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

Identificação da subtilase responsável pelo processamento do prepropeptídeo AtRALF1 em *Arabidopsis thaliana*

Juan Carlos Guerrero Abad

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

Piracicaba
2011

Juan Carlos Guerrero Abad
Engenheiro Agrônomo

Identificação da subtilase responsável pelo processamento do prepropeptídeo AtRALF1 em *Arabidopsis thaliana*

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

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

Piracicaba
2011

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

Guerrero Abad, Juan Carlos
Identificação da subtilase responsável pelo processamento do prepropeptídeo AtRALF1 em *Arabidopsis thaliana* / Juan Carlos Guerrero Abad. - - Piracicaba, 2011.
69 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Desenvolvimento vegetal 2. Enzimas - Identificação 3. Expressão gênica 4. Peptídeos hormonais 5. Proteínas de plantas I. Título

CDD 581.192456
G934i

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

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais e irmãos,
pelo carinho incondicional

AGRADECIMENTOS

Um especial agradecimento ao Prof. Dr. Daniel Scherer de Moura, pelo acolhimento, ensinamento científico, orientação, apoio, amizade e confiança durante esses dois anos.

Ao Prof. Dr. Marcio de Castro Silva-Filho, pelo acolhimento no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas e disponibilização do Microscópio Confocal.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, pela bolsa concedida.

Ao Antonio F. C. Amaral técnico do laboratório de Bioquímica de Proteínas, pelos grandes conselhos acertados.

Ao Agustin Cerna professor da graduação, pelos conselhos e amizade durante estes dois anos.

Aos grandes amigos Wellington Ferreira e Enéas Konsen pelo acompanhamento nos momentos mais difíceis durante minha estadia no Brasil.

De coração aos bons e grandes companheiros do laboratório Tábata Bergonci, Amanda Morato, Paulo Ceciliato, Keini Dressano, Bianca Ribeiro, Andrés Ortiz e Juliano e Guerreiro.

A Guadalupe Ximena, pelo carinho, grandes conselhos e motivações.

Aos inesquecíveis amigos(as) Santiago Ramos, Clederson Ferreira, Pablo Fresia, Geraldo Silva, Renata Diaz, Larissa Spo, Poliene Costa, André Barbosa, Natalie Rondoniel, Nancy Farfan, Daniel Grados e Valentina de Fatima pelo apoio contribuído direta ou indiretamente.

E por fim a minha família, María L. Abad, Cresencio Guerrero, María Nerida, Gladys Anamelba, Roger Arbildo e Alexander.

EPÍGRAFE

"*Todo mundo tem talento, é só uma questão de se mover até que você tenha descoberto qual ele é* "

George Lucas

SUMÁRIO

RESUMO..... 11
ABSTRACT..... 13
RESUMEN..... 15
LISTA DE FIGURAS..... 17
1 INTRODUÇÃO..... 19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 21
2.1 Peptídeos hormonais relacionados a defesa..... 21
2.2 Peptídeos relacionados ao desenvolvimento..... 22
2.3 Processamento de propeptídeos mediados por subtilases..... 27
3 MATERIAL E MÉTODOS..... 31
3.1 Análises *in-silico*..... 31
3.2 Extração de RNA total..... 31
3.3 Síntese de cDNA 32
3.4 PCR e purificação de DNA a partir de gel de agrarose..... 32
3.5 Clonagens..... 33
3.6 Preparação de *E. coli* eletrocompetente..... 34
3.7 Preparação de *Agrobacterium* eletrocompetente 34
3.8 Eletroporação de células de *E. coli* e *A. tumefaciens* 35
3.9 Extração de DNA plasmidial de *E. coli*..... 35
3.10 Obtenção de transgênicos..... 36
3.11 Confirmação de mutantes nocaute..... 37
3.12 Análise de expressão 38
3.13 Hibridação..... 38
3.14 Confirmação da presença da superexpressão do AtRALF1 e ausência de expressão das subtilases em plantas F1 e F2..... 39
4 RESULTADOS..... 41
4.1 Seleção de subtilases potencialmente envolvidas no processamento do AtRALF1..... 41
4.2 Determinação da localização subcelular das subtilases selecionadas através de fusões proteicas com a proteína verde fluorescente (GFP)..... 44

4.3 Análise de mutantes com baixa expressão ou nocautes nas subtilases potencialmente envolvidas no processamento do AtRALF1..... 46
4.4 Hibridações entre plantas superexpressoras do AtRALF1 (35S:AtRALF1) e as linhagens nocaute ou de baixa expressão para as subtilases selecionadas 48
5 DISCUSSÃO..... 51
5.1 Seleção e localização subcelular das subtilases..... 51
5.2 Mais de uma subtilase é responsável pelo processamento do prepropeptideo AtRALF1..... 52
6 CONCLUSÕES..... 53
REFERÊNCIAS..... 55
APÊNDICES 65

RESUMO

Identificação da subtilase responsável pelo processamento do prepropeptídeo AtRALF1 em *Arabidopsis thaliana*

Desde a década de 90, uma nova família de moléculas de origem protéica e com características hormonais vem sendo estudada em plantas. Esse grupo de novas moléculas, coletivamente chamado de peptídeos hormonais, está envolvido com defesa, reprodução, crescimento e desenvolvimento. RALF, que é um desses novos peptídeos, é ubíquo em plantas e está envolvido com desenvolvimento vegetal. Em *Arabidopsis* existem 34 genes semelhantes ao RALF (AtRALFs). Nosso grupo mostrou que AtRALF1 é processado de um precursor maior por uma subtilase. *Arabidopsis* possui 56 subtilases, o objetivo deste trabalho é identificar a subtilase responsável pelo processamento do AtRALF1. Predição da localização subcelular e análise da expressão *in silico*, ambas confirmadas por análise da expressão por RT-PCR e fusões proteicas com a proteína verde fluorescente, permitiram reduzir para sete o número de subtilases candidatas. Cruzamentos entre mutantes nocaute ou plantas de baixa expressão por RNAi dessas sete subtilases com plantas superexpressoras do AtRALF1 identificaram as subtilases AtSBT6.1 (At5g19660) e AtSBT5.3 (At2g04160) como prováveis envolvidas no processamento do prepropeptídeo AtRALF1.

Palavras-chave: Peptídeos hormonais; Desenvolvimento vegetal; Preproproteína

ABSTRACT

Identification of the subtilase responsible for the prepropeptide AtRALF1 processing in *Arabidopsis thaliana*

Since the 90s, a new family of molecules of protein origin and with hormone characteristics has been studied in plants. This group of new molecules, collectively named peptide hormones, is involved in defense, reproduction, growth and development. RALF, one of these peptides, is ubiquitous in plants and is involved in plant development. In *Arabidopsis* there are 34 RALF-like genes (AtRALFs). Our group has shown that AtRALF1 is processed from a larger precursor by a subtilase. *Arabidopsis* has 56 subtilases, our goal is the identification of the specific subtilase that is responsible for the AtRALF1 processing. Prediction of subcelular localization and *in silico* gene expression analysis, both confirmed by RT-PCR expression analysis and chimeric proteins with green-fluorescent protein, allowed the reduction of the initial 56 candidates to only 7 subtilases. Crosses between knockout mutants or RNAi plants expressing low levels of subtilases with overexpressors of AtRALF1 identified the subtilases AtSBT6.1 (At5g19660) and AtSBT5.3 (At2g04160) as potentialy involved in the prepropeptide AtRALF1 processing.

Keywords: Peptide hormone; Plant development; Preproprotein

.

