.; Fernandez, D. & Sussman, M. R. (2018). Comparison of the effects of a kinase-dead mutation of FERONIA on ovule fertilization and root growth of *Arabidopsis*. *FEBS Letters*, 592(14): 2395-2402.

Hedden, P. (2003). The genes of the Green Revolution. *TRENDS in Genetics*, 19(1): 5-9.

Hirakawa, Y.; Shinohara, H.; Kondo, Y.; Inoue, A.; Nakanomyo, I.; Ogawa, M. & Fukuda, H. (2008). Non-cell-autonomous control of vascular stem cell fate by a CLE peptide/receptor system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(39): 15208-15213.

Hocq, L.; Pelloux, J. & Lefebvre, V. (2017). Connecting homogalacturonan-type pectin remodeling to acid growth. *Trends in Plant Science*, 22(1): 20-29.

Hunt, L.; Bailey, K. J. & Gray, J. E. (2010). The signalling peptide EPFL9 is a positive regulator of stomatal development. *New Phytologist*, 186(3): 609-614.

Ivanchenko, M. G.; Coffeen, W. C.; Lomax, T. L. & Dubrovsky, J. G. (2006). Mutations in the diageotropica (dgt) gene uncouple patterned cell division during lateral root initiation from proliferative cell division in the pericycle. *The Plant Journal*, 46(3): 436-447.

Ivanchenko, M. G.; Zhu, J.; Wang, B.; Medvecká, E.; Du, Y.; Azzarello, E.; Mancuso, S.; Megraw, M.; Filichkin, S.; Dubrovsky, J. G.; Friml, J. & Geisler, M. (2015). The cyclophilin A DIAGEOTROPICA gene affects auxin transport in both root and shoot to control lateral root formation. *Development*, 142(4): 712-721.

Iwata, H.; Gaston, A.; Remay, A.; Thouroude, T.; Jeauffre, J.; Kawamura, K.; Oyant, L. H. S.; Araki, T.; Denoyes, B. & Foucher, F. (2012). The *TFL1* homologue *KSN* is a regulator of continuous flowering in rose and strawberry. *The Plant Journal*, 69: 116-125.

Jiang, K.; Liberatore, K. L.; Park, S. J.; Alvarez, J. P. & Lippman, Z. B. (2013). Tomato yield heterosis is triggered by a dosage sensitivity of the florigen pathway that fine-tunes shoot architecture. *PLoS Genetics*, 9: e1004043.

Jones, C. M.; Rick, C. M.; Adams, D.; Jernstedt, J. & Chetelat, R. T. (2007). Genealogy and fine mapping of *obscura venosa*, a gene affecting the distribution of chloroplasts in leaf veins, and evidence of selection during breeding of tomatoes (*Lycopersicon esculentum*; Solanaceae). *American Journal of Botany*, 94(6): 935-947.

Kepinski, S. & Leyser, O. (2005). The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, 435: 446-451.

Kondo, T., Sawa, S.; Kinoshita, A.; Mizuno, S.; Kakimoto, T.; Fukuda, H. & Sakagami, Y. (2006). A plant peptide encoded by CLV3 identified by in situ MALDI-TOF MS analysis. *Science*, 313(5788): 845-848.

Lease, K. A. & Walker, J. C. (2006). The *Arabidopsis* unannotated secreted peptide database, a resource for plant peptidomics. *Plant Physiology*, 142(3): 831-838.

Levesque-Tremblay, G.; Pelloux, J.; Braybrook, S. A. & Müller, K. (2015). Tuning of pectin methylesterification: consequences for cell wall biomechanics and development. *Planta*, 242(4): 791-811.

Leyser, O. (2006). Dynamic integration of auxin transport and signalling. *Current Biology*, 16: 424-433.

Leyser, O. (2018). Auxin signaling. *Plant Physiology*, 176(1): 465-479.

Löfke, C.; Dünser, K.; Scheuring, D. & Kleine-Vehn, J. (2015). Auxin regulates SNARE-dependent vacuolar morphology restricting cell size. *Elife*, 4: e05868.

Minami, A.; Takahashi, K.; Inoue, S. I.; Tada, Y. & Kinoshita, T. (2019). Brassinosteroid induces phosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase during hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 60(5): 935-944.

Mingossi, F. B.; Matos, J. L.; Rizzato, A. P.; Medeiros, A. H.; Falco, M. C.; Silva-Filho, M. C. & Moura, D. S. (2010). SacRALF1, a peptide signal from the grass sugarcane (*Saccharum* spp.), is potentially involved in the regulation of tissue expansion. *Plant Molecular Biology*, 73(3): 271-281.

Mitchell, J. W.; Mandava, N.; Worley, J. F. & Plimner, J. R. (1970). Brassins-a new family of plant hormones from rape pollen. *Nature*, 225: 1065-1066.

Morato Do Canto, A.; Ceciliato, P. H.; Ribeiro, B.; Ortiz Morea, F. A.; Franco Garcia, A. A.; Silva-Filho, M. C. & Moura, D. S. (2014). Biological activity of nine recombinant AtRALF peptides: implications for their perception and function in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 75: 45-54.

Muday, G. K., Lomax, T. L. & Rayle, D. L. (1995). Characterization of the growth and auxin physiology of roots of the tomato mutant, diageotropica. *Planta*, 195(4): 548-553.

Murphy, E. & De Smet, I. (2014). Understanding the RALF family: a tale of many species. *Trends in Plant Science*, 19(10): 664-671.

Murphy, E.; Smith, S. & De Smet, I. (2012). Small signaling peptides in *Arabidopsis* development: how cells communicate over a short distance. *The Plant Cell*, 24(8): 3198-3217.

Ohshima, S.; Murata, M.; Sakamoto, W.; Ogura, Y. & Motoyoshi, F. (1997). Cloning and molecular analysis of the *Arabidopsis* gene terminal flower 1. *Molecular General Genetics*, 254(2): 186-194.

Ohyama, K.; Ogawa, M. & Matsubayashi, Y. (2008). Identification of a biologically active, small, secreted peptide in *Arabidopsis* by in silico gene screening, followed by LC-MS-based structure analysis. *The Plant Journal*, 55(1): 152-160.

Paque, S. & Weijers, D. (2016). Q&A: Auxin: the plant molecule that influences almost anything. *BMC Biology*, 14(67): 1-5.

Pearce, G. & Ryan, C. A. (2003). Systemic signaling in tomato plants for defense against herbivores. Isolation and characterization of three novel defense-signaling glycopeptide hormones coded in a single precursor gene. *Journal of Biological Chemistry*, 278(32): 30044-30050.

Pearce, G.; Moura, D. S.; Stratmann, J. & Ryan, C. A. (2001). RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 12843-12847.

Perrot-Rechenmann, C. (2010). Cellular responses to auxin: division versus expansion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(5): a001446.

Pnueli, L.; Carmel-Goren, L.; Hareven, D.; Gutfinger, T.; Alvarez, J.; Ganai, M.; Zamir, D. & Lifschitz, E. (1998). The *SELF-PRUNING* gene of tomato regulates

vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of *CEN* and *TFL1*. *Development*, 125: 1979-1989.

Pnueli, L.; Gutfinger, T.; Hareven, D.; Ben-Naim, O.; Ron, N.; Adir, N. & Lifschitz, E. (2001). Tomato SP-interacting proteins define a conserved signaling system that regulates shoot architecture and flowering. *Plant Cell*, 13: 2687-2702.

Rayle, D. L. & Cleland, R. (1970). Enhancement of wall loosening and elongation by acid solutions. *Plant Physiology*, 46: 250-253.

Rayle, D. L. & Cleland, R. E. (1992). The Acid Growth Theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology*, 99(4): 1271-1274.

Ren, H.; Park, M. Y.; Spartz, A. K.; Wong, J. H. & Gray, W. M. (2018). A subset of plasma membrane-localized PP2C. D phosphatases negatively regulate SAUR-mediated cell expansion in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics*, 14(6): e1007455.

Retzer, K. & Luschnig, C. (2015). DIAGEOTROPICA: news from the auxin swamp. *Trends in Plant Science*, 20(6): 328-329.

Rice, M. S. & Lomax, T. L. (2000). The auxin-resistant diageotropica mutant of tomato responds to gravity via an auxin-mediated pathway. *Planta*, 210(6): 906-913.

Sampedro, J. & Cosgrove, D. J. (2005). The expansin superfamily. *Genome Biology*, 6(12): 242.

Sattelmacher, B. (2001). The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytologist*, 149: 167-192.

Sauer, M. & Kleine-Vehn, J. (2011). Auxin binding protein1: the outsider. *The Plant Cell*, 23(6): 2033-2043.

Savaldi-Goldstein, S.; Peto, C. & Chory, J. (2007). The epidermis both drives and restricts plant shoot growth. *Nature*, 446(7132): 199-202.

Scheer, J. M.; Pearce, G. & Ryan, C. A. (2005). LeRALF, a plant peptide that regulates root growth and development, specifically binds to 25 and 120 kDa cell surface membrane proteins of *Lycopersicon peruvianum*. *Planta*, 221(5): 667-674.

Shani, E.; Weinstain, R.; Zhang, Y.; Castillejo, C.; Kaiserli, E.; Chory, J.; Tsien, R. Y. & Estelle, M. (2013). Gibberellins accumulate in the elongating endodermal cells of *Arabidopsis* root. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(12): 4834-4839.

Shi, B.; Guo, X.; Wang, Y.; Xiong, Y.; Wang, J.; Hayashi, K. I.; Lei, J.; Zhang, L. & Jiao, Y. (2018). Feedback from lateral organs controls shoot apical meristem growth by modulating auxin transport. *Developmental Cell*, 44(2): 204-216.

Shiu, S. & Bleecker, A. B. (2001). Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(19): 10763-10768.

Silva, W. B.; Vicente, M. H.; Robledo, J. M.; Reartes, D. S.; Ferrari, R. C.; Bianchetti, R.; Araújo, W. L.; Freschi, L.; Peres, L. E. P. & Zsögön, A. (2018). SELF-PRUNING acts synergistically with DIAGEOTROPICA to guide auxin responses and proper growth form. *Plant Physiology*, 176(4): 2904-2916.

Simon, S. & Petrásek, J. 2011. Why plants need more than one type of auxin. *Plant Science*, 180: 454-460.

Spartz, A. K.; Ren, H.; Park, M. Y.; Grandt, K. N.; Lee, S. H.; Murphy, A. S. & Gray, W. M. (2014). SAUR inhibition of PP2C-D phosphatases activates plasma membrane H⁺-ATPases to promote cell expansion in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 26(5): 2129-2142.

Spartz, A. K.; Lor, V. S.; Ren, H.; Olszewski, N. E.; Miller, N. D.; Wu, G.; Spalding, E. P. & Gray, W. M. (2017). Constitutive expression of *Arabidopsis* SMALL AUXIN UP RNA19 (SAUR19) in tomato confers auxin-independent hypocotyl elongation. *Plant Physiology*, 173(2): 1453-1462.

Spiegelman, Z.; Omer, S.; Mansfeld, B. N. & Wolf, S. (2017). Function of Cyclophilin1 as a long-distance signal molecule in the phloem of tomato plants. *Journal of Experimental Botany*, 68(5): 953-964.

Srivastava, R.; Liu, J. X.; Guo, H.; Yin, Y. & Howell, S. H. (2009). Regulation and processing of a plant peptide hormone, AtRALF23, in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 59, 6, 930-939.

Stenvik, G. E.; Tandstad, N. M.; Guo, Y.; Shi, C. L.; Kristiansen, W.; Holmgren, A.; Clark, S. E.; Aalen, R. B. & Butenko, M. A. (2008). The EPIP peptide of INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION is sufficient to induce abscission in *Arabidopsis* through the receptor-like kinases HAESA and HAESA-LIKE2. *The Plant Cell*, 20(7): 1805-1817.

Stratmann, J.; Scheer, J. & Ryan, C. A. (2000). Suramin inhibits initiation of defense signaling by systemin, chitosan, and a β -glucan elicitor in suspension-cultured *Lycopersicon peruvianum* cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16): 8862-8867.

Swarup, R.; Kramer, E. M.; Perry, P.; Knox, K.; Leyser, H. O.; Haseloff, J. & Bennett, M. J. (2005). Root gravitropism requires lateral root cap and epidermal cells for transport and response to a mobile auxin signal. *Nature Cell Biology*, 7(11): 1057-1065.

Takahashi, K.; Hayashi, K. & Kinoshita, T. (2012). Auxin activates the plasma membrane H^+ -ATPase by phosphorylation during hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 159(2): 632-641.

Teo, Z. W. N.; Song, S.; Wang, Y. Q.; Liu, J. & Yu, H. (2014). New insights into the regulation of inflorescence architecture. *Trends in Plant Science*, 19(3): 158-165.

Tomas, A.; Paque, S.; Stierlé, V.; Quettier, A. L.; Muller, P.; Lechner, E. & Perrot-Rechenmann, C. (2013). Auxin-Binding Protein 1 is a negative regulator of the SCFTIR1/AFB pathway. *Nature Communications*, 4(2496): 1-9.

Ubeda-Tomás, S.; Federici, F.; Casimiro,.; Beemster, G. T.; Bhalerao, R.; Swarup, R. & Bennett, M. J. (2009). Gibberellin signaling in the endodermis controls *Arabidopsis* root meristem size. *Current Biology*, 19(14): 1194-1199.

Ubeda-Tomás, S.; Swarup, R.; Coates, J.; Swarup, K.; Laplaze, L.; Beemster, G. T. S.; Hedden, P.; Bhalerao, R. & Bennett, M. J. (2008). Root growth in *Arabidopsis* requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis. *Nature Cell Biology*, 10(5): 625-628.

Vanstraelen, M. & Benková, E. (2012). Hormonal interactions in the regulation of plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28: 463-487.

Yang, S. L.; Xie, L. F.; Mao, H. Z.; San Pua, C.; Yang, W. C.; Jiang, L.; Sundaresan, V. & Ye, D. (2003). TAPETUM DETERMINANT1 is required for cell specialization in the *Arabidopsis* anther. *The Plant Cell*, 15(12): 2792-2804.

Yeager, A. F. (1927). Determinate growth in the tomato. *Journal of Heredity*, 18: 263-265.

Zandonadi, D. B.; Santos, M. P.; Caixeta, L. S.; Marinho, E. B.; Peres, L. E. P. & Façanha, A. R. (2016). Plant proton pumps as markers of biostimulant action. *Scientia Agricola*, 73(1): 24-28.

4. TRABALHOS

4.1 SINALIZAÇÃO DO PEPTÍDEO RALF1 SUBJACENTE À MODULAÇÃO DOS FLUXOS DE H⁺ DE CÉLULAS EM EXPANSÃO NA ZONA DE ALONGAMENTO DE RAÍZES

RESUMO

Os peptídeos Rapid Alkalinization Factor (RALF) desempenham um papel importante durante o crescimento das células vegetais, mas, apesar de muitos avanços moleculares, o mecanismo de ação subjacente permanece incerto. Aqui, foi investigado como o fluxo H⁺ de células da zona de alongamento radicular é modulado pelos peptídeos AtRALF1 e suas consequências no crescimento radicular de *Arabidopsis thaliana*. O fluxo de prótons e o pH foram medidos diretamente nas superfícies das células através de uma técnica não invasiva com uso de eletrodos vibráteis seletivos a íons (SIET) e as alterações estruturais das

células verificadas por microscopia de transmissão. Os resultados do presente estudo indicaram que a sinalização de AtRALF1 promove uma inibição transitória dos fluxos H^+ da membrana plasmática concomitantemente com um aumento do pH rizosférico, localizado especificamente na zona de alongamento das raízes. Os mutantes Fer-4 de *A. thaliana* (com silenciamento do receptor do peptídeo FERONIA) e os transformantes p35s:AtRALF1 (superexpressão do peptídeo RALF1) se mostraram insensíveis à aplicação exógena do peptídeo, não exibindo alterações nos fluxos de H^+ e na espessura da parede celular indicativas de um efeito inibitório dependente de H^+ -ATPase de membrana plasmática no crescimento radicular. Este estudo fornece evidências convincentes sobre a regulação de bombas de H^+ por peptídeos RALF, sendo possível vislumbrar um novo personagem dentro do mecanismo de crescimento ácido do desenvolvimento de células vegetais.

Palavras-chave: H^+ -ATPase de membrana plasmática, Teoria do Crescimento Ácido, técnica de eletrodos vibráteis seletivos a íons, Rapid Alkalinization Factor, Transporte de H^+ , pH apoplástico.

ABSTRACT

Rapid Alkalinizing Factor (RALF) peptides play an important role during plant cell growth, but despite many molecular advances, the underlying mechanism of action remains unclear. Here, we investigate how the H^+ flux of cells of the root elongation zone is modulated by the AtRALF1 peptide, and its consequences on primary root growth of *Arabidopsis thaliana*. Proton flux and pH were directly probed at living cell surfaces by a non-invasive selective ion electrode technique (SIET) and the cell structural changes verified by transmission microscopy. Our results indicate that AtRALF1 signaling promotes a transient inhibition of the plasma membrane H^+ fluxes concomitantly with an increasing rhizospheric pH specifically localized in the root elongation zone. Fer-4 mutants of *A. thaliana* (null mutation of the FERONIA peptide receptor) and the transformants p35s: AtRALF1 (Over-expression of the

RALF1 peptide), were insensitive to exogenous application of the peptide, exhibiting changes in the H⁺ fluxes and cell wall thickness indicative of a P-type H⁺-ATPase-dependent inhibitory effect on the root growth. This study provides compelling evidence on the regulation of H⁺ pumps by RALF peptides, shading new light on the acid growth mechanism of plant cell development.

Keywords: P-type ATPase, Acid Growth Theory, Scanning ion-selective electrode technique, Rapid Alkalinization Factor, H⁺ transport, apoplastic pH.

INTRODUÇÃO

Os peptídeos tipo hormonais são pequenas proteínas que assim como os fitormônios realizam a sinalização célula-célula, ocorrem em todo o reino vegetal e atuam tanto no desenvolvimento, fisiologia e defesa das plantas (Murphy et al., 2012; Albert, 2013; Ghorbani et al., 2014). Os peptídeos RALF (Rapid Alkalinization Factor) foram descobertos em ensaio de alcalinização de moléculas extraídas de folha de tabaco, onde buscava-se peptídeos relacionados a respostas sistêmicas, porém devido à sua capacidade de promover uma rápida alcalinização do apoplasto e inibição do crescimento radicular, foi desconsiderado sistêmico (Pearce et al., 2001).

Dentre as atividades biológicas que estão relacionadas aos peptídeos RALF até o momento pode-se destacar: inibição do crescimento de raiz primária, inibição do alongamento de hipocótilo, alcalinização do meio extracelular, mobilização de cálcio, indução de uma quinase ativada por mitógeno (MAPK) e inibição do crescimento de tubo polínico (Pearce et al., 2001; Haruta et al., 2008; Matos et al., 2008; Mingossi et al., 2009; Covey et al 2010). O peptídeo AtRALF1, uma isoforma encontrada especificamente em raízes de *Arabidopsis*, também induz genes envolvidos com a via de sinalização dos brassinosteroides, um fitormônio conhecido por promover o crescimento vegetal (Bergonci et al., 2014). Há poucos anos foi identificado um dos receptores do peptídeo AtRALF1, FERONIA, uma proteína de membrana com atividade tipo quinase no domínio intracelular (Haruta et al., 2014).

Quando o peptídeo AtRALF1 se liga ao seu receptor FERONIA ocorre uma cascata de sinalização que culmina na fosforilação da H⁺-ATPase (AHA2) de membrana plasmática, inibindo o transporte de H⁺ através da membrana, levando a uma alcalinização do meio extracelular. Esta alcalinização é apontada como parte do mecanismo responsável pela inibição do crescimento da raiz primária em resposta a este peptídeo, antagonizando a acidificação do meio extracelular, condição necessária para a expansão celular, de acordo com a clássica teoria do crescimento ácido (Rayle e Cleland, 1992).

Recentemente, Hocq et al. (2017) propuseram um novo mecanismo para o processo de expansão celular, no qual a alcalinização do apoplasto parece ser uma importante etapa na transição da fase lenta para a rápida expansão celular. Outros estudos mostraram recentemente que o receptor de membrana de FERONIA é importante para o processo de expansão celular (Dünser et al., 2019; Herger et al., 2019a; 2019b). No entanto, apesar das evidências, o papel da H⁺-ATPase permanece desconhecido nesse processo. Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar o efeito dos peptídeos AtRALF1 na modulação dos fluxos de H⁺ na zona de alongamento da raiz de *Arabidopsis*, em correlação com o mecanismo de crescimento ácido.

MATERIAL E MÉTODOS

Material experimental e condição de crescimento das plantas

Neste experimento foram utilizadas sementes de *Arabidopsis thaliana* dos ecótipos: Col-0 (controle), Fer-4 (com silenciamento do gene que expressa a proteína FERONIA) e p35s:AtRALF1 (com superexpressão do peptídeo AtRALF1).