RESUMEN

Identificación de la subtilase responsable por el procesamiento del prepropeptídeo AtRALF1 en *Arabidopsis thaliana*

Desde la década de 90, una nueva familia de moléculas de origen proteico y con características hormonales viene siendo estudiada en plantas. Este nuevo grupo de nuevas moléculas, colectivamente llamado de péptidos hormonales, está involucrado con defensa, reproducción, crecimiento y desarrollo. RALF, que es uno de estos nuevos péptidos, está ubicado en plantas y está involucrado con el desarrollo vegetal. En *Arabidopsis* existen 34 genes semejantes a RALF (AtRALFs). Nuestro grupo mostró que AtRALF1 es procesado de un precursor mayor, hecho por una subtilase. *Arabidopsis* posee 56 subtilases, el objetivo del trabajo es identificar la subtilase responsable por el procesamiento de AtRALF1. Predicción de localización subcelular y análisis de expresión *in silico*, ambas confirmadas por análisis de expresión por RT-PCR y fusiones proteicas con la proteína verde fluorescente, permitieron reducir para siete el número de subtilases candidatas. Cruzamientos entre mutantes nocaut o plantas de baja expresión por RNAi de las siete subtilases con plantas superexpresoras de AtRALF1 identificaron a las subtilases AtSBT6.1 (At5g19660) e AtSBT5.3 (At2g04160) como probables involucradas en el procesamiento del prepropeptídeo AtRALF1.

Palabras-clave: Péptidos hormonales; Desarrollo vegetal; Preproproteína

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Seleção das subtilases com potencial para processamento do AtRALF1..... 43

Figura 2 – Localização subcelular das subtilases com a proteína verde fluorescente (GFP). 45

Figura 3 – Linhagens nocaute por inserção de T-DNA e de baixa expressão gênica para as subtilases selecionadas..... 47

Figura 4 – Análise dos híbridos F2 dos cruzamentos entre mutantes nocaute ou plantas de baixa expressão das subtilases e plantas que superexpressam o gene AtRALF1..... 50

1 INTRODUÇÃO

RALF (*Rapid ALkalinization Factor*) é uma pequena proteína (peptídeo) de características hormonais, ubíqua em plantas e que está envolvida com desenvolvimento vegetal, mais especificamente com alongamento celular (MOURA et al., 2006). Os peptídeos hormonais têm função de sinalização celular semelhante aos hormônios vegetais tradicionais e estão relacionados a defesa, organização de meristema, reprodução, crescimento e desenvolvimento (MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 2006). RALF é um peptídeo de 5kDa, isolado pela primeira vez de folhas de tabaco, e que foi inicialmente descoberto por causar uma rápida alcalinização do meio de cultivo de suspensões celulares e por inibir o crescimento e desenvolvimento de raízes (PEARCE et al., 2001b). Da mesma forma que ocorre em animais e leveduras, peptídeos hormonais em plantas também são processados de proteínas precursoras maiores por proteases da família das subtilases. O objetivo é a identificação da enzima responsável pelo processamento do propeptídeo. Nosso grupo mostrou que um dos membros da família RALF em *Arabidopsis* exclusivo de raízes, AtRALF1, é processado provavelmente por uma subtilase do tipo *kexin/furin* localizada na fração microssomal (MATOS et al., 2008), objetiva-se identificá-la entre as 56 subtilases existentes em *Arabidopsis.*

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Peptídeos hormonais relacionados a defesa

2.1.1 Sistemina

A sistemina é um polipeptídio de 18 aminoácidos isolado de folhas de tomate que ativa uma resposta de defesa sistêmica a herbivoria ou a ferimento. Pequenas quantidades, fmol/planta, levam ao acúmulo de inibidores de proteinase I e II (RYAN; PEARCE, 1998). Estes inibidores de proteinase dificultam a digestão de proteínas geradas pelo ataque do inseto, reduzindo o crescimento e desenvolvimento do mesmo (RYAN, 1990). A localização do polipeptídeo marcado radioativamente com ^{14}C na planta, mostra que ele é móvel (NARVAEZ-VASQUEZ et al., 1995; BAYDOUN, 1985). A sistemina de tomate, TomSys, é derivada por processamento proteolítico de um precursor maior de 200 aminoácidos. Uma vez processada a TomSys ativa a biossíntese de ácido jasmônico (STRATMANN, 2003; LEE, 2003; HOWE et al., 1999; LI et al., 2001). TomSys desencadeia numerosos eventos na célula como fluxo de íons, incremento de cálcio citosólico, incremento da expressão da calmodulina, inativação de bombas de prótons H^+ - ATPase na membrana plasmática, ativação de proteína quinase (MAPK) que desencadeia a produção de fosfolipase A e óxido ciclases através das quais são liberados ácido linolênico e ácido jasmônico (FELIX; BOLLER, 1995; MOYEN et al., 1998; BERGEY; RYAN, 1999; SCHALLER; OECKING, 1999; HOLLEY et al., 2003; NARVAEZ-VASQUEZ; FLORIN-CHRISTENSEN; STENZEL et al., 2003; CONSTABEL; YIP; RYAN, 1998). O ácido jasmônico liberado regula positivamente a expressão do gene da prosistemina e a movimentação conjunta do peptídeo e do ácido jasmônico pelo tecido vascular induz a produção de inibidores de proteinase (RYAN; MOURA, 2002).

2.1.2 Peptídeo *elicitor* 1 de *Arabidopsis* (AtPep1)

O AtPep1 é um peptídeo de 23 aminoácidos derivado de um precursor maior de 92 aminoácidos denominado PROPEP1. O peptídeo também pode ser detectado via ensaios de alcalinização, atua como elicitor na ativação de genes de defesa (p.ex. PDF-1.2, PR-1) e leva a produção de espécies reativas de oxigênio (p.ex. H_2O_2) desencadeando o sistema imune em plantas (ZIPFEL, 2009). O gene é fortemente induzido em resposta a degradação da parede celular, ferimento, presença de jasmonato, etileno e outros *elicitors* (ZIPFEL, 2009). A percepção

é mediada por dois tipos de receptores AtPEPR1 e AtPEPR2 (HUFFAKER et al., 2006; HUFFAKER; RYAN, 2007). *Arabidopsis* possui seis AtPeps e a percepção deles aumenta os níveis de cálcio no citosol com ativação de canais cloreto, seguido por uma depolarização da membrana dependente pelo receptor (YAMAGUCHI; PEARCE; RYAN, 2006; KROL et al., 2010).

2.2 Peptídeos relacionados ao desenvolvimento

2.2.1 Fatores de Alkalinização Rápida (RALFs)

Grupo de peptídeos hormonais em plantas que provoca uma rápida e forte alcalinização do meio extracelular de células em suspensão (PEARCE et al., 2001a). Além de provocar um aumento do cálcio transiente no citoplasma, inibição no desenvolvimento de microcalli e inibição do crescimento do tubo polínico e raiz (PEARCE et al., 2001b; HARUTA et al., 2008; COVEY et al., 2010; MINGOSSI et al., 2010; MATOS et al., 2008).

O peptídeo hormonal RALF, do inglês *Rapid ALkalinization Factor*, possui 49 aminoácidos e foi isolado primeiramente de extratos proteicos de tabaco através do ensaio de alcalinização de suspensões celulares quando se buscava o peptídeo hormonal sistemina (PEARCE et al., 2001b). Identificou-se além da indução de uma rápida alcalinização do meio extracelular, a ativação de uma MAP quinase em células de tabaco (PEARCE et al., 2001a)

Em um estudo de transporte de proteínas em tabaco, Escobar et al. (2003) mostraram que a fusão preproRALF:GFP foi visualizada primeiramente no retículo endoplasmático (RE) e depois de 24 horas no RE e na parede celular. O peptídeo RALF de tomate (LeRALF) interage com duas proteínas integrais de membrana de 25 e 120 kDa componentes de um provável receptor de membrana (SCHEER et al., 2005). Deleções e substituições de aminoácidos do peptídeo revelaram um *motif* especifico –YISY– ubíquo entre as posições 5 e 8 da região N-terminal do peptídeo ativo, sendo essencial para interagir com o receptor (PEARCE et al., 2010) de natureza ainda desconhecida.