As sementes foram esterilizadas superficialmente com etanol a 70% por 3 min, hipoclorito de sódio a 1% (v / v) por 5 min, lavados com cinco trocas de água estéril e semeados em placas de cultura de células de seis poços contendo 3 mL de meio Murashige e Skoog (Barbez et al., 2017) composto por: 2,16 g de sais MS (sigma), 4,7 mM de Mes por litro. O pH foi ajustado para 5,5 a 5,6 e as placas de cultura de células foram incubadas por 10 dias em uma câmara de crescimento (16/8 h claro/escuro, (350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 2 °C).

Após 10 dias de crescimento, os fluxos de H⁺ foram medidos usando o sistema de sonda vibrátil seletiva a íons na zona de alongamento das raízes principais de *A. thaliana*, tratados ou não com peptídeo AtRALF1. A concentração de 5 μM foi selecionada a partir de uma curva de dose resposta, como demonstrado na Figura 1. Já a concentração de AtPEP1 usada no experimento foi escolhida com base na literatura (Gully et al., 2015).

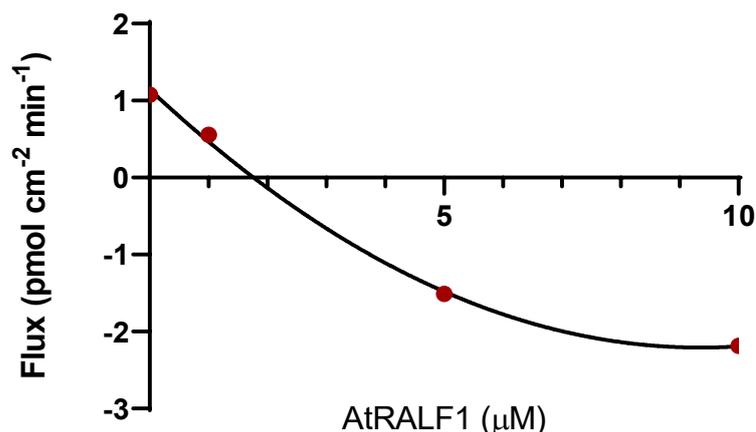


Figura 1. Efeito de diferentes concentrações do peptídeo AtRALF1 (0, 1, 5 e 10 µM) sobre os fluxos de H⁺ da zona de alongamento radiculares de plântulas de *A. thaliana* (Col-0). Aquisição de dados 5 min após a adição do peptídeo (n= 50).

Medição dos fluxos de H⁺

Neste estudo, foram analisadas duas condições: (1) plantas Col-0 tratadas ou não com peptídeos AtRALF1 (5µM) e AtPEP1 (0,1µM), (2) ecótipos de *A. thaliana* (Col-0, Fer4 e p35s: AtRALF1) tratado ou não com o peptídeo AtRALF1 (5 µM).

Uma descrição detalhada do procedimento experimental da técnica de eletrodos vibráteis íons-seletivos, utilizada neste estudo, já foi bem descrita em estudos anteriores (Feijó et al., 1999; Zonia et al., 2002; Ramos et al., 2009).

As plantas de *Arabidopsis thaliana* foram colocadas em placas de Petri de plástico (52 × 58 mm), preenchidas com 3 mL de meio Murashige e Skoog 1/2 F. Os microeletrodos vibráteis ion-específicos foram produzidos como descrito por Feijó et al. (1999). Estes foram produzidos de microcapilares de borossilicato com diâmetro exterior de 1,5 mm e 1,12 mm de diâmetro interior (www.sutter.com), 30 utilizando o aparelho Puller Flaming Brown, Sutter P-98 (Sutter Instruments, Novato, CA). Posteriormente, os microeletrodos foram colocados sob um suporte de vidro coberto por um becker de vidro (1 L) e secos em estufa a 250 °C por 3 h. Após este período, foi realizada a silanização dos microcapilares, por exposição a vapor de N, N-dimetiltrimetilsilamina (C₅H₁₅NSi, Fluka 41716), ainda na estufa por 20 min e deixados para secar por mais 3 h, na mesma temperatura. Após a vaporização com silano (C₅H₁₅NSi), os microeletrodos foram preenchidos com uma solução de eletrólito (15 mM KCl e 40 mM KH₂PO₄, pH 6,0, para H⁺)

correspondente a uma coluna de 1,5 mm do eletrodo. Após esta etapa, os eletrodos foram preenchidos na ponta, com uma coluna de 20 a 25 μm do respectivo coquetel seletivo, contendo os ionóforos respectivos aos íons estudados (Fluka, Milwaukee, WI). Para estabelecer o contato elétrico com o meio, foi inserido na extremidade basal do microeletrodo, um suporte com um eletrodo de Ag/AgCl (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA)

O eletrodo de referência foi uma referência seca (DRIREF-2, World Precision Instruments), inserido no meio de banho da amostra. Os sinais foram medidos pelo amplificador (www.applicableelectronics.com), sendo a vibração e o posicionamento do eletrodo obtidos através de motores posicionais (steppermotors), os quais permitem um movimento tridimensional. O controle dos motores, a aquisição de dados e o seu processamento preliminar foram ajustados no software ASET (Science Wares [East Falmouth, MA] - www.sciencewares.com). A calibração dos eletrodos foi realizada por medição do potencial (mV) registrado em três soluções contendo o íon em estudo, com concentração conhecida: 0,1 mM, 1 mM e 10 mM; dado que as concentrações abrangem as condições dos meios utilizados.

A coleta dos dados da microsonda vibrátil seletiva, foi realizada pelo software ASET, que fornece a informação necessária para calcular o fluxo iônico em um determinado ponto $[x, y, z]$ do espaço, por meio da lei de Fick ($J = D (dc/dx)$). O coeficiente de difusão (D) é um valor tabelado para cada íon (de acordo com Handbook of Chemistry and Physics, Chemical Rubber Co.). A diferença espacial (dx) resulta do cálculo da distância entre os dois pontos em que foram realizadas as medições das concentrações para cálculo do fluxo (10 μm). A diferença de concentração (dc) é um vetor que varia ao longo do ensaio. Em cada ponto, a concentração pode ser calculada a partir do valor de mV registrado no dado ponto e da equação previamente determinada para o ionóforo durante o processo de calibração.

Determinação da espessura da parede celular

A espessura das paredes celulares foi medida em micrografias obtidas através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Pequenos segmentos de folhas de *Arabidopsis* sp. foram fixados em glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% e tampão fosfato 0,05 M por 24 h. Após este período, o material foi lavado em mesmo tampão, pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% e

lavado novamente em TPO4. Após a fixação, o material foi lavado em TPO4 por 30min, pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% (OsO₄), lavado novamente em TPO4 e desidratado em séries crescentes de acetona (15, 30, 50, 70, 90 e 100%) por 30min, seguido de inclusão em resina epoxi® na proporção 3:1 a cada 24 h, ao final da inclusão o material foi levado a estufa a 60°C para polimerização. Através dos blocos foram obtidos cortes ultrafinos 70 nm em equipamento ultramicrotomo do tipo Reichert Ultracuts Leica, distribuídos em grades de cobre de 400 mesh e contrastados com acetato de uranila 1% e citrato de chumbo 5%. O material foi observado em microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1400 PLUS.

Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos utilizando um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial constando de dois peptídeos e três ecótipos de *A. thaliana* (mínimo de 4 repetições). Os resultados foram expressos como média com o respectivo desvio padrão, o número de repetições é fornecido em cada legenda da figura. Para análise estatística, foi utilizado o programa Graphpad Prism 8.02.

RESULTADOS

Efeito de AtRALF1 e AtPEP1 nos fluxos de H⁺ e pH da superfície radicular da zona de alongamento da raiz de *A. thaliana*

O fluxo de H⁺ e o pH da superfície foram medidos nas raízes primárias de *A. thaliana* Col-0, utilizando uma sonda vibratória seletiva de íons (Figura 2). Um teste de aplicação em tempo real do peptídeo AtRALF1 e AtPEP1 revelou alterações de fluxo de H⁺.

As plantas de *Arabidopsis thaliana* exibiram um efluxo de H⁺ de magnitude similar, anteriormente à aplicação dos peptídeos AtRALF1 e AtPEP1 (1,940 ± 0,65

e $1,593 \pm 0,33$, respectivamente). Após 5 min de exposição a $5 \mu\text{M}$ de AtRALF1, a média dos fluxos de H^+ extracelulares na zona de alongamento radicular demonstrou um influxo de H^+ em torno de $-0,61 \pm 0,24 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ (Figura 2A e 3A). Por outro lado, a zona de alongamento das raízes expostas a $0,1 \mu\text{M}$ de AtPEP1 demonstrou um efluxo de H^+ de magnitude $2,39 \pm 0,32 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ (Figura 2B e 3A).

Foi possível observar uma alcalinização significativa no pH da superfície das raízes tratadas com AtRALF1 ($p \leq 0,0001$), por outro lado, as raízes tratadas com AtPEP1 apresentaram uma acidificação significativa quando comparadas aos tratamentos controle ($p \leq 0,0001$, Figura 3B).

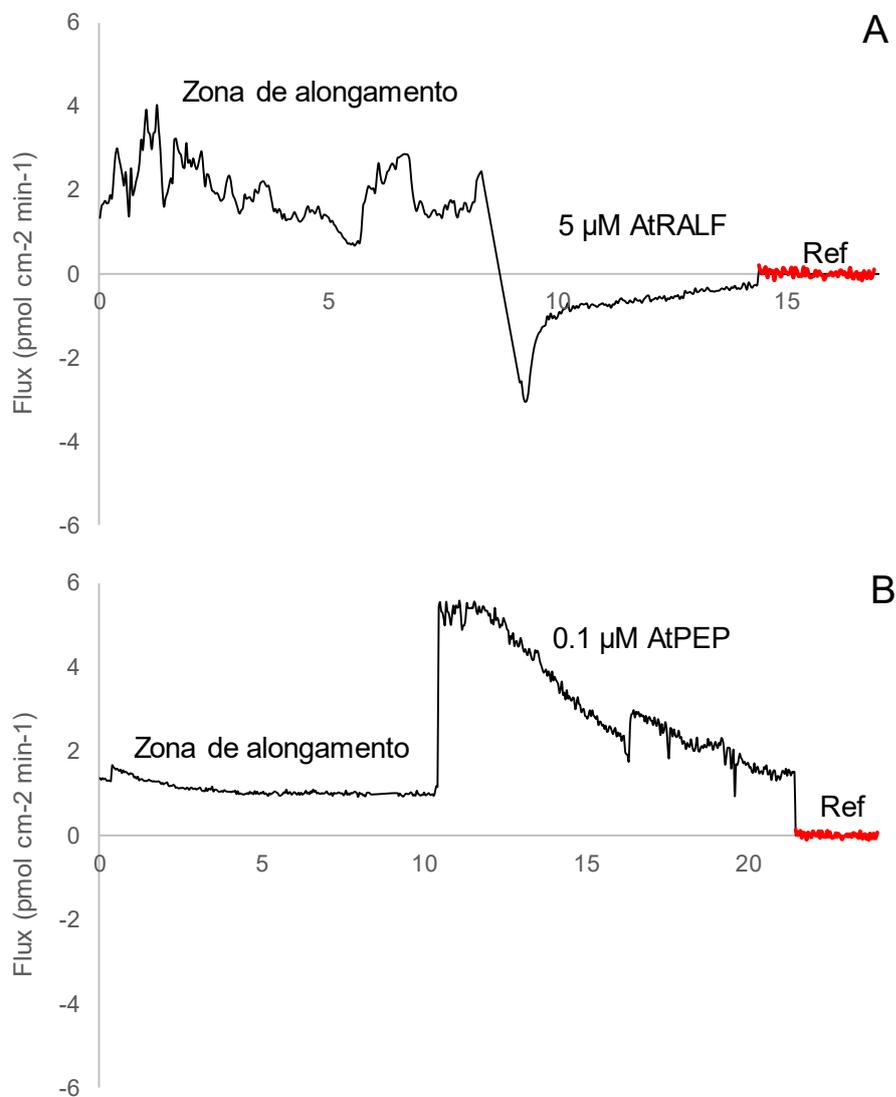


Figura 2. Sinais eletroquímicos extracelulares detectados pela sonda vibratória seletiva a íons (SIET) na zona de alongamento radicular de plântulas de *A. thaliana* expostas aos peptídeos: AtRALF1 (A) e AtPEP1 (B). (Os gráficos exibem respostas representativas obtidas em pelo menos três ensaios independentes).

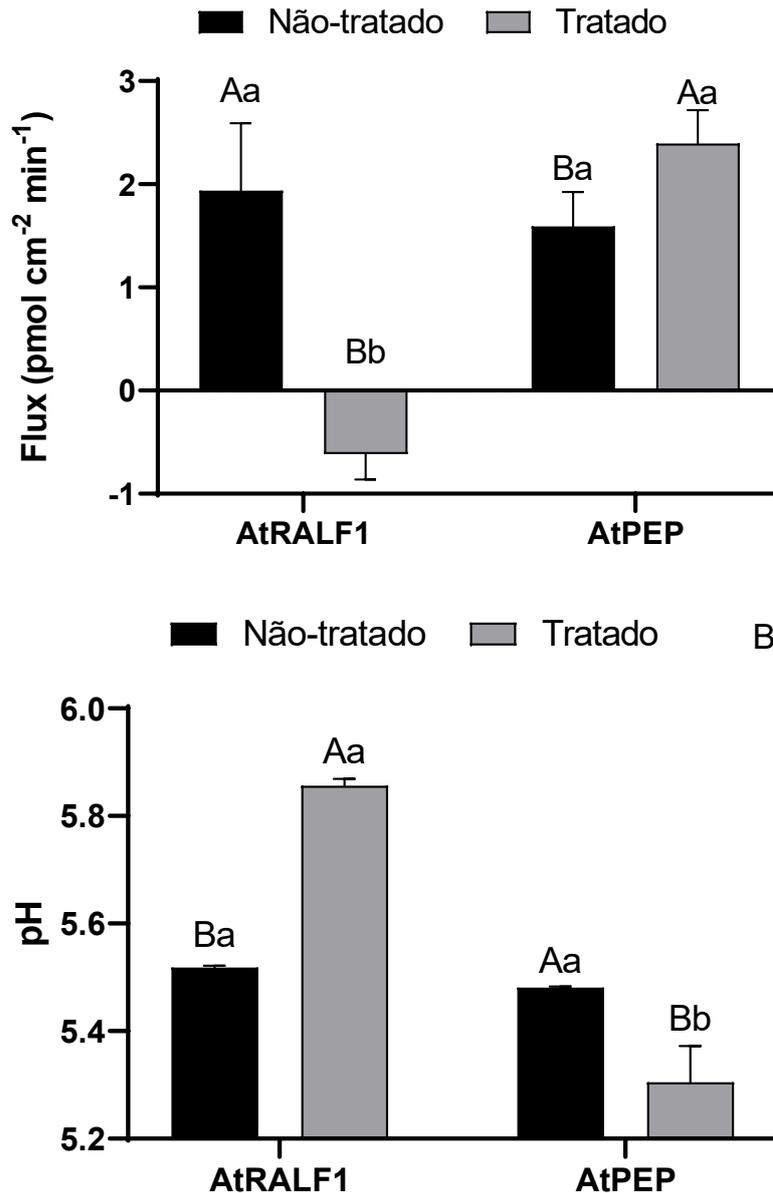


Figura 3. Efeito dos peptídeos nos fluxos H⁺ (A) e pH superficial (B) na zona de alongamento de plântulas de *A. thaliana* (Col-0). Aquisição de dados antes e 5 min após as adições dos peptídeos: AtRALF1 e AtPEP1. Barras representam os valores das médias \pm DP. As médias seguidas pela mesma letra maiúscula (não tratado e tratado) não diferem significativamente pelo teste de Tukey. As médias seguidas pela mesma letra minúscula (AtRALF1 e AtPEP) não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$; $n = 50$).

Medição do crescimento das raízes de diferentes ecótipos de *A. thaliana* expostos ao peptídeo AtRALF1

As raízes dos ecótipos de *Arabidopsis thaliana* (Col-0, Fer-4 e p35s:AtRALF1) foram medidas após 8 dias de crescimento em meio (suplementado com 5 μ M de peptídeo AtRALF1 nos últimos três dias de crescimento). As plantas

Col-0, quando expostas ao peptídeo, apresentaram menor comprimento radicular do que as plantas controle ($p=0,0281$, Figura 4). No entanto, nos ecótipos Fer-4 e p35s:AtRALF1, não foi possível observar alterações no crescimento radicular, nem quando exposto a 5 μM de peptídeo AtRALF1 ($p=0,9999$ e $p=0,9621$, respectivamente, Figura 4). Também foi possível observar que as plantas p35s:AtRALF1 apresentaram raízes significativamente menores que a Col-0, enquanto a Fer-4 não apresentou diferenças ($p=0,1006$, $p=0,0012$, Figura 4). Por outro lado, as plantas col-0 tratadas com o peptídeo AtRALF1 apresentaram comprimento radicular semelhante ao das plantas p35s:AtRALF1 ($p=0,9791$). Estes resultados sugerem que o peptídeo AtRALF1 aparentemente influencia o crescimento radicular das plantas de *A. thaliana* (Figura 4).

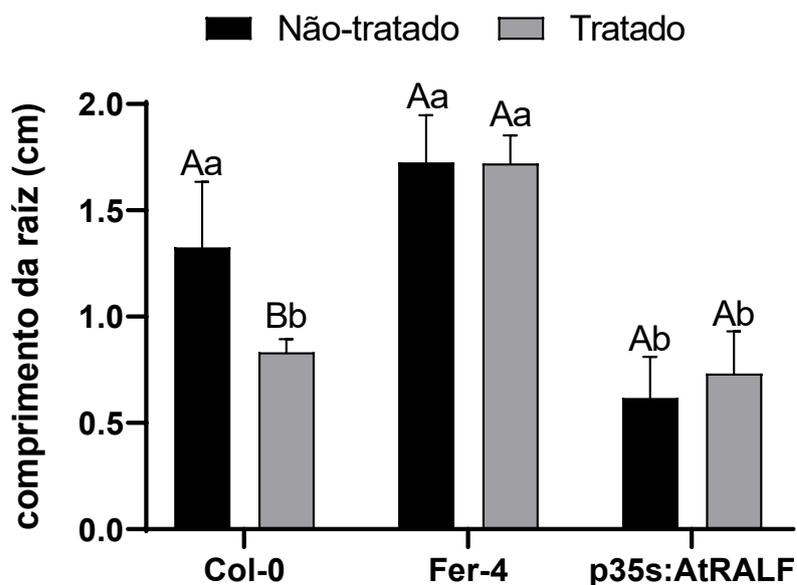


Figura 4. Comprimento da raiz dos ecótipos de *A. thaliana* (Col-0, Fer-4 e P35s: AtRALF1) crescidas por 8 dias em placas de cultura de tecidos suplementadas com meio MS, sendo expostos, ou não, a 5 μM de peptídeo AtRALF1 por pelo menos 3 dias. Barras representam os valores das médias \pm DP. As médias seguidas pela mesma letra maiúscula (não tratado e tratado) não diferem significativamente pelo teste de Tukey. As médias seguidas pela mesma letra maiúscula (Col-0, Fer-4 e p35s:AtRALF1) não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p<0,05$; $n= 50$).

Efeito do peptídeo AtRALF1 nos fluxos de H⁺ e pH da superfície da zona de alongamento radicular de diferentes ecótipos de *A. thaliana*

O fluxo de H⁺ e o pH da superfície foram medidos nas raízes primárias de *A. thaliana* Col-0, Fer-4 e p35s:AtRALF1 utilizando uma sonda vibratória seletiva de íons (Figura 5). Um teste de aplicação em tempo real do peptídeo AtRALF1 mostrou que a resposta ao peptídeo varia dependendo do ecótipo de *A. thaliana* no qual é aplicado.

Após cinco minutos de exposição a 5 μM de AtRALF1, as plantas Col-0 mostraram um influxo de H⁺ na zona de alongamento em torno de $-0,869 \pm 0,24$ pmol cm⁻² min⁻¹ (Figura 5A e 6A). Por outro lado, as plantas Fer-4 apresentaram um perfil de efluxo de H⁺ na magnitude de $-0,957 \pm 0,190$ pmol cm⁻² min⁻¹, não havendo diferenças significativas entre as plantas tratadas e não tratadas com o peptídeo AtRALF1 ($p=0,9983$, Figura 5B e 6B). Enquanto as plantas Col-0 e Fer-4 apresentaram um perfil de efluxo de H⁺, as plantas p35s: AtRALF1 apresentaram influxo de H⁺ na magnitude de -1.536 ± 0.992 pmol cm⁻² min⁻¹ naturalmente, permanecendo com o mesmo perfil após a aplicação do peptídeo, não havendo diferença significativa no fluxo de H⁺ (Figura 5C e 6C). Todas as plantas utilizadas neste experimento apresentaram um perfil de fluxo de H⁺ sensível ao vanadato (Figura 5).

Foi possível observar uma alcalinização significativa do pH da superfície de raízes Col-0 tratadas com AtRALF1 ($p \leq 0,0001$). Já as plantas Fer-4 não apresentaram diferenças em relação ao pH quando comparadas às plantas Col-0 ($p=0,1783$), mesmo após a aplicação do peptídeo ($p=0,9850$). Diferentemente das demais, as plantas do ecótipo p35s:AtRALF1 apresentaram pH mais alto, em magnitude semelhante ao pH das plantas Col-0 após a aplicação do AtRALF1 ($p=0,7593$). Porém, quando expostas ao peptídeo, essas plantas apresentaram pH ligeiramente mais baixo do que anteriormente à sua aplicação, porém não significativo ($p=0,3316$, Figura 6B).