Peptídeos RALF já foram identificados em diversos representantes do reino vegetal, pelo menos 20 espécies de plantas distribuídas em 9 famílias compreendendo vegetais inferiores e superiores, monocotiledôneas e dicotiledôneas (MOURA; SILVA-FILHO, 2006). Genes que codificam RALFs são encontrados em grandes famílias, como é o caso de *Arabidopsis*, ou ainda em cópia única, como é o caso de *Nicotiana atenuata* (OLSEN et al., 2002; WU et al., 2007). Os

genes são expressos de forma ubíqua nos tecidos vegetais, sendo tecido-específicas para algumas isoformas (MOURA et al., 2006; GERMAIN et al., 2005; HARUTA; CONSTABEL, 2003; OLSEN et al., 2002). Em uma busca *in silico* por peptídeos secretados menores que 200 aminoácidos, Olsen et al. (2002) propuseram a existência de uma família gênica em *Arabidopsis* de 34 RALFL (RALF-LIKE) genes. A família é baseada na conservação da região C-terminal onde reside o peptídeo ativo, a presença de outros domínios como peptídeo sinal, sítio dibásico, arranjos de cisteínas e resíduos de ácidos glutâmicos não são levadas em consideração.

Em *Arabidopsis*, a isoforma At1g02900 apresenta expressão mais restrita e abundante em raízes e hipocótilos (HARUTA et al., 2008; BIRNBAUM et al., 2003). Em células com baixa taxa de divisão celular a expressão desta isoforma é alta e em células com alta taxa de divisão celular a expressão é baixa (MOURA et al., 2006). Plantas que superexpressam essa isoforma apresentam fenótipo semi-anão, indicando o papel deste gene em regular a expansão celular durante o crescimento e desenvolvimento (MATOS et al., 2008). Recentemente, Mingossi et al. (2010), estudando peptídeos RALF isolados de cana-de-açúcar, demonstraram que os mesmos estão envolvidos na expansão celular, provavelmente regulando o alongamento celular.

Análises de bibliotecas de cDNA de ovário e óvulos fertilizados de tomate mostraram a identificação de 5 isoformas (ScRALF1-5) com expressão diferenciada nos estágios de desenvolvimento e maturação dos frutos, sendo esta menor durante a polinização e fertilização e sofrendo aumento considerável durante o processo de maturação dos frutos (GERMAIN et al., 2005). Em *Nicotiana attenuata* foi identificada uma única isoforma do peptídeo RALF (NaRALF) cujo silenciamento gênico levou a um aumento do crescimento das raízes e interrupção do desenvolvimento de pelos radiculares. Esses efeitos foram correlacionados com perturbação da regulação do pH apoplástico e do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos pelos radiculares (WU et al., 2007). Estudos de detecção de peptídeos endógenos envolvidos com a regulação do Ca^{+2} intracelular revelaram que o peptídeo AtRALF1 (At1g02900) é capaz de induzir um aumento do Ca^{+2} intracelular de plântulas de *Arabidopsis* (HARUTA et al., 2008).

2.2.2 Clavata 3 (CLV3)

O peptídeo hormonal CLV3 é secretado e produzido na gema apical meristemática (KONDO, 2010). CLV3 é produzido nas camadas de células epidérmicas L1 e L2 e difunde-se

para a L3 (SABLOWSKI, 2007). Ele possui um precursor de 96 aminoácidos que sofre modificações pós-traducionais por glicosilação gerando um peptídeo de 13 aminoácidos (OHYAMA et al., 2009). CLV3 ativa o complexo CLV1/CLV2 desencadeando uma via de sinalização na zona central do meristema apical regulando a especificação e diferenciação das células meristemáticas (FIERS et al., 2007). A perda da função do peptídeo em mutantes *clv3* resulta em um mutante aberrante com acúmulos descontrolados de células meristemáticas na região do meristema apical. Uma vez que CLV3 ativa o complexo de receptores de CLV1/CLV2, WUSCHEL(WUS), um fator transcricional que promove a atividade das células meristemáticas, é negativamente regulado. Plantas mutantes para WUS não apresentam expressão de CLV3, indicando que WUS regula positivamente a expressão de CLV3 e CLV3 regula negativamente WUS, mantendo uma retroalimentação regulatória necessária para manter o equilíbrio ótimo das células meristemáticas (BRAND et al., 2002; HOBE et al., 2003).

2.2.3 Fitosulfoquinas (PSKs)

As fitosulfoquinas são pentapeptídeos sulfatados isolados de meios condicionados de cultivos celulares vegetais *in vitro* (MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 1996). Eles são produzidos na etapa exponencial de crescimento celular e promovem a diferenciação e proliferação celular em baixas concentrações (HANAI et al., 2000; MATSUBAYASHI et al., 1999; YANG et al., 2001). As PSKs são indispensáveis em vários estágios de crescimento das plantas tais como: embriogênese somática (HANAI et al., 2000; IGASAKI et al., 2003; KOBAYASHI et al., 1999), formação de gemas adventícias (YAMAKAWA et al., 1998), formação de raízes adventícias (YAMAKAWA et al., 1998) e germinação de pólen (CHEN; MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 2000). Além das etapas de desenvolvimento citadas anteriormente, elevadas concentrações de PSKs em mudas retardam a senescência sob condições de estresse pelo calor (YAMAKAWA et al., 1999).

As fitosulfoquinas são produzidos pelo processamento enzimático do precursor de 89 aminoácidos (PP-PSK). Esse precursor possui um domínio hidrofóbico de 22 aminoácidos na região N-terminal (YANG et al., 1999), é uma região semelhante a encontrada em proteínas precursoras de origem animal responsável pela liberação de peptídeos hormonais potenciais (DOUGLASS, 1984). Na procura de PSKs em *Arabidopsis*, Yang et al. (2001) encontraram

quatro genes que codificam PSKs, todas as sequências possuem um intron e somente uma cópia do peptídeo PSK na região C-terminal do gene.

Matsubayashi et al., (2002) identificaram o receptor das PSKs como uma proteína de membrana da família dos receptores do tipo quinase com um domínio rico em repetições de leucina, LRR-RLK. Essa proteína receptora, PSKR1, sofre modificação pós-traducional e, por esse motivo, apresenta peso molecular de 120 e 150 kDa. Suspensões celulares de cenoura superexpressando PSK mostraram um crescimento acelerado nas células (KOBAYASHI et al., 1999). A expressão do PSKR1 detectada em cenoura revelou a presença do receptor no meristema apical, hipocótilo, raiz e folhas. Experimentos com construções gênicas em orientação antisenso do receptor em calos de cenoura mostraram que, na ausência da percepção do PSK, as células podem sobreviver e dividir, porém não crescem normalmente e a regeneração ocorre por organogenêse.