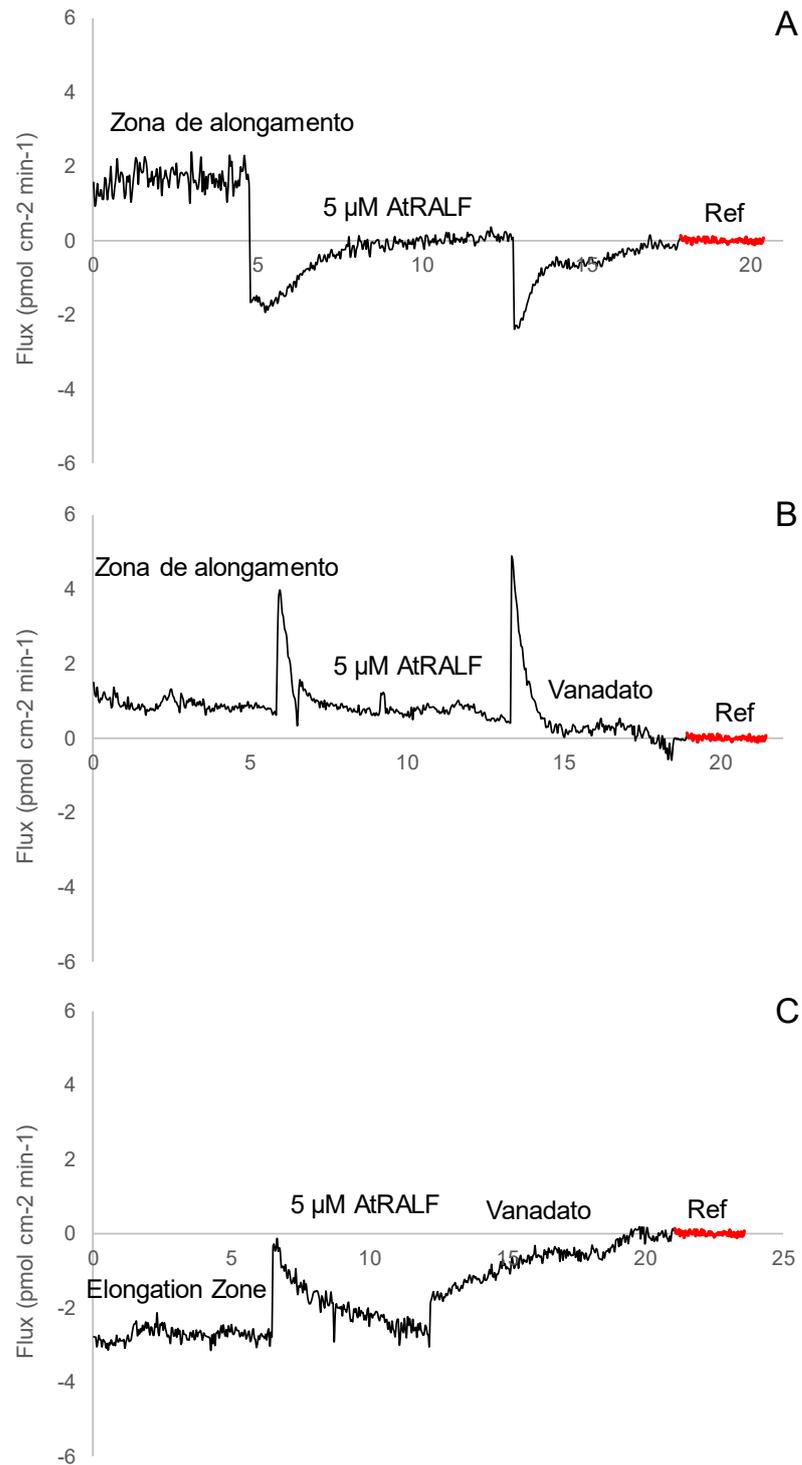


Figura 5. Sinais eletroquímicos extracelulares detectados pela sonda vibratória seletiva a íons (SIET) na zona de alongamento radicular de plântulas de *A. thaliana*: Col-0 (A), Fer-4 (B) e p35s:AtRALF1 (C) expostas a 5 μM do peptídeo RALF. (Os gráficos exibem respostas representativas obtidas em pelo menos três ensaios independentes).

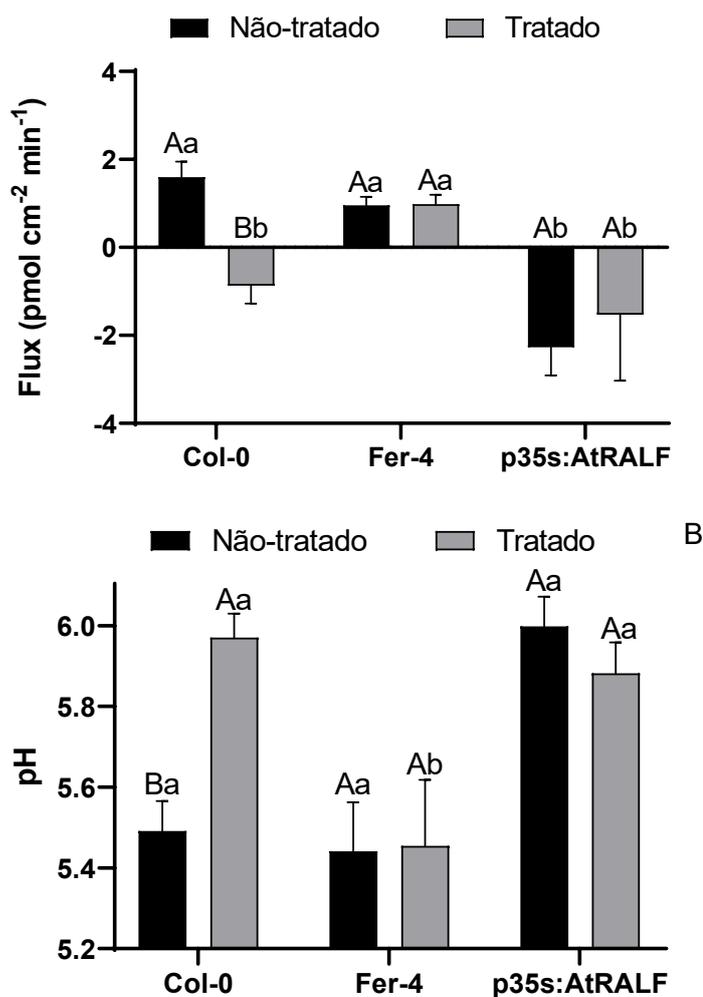


Figura 6. Efeito dos peptídeos nos fluxos H⁺ (A) e pH superficial (B) na zona de alongamento de plântulas de *A. thaliana* (Col-0, Fer-4 e p35s:AtRALF1). Aquisição de dados antes e 5 min após as adições dos peptídeos. Barras representam os valores das médias \pm DP. As médias seguidas pela mesma letra maiúscula (não tratado e tratado) não diferem significativamente pelo teste de Tukey. As médias seguidas pela mesma letra maiúscula (Col-0, Fer-4 e p35s:AtRALF) não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$; $n = 50$).

Medições da espessura da parede celular dos diferentes ecótipos de *A. thaliana*

Alterações na morfologia da parede celular de células das folhas de *A. thaliana* (Col-0, Fer-4 e p35s:AtRALF1) foram observadas no MET (Figura 7). Observou-se que as paredes celulares dos diferentes ecótipos apresentaram diferenças notáveis em sua espessura. As plantas Fer-4 apresentaram espessura da parede celular mais fina que os tratamentos Col-0 e p35s:AtRALF1 ($p \leq 0,0001$, Figura 7D). Por outro lado, os tratamentos Col-0 e p35s:AtRALF1 não apresentaram diferenças significativas entre as espessuras das paredes celulares ($p = 0,3577$, Figura 7D).

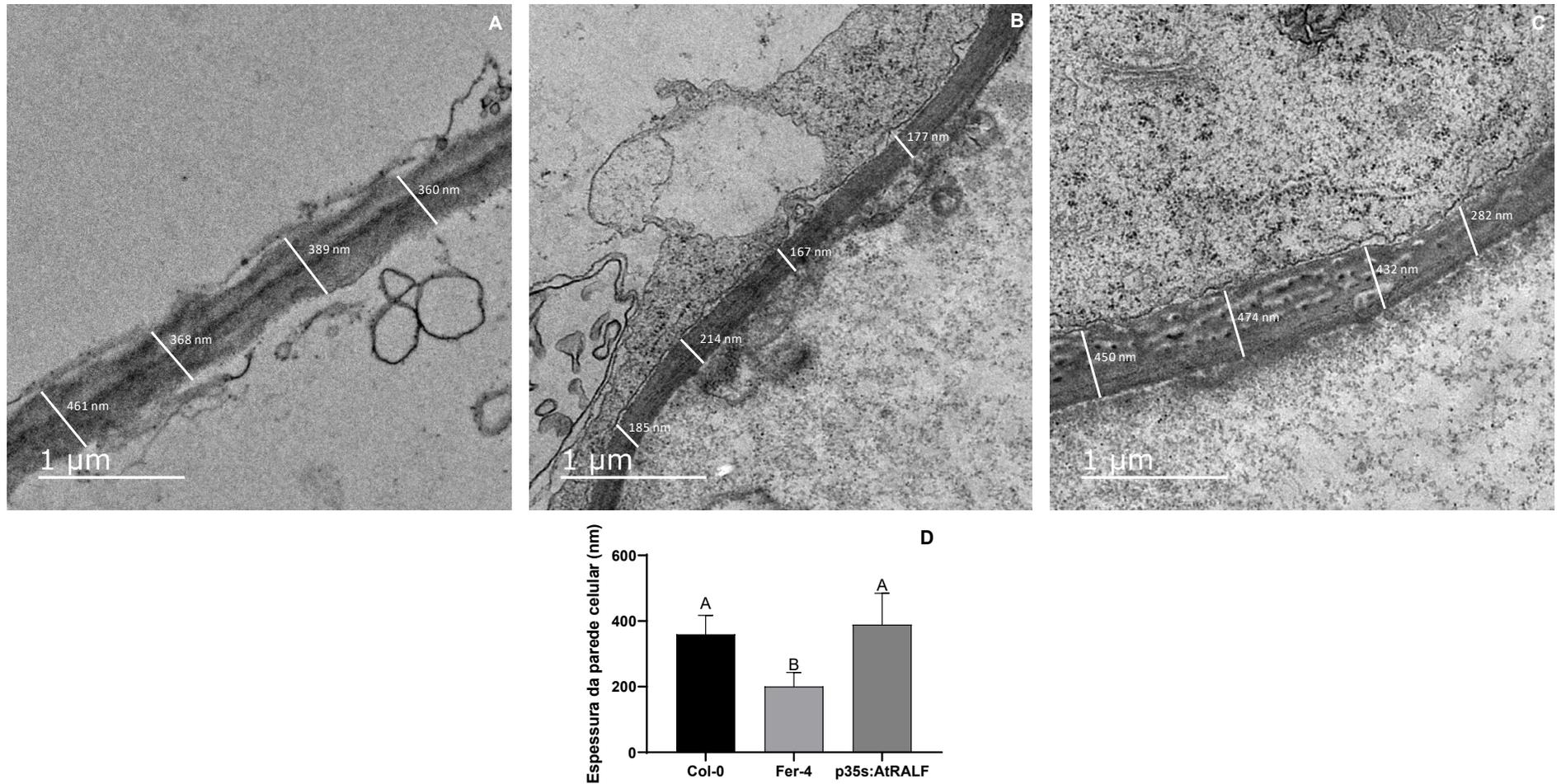


Figura 7. Microscopia eletrônica de transmissão da ultraestrutura da parede celular de três ecótipos diferentes de *A. thaliana* (A-Col-0; B-Fer-4; C-p35s:AtRALF1). As linhas indicam os pontos que foram medidos na parede celular. Foram utilizadas pelo menos 5 imagens independentes para as medições da espessura da parede celular (D). As médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$; $n = 50$).

DISCUSSÃO

Neste estudo investigou-se como o fluxo de H^+ ocorrido na região de alongamento de raízes de *A. thaliana* é modulado pelo peptídeo AtRALF1. Aqui foi demonstrado que o peptídeo RALF1 não só provoca alcalinização do meio, mas também parece exercer um papel de sinalizador no processo de crescimento celular.

O peptídeo AtRALF1 apresenta efeito regulatório diferente do peptídeo AtPEP1

Tanto o AtRALF1 quanto o AtPEP1 são peptídeos que promovem alcalinização do meio extracelular, entretanto apenas o AtRALF1 tem efeito inibitório do processo de expansão da célula vegetal (Pearce et al., 2001). Logo, existem questionamentos se este efeito inibitório promovido por RALF1 teria ligação, ou não, com o processo de alcalinização do meio.

Baseado nesta suposição, foi analisado o efeito destes dois peptídeos no fluxo de H^+ e no pH da zona de alongamento de raízes de *A. thaliana*. Nossos resultados indicam que a aplicação do peptídeo AtRALF1 promove um rápido influxo de H^+ , provocando a alcalinização do meio extracelular destas raízes (Figura 2A e 3), estes resultados corroboram com os efeitos encontrados em diversos estudos, que demonstraram a capacidade deste peptídeo em alcalinizar o meio extracelular (Pearce et al., 2001; Haruta et al., 2014; Haruta et al., 2017). Entretanto, o perfil do fluxo de H^+ relacionado à aplicação deste peptídeo foi ineditamente demonstrado, e reforça que este se trata, possivelmente, de um importante regulador do crescimento celular, uma vez que modula a atividade das bombas de H^+ , devido à importância que estas bombas apresentam para este processo (Falhof et al., 2016).

Alguns estudos têm apontado que o pH pode variar no decorrer de todo o apoplasto, apresentando tanto pH ácido quanto alcalino. Essa heterogeneidade do pH pode ser um fator importante para o processo de remodelação da parede celular, uma vez que algumas enzimas fundamentais para esse processo são ativas apenas em pHs alcalinos (Barbez et al., 2017; Hocq et al., 2017). Nossos resultados indicam que o AtRALF1 promove uma forte alcalinização, devido a inativação das bombas de H⁺, entretanto por um curto espaço de tempo. Sugerindo que este peptídeo pode desempenhar um papel de importante sinalizador para o processo de expansão celular, principalmente, dentro desta nova proposição, em que pulsos de alcalinização são importantes para este processo (Hocq et al., 2017).

Por outro lado, o peptídeo AtPEP1 não provocou influxo de H⁺, nem a alcalinização do meio extracelular (Figura 2B e 3), ao contrário do que já foi demonstrado em diversos estudos (Huffaker et al., 2006; Huffaker e Ryan, 2007; Lyapina et al., 2019). Estes resultados sugerem que o efeito de alcalinização do meio pode não estar, de fato, diretamente correlacionado com a inibição da extrusão de íons H⁺ pela bomba, e sim com fenômenos acoplados que podem incluir abertura de canais iônicos e/ou transportadores secundários. Normalmente os estudos que trabalham com este peptídeo fazem medições do pH do meio utilizando pHmetros convencionais (Huffaker et al., 2006; Huffaker e Ryan, 2007; Lyapina et al., 2019), mas neste estudo nós utilizamos uma sonda seletiva a H⁺, que faz medições a 15 µm da superfície celular tendo uma acuidade maior das variações do pH, relacionadas diretamente ao H⁺ tendo uma acuidade maior das variações do pH, relacionadas diretamente ao H⁺ (Feijó et al., 1999).

Logo, por mais que ambos os peptídeos promovam alcalinização do meio, apenas o AtRALF1 modula a extrusão de H⁺, indicando o porquê de apenas ele estar relacionado ao processo de desenvolvimento celular, enquanto o outro participa, como já foi descrito, de processos sistêmicos (Morsomme e Boutry, 2000; Palmgren, 2001; Falhof et al., 2016; Lyapina et al., 2019).

Plantas Fer-4 e P35s:AtRALF1 apresentam insensibilidade à aplicação de AtRALF1

Tanto as plantas Fer-4 quanto P35s:AtRALF1 apresentaram insensibilidade ao peptídeo AtRALF1 (Figura 5). As plantas Fer-4 apresentam silenciamento do

gene referente ao receptor do peptídeo (FERONIA), desta forma, mesmo quando aplicado de maneira exógena, o AtRALF1 não promove nenhuma mudança referente a pH nestas plantas (Haruta et al., 2014). Por outro lado, as plantas P35s:AtRALF1 apresentam superexpressão do gene que traduz o peptídeo AtRALF1, que faz com que essas plantas apresentem um fenótipo semianão (Campos et al., 2018).

Nossos resultados demonstraram que as plantas Fer-4 não apresentaram respostas à aplicação do AtRALF1 na zona de alongamento das raízes, não havendo mudanças quanto ao fluxo de H^+ e nem em relação ao pH (Figura 5 e 6). Não foi possível observar também inibição do crescimento do hipocótilo destas plantas quando tratadas com o peptídeo (Figura 4). Estes resultados corroboram com os encontrados por Haruta et al. (2014), em que plantas Fer-4 apresentaram insensibilidade ao peptídeo. Haruta et al. (2018) também observaram que estas plantas apresentaram taxa de crescimento da raiz mais elevado que plantas Col-0, similar aos resultados encontrados neste estudo. Entretanto, isso não quer dizer que estas plantas se desenvolveriam melhor, uma vez que apresentam falhas na percepção do peptídeo e, devido a isso, cresçam mais em seus estágios iniciais. Segundo Feng et al. (2018), FERONIA é importante para o crescimento correto das células e formação por completo das paredes celulares, logo, apesar de apresentar um crescimento mais rápido nos primeiros dias, este crescimento ficaria comprometido à medida que a planta ficasse mais velha, estes autores demonstram inclusive, que elas ficam mais susceptíveis a estresses abióticos. Sabe-se também que plantas Fer-4, apresentam fenótipo 40% menor que as das plantas Col-0 em um estágio mais maduro (Dünser et al., 2019). Logo, este peptídeo e seu receptor de membrana parecem ter uma imensa importância para o desenvolvimento das plantas.

Plantas de *A. thaliana* do ecótipo p35s:AtRALF1, além de apresentarem o comprimento da raiz menor que as plantas Col-0 e Fer-4, também apresentaram insensibilidade ao peptídeo AtRALF1, uma vez que o perfil do fluxo de H^+ e alcalinização se mantiveram os mesmos que anteriormente à aplicação do peptídeo (Figura 5 e 6). Esses resultados corroboram com os encontrados por Matos et al. (2008) e Campos et al. (2018).

Quando se analisa os resultados obtidos com as plantas P35s:AtRALF1 em relação às Col-0, é possível observar que estas plantas já apresentam naturalmente

o mesmo fenótipo que as plantas Col-0 tratadas com AtRALF1 (Figura 4), assim como em relação ao fluxo de H^+ e ao pH nas zonas de alongamento da raiz (Figura 5 e 6), sendo que a aplicação do peptídeo não promoveu mudanças neste perfil. Um estudo recente conduzido por Moussu et al. (2019) demonstrou que os peptídeos RALF se ligam ao seu receptor (FERONIA) e também a LRX (Leucine rich repeat extensins), ativando assim o sinal referente a essas proteínas. Logo, uma vez que estas plantas superexpressam o AtRALF1, pode-se especular que estes complexos de proteínas permaneçam constantemente ativados, gerando inibição do fluxo de H^+ , aumento do pH e consequentemente inibição do crescimento. Uma explicação para que a aplicação do peptídeo não tenha gerado nenhum tipo de efeito adicional, é que a maioria das reações de dose-resposta apresenta uma concentração em que o efeito máximo já foi atingido, uma vez que estas plantas apresentam naturalmente uma concentração alta do peptídeo, nenhuma resposta adicional foi notada.

Plantas Fer-4 e p35s:AtRALF1 apresentam diferenças quanto à estrutura da parede celular

Sabe-se que a ativação das H^+ -ATPases da membrana plasmática é importante para o afrouxamento da parede e o crescimento das células vegetais (Rayle e Cleland, 1992; Morsomme e Boutry, 2000; Palmgren, 2001; Falhof et al., 2016). Uma vez que foi demonstrado que esse peptídeo está envolvido com a inibição da atividade da H^+ -ATPase e do processo de crescimento da planta, também deve modular o crescimento da célula e, consequentemente, o desenvolvimento da parede celular. Baseados neste pressuposto, foi realizada uma análise da espessura da parede de células do tecido foliar dos ecótipos de *A. thaliana* Col-0, Fer-4 e p35s:AtRALF1, através da técnica de microscopia de transmissão. Os resultados do presente trabalho indicaram que tanto o silenciamento do gene que expressa FERONIA quanto a superexpressão do AtRALF1 levaram a alterações na parede celular.