2.2.4 Locus estéril rico em cisteína/Locus estéril proteína11 (SCR/SP11)

A autoincompatibilidade é um mecanismo de manutenção da diversidade que evita a endogamia entre as espécies. Análises genéticas clássicas revelaram que a autoincompatibilidade é regulada pelo locus multialélico nomeado de locus estéril (S-locus). Quando o pólen e o pistilo possuem o mesmo alelo, uma interação molecular causa a inibição do crescimento do tubo polínico (TAKAYAMA et al., 2001). Estudos bioquímicos e moleculares revelaram a presença de dois genes no S-locus: glicoproteína (SLG) e um receptor de membrana do tipo quinase (SRK), ambos expressos no estigma. SRK interage com o peptídeo rico em cisteína (SCR ou SP11) promovendo a incompatibilidade (SUSUKI et al., 1999; TAKAYAMA et al., 2000). Estudos feitos em *Brassica* revelaram que baixas concentrações do peptídeo SCR/SP11 (50 fmol/estigma) inibe a hidratação do pólen (TAKAYAMA et al., 2000). Na procura de homólogos em *Arabidopsis*, Vanoosthuyse et al. (2001) encontraram 28 homólogos denominados SCRLs, peptídeos básicos e hidrofílicos de 4,4 a 9,5 kDa.

2.2.5 Inflorescência deficiente em Abscisão (IDA)

Esse peptídeo possui 77 aminoácidos, ocorre na região de abscisão do órgão floral gerando a separação das células que articulam o órgão da planta (JINN et al., 2000). Plantas de *Arabidopsis* portadoras da mutação no gene IDA (*inflorescence deficient in absicission*) retêm de

forma indefinida os órgãos florais (BUTENKO et al., 2003). Em *Arabidopsis* foram identificados cinco genes IDA (IDAL1-5) (STENVIK, 2008). Alinhamentos de sequências mostraram que estes peptídeos mantêm um domínio altamente conservado de aminoácidos básicos na região C-terminal, características que também são reportadas para PSK e CLV3 (YANG et al., 1999; STENVIK, 2008)

2.2.6 *Rotundifolia4-Like/Devil* (ROT 4/DVL1)

ROT4/DVL1 são peptídeos de 53 e 51 aminoácidos membros de uma família de 24 genes em *Arabidopsis* considerados reguladores potenciais da proliferação celular durante vários estágios de desenvolvimento (NARITA et al., 2004; WEN et al., 2004). A análise da expressão gênica em *Arabidopsis* revelou a presença de transcritos de ROT4 e DVL1 em gemas apicais, flores, raízes e folhas jovens (IKEUCHI et al., 2011; DONNELLY et al., 1999).

2.2.7 Polaris (PLS)

PLS é um peptideo de 36 aminoácidos, não secretado e envolvido na vascularização, crescimento longitudinal e radial de raízes (CASSON, 2002). Mutantes pls mostram uma resposta hipersensitiva a citocininas e uma resposta reduzida para auxinas, sugerindo que o peptídeo PLS tem sua função relacionada a manutenção do equilíbrio entre auxina-citocinina (CHILLEY, 2006).

2.2.8 Nodulina precoce 40 (ENOD40)

O ENOD40 está envolvido no desenvolvimento da nodulação induzido pelo *Rhizobium* em fabáceas, a expressão do gene que codifica o ENOD40 é rapidamente induzida pelo *Rhizobium* no periciclo da raiz (CHARON et al., 1999). ENDO40 também foi detectado em órgãos não simbiônticos de fabáceas (PAPADOPOULOU; ROUSSIS; KATINAKIS, 1996) e, em arroz, a presença do ENDO40 foi relacionada ao desenvolvimento do tecido vascular (COMPAAN et al., 2003). Tradução *in vitro* do RNA mensageiro que codifica o ENOD40 de soja, gerou dois peptídeos de 12 e 24 aminoácidos denominados peptídeos A e B. O peptídeo A interage covalentemente via ligações enxofre nos resíduos de cisteína com uma unidade de sucrose sintase de 93 kDa (ROHRIG; JOHN; SCHMIDT, 2004).

2.3 Processamento de propeptídeos mediados por subtilases

2.3.1 Subtilases

Em animais e leveduras, o grupo de serino proteases *Kexin*, também denominado de convertases ou subtilases, são responsáveis pelo reconhecimento e processamento de preproproteínas hormonais em um sítio dibásico de processamento (ROCKWELL, 2002; WHEATLEY; HOLYOAK, 2007).

Subtilases são serino proteases com uma tríade catalítica de aminoácidos: ácido aspártico (D), histidina (H) e serina (S) e são responsáveis pelo processamento de proteínas precursoras (DODSON; WLODAWER, 1998). Existem poucos relatos de subtilases em plantas, Rautengarten et al. (2005), baseado em análise computacional do genoma de *Arabidopsis*, detectou 56 genes que codificam potenciais subtilases, AtSBT1 a 56. Essas subtilases foram separadas em seis grupos de acordo com a conservação de suas estruturas primárias.

O precursor do peptídeo hormonal sistemina interage com uma proteína de membrana com propriedades semelhantes à proteína kexin-2p de animais e leveduras (SCHALLER et al., 1994). A atividade de enzimas subtilases foi observada em plantas quando o precursor da toxina anti-fúngica KP6 foi superexpresso em tabaco (KINAL et al., 1995). Jiang e Rogers (1999) mostraram que proproteínas com sítio dibásico de processamento foram corretamente processadas em tabaco. Posteriormente, foi isolada de feijão uma protease KLSP, do tipo subtilase com propriedades *Kexin*, que foi capaz de processar substratos em sítios dibásicos (POPOVIC et al., 2002).

Em *Arabidopsis* todas as nove isoformas do peptídeo RALF apresentadas por Pearce et al., (2001b) apresentam um sítio dibásico (dupla arginina) acima do N-terminal do peptídeo ativo e diversos resíduos de ácidos glutâmicos acima da dupla arginina. Essas características também estão presentes em prepropeptídeos hormonais de animais sugerindo uma semelhança entre os mecanismos de processamento (Douglass et al., 1984). Essas semelhanças sugerem uma conservação dos mecanismos de processamento entre animais e plantas (RYAN et al., 2002; MATSHUBAYASHI; SAKAGAMI, 2006).

2.3.2 Sítios de processamento em PSKs

Estudos com explantes de raízes de **Arabidopsis** e indução em meio de regeneração da parte aérea indicaram o processamento do peptídeo fitosulfoquina AtPSK4 pela subtilase AtSBT1.1, no sítio RRSLVL↓HTDY anterior ao peptídeo ativo localizado na porção C-terminal (SRIVASTAVA et al., 2008).

2.3.3 Sítios de processamento em AtRALF1

Matos et al. (2008) demonstraram que o sítio dibásico, formado por uma dupla de argininas na posição 68 e 69 do preproRALF1, posicionada acima do peptídeo ativo é responsável pelo reconhecimento, processamento e liberação do peptídeo ativo em *Arabidopsis*. Plantas transgênicas superexpressando o precursor mutado (substituição da arginina por uma alanina na posição 69) não apresentam o fenótipo semi-anão característico da superexpressão do precursor selvagem. A análise dos extratos proteicos dessas plantas revelaram o acúmulo do precursor não processado e a não liberação do peptídeo ativo para o mutante. Estudos de processamento *in vitro* confirmaram o processamento do precursor preproRALF por frações microssomais de suspensões celulares de *Arabidopsis*, revelando que o processamento é realizado por enzimas do tipo subtilisina/convertase presentes na rota secretória de proteínas.

2.3.4 Sítios de processamento em AtRALF23

De modo análogo ao que ocorre com AtRALF1, a quimera preproRALF23-myc foi superexpressa em *Arabidopsis* e gerou plantas com fenótipo semi-anão de raízes com capacidade reduzida de acidificar a rizosfera. Quando a mesma construção foi superexpressa em um mutante nocaute para a subtilase AtS1P/AtSBT6.1 de *Arabidopsis*, não houve manifestação do fenótipo semi-anão, provavelmente devido a ausência de processamento (SRIVASTAVA et al., 2009). Os resultados sugerem que dentre as 56 subtilases de *Arabidopsis* apresentando similaridade com as proteases *Kexin*, a subtilase AtSBT6.1 seja específica para o processamento do preproRALF23.