Plantas Fer-4 exibiram paredes mais finas se comparadas às plantas Col-0, corroborando com os resultados encontrados por Podgórska et al. (2017). Recentemente muitos trabalhos abordaram a possibilidade do complexo RALF-FERONIA atuar no remodelamento da parede celular e controlar, de certa forma, o

processo de expansão da célula (Cosgrove, 2018; Duan e Cheung, 2018; Feng et al., 2018; Lin et al., 2018; Verger et al., 2018; Dünser et al., 2019; Herger et al., 2019a; 2019b; Rui e Dinnery, 2019; Vogler et al., 2019). Os achados nestes estudos indicam que FERONIA esteja ligada a um complexo de proteínas chamado LRX (Leucin rich repeat extensins), onde estas proteínas atuam como uma ponte entre a parede celular e FERONIA, desta forma este complexo capta os sinais do status da parede, fornecendo informações para o correto processo de crescimento da célula (Feng et al., 2018; Dünser et al., 2019).

Neste contexto, o complexo RALF-FERONIA-LRX participaria no processo de sinalização durante a expansão e retração vacuolar, para que no processo de expansão da célula a parede se mantenha íntegra e desenvolvida de maneira correta (Dünser et al., 2019), auxiliando, também, na manutenção da integridade da parede celular durante processos de corrosão e estresses (Feng et al., 2018; Verger et al., 2018). Baseado nisso, pode-se supor, que o motivo pelo qual plantas Fer-4 exibiram paredes das células do tecido foliar mais finas, neste experimento, se deva à ausência de FERONIA, provocando então, defeitos quanto à composição da mesma.

As plantas de *A. thaliana* do ecótipo p35s:AtRALF1 não apresentaram diferenças em relação às plantas Col-0 no que tange à espessura da parede da célula vegetal (Figura 7). No entanto, foi possível notar a presença de deposição de elementos secretados na parede celular. Não existem evidências na literatura quanto à morfologia da parede em relação à superexpressão de AtRALF1. Como já foi dito anteriormente, o complexo AtRALF1-FERONIA-LRX parece funcionar como sinalizador do crescimento celular, inibindo o processo de expansão para que a parede seja remodelada e cresça de maneira correta (Dünser et al., 2019). Assim, pode-se sugerir que este complexo permaneça sempre ativo nestas plantas, promovendo uma secreção constante de elementos para a remodelação da parede, mas devido a falhas no processo de expansão, há acúmulo de material secretado na parede celular (Figura 7C).

CONCLUSÃO

Em conclusão, este trabalho fornece evidências convincentes para um novo aspecto do mecanismo de crescimento ácido das plantas, pelo qual a atividade da H⁺-ATPase também é modulada pelo peptídeo AtRALF1, de uma maneira específica na zona alongada das raízes. Foi mostrado que as variações de pH nos microambientes rizosféricos e apoplásicos são respostas comuns induzidas pelo AtRALF1, ao mesmo tempo que também revelou uma clara dissociação entre o efeito inibitório promovido pelo peptídeo na raiz e seu efeito de alcalinização no meio.

Os resultados também indicaram que o peptídeo AtRALF1 e seu receptor de membrana FERONIA podem ser importantes para a formação correta da parede celular, sendo que a exclusão de um desses componentes causou a formação de paredes mais finas, o que está de acordo com uma nova visão do mecanismo de crescimento ácido, que liga os efeitos do peptídeo AtRALF1 com a inibição da H⁺-ATPase e o pH transitório como fundamentais para o crescimento correto das células.

REFERÊNCIAS

Albert, M. (2013). Peptides as triggers of plant defence. *Journal of Experimental Botany*, 64: 5269-5279.

Barbez, E; Dünser, K.; Gaidora, A.; Lendl, T. & Busch, W. (2017). Auxin steers root cell expansion via apoplastic pH regulation in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(24): 4884-4893.

Campos, W. F.; Dressano, K.; Ceciliato, P. H.; Guerrero-Abad, J. C.; Silva, A. L.; Fiori, C. S. & Moura, D. S. (2018). *Arabidopsis thaliana* rapid alkalization factor 1–

mediated root growth inhibition is dependent on calmodulin-like protein 38. *Journal of Biological Chemistry*, 293(6): 2159-2171.

Cosgrove, D. J. (2018). Diffuse growth of plant cell walls. *Plant Physiology*, 176(1): 16-27.

Covey, P. A.; Subbaiah, C. C.; Parsons, R. L.; Pearce, G.; Lay, F. T.; Anderson, M. A. & Bedinger, P. A. (2010). A pollen-specific RALF from tomato that regulates pollen tube elongation. *Plant Physiology*, 153(2): 703-715.

Duan, Q. & Cheung, A. Y. (2018). Context-specific dependence on FERONIA kinase activity. *FEBS Letters*, 592(14): 2392-2394.

Dünser, K.; Gupta, S.; Herger, A.; Feraru, M. I.; Ringli, C. & Kleine-Vehn, J. (2019). Extracellular matrix sensing by FERONIA and leucine-rich repeat extensins controls vacuolar expansion during cellular elongation in *Arabidopsis thaliana*. *The EMBO Journal*, 38(7): e100353.

Falhof, J.; Pedersen, J. T.; Fuglsang, A. T. & Palmgren, M. (2016). Plasma Membrane H⁺-ATPase Regulation in the Center of Plant Physiology. *Molecular Plant*, 7,9(3): 323-337.

Feijó, J.; Sainhas, J.; Hackett, G.; Kunkel, J. & Hepler, P. (1999). Growing pollen tubes possess a constitutive alkaline band in the clear zone and a growth dependent acidic tip. *The Journal of Cell Biology*, 144(3): 483-496.

Feng, W.; Kita, D.; Peaucelle, A.; Cartwright, H. N.; Doan, V.; Duan, Q. & Yvon, R. (2018). The FERONIA receptor kinase maintains cell-wall integrity during salt stress through Ca²⁺ signaling. *Current Biology*, 28(5): 666-675.

Ghorbani, S.; Fernandez, A.; Hilson, P. & Beeckman, T. (2014). Signaling peptides in plants. *Cell and Developmental Biology*, 3: 1-11.

Gully, K.; Hander, T.; Boller, T. & Bartels, S. (2015). Perception of *Arabidopsis* AtPep peptides, but not bacterial elicitors, accelerates starvation-induced senescence. *Frontiers in Plant Science*, 6(14): 1-6.

Haruta, M.; Gaddameedi, V.; Burch, H.; Fernandez, D. & Sussman, M. R. (2018). Comparison of the effects of a kinase-dead mutation of FERONIA on ovule fertilization and root growth of *Arabidopsis*. *FEBS Letters*, 592(14): 2395-2402.

Haruta, M.; Sabat, G.; Stecker, K.; Minkoff, B. B.; Sussman, M. R. (2014). A peptide hormone and its receptor protein kinase regulate plant cell expansion. *Science*, 343: 408-411.

Haruta, M.; Monshausen, G.; Gilroy, S. & Sussman, M. R. (2008). A cytoplasmic Ca²⁺ functional assay for identifying and purifying endogenous cell signaling peptides in *Arabidopsis* seedlings: Identification of AtRALF1 peptide. *Biochemistry*, 47: 6311-6321.

Herger, A.; Dünser, K.; Kleine-Vehn, J. & Ringli, C. (2019a). Leucine-rich repeat extensin proteins and their role in cell wall sensing. *Current Biology*, 29(17): 851-858.

Herger, A.; Gupta, S.; Franck, C. M.; Kadler, G.; Boisson-Dernier, A. & Ringli, C. (2019b). LRR-extensins of vegetative tissues are a functionally conserved family of RALF1 receptors interacting with the receptor kinase FERONIA. *BioRxiv*, 783266.

Hocq, L.; Pelloux, J. & Lefebvre, V. (2017). Connecting homogalacturonan-type pectin remodeling to acid growth. *Trends in Plant Science*, 22(1): 20-29.

Huffaker, A. & Ryan, C. A. (2007). Endogenous peptide defense signals in *Arabidopsis* differentially amplify signaling for the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(25): 10732-10736.

Huffaker, A.; Pearce, G. & Ryan, C. A. (2006). An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(26): 10098-10103.

Lin, W.; Tang, W.; Anderson, C. & Yang, Z. (2018). FERONIA's sensing of cell wall pectin activates ROP GTPase signaling in *Arabidopsis*. *BioRxiv*, 269647.

Lyapina, I.; Filippova, A. & Fesenko, I. (2019). The role of peptide signals hidden in the structure of functional proteins in plant immune responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18): 4343.

- Matos, J. L.; Fiori, C. S.; Silva-Filho, M. C. & Moura, D. S. (2008). A conserved dibasic site is essential for correct processing of the peptide hormone AtRALF1 in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 582(23-24): 3343-3347.
- Morsomme, P. & Boutry, M. (2000). The plant plasma membrane H⁺-ATPase: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1465(1-2): 1-16.
- Murphy, E.; Smith, S. & De Smet, I. (2012). Small signaling peptides in *Arabidopsis* development: how cells communicate over a short distance. *The Plant Cell*, 24(8): 3198-3217.
- Palmgren, M. G. (2001). Plant plasma membrane H⁺-ATPases: powerhouses for nutrient uptake. *Annual Review of Plant Biology*, 52(1): 817-845.
- Pearce, G.; Moura, D. S.; Stratmann, J. & Ryan, C. A. (2001). RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 12843-12847.
- Podgórska, A.; Burian, M.; Gieczewska, K.; Ostaszewska-Bugajska, M.; Zebrowski, J.; Solecka, D. & Szal, B. (2017). Altered cell wall plasticity can restrict plant growth under ammonium nutrition. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1344.
- Ramos, A. C.; Façanha, A. R. & Feijó, J. A. (2008). Proton (H⁺) flux signature for the presymbiotic development of the arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 178(1): 177-188.
- Rayle, D. L. & Cleland, R. E. (1992). The Acid Growth Theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology*, 99(4): 1271-1274.
- Rui, Y. & Dinneny, J. R. (2019). A wall with integrity: surveillance and maintenance of the plant cell wall under stress. *New Phytologist*, 225: 1428-1439.
- Verger, S. & Hamant, O. (2018). Plant physiology: FERONIA defends the cell walls against corrosion. *Current Biology*, 28(5): 215-217.

Vogler, H.; Santos-Fernandez, G.; Mecchia, M. A. & Grossniklaus, U. (2019). To preserve or to destroy, that is the question: the role of the cell wall integrity pathway in pollen tube growth. *Current Opinion in Plant Biology*, 52: 131-139.

4.2 GENE SELF-PRUNING REGULA RESPOSTAS AUXÍNICAS EM PLANTAS DE TOMATE VIA MODULAÇÃO DAS BOMBAS DE H⁺

RESUMO

A auxina é um fitormônio crucial para as plantas, pois participa da regulação de quase todos os aspectos do crescimento e desenvolvimento vegetal. No entanto, a participação deste fitormônio em aspectos relacionados ao hábito de vida das plantas permanece inconclusiva. A arquitetura das plantas é uma característica que apresenta grande importância agrícola e influencia diretamente na produtividade, pois influencia no porte das plantas, o que pode facilitar muitas vezes o processo de colheita no campo. Em tomateiros, o gene SELF-PRUNING parece modular o hábito de crescimento destas plantas, tornando o crescimento das mesmas indeterminado. Recentemente foi demonstrado que este gene está relacionado a modulações referentes ao fitormônio auxina e a outro gene, o DGT, que expressa uma proteína denominada ciclofilina A. Estas proteínas parecem estar relacionadas à sinalização da auxina, porém os mecanismos celulares relacionados tanto a estas proteínas quanto ao SP permanecem pouco elucidados. Baseado nisso, este

trabalho teve como objetivo investigar como as mutações nos genes SP e DGT em plantas de tomateiro cv. Micro-tom modulam as bombas de H^+ , relacionando com as alterações ecofisiológicas, de crescimento e frutificação observadas nestas plantas. Para tal foram realizadas análises dos parâmetros de crescimento, fotossintéticos, atividade hidrolítica e de bombeamento das bombas de H^+ , assim como análises usando eletrodos vibráteis seletivos a H^+ , em plantas de tomateiro da cv Micro-tom (MT, SP, DGT e SP-DGT), 75 dias após a germinação. Os resultados do presente estudo indicaram que plantas SP apresentaram altura da parte aérea menores, porém com frutos e taxa fotossintética maiores que os demais genótipos, podendo estar relacionado ao fato das bombas de H^+ isoladas das raízes apresentarem maior eficiência energética nestas plantas. Já as plantas DGT apresentaram menores frutos e taxas fotossintéticas que as plantas MT e SP, assim como menor atividade das bombas de H^+ radiculares, podendo isso estar diretamente relacionado à baixa sensibilidade à auxina encontrada nestas plantas. Tanto SP quanto DGT pareceram controlar aspectos importantes do desenvolvimento vegetal, entretanto mais estudos são necessários para elucidar mais atributos dos mecanismos ao qual estes genes estão incluídos, principalmente no que tange ao metabolismo energético.

Palavras-chave: Bombas de H^+ , Teoria do Crescimento Ácido, Hábito de vida das plantas, Transporte de H^+ , Auxina.

ABSTRACT

Auxin is a crucial phytohormone for plants, as it participates in the regulation of almost all aspects of plant growth and development. However, the participation of this phytohormone in aspects related to the shoot determination remains inconclusive. Plant architecture is a characteristic that has great agricultural importance and directly influences productivity, as it influences the size of plants, which can often facilitate the harvesting process in the field. In tomatoes, the SELF-PRUNING gene seems to modulate the shoot determination, making their growth

indeterminate. It has recently been demonstrated that this gene is related to modulations related to phytohormone auxin and to another gene, DGT, which expresses a protein called cyclophilin A. These proteins seem to be related to auxin signaling, but the cellular mechanisms related to both cyclophilins and SP remain poorly understood. Based on this, this work aimed to investigate how mutations in the SP and DGT genes in tomato plants cv. Micro-toms modulate the H⁺ pumps, relating to the ecophysiological, growth and fruiting changes observed in these plants. For this, analyzes of growth parameters, photosynthetics, hydrolytic activity and pumping of the H⁺ pumps were carried out, as well as a non-invasive selective ion electrode technique, in tomato plants of cv Micro-Tom (MT, SP, DGT and SP-DGT), 75 days after germination. Our results indicated that SP plants had shorter shoot height, but with higher fruits and photosynthetic rate than the other genotypes, which may be related to the fact that H⁺ pumps isolated from the roots, showed greater energy efficiency in these plants. On the other hand, DGT plants showed lower fruits and photosynthetic rates than MT and SP plants, as well as lower activity of root H⁺ pumps, which may be directly related to the low sensitivity to auxin found in these plants. Both SP and DGT seemed to control important aspects of plant development, however more studies are needed to elucidate more attributes of the mechanisms to which these genes are included, especially with regard to energy metabolism.

Keywords: H⁺ Pumps, Acid growth theory, Shoot determinacy, H⁺ transport, Auxin.

INTRODUÇÃO

A arquitetura da parte aérea das plantas de interesse agrônômico é uma característica fundamental para a produtividade agrícola no que diz respeito aos tratamentos culturais e à colheita, sendo determinada principalmente pelo padrão de ramificação do crescimento lateral, pelo alongamento dos entrenós e pelo hábito de crescimento determinado ou indeterminado (Wang e Li, 2008).

O hábito de crescimento indeterminado é definido pela presença de um meristema apical com uma população de células-tronco que mantém o crescimento vegetativo mesmo após o florescimento. Enquanto no crescimento determinado, as células do meristema apical sofrem diferenciação, cessando o crescimento vegetativo em uma flor ou inflorescência terminal (Tian et al., 2010). Esta característica da parte aérea foi um fator preponderante na domesticação de diversas espécies, incluindo importantes culturas agrícolas, como a soja (*Glycine max*), o feijão (*Phaseolus vulgaris*) e o tomate (*Solanum lycopersicum*) (Pnueli et al., 1998; Tian et al., 2010; Repinski et al., 2012).

A cultura do tomate, por apresentar um crescimento vegetativo indeterminado (Samach e Lotan, 2007) pode promover uma distribuição desigual dos fotoassimilados entre órgãos vegetativos e reprodutivos, além do amadurecimento desigual de frutos, resultando em efeitos indesejáveis na produção. Entretanto, em 1914 foi descoberto um mutante recessivo espontâneo que apresentava modificações da arquitetura da parte aérea, com um hábito de crescimento determinado e um dossel compacto, espesso e com um número reduzido de nós vegetativos (Yeager, 1927; MacArthur, 1934). Mas, foi somente em 1998 que Pnueli e colaboradores revelaram que esta mutação se tratava da substituição de um único nucleotídeo no gene SELF-PRUNING (SP), que compartilha semelhança de sequência com proteínas de ligação à fosfatidiletanolamina (PEBPs), um grupo de polipeptídeos encontrados em plantas, porém inicialmente descritos como integrantes da sinalização celular de mamíferos (Hengst et al., 2001; Krosiak et al., 2001).

A criação da mutação SP em cultivares industriais de tomate, através da estratégia de melhoramento clássico, foi fundamental no advento da colheita

mecânica (Rick, 1978; Stevens e Rick, 1986). Devido ao seu hábito de crescimento determinado, apresentava um número progressivamente reduzido de folhas por nó até o término em inflorescência, que supera o crescimento vertical da planta (Samach e Lotan, 2007) levando ao amadurecimento simultâneo dos frutos.

Para que o emprego de plantas mutantes SP possa ocorrer de maneira mais eficiente e segura, é importante entender o mecanismo por trás das alterações que esta mutação promove no desenvolvimento vegetal. Anteriormente foi descrito que o hábito de crescimento das plantas SP poderia estar ligado ao fitormônio auxina (Pnueli et al., 2001), principalmente devido à atuação que este possui no processo de morfogênese das plantas (Berleth e Sachs, 2001). Recentemente Silva et al. (2018) mostraram que o SELF-PRUNING age sinergicamente com o DIAGEOTROPICA (DGT), orientando as respostas do fitormônio auxina e, desta forma, regulando o crescimento.

A auxina é um dos principais controladores do desenvolvimento vegetal, no entanto, seu papel na regulação do hábito de crescimento das plantas ainda não está claro (Silva et al., 2018). Dentre os aspectos que diferencia a auxina de outros hormônios vegetais está a natureza relativamente bem compreendida de seu transporte através do corpo da planta (Friml, 2003; Petrášek e Friml, 2009). O transporte polar de auxina (TPA), que ocorre basipetalmente a partir do meristema apical, é crucial para a distribuição da auxina nos tecidos vegetais (Rubery e Sheldrake, 1974; Sheldrake, 1974). O TPA funciona como organizador da polaridade apical-basal no corpo da planta (Friml et al., 2006), controlando assim uma multiplicidade de processos de desenvolvimento (Reinhardt et al., 2003; Blilou et al., 2005; Scarpella et al., 2006). Recentemente foi demonstrado que o DGT afeta o TPA em tomate (Ivanchenko et al., 2015).

O DGT é uma proteína ciclofilina A com atividade enzimática peptidil-prolil trans/cis-isomerase (PPIase) (Takahashi et al., 1989; Oh et al., 2006). A função do DGT é altamente conservada entre as plantas (Lavy et al., 2012). No tomate, alguns dos defeitos fenotípicos mais significativos causados pela falta de proteína DGT são o crescimento horizontal da parte aérea, os caules finos, a diferenciação vascular secundária alterada e as raízes sem ramos laterais (Zobel, 1973; Muday et al., 1995; Coenen et al., 2003). Aparentemente, existe uma correlação entre os efeitos relacionados a estes dois genes, levando a crer que o SP age sinergicamente com DGT, guiando as repostas auxínicas nos tecidos vegetais

(Silva et al., 2018). No entanto, como essas respostas ocorrem em nível celular, ainda não está elucidado. Um dos efeitos do fitormônio auxina mais conhecidos consiste na indução do alongamento celular, no processo originalmente descrito na clássica Teoria do Crescimento Ácido (Rayle e Cleland, 1970; 1992). Posteriormente, mais detalhes do processo foram descritos, revelando que a auxina se liga ao seu receptor de membrana plasmática (ABP1), gerando uma cascata de sinalização que culmina na ativação das H⁺-ATPases do tipo P. Estas bombas que transportam H⁺ para a região do apoplasto, acidificando-o, se tornam essenciais para a ativação de enzimas responsáveis pelo afrouxamento da parede celular, que conjuntamente com a entrada de água no vacúolo promovem o aumento da pressão de turgor, possibilitando a expansão celular (Serrano et al., 1991; Hager, 2003).

As bombas de H⁺ constituem o sistema de transporte iônico primário em membranas celulares vegetais (Sondergaard et al., 2004; Shavrukov e Hirai, 2015). Nesses organismos, a absorção de nutrientes ocorre, via transportadores secundários que transportam íons e nutrientes diversos conjuntamente com H⁺, requerendo o aporte de energia via gradiente eletroquímico de H⁺ gerado pelos transportadores primários (Gaxiola, 2007). Deste modo, as H⁺-ATPases do tipo P e V, e as H⁺-Pirofosfatases (H⁺-PPases), geram a força próton-motora que energiza os transportadores secundários (Sze et al., 1999; Shavrukov e Hirai, 2015).