2.3.5 Sítios de processamento em CLV3

Estudos realizados com o peptídeo hormonal CLV3 mostraram que quando o precursor do CLV3 foi incubado com extratos proteicos de couve-flor houve a liberação de dois fragmentos menores no sítio M41 e R70, sendo este último resíduo conservado entre os peptídeos da família

CLE (Ni e Clark 2006). Recentemente, outra subtilase de *Arabidopsis*, AtSBT5.4, quando superexpressa, mostrou um fenótipo típico dos mutantes clavata (LIU et al. 2009). O fenótipo não foi observado quando a superexpressão se deu no mutante wuschel.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análises *in silico*

A partir de análises *in silico* de subtilases vegetais realizadas por Rautengarten et al. (2005) e de análises de predição da localização subcelular disponíveis no banco de dados do TAIR (www.arabidopsis.org), selecionou-se aquelas direcionadas para a via secretória.

Além da localização subcelular, utilizou-se dados de expressão disponíveis em banco de dados público (The Bio-Array Resource for Plant Biology, http://bar.utoronto .ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi) para eleger subtilases cuja expressão ocorre na raiz. Em seguida, os níveis de expressão das subtilases presentes na raiz foram comparados com o nível de expressão do AtRALF1, para eleger um conjunto de subtilases candidatas.

Posteriormente, a predição da localização subcelular foi analisada separadamente em plantas de *Arabidopsis* transformadas estavelmente com cada uma das subtilases fusionadas à GFP. Adicionalmente, análises de expressão gênica (RT-PCR) das subtilases foram feitas em raiz de plantas *Arabidopsis* selvagem (wt, Columbia, Col-0) e plantas superexpressando AtRALF1 (35S:AtRALF1).

3.2 Extração de RNA total

3.2.1 Material vegetal

Sementes de *A. thaliana* (wt, Columbia, Col-0) foram esterilizadas superficialmente da seguinte maneira: etanol 75% por 15 segundos, hipoclorito de sódio por 10 minutos e três lavagens com água ultra-pura estéril. Após esterilização as sementes foram colocadas a 4°C/48 horas para quebrar a dormência.

Para germinar e crescer as sementes foram colocadas em placas contendo meio MS 0,5X (Murashige & Skoong, pH 5,75) e fitagel (Gibco) 6 g/L. As sementes foram crescidas em câmaras de crescimento (Conviron) com fotoperíodo de 16 horas luz (200 µmol/m^2s) e 8 horas de escuro a 24°C±2 até os 25 dias de crescimento.

3.2.2 Extração de RNA total

Tecido radicular foi macerado em nitrogênio líquido e colocado em tubos de 1,5 mL. A extração de RNA total foi feita na presença de Trizol (Invitrogen), seguindo recomendações do

fabricante. Brevemente, foi adicionado 1 mL de Trizol (Invitrogen) e agitado por 1 minuto. Em seguida, foi adicionado 200 μL de clorofórmio e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, onde foi adicionado 500 μL de isopropanol e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. A solução foi centrifugada a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi lavado com 1 mL de etanol 75%, e centrifugado a 7500 rpm por 5 minutos a 4°C. O sedimentado foi seco a temperatura ambiente, ressuspenso em água DEPC. Adicionalmente, todas as amostras foram tratadas com DNase para eliminar contaminação por DNA genômico.

3.2.3 Quantificação do RNA

De cada amostra de RNA total foi retirado uma alíquota de RNA e diluída em água DEPC na proporção de 5:1000. O RNA diluído foi usado para leitura de absorbância no comprimento de onda de 260 nm e 280 nm. Os valores de absorbância foram usados para calcular a concentração e avaliar a qualidade do RNA por meio da razão 260/280.

3.3 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada com ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega) seguindo recomendações do fabricante. Brevemente, 1μg de RNA total foi misturado com oligodT 50 μM e incubado a 70°C por 5 minutos. Imediatamente após este período a amostra foi colocada em gelo por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado uma solução contendo Buffer Improm-II 1X; $MgCl_2$ 1,5 mM; dNTPmix (concentração final 0,5 mM de cada dNTP) e 1 U Improm-II Reverse Transcriptase. A solução foi incubada a 25°C por 5 minutos, 42°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos. O cDNA sintetizado foi utilizado para PCR, clonagens e análises de expressão (RT-PCR).

3.4 PCR e purificação de DNA a partir de gel agarose

A partir do cDNA, os genes das subtilases AtSBT5.3(At2g04160), AtSBT1.8(At2g05920), AtSBT1.4(At3g14067), AtSBT2.6(At4g30020), AtSBT6.1(At5g19660), AtSBT4.12(At5g59090), AtSBT1.7(At5g67360), foram amplificados com a sequência CACC na extremidade 5’ do iniciador Fw e sem códon de parada na extremidade 3’ do terminador Rev.

Os iniciadores utilizados foram: At2g04160Fw: **CACC**ATGAAGCTAACACATA ACTTCTCGTT, At2g04160Rev: GAGCTTCACCACAATGGGACTTCTCACACGAT GCTTCTT, At2g05920Fw: **CACC**ATGGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCCTCCAT, At2g05920Rev: AAACCGGTTCCAAGAGAATGCAACGGGACTT, At3g14067Fw: **CACC**ATGGCTAAGCTCTCTCTTTCCTCCAT, At3g14067Rev: GAAGGACTGAA CTGATCCCTGACCCCATT, At4g30020Fw: **CACC**ATGGATATCGGGTGTAAAGT TCTCGTCT, At4g30020Rev: TCGCCTTTGTCCCATAGCAACCACAGGGAGA GTCACTTTA, At5g19660Fw: **CACC**ATGAAGGTGCTCGGAGAAGCTTCTTCAT AT, At5g19660Rev: GGCTAATCGATTCGACCCTGATGCTCTT, At5g59090Fw: **CACC**ATGGCGAATCTAGCTGCGTCCACTTGCCTATACTCAT, At5g59090Rev: TGCCTCATCAACAACCATTATGTAAACAACAATGGGACTT, At5g67360Fw: **CACC**ATGTCTTCTTCGTTTCTCTCCTCCACTGCTT e At5g67360Rev: TGTCC AGCTAATCGCCACGGGACTT.

A reação foi composta por tampão 1X; $MgCl_2$ 1,5 mM; dNTP mix (concentração final 0,2 mM de cada dNTP); iniciador Fw (0,2 μM); terminador Rev (0,2 μM); 1 μL de cDNA e 1 U de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen). A reação foi levada no termociclador programada para 94°C por 2 minutos, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, por fim um passo de finalização da extensão a 72°C por 8 minutos.

O produto de PCR foi verificado em gel de agarose 1% e purificado com QIAEX II Gel Extraction *Kit* (QIAGEN). Brevemente, foram adicionados três volumes de Buffer QX1 para cada 100 mg de agarose, 10 μl de Buffer QIAEX II e incubado a 50°C por 10 minutos. A solução foi centrifugada a 12000 rpm por 30 segundos e após retirada do sobrenadante, o sedimentado foi lavado uma vez com 500 μL de Buffer QX1, duas vezes com 500 μL de Buffer PE e secado a temperatura ambiente por 30 minutos. Eluiu-se o DNA com água ultra-pura.