A H⁺-ATPase de membrana plasmática desempenha importantes funções no crescimento e na nutrição da célula vegetal (Hu-Cheng et al., 2003). Além disso, o gradiente de prótons transmembranar criado por esta bomba eletrogênica, durante a sinalização por auxina, é determinante na expansão celular (Perrot-Rechenmann, 2010; Dünser e Kleine-Veine, 2015). Já as H⁺-ATPases do tipo V e as H⁺-PPases participam ativamente no processo de vacuolação, ou seja, na capacidade de manutenção da pressão de turgor pelo vacúolo durante a expansão celular (Maeshima et al., 1996; Smart et al., 1998; Cosgrove, 2000; Zandonadi et al., 2007). As bombas de H⁺ controlam, em conjunto, diversos aspectos do desenvolvimento celular e conseqüentemente da fisiologia de toda a planta, desta forma, entender como SP e DGT modulam estas proteínas pode ser um passo importante para desvendar o mecanismo por trás das modificações que estes promovem nas plantas.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo investigar como as mutações nos genes SP e DGT em plantas de tomateiro cv. Micro-tom modulam as bombas de H⁺, correlacionando com alterações ecofisiológicas, de crescimento e frutificação observadas nestas plantas. Na presente tese, foi trabalhada a hipótese de tanto SP quanto DGT promoverem mudanças que envolvam modulações específicas da atividade das principais bombas de H⁺ da célula vegetal, assim regulando oscilações espaço-temporais de fluxos iônicos e de pH, responsáveis, em última instância, pelo controle do mecanismo de crescimento ácido, aqui estudado em raízes de plântulas de tomateiro cv. Micro-tom.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal e condição de crescimento, parâmetros de crescimento

Sementes de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-tom) dos genótipos MT, SP, DGT e SP-DGT, foram desinfestadas com álcool etílico 70% por 3 minutos e hipoclorito de sódio 1% (v/v) por 5 min, lavadas 5 vezes em água deionizada e embebidas durante 1 hora também em água deionizada estéril. Em seguida, as sementes foram colocadas em placas de Petri (5 sementes por placa e 5 placas por tratamento) contendo 10 mL de solução de Hoagland ½ força e foram incubadas por 10 dias em câmara de crescimento (16/8 h claro/escuro, 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz, 25 °C).

Posteriormente, foram levadas para uma câmara de crescimento controlado (Fitotron) nas condições de: 16/8 h claro/escuro, 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz, 25 °C e 70% de umidade. As plantas foram distribuídas em vasos (com 4 plantas cada) em um sistema de hidroponia. O meio para crescimento das plantas foi o de Hoagland ½ força, sendo trocado 2x por semana. As plantas permaneceram nestas condições por mais 65 dias até o experimento ser desmontado para análise.

Parâmetros de crescimento

Setenta e cinco dias após a germinação das sementes foram realizadas as medições dos parâmetros de crescimento das plantas de tomate Micro-tom. A análise da altura e comprimento da raiz das plantas foi realizada utilizando-se uma régua milimetrada. O volume radicular foi inferido através do uso de uma proveta. O diâmetro dos frutos foi medido utilizando-se um paquímetro. O peso fresco e seco dos frutos e o peso seco da parte aérea e da raiz foram inferidos utilizando-se uma balança de precisão.

Trocas gasosas e fluorescência da clorofila

A avaliação das trocas gasosas de folhas individuais (taxa fotossintética líquida A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), (condutância estomática g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e (transpiração E , $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), foi feita, às 7:00, a uma intensidade de luz de $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fornecida por um sistema de iluminação artificial (Li6400-02B red/blue LED light source). Esse sistema de iluminação foi acoplado ao sistema portátil de medição de trocas gasosas IRGA (infrared gas analyser) LI6400 XT (LiCor, Nebraska, USA).

Isolamento da fração microssomal

As vesículas de tonoplasto e de membrana plasmática foram isoladas de raízes das plantas tomate utilizando a centrifugação diferencial como descrito por De Michelis e Spanswich (1986), com algumas modificações (Façanha e de Meis, 1995). Aproximadamente, 5 g (massa fresca) de raízes foram homogeneizadas usando grau e pistilo em 15 mL de meio de extração gelado contendo 250 mM de sacarose, 10% de glicerol (m:v), 0,5% de PVP-40 (polivinilpirrolidona-40 KDa), 150 mM de KCl, 2 mM de EDTA (ácido etileno diamino tetracético) 0,3% de BSA (albumina sérica bovina) (m:v) e 0,1 M de tampão HEPES, pH 8,0. As soluções estoque utilizadas na preparação foram mantidas em geladeira. Imediatamente antes do uso foram adicionados 2 mM de DTT (ditiotreitól), 1 mM de benzamidina e 1 mM de PMSF (fluoreto de metilfenilsulfonil). A manipulação das raízes até a obtenção do homogenato, bem como as centrifugações, tiveram a temperatura controlada a fim de que não excedesse 4°C. Além disso, o pH do tampão de

extração também foi monitorado durante o procedimento, mantendo-se na faixa de 7,5-8,0.

Após a maceração, o homogenato resultante foi filtrado através de quatro camadas de gaze e submetido à centrifugação em uma centrífuga Himac CP (HITACHI) a 1500 x g durante 15 minutos para a remoção de células não rompidas e núcleos. O sobrenadante foi coletado e submetido a uma nova centrifugação a 10000 x g por 15 minutos em uma ultracentrífuga Himac CP 85b (HITACHI) utilizando o rotor P50 para o isolamento das mitocôndrias. Estas organelas foram separadas e descartadas a fim de não interferirem nos experimentos futuros. O sobrenadante foi submetido à nova centrifugação, agora a 100.000 x g por 45 minutos. O precipitado dessa nova centrifugação, denominado fração microssomal, foi ressolubilizado em 2 mL de solução tampão (meio de ressuspensão: glicerol 15% (v:v), DTT 1 mM, PMSF 1 mM, Benzamidina 1 mM, 10 mM de HEPES pH 7,6). A concentração de proteína total contida na preparação foi dosada pelo método descrito por Bradford (1976).

Determinação da atividade H⁺-ATPase de Membrana Plasmática

A atividade ATPásica foi determinada pela medida da liberação de Pi segundo o método colorimétrico clássico descrito por Fiske e Subbarow (1925). A reação foi iniciada com a adição da proteína e parada através da adição de ácido tricloroacético (TCA) gelado para uma concentração final de 10% (v/v). A revelação do Pi hidrolisado foi realizada mediante a adição de 0,5 mL da mistura contendo molibdato de amônio 2% em H₂SO₄ 2%+ ácido ascórbico 1% (100:1) e após 15 minutos foi feita a leitura em um espectrofotômetro Shimadzu UV-2000 no comprimento de onda de 750 nm. Nesta reação o fosfato é incorporado dentro de um complexo fósforo-molibdênio e reduzido com ácido ascórbico para formar a cor azul. Composição do meio de reação: 10 mM de Mops [ácido 3-(N-morfino) propano sulfônico]-Tris pH 6,5, 3 mM de MgCl₂, 100 mM de KCl, 1 mM de ATP e 30 µg de proteína. Cerca de 70-90% da atividade da H⁺-ATPase das vesículas medida foi inibida por 0,2 mM de ortovanadato de sódio (Na₃VO₄), um inibidor muito eficiente da ATPase do tipo P (De Michelis e Spanswick, 1986). Em todos os experimentos, a atividade hidrolítica da H⁺-ATPase foi medida a 35°C, com ou sem vanadato, e a diferença entre essas duas atividades foi atribuída a ATPase do tipo P.

Determinação da atividade da V-ATPase e da H⁺-PPase

A atividade da H⁺-PPase e da V-ATPase de vesículas de tonoplasto foi determinada pela medida da liberação de Pi, segundo o método colorimétrico clássico descrito por Fiske e Subbarow (1925). A reação foi iniciada com a adição da proteína e parada através da adição de ácido tricloro acético (TCA gelado) para uma concentração final de 10% (v/v). A atividade enzimática da H⁺-PPase representa a atividade hidrolítica de PPi dependente de K⁺ (V-PPase tipo 1) e foi obtida na presença e ausência de 100 mM de KCl. A atividade foi dependente de KCl em pelo menos 60%. Já, cerca de 80-95% da atividade da V-ATPase das vesículas medidas a pH 7,0 foi inibida por 10 nM de concanamicina, um eficiente inibidor da V-ATPase. O meio de reação conteve 10 mM de Mops-Tris (pH 7,0) 100 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂ e 50 µg de proteína. A atividade da H⁺-PPase das vesículas medidas a pH 7,0 foi medida por diferença entre a ausência e presença de KCl. A atividade da V-ATPase das vesículas medidas a pH 7,0 foi medida por diferença entre a ausência e presença de Concanamicina.

Atividade de bombeamento da H⁺-ATPase de Membrana Plasmática

O gradiente de prótons foi mensurado através da taxa de decréscimo da fluorescência ($\Delta F/\text{min}$) da sonda fluorescente metacromática, 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina (ACMA), excitada com um feixe de comprimento de onda de 415 nm e a emissão captada a 485 nm a 25°C, em um espectrofluorímetro (model F3010, Hitachi, Tokyo), utilizando um protocolo adaptado por Façanha e De Meis (1988). O meio reacional foi composto de Tris-HCl 10 mM pH 6,5, KCl 100 mM, ACMA 2 µM, MgCl₂ 5 mM, ATP 1 mM. A reação foi iniciada com a adição de 30 µg mL⁻¹ de proteína. A adição de 20 mM NH₄Cl foi utilizada para revelar a recuperação da fluorescência que indica o colapso do gradiente de H⁺ formado preliminarmente. A atividade de bombeamento de H⁺ foi mensurada com e sem Na₃VO₄ 0,2 mM e a atividade vanadato sensível foi atribuída a P-H⁺-ATPase. Para analisar os efeitos da melanina exsudada pelo fungo *P. tinctorius* na atividade de bombeamento de H⁺ da P-H⁺-ATPase, 750 mg L⁻¹ de melanina foram incubadas por 5 min com as vesículas contendo as P-H⁺-ATPases, antes do início da reação.

Atividade de bombeamento da H⁺-ATPase e H⁺-PPase vacuolares

O gradiente de prótons foi mensurado através da taxa de decréscimo da fluorescência ($\Delta F/\text{min}$) da sonda fluorescente metacromática, 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina (ACMA), excitada com um feixe de comprimento de onda de 415 nm e a emissão captada a 485 nm a 25°C, em um espectrofluorímetro (modelo F3010, Hitachi, Tokyo), utilizando um protocolo adaptado por Façanha e De Meis (1998). O meio reacional foi composto de HEPES 10 mM pH 6,5, KCl 100 mM, ACMA 2 μM , MgSO_4 3 mM e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína. A reação foi iniciada com a adição de 1 mM de ATP para as H⁺-ATPases de membrana plasmática e 1 mM de PPi para as H⁺-PPases. A adição de 1,5 mM NH_4Cl foi utilizada para revelar a recuperação da fluorescência que indica o colapso do gradiente de H⁺ formado preliminarmente. A atividade de bombeamento de H⁺ das ATPases do tipo P foi mensurada com e sem Na_3VO_4 0,2 mM e a atividade vanadato sensível foi atribuída a P-H⁺-ATPase. Já a atividade de bombeamento de H⁺ das ATPases do tipo V foi mensurada com e sem Concanamicina 5 nM e a atividade concanamicina sensível foi atribuída a V-H⁺-ATPase.

Medições dos fluxos de H⁺ utilizando o sistema de eletrodos vibráteis íons-seletivos (SIET)

Neste estudo foram analisadas plantas de tomate (MT, SP, DGT e SP-DGT) crescidas em câmara de crescimento controlado por 10 dias, posteriormente neste período foram analisadas, sendo aplicado 1 μM de ácido indol-3-Acético (AIA) durante a leitura.

Uma descrição detalhada do procedimento experimental da técnica de eletrodos vibráteis íons-seletivos, utilizada neste estudo, já foi bem descrita em estudos anteriores (Feijó et al., 1999; Zonia et al., 2002; Ramos et al., 2009).

Plântulas tomate foram colocadas em placas de Petri de plástico (140 x 140 mm) contendo 30 mL de solução de Hoagland 1/2 F. Os microeletrodos vibráteis ion-específicos foram produzidos como descrito por Feijó et al. (1999). Estes foram produzidos de microcapilares de borossilicato com diâmetro exterior de 1,5 mm e 1,12 mm de diâmetro interior (www.sutter.com), 30 utilizando o aparelho Puller Flaming Brown, Sutter P-98 (Sutter Instruments, Novato, CA). Posteriormente, os

microeletrodos foram colocados sob um suporte de vidro coberto por um becker de vidro (1 L) e secos em estufa a 250°C por 3 h. Após este período, foi realizada a silanização dos microcapilares, por exposição a vapor de N, N-dimetiltrimetilsilamina (C₅H₁₅NSi, Fluka 41716), ainda na estufa por 20 min e deixados para secar por mais 3 h, na mesma temperatura. Após a vaporização com silano (C₅H₁₅NSi), os microeletrodos foram preenchidos com uma solução de eletrólito (15 mM KCl e 40 mM KH₂PO₄, pH 6.0, para H⁺) correspondente a uma coluna de 1,5 mm do eletrodo. Após esta etapa, os eletrodos foram preenchidos na ponta, com uma coluna de 20 a 25 µm do respectivo coquetel seletivo, contendo os ionóforos respectivos aos íons estudados (Fluka, Milwaukee, WI). Para estabelecer o contato elétrico com o meio, foi inserido na extremidade basal do microeletrodo, um suporte com um eletrodo de Ag/AgCl (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA).

O eletrodo de referência foi uma referência seca (DRIREF-2, World Precision Instruments), inserido no meio de banho da amostra. Os sinais foram medidos pelo amplificador (www.applicableelectronics.com), sendo a vibração e o posicionamento do eletrodo obtidos através de motores posicionais (steppermotors), os quais permitem um movimento tridimensional. O controle dos motores, a aquisição de dados e o seu processamento preliminar foram ajustados no software ASET (Science Wares [East Falmouth, MA]- www.sciencewares.com). A calibração dos eletrodos foi realizada por medição do potencial (mV) registrado em três soluções contendo o íon em estudo, com concentração conhecida: 0,1 mM, 1 mM e 10 mM; dado que as concentrações abrangem as condições dos meios utilizados.

A coleta dos dados da microsonda vibrátil seletiva, foi realizada pelo software ASET, que fornece a informação necessária para calcular o fluxo iônico em um determinado ponto [x, y, z] do espaço, por meio da lei de Fick ($J = D (dc/dx)$). O coeficiente de difusão (D) é um valor tabelado para cada íon (de acordo com Handbook of Chemistry and Physics, Chemical Rubber Co.). A diferença espacial (dx) resulta do cálculo da distância entre os dois pontos em que foram realizadas as medições das concentrações para cálculo do fluxo (10 µm). A diferença de concentração (dc) é um vetor que varia ao longo do ensaio. Em cada ponto, a concentração pode ser calculada a partir do valor de mV registrado no dado ponto e da equação previamente determinada para o ionóforo durante o processo de calibração.

pH da rizosfera



Raízes de plântulas de tomate tratadas ou não por 72h com AIA foram colocadas sobre uma camada de 5 mm de gel agar 1% contendo 10 mM de CaSO_4 e 0,03% do indicador de pH púrpura de bromocresol em pH 6,5 em placas de Petri. A mudança da cor do meio de púrpura para amarelo demonstra a acidificação da raiz (a cor amarela indica que o pH está abaixo de 6,0). As imagens foram gravadas após 70 min. de incubação.

Análises estatísticas

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado constando de 4 genótipos de tomateiro cv. Micro-tom (MT, SP, DGT e SP-DGT) constando de 16 repetições (4 plantas por vaso por genótipo). Os fluxos de H^+ , medidos nas condições meio de medição (-) AIA e meio de medição (+) AIA, foram analisados estatisticamente através de two-way ANOVA, seguido do teste de médias (Tukey a $p \leq 0,05$). Todas as análises foram conduzidas utilizando-se o programa GraphPad Prism 8.02, utilizando um nível de 5% de significância para os testes das hipóteses. Uma análise de componente principal (PCA) foi utilizada para correlacionar os parâmetros analisados, através do programa FITOPAC 2.1.2.85.

RESULTADOS

Efeitos do silenciamento dos genes SP e DGT no crescimento de plantas de tomate

Plantas de tomate cv. Micro-tom tiveram seus parâmetros de crescimento medidos após 75 dias em meio hidropônico. As plantas do genótipo SP apresentaram valores de altura e peso seco da parte aérea entre 30% e 40% significativamente menores quando comparadas às plantas dos demais genótipos



($p=0,034$ e $p=0,0105$ respectivamente; **Figura 1A, 1B e 1D**). Não houve diferença significativa entre as plantas MT, DGT e SP-DGT com relação a estes parâmetros.

Já os genótipos DGT e SP-DGT apresentaram tanto o volume radicular ($p=0,009$) quanto o peso seco da raiz ($p=0,0008$) significativamente menores que os valores encontrados nas plantas MT, assim como se comparadas às plantas SP ($p=0,0156$ e $p=0,0056$, respectivamente; **Figura 1A, 1C e 1E**). Não foi possível observar diferenças significativas entre as plantas MT e DGT com relação a estes parâmetros.

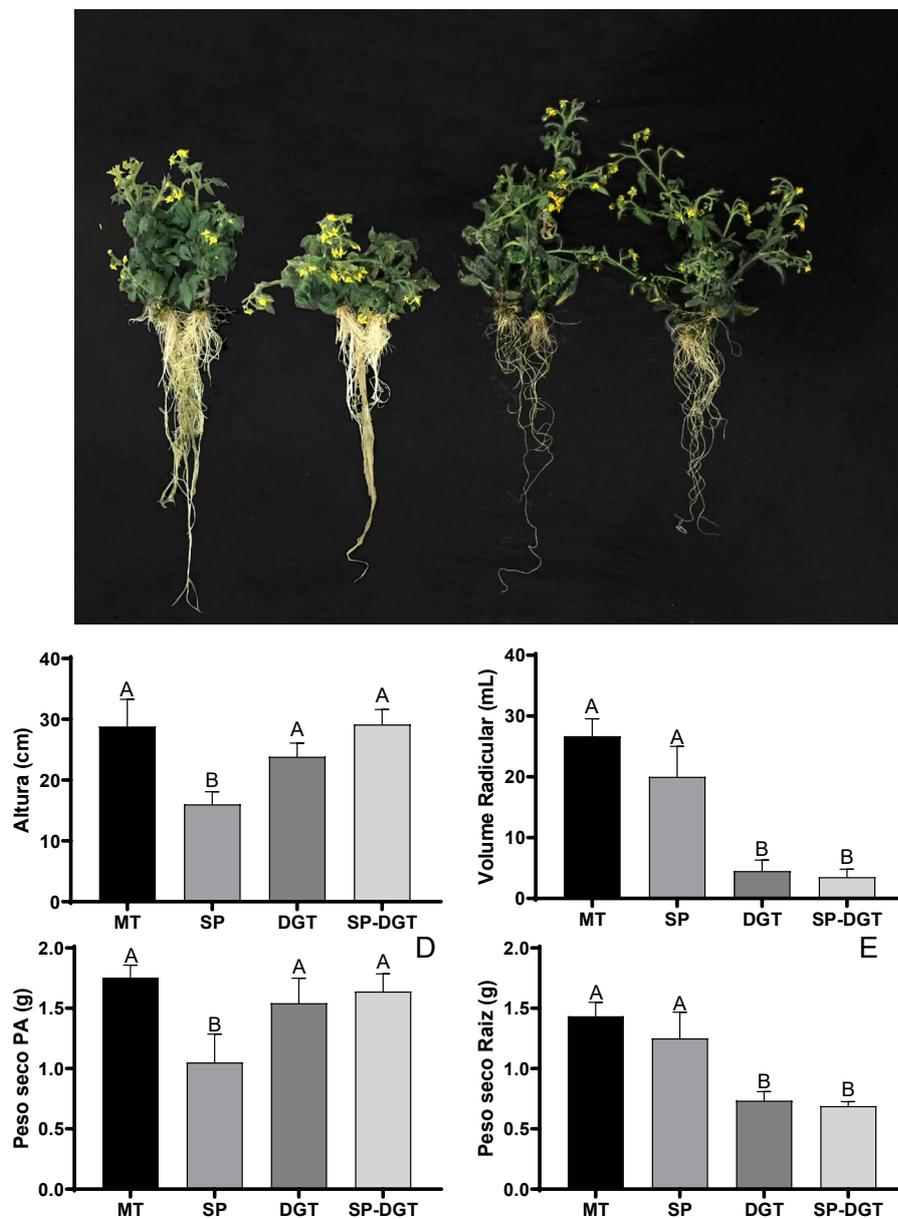


Figura 1. (A) Visualização frontal das plantas. (B) Altura (C) Volume radicular, (D) Peso seco da parte aérea e (E) peso seco da raiz de plantas de tomate Micro-tom (SP, WT, DGT e SP-DGT) crescidas por 75 dias. Tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) ($n = 16$).

Silenciamento do gene SP influencia o desenvolvimento dos tomates

As plantas do genótipo SP apresentaram valores de peso e diâmetro dos frutos maiores que os genótipos DGT ($p=0,0013$ e $p=0,0001$, respectivamente) e SP-DGT ($p=0,0032$ e $p=0,0001$, respectivamente; Figura 2). Apesar do valor médio ser maior que o encontrados nas plantas MT, não foi possível diferenças significativas ($p=0,061$ e $p=0,056$, respectivamente; Figura 2).

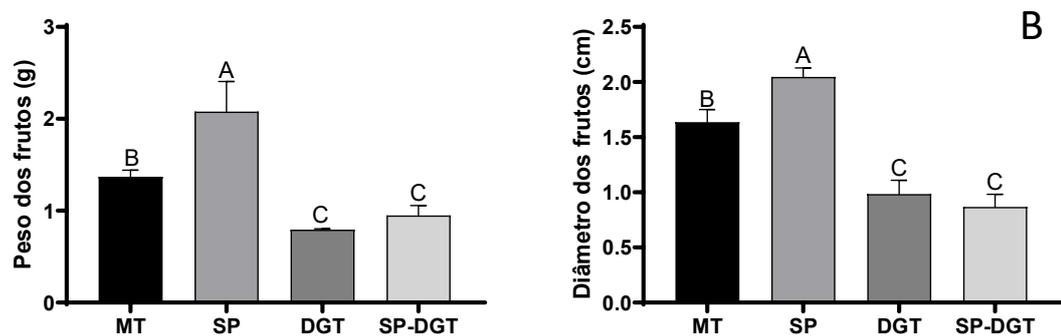


Figura 2. (A) Peso dos frutos e (B) Diâmetro dos frutos de plantas de tomate Micro-tom (SP, WT, DGT e SP-DGT) crescidas por 75 dias. Tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) ($n = 16$).

Análise das trocas gasosas em plantas de tomate Micro-tom

Plantas de tomate do genótipo SP apresentaram taxas fotossintéticas (A) 43,27% maiores que as plantas MT ($p=0,0021$; Figura 3A). Já as plantas DGT e SP-DGT apresentaram valores entre 50 e 65% menores que as plantas MT ($p=0,0167$ e $p=0,0048$; Figura 3A). Já com relação às taxas de transpiração (E) e condutância estomática (g_s), as plantas SP também apresentaram valores superiores aos encontrados nas plantas MT ($p=0,0014$ e $p=0,0135$; Figura 3B e 3C). Semelhante aos resultados encontrados para a taxa fotossintética, as plantas DGT e SP-DGT apresentaram valores significativamente menores que as plantas MT com relação à taxa de transpiração ($p=0,0334$ e $p=0,0322$) e condutância estomática ($p=0,0234$ e $p=0,0165$).

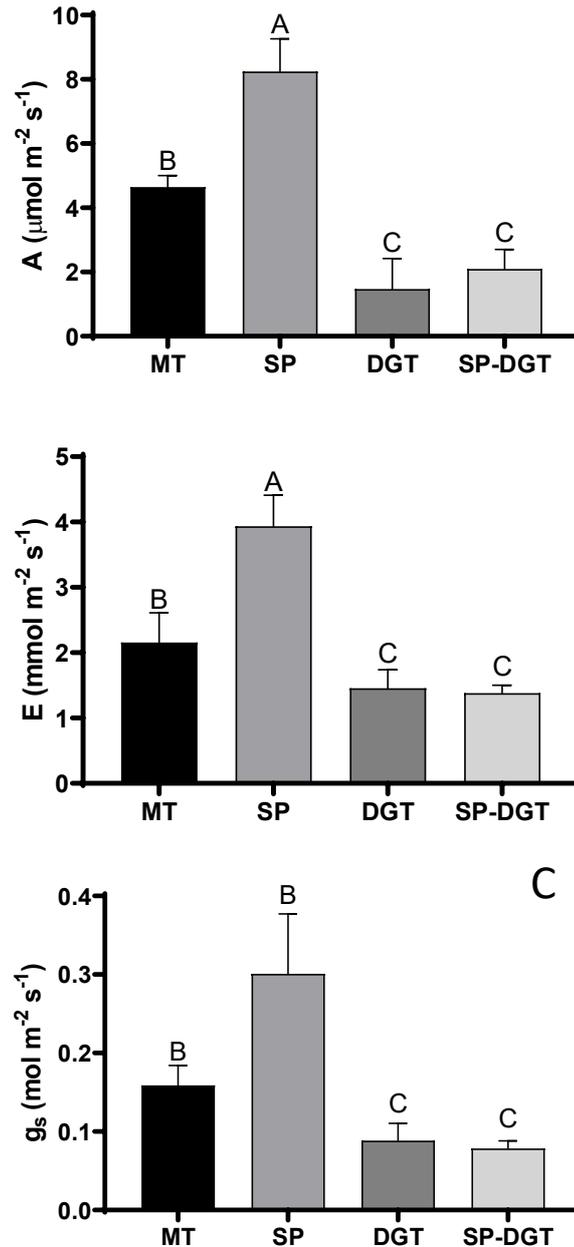


Figura 3. (A) Taxa fotossintética (A), (B) Condutância estomática (g_s) e (C) Taxa de transpiração (E) de plantas de tomate Micro-tom (SP, WT, DGT e SP-DGT) crescidas por 75 dias. Tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) ($n=16$).

Atividade hidrolítica das H^+ -ATPases e H^+ -PPases

A atividade das P- H^+ -ATPase, V- H^+ -ATPase e H^+ -PPase foram determinadas em fração microsomal isoladas de raízes dos genótipos do tomateiro Micro-tom (MT, SP, DGT e SP-DGT; Figura 4).

Plantas de tomateiro do genótipo DGT apresentaram atividade hidrolítica das H^+ -ATPases de membrana plasmática 32,68% maior que as plantas MT e 45,91% ($p=0,0029$ e $p=0,0003$; Figura 4A). Não possível notar diferença significativa na atividade hidrolítica destas proteínas entre as plantas do genótipo DGT e SP-DGT ($p=0,0514$; Figura 4A).

A atividade hidrolítica das H^+ -ATPases presentes no tonoplasto se mostraram menores nas plantas dos genótipos SP (53%; $p=0,0037$; Figura 4B) e DGT (62,80%; $p=0,0012$) se comparadas às plantas do genótipo MT. Não houve diferença significativa entre as plantas do genótipo MT e SP-DGT em relação à atividade desta proteína ($p=0,1112$; Figura 4B).

Plantas do genótipo SP apresentaram atividade hidrolítica das H^+ -PPases 186,05% maior que nas plantas MT ($p=0,0004$; Figura 4C). Não foi possível notar diferença significativa entre os demais genótipos (DGT e SP-DGT) e as plantas MT ($p=0,4490$ e $p=0,7958$; Figura 4C).

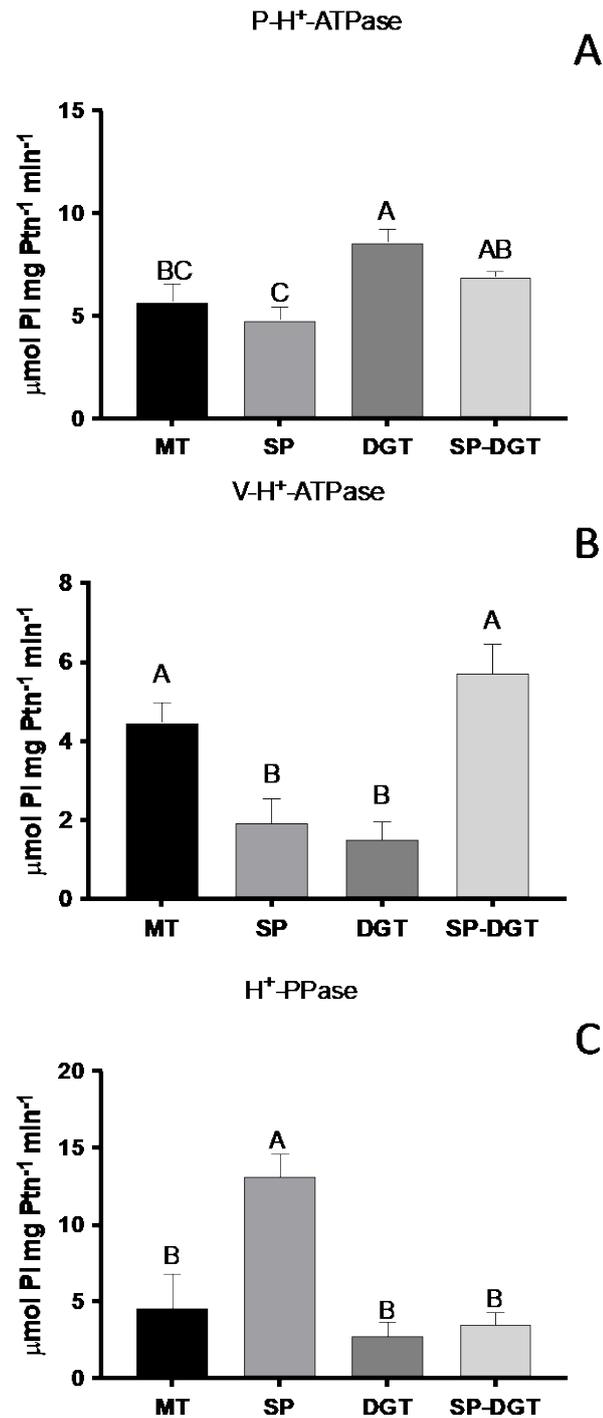


Figura 4. Atividade hidrolítica das bombas de H⁺ (A) P-ATPase, (B) V-ATPase e (C) PPase da fração microssomal isoladas de raízes de plantas de tomate Micro-tom (SP, WT, DGT e SP-DGT) crescidas por 75. Tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) ($n = 4$).

Atividade de Bombeamento de H⁺ das H⁺-ATPases e H⁺-PPases

O transporte de H⁺ dependente de ATP e PPI foi estimado pelo decréscimo da fluorescência da sonda sensível ao pH, 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina

(ACMA) e então pode ser calculada a fluorescência máxima (total) ($\Delta F_{\text{máx}}$) nos diferentes genótipos de tomateiros Micro-tom.

Plantas do genótipo SP apresentaram valores de fluorescência máxima, referente à atividade das H^+ -ATPases de membrana plasmática, 45,13% maior que nas plantas do genótipo MT ($p=0,0006$; Figura 5A). Já as plantas DGT apresentaram o valor de $F_{\text{máx}}$ 77,14% menor que as plantas MT ($p=0,0005$; Figura 5A).

Em relação às H^+ -ATPases presentes no tonoplasto, o maior valor de $F_{\text{máx}}$ foi encontrado nas plantas do genótipo SP, sendo este valor significativamente maior que o encontrado nas plantas MT ($p=0,0060$; Figura 5B). Já as plantas DGT apresentaram valores 51,82% menores que nas plantas MT ($p=0,0036$; Figura 5B), sendo que estes valores não diferiram significativamente dos encontrados nas plantas SP-DGT ($p=0,9460$; Figura 5B).

As plantas MT apresentaram valores de $F_{\text{máx}}$ superiores aos demais genótipos, principalmente em relação às plantas SP, em que o valor foi 47,96% maior ($p=0,0008$; Figura 5C). Já em relação aos genótipos SP e SP-DGT a diferença ficou entre 22% e 31% ($p=0,0139$ e $p=0,0039$; Figura 5C).

Na Figura 6 é possível observar o decaimento da fluorescência devido à aplicação do ATP e consequente atividade de bombeamento de H^+ das H^+ -ATPases e H^+ -PPases. É possível observar que as atividades referentes às H^+ -ATPases de membrana plasmática e vacuolares foram maiores no tratamento SP (Figura 6A e 6B). Já com relação às H^+ -PPases, o maior decaimento pôde ser visto no tratamento DGT (Figura 6C).

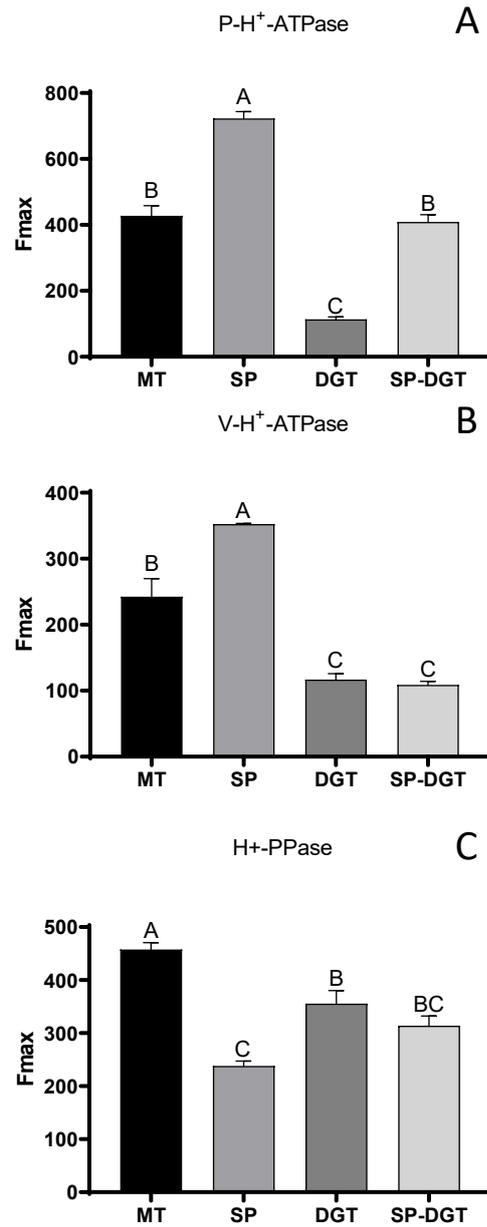


Figura 5. Atividade de transporte de H⁺ realizada pelas bombas (A) P-ATPase, (B) V-ATPase e (C) PPase da fração microssomal isolada de raízes de plantas de tomate Microtom (SP, WT, DGT e SP-DGT) crescidas por 75 dias. Tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) ($n = 4$).

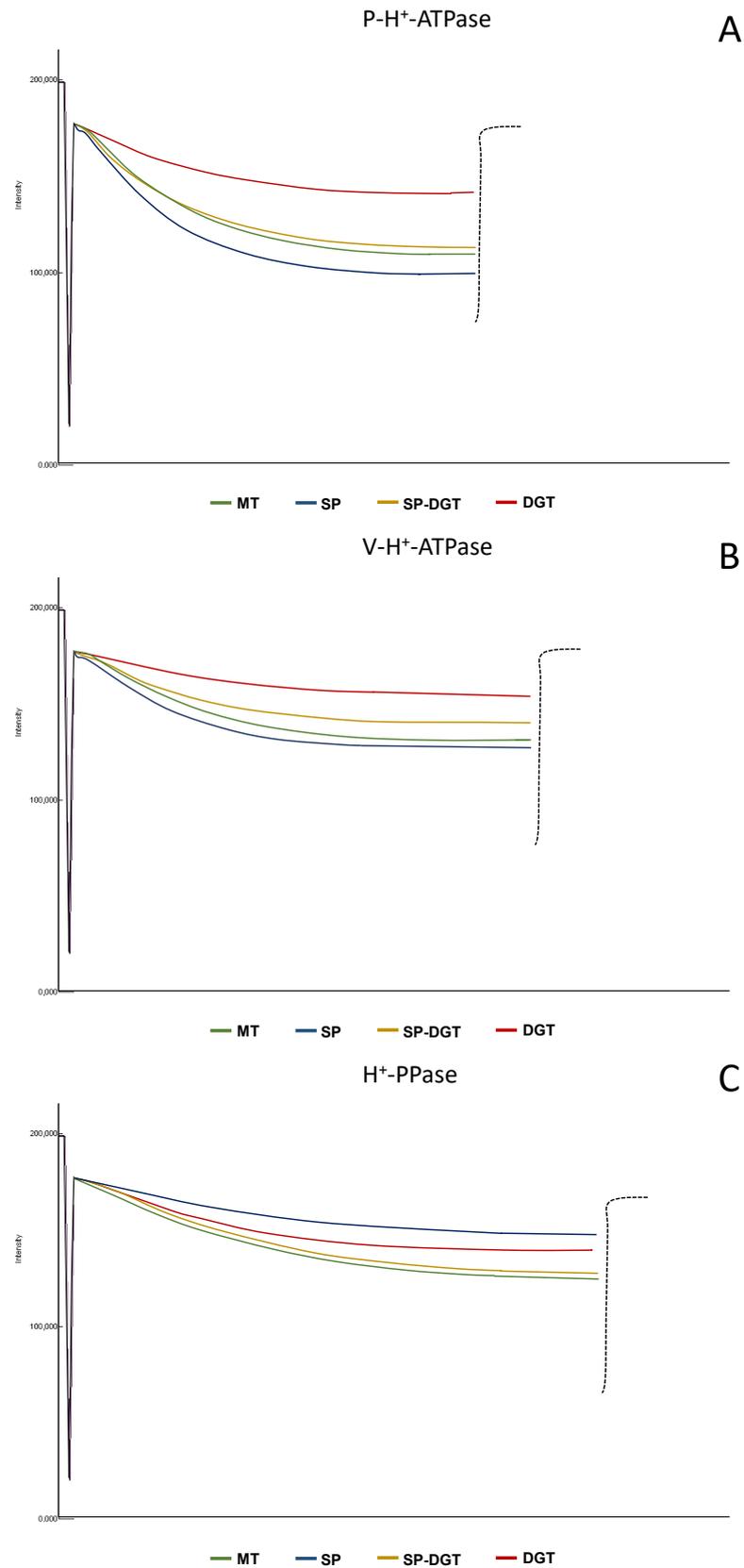


Figura 6. Atividade de transporte de H⁺ realizado pelas bombas (A) P-ATPase, (B) V-ATPase e (C) PPase da fração microsomal isolada de raízes de plantas de tomate Microtom (SP, WT, DGT e SP-DGT) crescidas por 75 dias. Tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) ($n = 4$).

Alterações no fluxo de H⁺ na zona de alongamento e no pH de raízes dos genótipos de tomateiro Micro-tom decorrentes da aplicação do fitormônio auxina

Plântulas dos diferentes genótipos de tomateiro Micro-tom com 10 dias tiveram os fluxos de H⁺ avaliados na zona de alongamento radicular, sendo verificadas as diferenças entre eles, assim como a resposta dos mesmos à adição de 1 µM do fitormônio auxina.

Todos os genótipos de tomateiro apresentaram influxo de H⁺ como perfil padrão (Figura 7). Plantas do genótipo SP apresentaram um perfil de influxo de H⁺ de $-0,351 \pm 0,055$, de intensidade significativamente menor que o encontrado nas plantas SP ($p \leq 0,0001$), DGT ($p \leq 0,0001$) e SP-DGT ($p \leq 0,0001$), que apresentaram influxos de $-2,146 \pm 0,088$, $-1,733 \pm 0,110$ e $-1,805 \pm 0,196$, respectivamente (Figura 7E).

Para inferir a resposta dos diferentes genótipos de tomateiro a auxina, foi aplicado 1µM do fitormônio na zona de alongamento das raízes dos tomates, e após 30 minutos foi realizada a medição do fluxo de H⁺. Plântulas do genótipo MT e SP apresentaram perfil de efluxo de H⁺, após esse período, de $1,368 \pm 0,081$ e $1,024 \pm 0,137$, respectivamente, sendo o fluxo das plantas MT significativamente maior que o encontrado nas plantas SP ($p=0,0016$; Figura 7A, 7B e 7E). Tanto o genótipo DGT quanto o SP-DGT permaneceram com o perfil do fluxo de H⁺ em influxo após a aplicação da auxina de $-1,635 \pm 0,057$ e $-1,957 \pm 0,202$ (Figura 7C, 7D e 7E), sendo que o genótipo SP-DGT apresentou um valor de influxo 20,9% maior que as plantas DGT ($p=0,0040$; Figura 7E). Nos genótipos DGT e SP-DGT também foi possível notar que não houve diferença significativa entre o perfil de fluxo de H⁺ anterior e posterior à aplicação da auxina ($p=0,9091$ e $p=0,7859$, respectivamente; Figura 7E).