3.5 Clonagens

Os produtos de PCR purificados dos genes das subtilases AtSBT5.3, AtSBT1.4, AtSBT2.6, AtSBT6.1, AtSBT1.7, AtSBT1.8, AtSBT4.12 foram recombinados no vetor de entrada pENTER/D-TOPO (Invitrogen) seguindo recomendações do fabricante e eletroporados em *E. coli*. Após sequenciamento, os vetores de entrada contendo os genes das subtilases foram recombinados com vetores de destino da plataforma GATEWAY (Invitrogen).

Entre os vetores de destino utilizados estão o vetor pk7FWG2 (KARIMI et al., 2002), que fusiona a proteína de interesse com a proteína GFP, e o vetor pk7GWIWG2I (KARIMI *et al*., 2002), que provoca o silenciamento gênico. A estratégia de silenciamento gênico foi utilizada apenas para a subtilase AtSBT1.7 (At5g67360), pois não possui disponível uma linhagem nocaute por inserção de T-DNA. Uma vez confirmados por sequenciamento os vetores de destino contendo os insertos foram transferidos para *Agrobacterium*.

3.6 Preparação de *E. coli* eletrocompetente

Células de *E. coli* desarmadas da cepa TOP10 (Invitrogen) foram estriadas em placas contendo meio LB sólido (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, cloreto de sódio 10 g/L, ágar 12 g/L pH 7,5) e crescida a 37°C/16 horas.

Após 16 horas, foi feito um pré-inoculo a partir de uma colônia colocada em 10 mL de LB líquido, e colocado a 37°C/16 horas sob agitação de 180 rpm. No inóculo de 500 mL de meio LB líquido foi adicionado 5 mL de pré-inóculo, e colocado a 37°C sob agitação de 180 rpm até a densidade ótica (DO_{600}) atingir 0,5-0,8.

As células foram centrifugadas 5000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em água ultra-pura estéril e gelada. As lavagens foram repetidas mais duas vezes e as células foram ressuspensas em 3 mL de glicerol 10% filtro-esterilizado. Foram feitas alíquotas de 70 μL de células e armazenadas a -80°C.

3.7 Preparação de *Agrobacterium* eletrocompetentes

Estriou-se *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 sob uma placa contendo meio MAS sólido (1 L: 200 mL de meio 5XA; 10 mL de sacarose 20% filtro-esterilizada; 2 mL de MgSO4 20%; 0,5 mL de tiamina 10 mg/ml; 12 g de ágar; pH 7,0 - Meio 5XA: K_2HPO_4 69 g/L; $K_2H_2PO_4$ 22,5 g/L; $(NH_4)_2SO_4$ 5 g/L e citrato de sódio 2,5 g/L) contendo rifampicina (50 μg/mL) e gentamicina (50 μg/mL). A placa foi colocada a 28°C/48 horas.

Inoculou-se uma colônia em 10 mL de LB líquido contendo os antibióticos anteriores e crescido a 28°C sob agitação de 180 rpm durante 18 horas. O pré-inóculo foi colocado em 500 mL de meio LB com antibióticos e colocado para crescer a 28°C sob uma agitação de 180 rpm até atingir DO_{600} 0,5-0,8.

A cultura foi centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas três vezes com água ultra-pura estéril e gelada. Por fim, as células foram ressuspensas em 2 mL de glicerol 10% filtro-esterilizado. Alíquotas de 70 µL de células foram armazenadas a -80°C.

3.8 Eletroporação de células de *E. coli* e *A. tumefaciens*

Aproximadamente 2 µL da reação de recombinação foi adicionado a 70 µL de células de *E. coli* eletrocompetentes. Misturou-se suavemente e as células foram transferidas para a cubeta de eletroporação. Submeteu-se uma descarga de 2,5 kV/2,5 µF (Eletroporador gene pulse, BioRad) e, após a eletroporação, adicionou-se 500 µL de meio SOC (100 ml: 2 g de triptona; 0,5 g de extrato de levedura; 0,05 g de NaCl; 1 ml de KCl 250 mM; 180 µL de glicose 20% filtro-esterelizada; 180 µL de $MgCl_2$ 1 M; pH 7,0) e foi colocado sob agitação de 180 rpm a 37°C/1 hora. Centrifugou-se a 5000 rpm por 30 segundos e plaqueou-se todas células em placas contendo meio LB sólido e os antibióticos apropriados. As colônias cresceram a 37°C 16 a 18 horas.

Em 70 µL de células de *A. tumefaciens* eletrocompetentes foi adicionado 0,5-1 µg de plasmídeos e eletroporado como anteriormente para as células de *E. coli*. As células de *Agrobacterium* eletroporadas foram crescidas a 28°C sob agitação de 180 rpm por 2 horas. Centrifugou-se e plaqueou-se em meio LB sólido, contendo os antibióticos apropriados e deixou crescer colônias durante dois dias a 28°C.

3.9 Extração de DNA plasmidial de *E. coli*

Colônias isoladas fora crescidas em 5 mL de meio LB com os antibióticos adequados a 37°C, sob agitação de 180 rpm durante 16-18 horas. Centrifugou-se 1 mL de cultura bacteriana a 12000 rpm e as células ressuspendidas em 75 µL de Buffer TE (10 mM Tris-HCl pH7,6; 1 mM EDTA). Adicionou-se 300 µL de Buffer TENS (10 mM Tris-HCl; pH 8,0; 1 mM EDTA; 0,1 N NaOH; 0,5% SDS), incubou-se a temperatura ambiente por 5 minutos. Após, foi adicionado 150 µL de acetato de potássio 3M (pH 5,2) e incubado no gelo por 15 minutos. Centrifugou-se a 12000 rpm a 4°C por 15 minutos, coletou-se o sobrenadante onde foi adicionado 1 µL de RNAse (10 U/µL) e incubado a 37°C por 30 minutos. Precipitou-se o plasmídeo com 500 µL de etanol 100% por 5 minutos e, centrifugou-se a 12000 rpm a 4°C durante 15 minutos. Foi feita a lavagem

do sedimentado com etanol 70% gelado e centrifugou-se a 12000 rpm a 4°C durante 15 minutos. Logo, o sedimentado foi colocado para secar a temperatura ambiente e ressuspenso em 30 µL de água ultra-pura estéril livre de DNase. Feita a quantificação o plasmídeo foi armazenado a -20°C

3.10 Obtenção de transgênicos

3.10.1 Crescimento de plantas

Sementes de *Arabidopsis* wt tratadas a 4°C/48 horas foram crescidas em câmaras de crescimento (Conviron) com fotoperíodo de 16 horas luz (200 µmol/m^2s) e 8 horas de escuro a 24°C±2 sobre substrato (Plant Max:vermiculita fina:vermiculita grossa, 2:1:1, v:v:v). Foram feitas irrigações com solução nutritiva e após emergência das primeiras flores, foi feita a remoção do broto principal para a emergência de maior número de brotos laterais. Plantas com brotos laterais de aproximadamente 45 dias, com inicio de floração foram usadas para transformação.

3.10.2 Preparação da cultura bacteriana

Foram crescidas colônias isoladas de *Agrobacterium* (contendo os clones com os genes de interesse) em pré-inóculos de 10 mL de meio LB líquido contendo os antibióticos adequados, incubou-se a 28°C por 18 horas sob agitação de 180 rpm.

Adicionou-se o pré-inóculo em 500 mL de meio LB líquido contendo os antibióticos adequados, e colocou-se para crescer a 28°C sob agitação de 180 rpm durante 48 horas. Em 400 ml de cultura foi adicionado 125 g de sacarose, dissolvida a sacarose a solução bacteriana foi transferida para um balão de 500 ml onde foi adicionado 80 µL de Silwet L-77 na parede do balão, completando com 500 mL com solução bacteriana restante e foi feita a mistura por meia rotação do balão. A solução foi vertida no becker de 600 mL e usada para transformação.

3.10.3 Transformação de plantas pelo método *floral-dip* modificado

Foram removidas flores abertas das plantas com aproximadamente 45 dias de idade, mantendo apenas botões florais fechados de acordo com o método já estabelecido (CLOUGH; BENT, 1998), com pequenas modificações.

A modificação do método *floral-dip*, ocorreu para aumentar e manter o contato da solução de *Agrobacterium* com os botões florais fechados. A modificação consistiu em levar a solução bacteriana numa pipeta Pasteur diretamente para os botões florais, aplicou-se a solução bacteriana

com leve fluxo até conseguir a penetração entre os espaços estreitos dos botões florais fechados. Após transformação, foi feita uma câmara úmida e as plantas foram colocadas em ambiente escuro por 24 horas. As plantas foram retiradas da câmara úmida e colocadas na câmara de crescimento, onde receberam os cuidados necessários até completar o ciclo reprodutivo e maturação de sementes.

3.10.4 Seleção de transgênicos

Sementes T1 foram esterilizadas superficialmente e colocadas a 4°C/48 horas como anteriormente. As sementes foram então misturadas com 0,1% de agarose e colocadas em placas contendo meio MS 0,5X (Murashige & Skoong, pH 5,75), fitagel (Gibco) 3 g/L, e 100 mg/l de canamicina.

Após 15 dias de crescimento em câmaras de crescimento (Conviron) com fotoperíodo de 16 horas luz (200 µmol/m^2s) e 8 horas de escuro a 24°C±2, selecionou-se as plantas resistentes a canamicina que apresentavam o segundo par de folhas. Estas plantas foram transferidas para o substrato composto (descrito anteriormente) até coletar e selecionar transgênicos das sementes T2. O mesmo processo foi realizado até obter a geração T3.

Na geração T1, as plantas que apresentavam resistência ao antibiótico foram analisadas em microscópio confocal (Olympus FV1000) para verificar a presença das subtilases fusionadas a GFP. Para detecção da GFP, a excitação ocorreu a 488 nm e a emissão entre 510-550 nm.

Plantas que apresentavam a subtilase AtSBT1.7 silenciada, foram selecionadas na geração T1 até T3 por análises de RT-PCR.

3.11 Confirmação de mutantes nocaute

Linhagens nocaute (T-DNA) para cada uma das subtilases candidatas foram obtidas no TAIR (www.arabidopsis.org): At2g04160 (SALK_125788), At2g05920 (SALK_020799), At3g14067 (SALK_147962), At4g30020 (SALK_068944), At5g19660 (SALK_097923) e At5g59090 (SALK_045125). As sementes foram colocadas a 4°C/48 horas colocadas em substrato, como descritas anteriormente.

A presença do T-DNA e ausência de segregação (homozigoto) foram confirmadas por PCR de DNA genômico utilizando-se os seguintes iniciadores: 125788Fw: CAAA AATTCTGTAATTTATATGGAAGGTGC, 125788Rev: GGAGAAAGGCTA

GGTTCGGAGAAG, 020799Fw: CACCAGTCTTCTTCCCTACAGCG, SALK_020799Rev: GATACGATTGCGATTGGAGCG, 147962Fw: TCAGA AGGACTGAACTGATC, 147962Rev: CATCCCGATTGGTCACCTGC, 068944Fw: CGTCACCTTGAGAGGAAGCATG, 068944Rev: GCTC TATCATAACCACCACCAGTTG, 097923Fw: CATAGGAGAGGACTCAG TTCCTTCTTC, 097923Rev: GACCTTTGACTAATTTGGCGACG, 045125Fw: GCAGACGAAGGGACTTCCGAG, 045125Rev: CAATG GCTTGTCCTCATGTTGC e LBb1.3: ATTTTGCCGATTTCGGAAC.

LBb1.3 é um iniciador interno do T-DNA. Os demais iniciadores flanqueiam o T-DNA. Desta maneira, foi feita uma PCR usando iniciadores flanqueando o T-DNA, para confirmar a ausência de segregação (linha homozigota) e uma PCR combinando os iniciadores LBb1.3 e gene-específico para confirmar a presença do T-DNA. Por fim, foram feitas análises de expressão (RT-PCR) nas linhas homozigotas para verificar ausência de expressão das subtilases nos mutantes nocaute.

3.12 Análise de expressão

As análises da expressão gênica em plantas silenciadas, superexpressas e mutantes SALK foram feitas por meio de RT-PCR. Quantificou-se o acúmulo de transcritos através de reações de PCR (10, 15, 20 e 30 ciclos) e comparação com o tipo selvagem (wt). Como controle positivo interno utilizou-se o gene da GAPDH (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) e o gene do AtRALF34.

3.13 Hibridação

Foram feitas hibridações entre linhagens homozigotas (SALK_125788, SALK_147962, SALK_068944, SALK_097923, SALK_045125, SALK_020799 e 35S:RNAi:AtSBT1.7) que não apresentavam expressão das subtilases com a planta 35S:AtRALF1. Os cruzamentos foram feitos de acordo com a invenção de uma técnica rápida e simples mostrada no Apêndice A.

A técnica foi baseada nos seguintes procedimentos: construção de microponteiras de 1,5 mm de diâmetro, seleção de botões florais próximos a abertura, remoção das anteras (emasculação) das linhagens mutantes e silenciadas, transferência do pólen proveniente de

plantas 35S:AtRALF1 ao interior das microponteiras e introdução do estigma ao interior vazio das microponteiras contendo os grãos de pólen.

Após três dias foi constatado o crescimento do estigma, sinal favorável a fecundação. Também foi acompanhado o desenvolvimento da sílica para retirada da microponteira e, por fim a maturação da sílica. Todas as hibridações foram feitas com lupas e pinças (5-SA Style 5 Tweezers).

3.14 Confirmação da presença da superexpressão do AtRALF1 e ausência de expressão das subtilases em plantas F1 e F2

Para confirmar o nocaute por T-DNA e a presença do gene AtRALF1 superexpresso em 35S:AtRALF1 foram feitos PCR a partir de DNA genômico em gerações F1 e F2. Os iniciadores 35SFw (ATCCCACTATCCT TCG CAAGACCCTTCCTCTA) e AtRALF1 Rev (CTAACTCCTGCAACGAGCAATTTT G) foram usados para verificar a presença de 35S:AtRALF1. O T-DNA foi confirmado como descrito anteriormente. O critério de seleção foi feito para obter híbridos homozigotos superexpressando AtRALF1 e ausência de expressão da subtilase no mesmo indivíduo.

4 RESULTADOS

4.1 Seleção de subtilases potencialmente envolvidas no processamento do AtRALF1

Nosso grupo anteriormente mostrou que a provável subtilase que processa o precursor do AtRALF1 está localizada na via secretória, mais especificamente na fração microssomal (MATOS et al., 2008). Levando-se esse dado em consideração e com base nos estudos feitos por (RAUTENGARTEN et al.,2005), foram selecionadas, dentre as 56 subtilases presentes em *Arabidopsis*, 46 preditas como secretadas. A análise da expressão gênica *in silico* (www.arabidopsis.org), revelou que dessas 46 subtilases somente 23 são expressas em raiz, região onde o peptídeo hormonal AtRALF1 é também expresso.