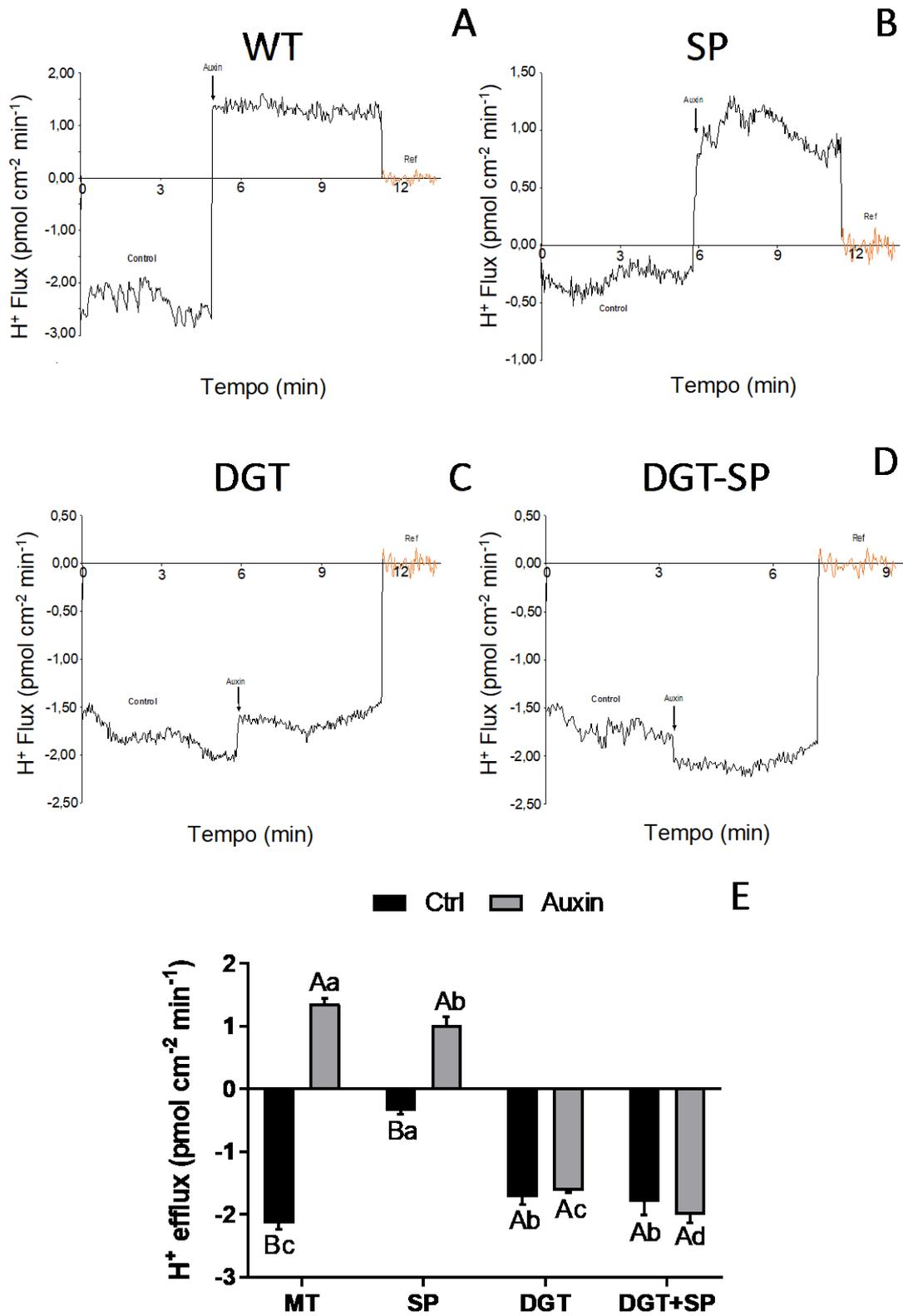


Figura 7. Atividade de transporte de H⁺ realizada pelas bombas (A) P-ATPase, (B) V-ATPase e (C) PPase da fração microsomal isolada de raízes de plantas de tomate (SP, WT, DGT e SP-DGT) crescidas por 75 dias. Tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) ($n = 4$).

Análise de componentes principais (PCA)

A análise de componente principal foi realizada para descobrir as possíveis relações entre os parâmetros de crescimento (altura, peso seco da parte aérea, peso seco da raiz e volume radicular), parâmetros dos frutos (diâmetro e peso fresco) e os parâmetros fotossintéticos entre os genótipos de tomateiro (Figura 8).

Nesta análise foi possível observar que os parâmetros diâmetro dos frutos, peso fresco dos frutos, taxa fotossintética (A), taxa de transpiração (E), condutância estomática (gs) estão mais relacionados às plantas SP, enquanto Volume radicular e Peso seco da raiz estão mais relacionados ao genótipo MT. Os genótipos DGT e SP-DGT não apresentaram nenhuma relação próxima para com os parâmetros analisados na PCA, estando inclusive negativamente relacionados aos parâmetros radiculares, o mesmo aconteceu com as plantas SP, porém apenas no que tange ao parâmetro Altura.

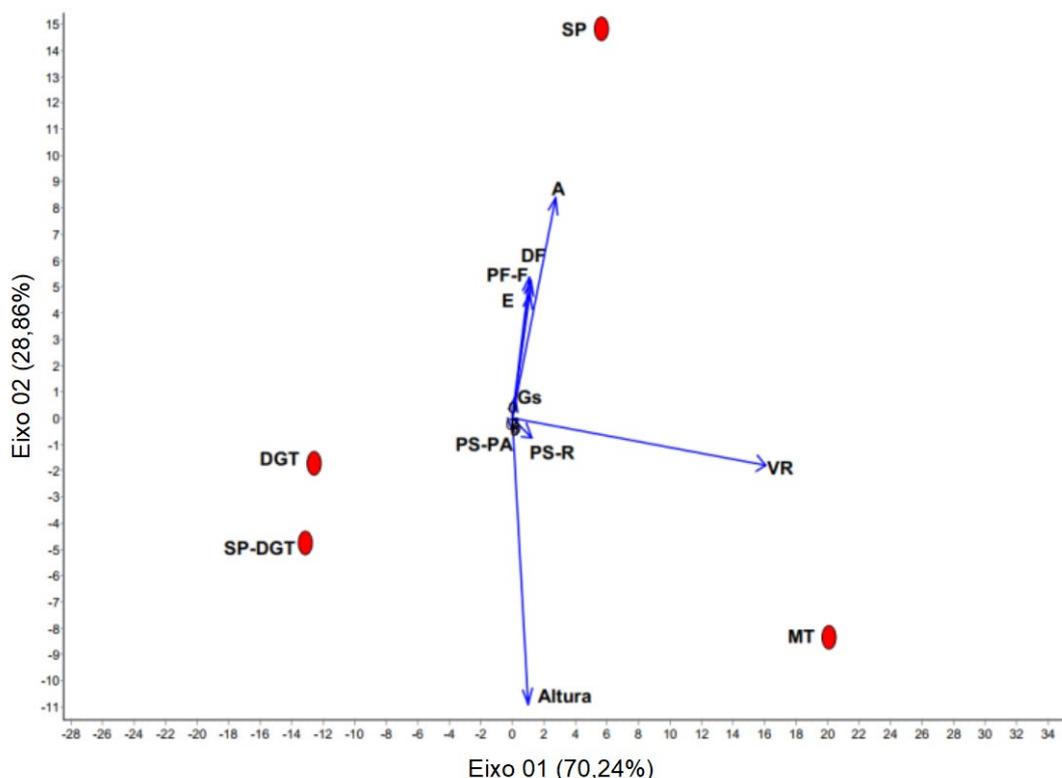


Figura 8. Análise de PCA da Altura, Peso seco da parte aérea (PS-PA), Peso seco da raiz (PS-R) e volume radicular (VR), Diâmetro dos frutos (DF) e peso fresco dos frutos (PS-F) entre os genótipos de tomateiro Micro-tom (SP, WT, DGT e SP-DGT) crescidos por 75 dias.

DISCUSSÃO

Neste estudo, foram avaliadas como alterações na expressão dos genes SP e DGT, que influenciaram no crescimento e na fisiologia de plantas de tomateiro Micro-tom, bem como na atividade das bombas de H^+ (P- H^+ -ATPase, V- H^+ -ATPase e H^+ -PPase) e no fluxo de H^+ nas regiões de alongamento radicular.

Os genes SP e DGT alteram o perfil de crescimento dos tomates cv. Micro-Tom

Plantas do genótipo SP foram descritas inicialmente com um hábito de crescimento da parte aérea compacto e espesso, apresentando também um número reduzido de folhas em sucessivas unidades simpodiais (Yeager, 1927; MacArthur, 1934; Pnueli et al., 1998). Estas características foram evidenciadas em nossos resultados, uma vez que plantas deste genótipo apresentaram valores de altura e peso seco da parte aérea significativamente inferiores aos encontrados nos demais genótipos de tomateiro cv. Micro-tom (Figura 1). No entanto, este efeito não se traduziu em relação aos parâmetros radiculares.

Já as plantas dos genótipos DGT e SP-DGT não apresentaram valores referentes à altura diferentes dos encontrados nas plantas controle, entretanto os valores referentes ao volume radicular e peso seco da raiz se mostraram menores que os encontrados tanto nas plantas MT, quanto nas plantas SP (Figura 1). Saiba-se que o tráfego de longa distância da ciclofilina A da parte aérea para a raiz é fundamental para as respostas referentes à auxina, alterando a morfologia do xilema e o desenvolvimento radicular (Spiegelman et al., 2015). Uma vez que plantas DGT, apresentam defeitos com relação ao transporte da ciclofilina A, conseqüentemente manifestam menor sensibilidade à auxina e, devido a isso, menor desenvolvimento radicular e baixa emissão de raízes laterais, semelhante aos resultados aqui encontrados (Spiegelman et al., 2017). Um estudo conduzido por Spiegelman et al. (2015), evidenciou que o resgate do fenótipo da raiz de plantas DGT pode ser parcialmente alcançado através do enxerto de plantas

SlCyp1-PX (que expressam uma ciclofilina A específica do floema) em porta-enxertos mutantes DGT. Essas observações são consistentes com a ideia de que o tráfego da Ciclofilina A pelo floema atua como um sinal móvel que auxilia na percepção e guia para a auxina, exercendo um papel fundamental para as respostas referentes a este fitormônio tanto na parte aérea quanto na raiz.

Recentemente foi demonstrado que possivelmente existe uma interação forte e complexa entre SP e DGT no controle da dominância apical, em que estes genes agem sinergicamente na orientação das respostas auxínicas para o desenvolvimento tanto da parte aérea, quanto da raiz. Logo, pode ser um indicativo do motivo pelo qual ambos os genótipos diferiram no desenvolvimento destes órgãos em relação às plantas MT neste estudo (Silva et al., 2018). No entanto, como esses genes impactam as respostas auxínicas ao nível celular, permanece sem respostas.

Plantas SP apresentam maior taxa de assimilação de CO₂ e consequentemente frutos maiores

Os fitormônios desempenham papéis essenciais em vários processos biológicos nas plantas, como imunidade, tolerância ao estresse abiótico, respostas sistêmicas e regulação do crescimento (Zhan et al., 2018). A auxina atua em inúmeros processos, principalmente transmitindo informações em longas e curtas distâncias, direcionando o desenvolvimento das plantas (Leyser, 2018), impactando até mesmo processos como a fotossíntese e a respiração (Ivanova et al., 2014; Bhardwaj et al., 2015; Li et al., 2020). A ligação entre a sinalização da auxina e o metabolismo do carbono em tecidos autotróficos permanece pouco conhecida (Batista et al., 2018).

Nossos resultados indicaram que plantas SP apresentaram a taxa fotossintética (A), transpiração (E) e condutância estomática (g_s) maiores que os demais tratamentos (Figura 3). Um estudo conduzido por McGarry et al. (2016), mostrou que plantas de algodão com silenciamento do gene SP apresentaram taxa fotossintética superior às plantas controle, semelhante aos resultados encontrados neste estudo.

Os frutos de tomate provenientes destas plantas também apresentaram valores referentes tanto ao peso fresco quanto ao diâmetro superiores aos demais

genótipos (Figura 2). Sabe-se que o tamanho do fruto pode estar diretamente relacionado às variações referentes às taxas fotossintéticas (Nilsen et al., 1983). Quando os frutos começam a se desenvolver os produtos originados na fotossíntese são transportados via floema para o enchimento dos mesmos, logo quanto maior a taxa de assimilação de carbono, maior será a possibilidade de os frutos apresentarem tamanhos maiores (Chalmers et al., 1975). Segundo Silva et al. (2018), estas plantas apresentam uma densidade de vasos maior que os demais genótipos, o que poderia representar uma vantagem em relação às taxas fotossintéticas, logo pode-se especular que este seja o motivo pelo qual estas plantas apresentaram maiores taxas fotossintéticas e frutos, neste estudo.

Já as plantas DGT e SP-DGT apresentaram a taxa fotossintética (A), transpiração (E), condutância estomática (g_s) e frutos menores que os valores encontrados nas plantas controle (Figura 3). De fato, plantas que apresentam silenciamento do gene DGT foram descritas anteriormente com capacidade fotossintética reduzida e, conseqüentemente, menores frutos que as plantas controle, corroborando com os resultados aqui encontrados (Batista et al., 2018). Já existem relatos de que a ciclofilina A está diretamente relacionada com a capacidade fotossintética das plantas (Spiegelman et al., 2015). Segundo estes autores, a ciclofilina A produzida nas folhas são transportadas via floema até as raízes, e lá, juntamente com a ciclofilina A expressa localmente, aumentam as respostas ao fitormônio auxina nestes tecidos. Dentre os efeitos relacionados estão: aumento da densidade de vasos, aumento da emissão de raízes laterais, aumento da absorção de nutrientes, aumento do transporte de água e nutrientes via xilema e por fim, aumento das taxas de transpiração e assimilação de carbono. Logo, o silenciamento do gene que expressa a ciclofilina A promove defeitos em todo este processo, possivelmente, sendo este o motivo pelo qual plantas DGT apresentaram tanto menores taxas fotossintéticas quanto menores frutos comparativamente às plantas controle, reforçando a importância da ciclofilina A e do fitormônio auxina para todo este processo.

Plantas SP e DGT apresentam modulações diferenciais das bombas de H^+ isoladas do tecido radicular

A auxina atua como coordenadora geral do crescimento e desenvolvimento das plantas. De certo, é uma via de sinalização elegante, curta e versátil, através da qual este fitormônio desencadeia modulações celulares, tanto em níveis transcricionais, quanto pós-transcricionais, sendo uma das mais clássicas, as modulações referentes às H^+ -ATPases, em especial as de membrana plasmática, que regem o crescimento celular (Falhof et al., 2015). Nos últimos anos, houve um progresso considerável na compreensão do mecanismo de resposta celular à auxina. No entanto, é cada vez mais claro que esse caminho não é suficiente para explicar todas as respostas referentes a este fitormônio, uma vez que evidências sobre outros sistemas de sinalização estão surgindo, e as explicações acabam ficando vagas (Leyser, 2018).

Neste estudo, trabalhamos com plantas de tomate da cultivar Micro-tom, que apresentam silenciamento dos genes SP e DGT. Recentemente, estes genes vêm sendo apontados como possíveis alvos para a realização do melhoramento de plantas, devido às suas atribuições, tais como: regulação do crescimento vegetativo, desenvolvimento radicular e dos frutos. Segundo Silva et al., (2018), estas modificações fenotípicas se devem a alterações em relação à sinalização auxínica, entretanto como isso modula as respostas em nível celular e permanece obscuro. Porém, já é bem sabido que as respostas relacionadas a este fitormônio estão intimamente relacionadas à modulação das bombas de H^+ (Falhof et al., 2015; Leyser, 2018).

Plantas com silenciamento do gene DGT apresentaram alta atividade hidrolítica das H^+ -ATPases de membrana plasmática e menores atividades das bombas de H^+ vacuolares, em relação às plantas MT (Figura 5). Já com relação à atividade de bombeamento de H^+ foi possível notar que a atividade das H^+ -ATPases de membrana plasmática e de tonoplasto apresentou valores menores que as do controle, em contrapartida as H^+ -PPases apresentaram aumento desta atividade (Figura 6). Estes resultados indicam que nestas plantas as H^+ -ATPases de membrana plasmática estão desacopladas, ou seja, estão menos eficientes no transporte de H^+ , enquanto as H^+ -PPases estão hiperacopladas. Modulações diferenciais de ATPases e PPases estão usualmente relacionadas a respostas a estresses energéticos, porém tal ativação da bomba de H^+ dependente de pirofosfato integrada a uma menor eficiência de bombas acionadas por ATP é

sugestiva de uma perturbação do sistema padrão de controle do balanço energético celular.

Como foi demonstrado anteriormente, estas plantas apresentaram menor volume radicular, menor taxa de assimilação de carbono e menores frutos, em relação às plantas controle (figura 1, 2 e 3). Estes resultados, segundo a literatura, podem estar diretamente relacionados à atividade das bombas de H^+ aqui encontradas (Palmgren, 2001, Gaxiola et al., 2007; Falhof et al., 2015). Segundo Spiegelman et al. (2015), plantas DGT apresentam uma falha no transporte da ciclofilina A produzida na parte aérea para raiz, diminuindo a sensibilidade à auxina e provocando falhas quanto à emissão de raízes laterais. Muitos estudos já apontaram que a ativação das H^+ -ATPases de membrana plasmática está diretamente relacionada à emissão de raízes laterais, tanto em respostas a auxina, quanto a substâncias com atividade tipo-hormonal, como os ácidos húmicos (Canellas et al., 2002; Zandonadi et al., 2007). Uma vez que estas plantas apresentam menor atividade das H^+ -ATPases de membrana plasmática, é esperado que apresentem menor emissão de raízes laterais. Entretanto, nossos dados indicam que o mecanismo por trás deste fenômeno parece ser muito mais complexo, incluindo defeitos no controle do balanço energético exercido via modulação dos acoplamentos funcionais das principais bombas de H^+ da célula vegetal, com reflexos negativos, diretos e indiretos, sobre o mecanismo de crescimento ácido.

De fato, recentemente muitos trabalhos vêm especulando que as respostas referentes ao fitormônio auxina são mais complexas e envolvem muito mais atores do que foi anteriormente descrito (Leyser et al., 2018). Dentre estes, pode-se destacar os peptídeos RALF, que podem apresentar atividades diferentes entre suas isoformas em diferentes tecidos (Murphy e De Smet, 2014). Segundo Murphy et al. (2016), o RALF 34 atua na emissão de raízes laterais, conjuntamente com o fitormônio etileno, sendo mais recentemente demonstrado que esta isoforma do peptídeo RALF se liga a um receptor específico, THESEUS1, e não ao receptor FERONIA como as demais isoformas deste peptídeo, gerando o sinal necessário para a iniciação do processo de emissão das raízes laterais a partir do periciclo (Gonneau et al., 2018). Há muito se sabe que as plantas DGT parecem ter, além da baixa sensibilidade ao fitormônio auxina, modulação diferenciada com relação à percepção do fitormônio etileno, em que a aplicação exógena deste fitormônio

recupera a sensibilidade das plantas DGT à auxina, recuperando parte do fenótipo relacionado à ausência da expressão deste gene (Chang et al., 1994). Logo, pode-se especular que talvez o mecanismo envolvendo auxina, etileno e a ciclofilina A durante a emissão das raízes laterais pode envolver uma sinalização pontual de peptídeos sinalizadores, como o RALF 34, que porventura são mais eficientes que os próprios fitormônios em respostas em curtas distâncias, em um mesmo tecido (Murphy e De Smet, 2014). Este mecanismo envolvendo estes atores modulariam os sistemas primários de transporte, explicando, em parte, as respostas bioenergéticas encontradas neste estudo.

Já as plantas do genótipo SP apresentaram menor atividade hidrolítica das H⁺-ATPases de membrana plasmática e vacuolares, e maior referente às H⁺-PPases, em relação às plantas MT (Figura 5). Com relação à atividade de bombeamento de H⁺ foi possível notar que a atividade das H⁺-ATPases de membrana plasmática e vacuolares apresentou valores superiores que as encontradas no controle, enquanto as H⁺-PPases apresentaram diminuição desta atividade (Figura 6). Estes resultados indicam que nestas plantas as H⁺-ATPases de membrana plasmática e vacuolares estão hiperacopladas, ou seja, estão mais eficientes no transporte de H⁺ por ATP hidrolisado, enquanto as H⁺-PPases aparentam estar menos acopladas.

As plantas do genótipo SP apresentaram crescimento inferior aos demais genótipos, entretanto tanto a taxa fotossintética quanto o tamanho dos frutos apresentaram valores maiores nestas plantas (Figura 1, 2 e 3). As respostas fotossintéticas estão diretamente associadas à qualidade dos frutos produzidos (Nilsen et al., 1983), e para se obter respostas fotossintéticas consistentes, a planta deve estar bem nutrida, para que a capacidade hidráulica nos vasos condutores seja capaz de manter uma taxa de transpiração alta, mantendo as trocas gasosas em estado ótimo (Guo et al., 2019; Yang et al., 2019). Para tal, a planta deve apresentar alta capacidade de absorção de nutrientes e água do solo, sendo esta resposta diretamente associada às bombas de H⁺ (Palmgren, 2001; Sondergaard et al., 2004; Falhof et al., 2015). Sabe-se que bioestimulantes, como, por exemplo os ácidos húmicos, aumentam a capacidade produtiva das plantas, a partir da estimulação das bombas de H⁺ de membrana plasmática, e conseqüentemente, aumento da capacidade de absorção de nutrientes e de trocas gasosas (Liu e

Bowman, 1998; Canellas et al., 2002, Lotfi et al., 2018), semelhante aos resultados encontrados neste estudo.

Possivelmente, o aumento da eficiência das H^+ -ATPases de membrana plasmática e vacuolar aqui encontrados pode estar diretamente relacionado aos benefícios encontrados nas plantas SP. Sabe-se que estas proteínas consomem a maior parte de todo ATP gerado nas células, desta forma quanto mais eficientes forem, menor o custo energético para a planta como um todo (Felle, 1982; Serrano et al., 1991; Sussman, 1994; Piper et al., 1997; Façanha e De Meis, 1998). Desta forma, pode-se especular que as raízes das plantas SP apresentam maior capacidade de absorver nutrientes e água do solo, porém com um custo energético reduzido. Diminuindo assim, a necessidade de receber fotoassimilados provenientes das folhas, podendo estes serem direcionados em maior quantidade para os frutos, melhorando, assim, a qualidade dos mesmos, sendo muito interessante do ponto de vista agrônomo. Este pode ser o primeiro relato de um gene relacionado a este tipo de controle metabólico que atua na manutenção do princípio da conservação de energia em células vegetais, entretanto mais estudos devem ser conduzidos para validar tal hipótese, principalmente no que tange ao acompanhamento da homeostase de ATP nas células de diferentes genótipos WT, SP e DGT.

Um fator interessante é que estas plantas apresentam uma modulação diferenciada das H^+ -PPases. Segundo Venâncio et al., (2014), o desacoplamento destas proteínas pode estar relacionado à reciclagem do PPi disperso no citosol, em que sua hidrólise libera Pi livre para ser reutilizado pela célula. Neste caso as bombas trabalham hidrolisando o PPi, porém sem realizar a atividade de bombeamento de H^+ para o interior dos vacúolos. Segundo Li et al. (2005), a superexpressão das H^+ -PPases modulam o transporte de auxina, a partir do aumento da expressão das proteínas PIN, aumentando a capacidade de absorção de nutrientes e conseqüentemente maior produtividade de frutos. Baseado em nossos resultados, pode-se especular que estas plantas apresentam uma modulação diferenciada destas proteínas, em que as mesmas podem estar desacopladas funcionando tanto na liberação de Pi a partir da hidrólise de PPi e/ou ATP, quanto, dependendo da sinalização que for dada, estas proteínas podem ativar, aumentando a capacidade homeostática por meio de mobilização das reservas vacuolares, energizada pelas H^+ -ATPases do tonoplasto, que controlam

a entrada e saída de água e nutrientes do vacúolo. De fato, trata-se de uma regulação complexa provavelmente envolvendo uma integração regulatória de todas as bombas de H^+ da célula vegetal, e mais estudos são necessários para entender como os genes SP e DGT, bem como o peptídeo RALF, podem estar relacionados com todas essas alterações, compondo uma versão mais completa e abrangente da proeminente Teoria do Crescimento Ácido.

CONCLUSÃO

Em conclusão, as plantas SP apresentaram crescimento determinado e maiores frutos que as plantas MT, devido a um aumento nas taxas fotossintéticas e a partir de uma regulação diferencial das bombas de H^+ , indicando a possibilidade destas plantas apresentarem maior eficiência energética que as demais.

As plantas com silenciamento do gene DGT de fato apresentaram defeitos quanto à formação de raízes laterais, apresentando assim menor volume radicular que as demais plantas. Estas plantas também apresentaram menor taxa fotossintética e menores frutos, devido possivelmente aos defeitos encontrados nas raízes. Foi identificado que estas plantas apresentam também uma menor eficiência das bombas de H^+ de membrana plasmática, explicando em parte o motivo pelo qual estas apresentam falhas quanto a emissão de raízes laterais.

É possível concluir que, em vista da importância que tanto o gene SP quanto o DGT demonstraram ter na regulação do desenvolvimento vegetal neste estudo, os mesmos podem despontar como importantes alvos moleculares para o melhoramento de plantas.

REFERÊNCIAS

- Batista-Silva, W.; Medeiros, D. B.; Rodrigues-Salvador, A.; Daloso, D. M.; Omena-Garcia, R. P.; Oliveira, F. S. & Zsögön, A. (2019). Modulation of auxin signalling through DIAGETROPICA and ENTIRE differentially affects tomato plant growth via changes in photosynthetic and mitochondrial metabolism. *Plant, Cell & Environment*, 42(2): 448-465.
- Bhardwaj, R.; Kaur, R.; Bali, S.; Kaur, P.; Sirhindi, G.; Thukral, A. K.; Ohri, P. & Vig, A. P. (2015). Role of various hormones in photosynthetic responses of green plants under environmental stresses. *Current Protein and Peptide Science*, 16(5): 435-449.
- Blilou, I.; Xu, J.; Wildwater, M.; Willemsen, V.; Paponov, I.; Friml, J. & Scheres, B. (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature*, 433(7021): 39-44.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-254.
- Canellas, L. P.; Olivares, F. L.; Okorokova-Façanha, A. L. & Façanha, A. R. (2002). Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiology*, 130(4): 1951-1957.
- Chalmers, D. J.; Canterford, R. L.; Jerie, P. H.; Jones, T. R. & Ugalde, T. D. (1975). Photosynthesis in relation to growth and distribution of fruit in peach trees. *Functional Plant Biology*, 2(4): 635-645.
- Chang, S.; Lee, M. S., Kang, B. (1994). Ethylene-induced auxin sensitivity changes in petiole epinasty of tomato mutant dgt. *Journal of Plant Biology*, 37(3): 257-262.

Coenen, C.; Christian, M.; Lüthen, H. & Lomax, T. L. (2003). Cytokinin inhibits a subset of diageotropica-dependent primary auxin responses in tomato. *Plant Physiology*, 131(4): 1692-1704.

Cosgrove, D. J. (2000). Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*, 407(6802): 321-326.

De Michelis, M. I. & Spanswick, R. M. (1986). H⁺-pumping driven by the vanadate-sensitive ATPase in membrane vesicles from corn roots. *Plant Physiology*, 81(2): 542-547.

Dünser, K. & Kleine-Vehn, J. (2015). Differential growth regulation in plants-the acid growth balloon theory. *Current Opinion in Plant Biology*, 28: 55-59.

Facanha, A. R. & de Meis, L. (1995). Inhibition of maize root H⁺-ATPase by fluoride and fluoroaluminate complexes. *Plant Physiology*, 108(1): 241-246.

Feijó, J. A.; Sainhas, J.; Hackett, G. R.; Kunkel, J. G. & Hepler, P. K. (1999). Growing pollen tubes possess a constitutive alkaline band in the clear zone and a growth-dependent acidic tip. *The Journal of Cell Biology*, 144(3): 483-496.

Felle, H. (1982). Effects of fusicoccin upon membrane potential resistance and current-voltage characteristics in root hairs of *Sinapis alba*. *Plant Science Letters*, 25(2): 219-225.



Fiske, C. H. & Subbarow Y. J. (1925). **Calorimetric determination of Phosphorous.** *The Journal of Biological Chemistry*, 68: 374-400.

Friml, J.; Vieten, A.; Sauer, M.; Weijers, D.; Schwarz, H.; Hamann, T.; Offringa, R. & Jürgens, G. (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature*, 426(6963): 147-153.

Gaxiola, R. A., Palmgren, M. G. & Schumacher, K. (2007). Plant proton pumps. *FEBS Letters*, 581(12): 2204-2214.

Gonneau, M.; Desprez, T.; Martin, M.; Doblas, V. G.; Bacete, L.; Miart, F.; Sormani, R.; Hématy, K.; Renou, J.; Landrein, B.; Murphy, E.; Van De Cotte, B.; Vernhettes, S.; De Smet, I & Höfte, H. (2018). Receptor kinase THESEUS1 is a rapid alkalinization factor 34 receptor in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 28(15): 2452-2458.

Guo, J.; Jia, Y.; Chen, H.; Zhang, L.; Yang, J.; Zhang, J.; Hu, X.; Ye, X.; Li, Y. & Zhou, Y. (2019). Growth, photosynthesis, and nutrient uptake in wheat are affected by differences in nitrogen levels and forms and potassium supply. *Scientific Reports*, 9(1): 1-12.

Hengst, U.; Albrecht, H.; Hess, D. & Monard, D. (2001). The phosphatidylethanolamine-binding protein is the prototype of a novel family of serine protease inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 276(1): 535-540.

Ivanchenko, M. G.; Zhu, J.; Wang, B.; Medvecká, E.; Du, Y.; Azzarello, E. & Friml, J. (2015). The cyclophilin A DIAGEOTROPICA gene affects auxin transport in both root and shoot to control lateral root formation. *Development*, 142(4): 712-721.

Ivanova, A.; Law, S. R.; Narsai, R.; Duncan, O.; Lee, J. H.; Zhang, B. & Whelan, J. (2014). A functional antagonistic relationship between auxin and mitochondrial retrograde signaling regulates alternative oxidase1a expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 165(3): 1233-1254.

Lavy, M.; Prigge, M. J.; Tigyi, K. & Estelle, M. (2012). The cyclophilin DIAGEOTROPICA has a conserved role in auxin signaling. *Development*, 139(6): 1115-1124.

Lee, H. J.; Kim, H. S.; Park, J. M.; Cho, H. S. & Jeon, J. H. (2020). PIN-mediated polar auxin transport facilitates root – obstacle avoidance. *New Phytologist*, 225(3): 1285-1296.

Leyser, O. (2018). Auxin signaling. *Plant Physiology*, 176(1): 465-479.

Li, J.; Yang, H.; Peer, W. A.; Richter, G.; Blakeslee, J.; Bandyopadhyay, A.; Titapiwantakun, B.; Undurraga, S.; Khodakovskaya, M.; Richards, E. L.; Krizek, B.; Murphy, A. S.; Gilroy, S. & Gaxiola, R. (2005). *Arabidopsis* H⁺-PPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development. *Science*, 310(5745): 121-125.

Li, T.; Kang, X.; Wei, L.; Zhang, D. & Lin, H. (2020). A gain-of-function mutation in Brassinosteroid-insensitive 2 alters *Arabidopsis* floral organ development by altering auxin levels. *Plant Cell Reports*, 39(2): 259-271.

Liu, C.; Cooper, R. J. & Bowman, D. C. (1998). Humic acid application affects photosynthesis, root development, and nutrient content of creeping bentgrass. *HortScience*, 33(6): 1023-1025.

Lotfi, R.; Kalaji, H. M.; Valizadeh, G. R.; Behrozyar, E. K.; Hemati, A.; Gharavi-Kochebagh, P. & Ghassemi, A. (2018). Effects of humic acid on photosynthetic efficiency of rapeseed plants growing under different watering conditions. *Photosynthetica*, 56(3): 962-970.

MacArthur, J. W. (1934). Linkage groups in the tomato. *Journal of Genetics*, 29(1): 123-133.

Maeshima, M.; Nakanishi, Y.; Matsuura-Endo, C. & Tanaka, Y. (1996). Proton pumps of the vacuolar membrane in growing plant cells. *Journal of Plant Research*, 109(1): 119-125.

Mazur, E.; Kulik, I.; Hajný, J. & Friml, J. (2020). Auxin canalization and vascular tissue formation by TIR1/AFB-mediated auxin signaling in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 1-25.

McGarry, R. C.; Prewitt, S. F.; Culpepper, S.; Eshed, Y.; Lifschitz, E. & Ayre, B. G. (2016). Monopodial and sympodial branching architecture in cotton is differentially regulated by the *Gossypium hirsutum* SINGLE FLOWER TRUSS and SELF-PRUNING orthologs. *New Phytologist*, 212(1): 244-258.

Muday, G. K.; Lomax, T. L. & Rayle, D. L. (1995). Characterization of the growth and auxin physiology of roots of the tomato mutant, diageotropica. *Planta*, 195(4): 548-553.

Murphy, E. & De Smet, I. (2014). Understanding the RALF family: a tale of many species. *Trends in Plant Science*, 19(10): 664-671.

Murphy, E.; Vu, L. D.; Van den Broeck, L.; Lin, Z.; Ramakrishna, P.; van de Cotte, B.; Gaudinier, A.; Goh, T.; Slane, D.; Beeckman, T.; Inzé, D.; Brady, S. M.; Fukaki, H. & De Smet, I. (2016). RALFL34 regulates formative cell divisions in *Arabidopsis* pericycle during lateral root initiation. *Journal of Experimental Botany*, 67(16): 4863-4875.

Nilsen, S.; Hovland, K.; Dons, C. & Sletten, S. P. (1983). Effect of CO₂ enrichment on photosynthesis, growth and yield of tomato. *Scientia Horticulturae*, 20(1): 1-14.

Oh, K.; Ivanchenko, M. G.; White, T. J. & Lomax, T. L. (2006). The diageotropica gene of tomato encodes a cyclophilin: a novel player in auxin signaling. *Planta*, 224(1): 133-144.

Palmgren, M. G. (2001). Plant plasma membrane H⁺-ATPases: powerhouses for nutrient uptake. *Annual Review of Plant Biology*, 52(1): 817-845.

Perrot-Rechenmann, C. (2010). Cellular responses to auxin: division versus expansion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(5): a001446.

Petrášek, J. & Friml, J. (2009). Auxin transport routes in plant development. *Development*, 136(16): 2675-2688.

Piper, P. W.; Ortiz-Calderon, C.; Holyoak, C.; Coote, P. & Cole, M. (1997). Hsp30, the integral plasma membrane heat shock protein of *Saccharomyces cerevisiae*, is a stress-inducible regulator of plasma membrane H⁺-ATPase. *Cell Stress & Chaperones*, 2(1): 12.

Pnueli, L.; Carmel-Goren, L.; Hareven, D.; Gutfinger, T.; Alvarez, J.; Ganai, M.; Zamir, D. & Lifschitz, E. (1998). The SELF-PRUNING gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of CEN and TFL1. *Development*, 125(11): 1979-1989.

Pnueli, L.; Gutfinger, T.; Hareven, D.; Ben-Naim, O.; Ron, N.; Adir, N. & Lifschitz, E. (2001). Tomato SP-interacting proteins define a conserved signaling system that regulates shoot architecture and flowering. *The Plant Cell*, 13(12): 2687-2702.

Ramos, A. C.; Lima, P. T.; Dias, P. N.; Kasuya, M. C. M. & Feijó, J. A. (2009). A pH signaling mechanism involved in the spatial distribution of calcium and anion fluxes in ectomycorrhizal roots. *New Phytologist*, 181(2): 448-462.

Rayle, D. L. & Cleland, R. E. (1992). The Acid Growth Theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology*, 99(4): 1271-1274.

Reinhardt, D.; Pesce, E. R.; Stieger, P.; Mandel, T.; Baltensperger, K.; Bennett, M.; Traas, J.; Friml, J. & Kuhlemeier, C. (2003). Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature*, 426(6964): 255-260.

Repinski, S. L.; Kwak, M. & Gepts, P. (2012). The common bean growth habit gene PvTFL1y is a functional homolog of *Arabidopsis* TFL1. *Theoretical and Applied Genetics*, 124(8): 1539-1547.

Rubery, P. H. & Sheldrake, A. R. (1974). Carrier-mediated auxin transport. *Planta*, 118(2): 101-121.

Samach, A. & Lotan, H. (2007). The transition to flowering in tomato. *Plant Biotechnology*, 24(1): 71-82.

Scarpella, E.; Marcos, D.; Friml, J. & Berleth, T. (2006). Control of leaf vascular patterning by polar auxin transport. *Genes & Development*, 20(8): 1015-1027.

Serrano, R.; Villalba, J. M.; Palmgren, M. G.; Portillo, F.; Parets-Soler, A.; Roldan, M. & Montesinos, C. (1992). Studies of the plasma membrane H⁺-ATPase of yeast and plants. *Biochemical Society Trans*, 20(3): 562-566.

Shavrukov, Y. & Hirai, Y. (2016). Good and bad protons: genetic aspects of acidity stress responses in plants. *Journal of Experimental Botany*, 67(1): 15-30.

Silva, W. B.; Vicente, M. H.; Robledo, J. M.; Reartes, D. S.; Ferrari, R. C.; Bianchetti, R.; Araújo, W. L.; Freschi, L.; Peres, L. E. P. & Zsögön, A. (2018). SELF-PRUNING acts synergistically with DIAGEOTROPICA to guide auxin responses and proper growth form. *Plant Physiology*, 176(4): 2904-2916.

Smart, L. B.; Vojdani, F.; Maeshima, M. & Wilkins, T. A. (1998). Genes involved in osmoregulation during turgor-driven cell expansion of developing cotton fibers are differentially regulated. *Plant Physiology*, 116(4): 1539-1549.

Sondergaard, T. E.; Schulz, A. & Palmgren, M. G. (2004). Energization of transport processes in plants. Roles of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiology*, 136(1): 2475-2482.

Spiegelman, Z.; Ham, B. K.; Zhang, Z.; Toal, T. W.; Brady, S. M.; Zheng, Y. & Wolf, S. (2015). A tomato phloem-mobile protein regulates the shoot-to-root ratio by mediating the auxin response in distant organs. *The Plant Journal*, 83(5): 853-863.

Spiegelman, Z.; Omer, S.; Mansfeld, B. N. & Wolf, S. (2017). Function of Cyclophilin1 as a long-distance signal molecule in the phloem of tomato plants. *Journal of Experimental Botany*, 68(5): 953-964.

Sussman, M. R. (1994). Molecular analysis of proteins in the plant plasma membrane. *Annual Review of Plant Biology*, 45(1): 211-234.

Sze, H.; Li, X. & Palmgren, M. G. (1999). Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases: regulation and biosynthesis. *The Plant Cell*, 11(4): 677-689.

Takahashi, N.; Hayano, T. & Suzuki, M. (1989). Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature*, 337(6206): 473-475.

Tian, Z.; Wang, X.; Lee, R.; Li, Y.; Specht, J. E.; Nelson, R. L.; McClean, P. E.; Qiu, L. & Ma, J. (2010). Artificial selection for determinate growth habit in soybean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(19): 8563-8568.

Venancio, J. B.; Catunda, M. G.; Ogliari, J.; Rima, J. A. H.; Okorokova-Façanha, A. L.; Okorokov, L. A. & Façanha, A. R. (2014). A vacuolar H⁺-pyrophosphatase differential activation and energy coupling integrate the responses of weeds and crops to drought stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(6): 1987-1992.

Wang, Y. & Li, J. (2008). Molecular basis of plant architecture. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 253-279.

Yang, D.; Zhang, Y. J.; Song, J.; Niu, C. Y. & Hao, G. Y. (2019). Compound leaves are associated with high hydraulic conductance and photosynthetic capacity: evidence from trees in Northeast China. *Tree Physiology*, 39(5): 729-739.

Yeager, A. F. (1927). Determinate growth in the tomato. *Journal of Heredity*, 18(6), 263-265.

Zandonadi, D. B.; Canellas, L. P. & Façanha, A. R. (2007). Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation. *Planta*, 225(6): 1583-1595.

Zhan, Y.; Qu, Y.; Zhu, L.; Shen, C.; Feng, X. & Yu, C. (2018). Transcriptome analysis of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) shoots reveals a crosstalk between auxin and strigolactone. *PLoS One*, 13(9): e0204873.

Zobel, R. W. (1973). Some physiological characteristics of the ethylene-requiring tomato mutant diageotropica. *Plant Physiology*, 52: 385-389.

Zonia, L.; Cordeiro, S.; Tupý, J. & Feijó, J. A. (2002). Oscillatory chloride efflux at the pollen tube apex has a role in growth and cell volume regulation and is targeted by inositol 3, 4, 5, 6-tetrakisphosphate. *The Plant Cell*, 14(9), 2233-2249.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Os fenômenos observados em detalhes neste trabalho evidenciam um novo aspecto do mecanismo de crescimento ácido das plantas, pelo qual a atividade da H⁺-ATPase também é modulada pelo peptídeo AtRALF1, de uma maneira específica na zona alongada das raízes. Este mecanismo ocorre através de variações de pH nos microambientes rizosféricos e apoplásicos, que são respostas comuns induzidas pelo AtRALF1. Estas variações de pH induzidas pelo peptídeo AtRALF1 e seu receptor de membrana FERONIA modulam formação correta da parede celular, em que a exclusão de um desses componentes provocou a formação de paredes mais finas, o que está de acordo com esta nova proposição do mecanismo de crescimento ácido, que liga os efeitos do peptídeo AtRALF1 com a inibição da H⁺-ATPase e o pH transitório como fundamentais para o crescimento correto das células. Desta forma o peptídeo AtRALF1 parece estar estritamente correlacionado com o mecanismo de crescimento ácido induzido por auxina, podendo até mesmo esta relacionado a outros mecanismos regulados por este fitormônio nas plantas. Apesar de muito estudado, ainda restam grandes lacunas no entendimento dos diversos mecanismos em que a auxina esta envolvida, como por exemplo na regulação da estratégia de crescimento das plantas.

Com o intuito de entender este fenômeno, foram utilizadas plantas de tomate dos genótipos MT, SP, DGT e SP+DGT. Foi possível observar que plantas SP

apresentaram crescimento determinado e maiores frutos que as plantas MT, possivelmente devido a um aumento nas taxas fotossintéticas e de uma regulação diferencial das bombas de H^+ , indicando a possibilidade destas plantas apresentarem maior eficiência energética que as demais, podendo assim se desenvolver com menor custo energético que os demais genótipos. Já nas plantas com silenciamento do gene DGT foi possível observar defeitos quanto à formação de raízes laterais, apresentando assim menor volume radicular que as demais plantas. Estas plantas também apresentaram menor taxa fotossintética e menores frutos, devido possivelmente aos defeitos encontrados nas raízes. Logo, também foi identificado que estas plantas apresentam uma menor eficiência das bombas de H^+ de membrana plasmática, explicando em parte o motivo pelo qual estas apresentam falhas quanto a emissão de raízes laterais. Desta forma, é possível concluir que, em vista da importância que tanto o gene SP quanto o DGT demonstraram ter na regulação do desenvolvimento vegetal neste estudo, os mesmos podem despontar como importantes alvos moleculares para o melhoramento de plantas, juntamente com os peptídeos RALF, uma vez que estes demonstram grande importância para o processo de desenvolvimento das plantas. Existe uma clara relação entre fenômenos relacionados a ausência do RALF e o fenótipo encontrado nas plantas DGT, indicando que este peptídeo pode estar, inclusive, relacionado a sensibilidade a auxina pelas células vegetais, nos mais diversos tecidos.