Com a finalidade de restringir ainda mais o grupo de prováveis subtilases envolvidas com o processamento do precursor do AtRALF1, foi utilizada a ferramenta *in silico* para análise de expressão disponível na Universidade de Toronto (http://www.bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi). Essa ferramenta utiliza os dados de expressão obtidos por Birnbaum et al. (2003). Nesse trabalho, os autores apresentam um mapa detalhado e pormenorizado da expressão gênica das raízes de *Arabidopsis*. Utilizando-se de 5 linhagens transgênicas expressando GFP especificamente em tecidos distintos da raiz, associado a separação celular (protoplastos) por fluorescência e análise da expressão gênica por microarranjos, os autores individualizaram 15 zonas distintas em raízes, três transversais (estágio I, II e III) e 5 longitudinais (Fig1A). Os dados mostram que a expressão mais abundante do AtRALF1 se encontra no estágio de desenvolvimento III (Fig 1C, asterisco). Das 23 subtilases selecionadas previamente, somente sete apresentam expressão diferenciada no estágio de desenvolvimento III (Fig 1C, setas pretas). Com base nesses dados, as sete subtilases selecionadas para as etapas posteriores do trabalho foram: AtSBT5.3 (At2g04160), AtSBT1.4 (At3g14067), AtSBT2.6 (At4g30020), AtSBT6.1 (At5g19660), AtSBT1.7 (At5g67360), AtSBT1.8 (At2g05920) e AtSBT4.12 (At5g59090).

A comprovação da expressão gênica das subtilases selecionadas foi feita através de reações de RT-PCR com cDNA gerado a partir de raízes de plântulas de 20 dias. A análise da expressão foi feita tanto em plantas selvagens (wt) quanto em plantas que superexpressam o AtRALF1. Os dados *in silico* foram confirmados para todas as 7 subtilases selecionadas. A de maior expressão *in silico*, AtSBT1.8, mostrou também a banda mais intensa na análise por RT-PCR (Figura 1B e C). A de menor expressão *in silico* também foi mostrou uma banda de menor

intensidade no RT-PCR, AtSBT6.1. Não foi detectada alteração significativa da expressão gênica das subtilases quando comparados os níveis de expressão em plantas selvagens e em plantas que superexpressam AtRALF1. Somente a AtSBT5.3 apresentou uma pequena redução na expressão em plantas superexpressoras do peptídeo.

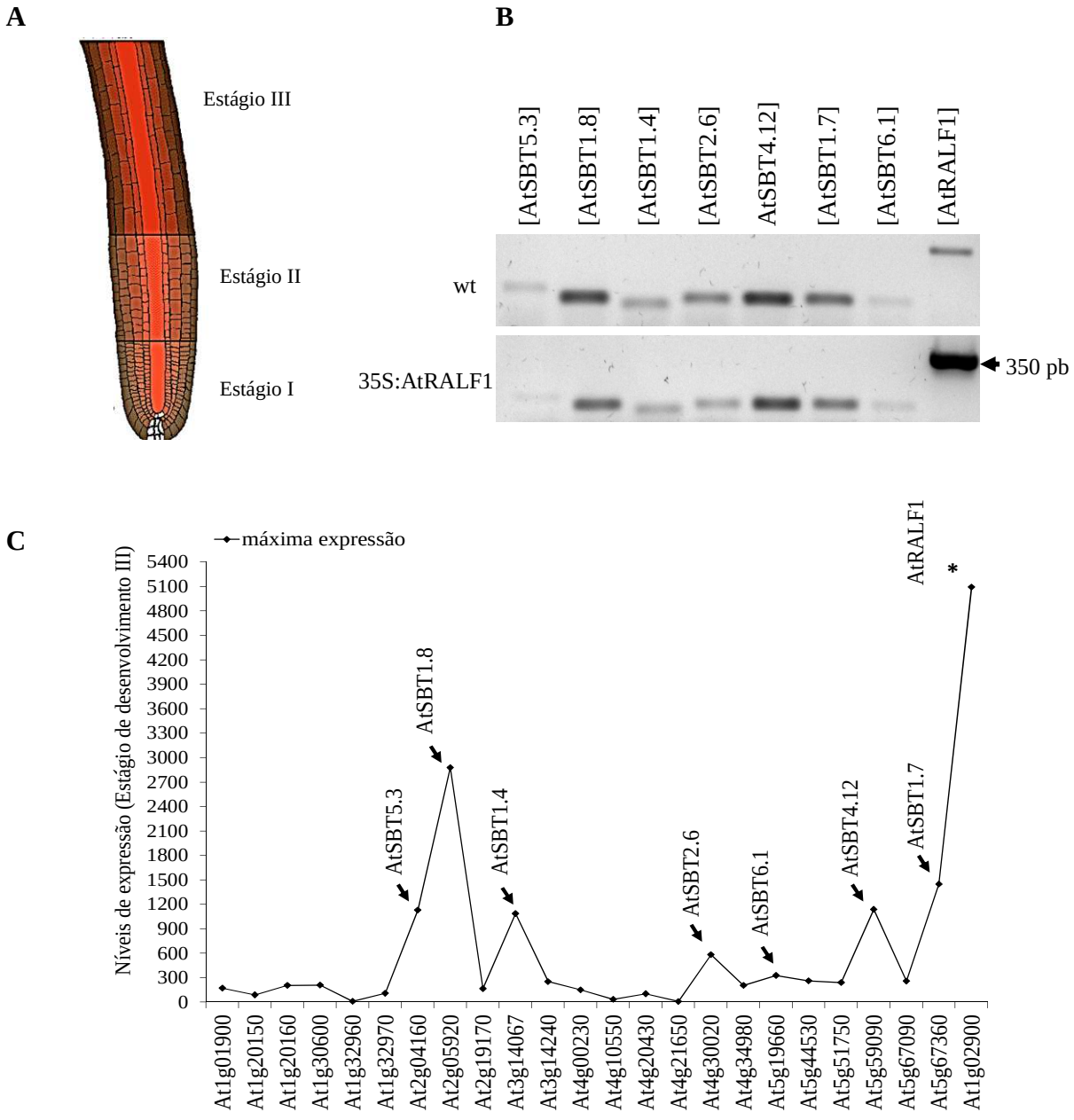


Figura 1- Seleção das subtilases com potencial para processamento do AtRALF1. (A) esquema das 15 regiões do mapa da expressão gênica de raízes de *Arabidopsis* segundo Birnbaum et al. (2003). (B). Análise da expressão gênica através de RT-PCR das 7 subtilases selecionadas e do AtRALF1 em raízes de *Arabidopsis* selvagem e em plantas que superexpressam AtRALF1.(C) Análise da expressão gênica *in silico* das 23 subtilases candidatas e do peptídeo AtRALF1 (*) na região do desenvolvimento radicular III. Setas indicam as sete subtilases selecionadas

4.2 Determinação da localização subcelular das subtilases selecionadas através de fusões proteicas com a proteína verde fluorescente (GFP)

Plantas de *Arabidopsis* transformadas geneticamente com vetores contendo transgenes formados pelas subtilases selecionadas fusionadas a proteína repórter GFP foram utilizadas para determinação da localização subcelular. Sementes de *Arabidopsis* selvagem e linhagens transgênicas de primeira geração foram avaliadas sob microscópio confocal após 36 horas da germinação. Foram obtidos e avaliados 5, 5, 4, 9, 7, 5 e 6 eventos independentes das linhages 35S:AtSBT5.3:GFP, 35S:AtSBT1.4:GFP, 35:AtSBT2.6:GFP, 35S:AtSBT1.7:GFP, 35S:AtSBT6.1:GFP, 35S:AtSBT4.12:GFP e 35S:AtSBT1.8:GFP, respectivamente.

Raízes de *Arabidopsis* selvagem não mostraram nenhuma fluorescência nas condições em que as plantas transgênicas foram avaliadas (Figura 2A-B). Plantas transformadas com a subtilase AtSBT5.3 fusionada a GFP mostraram fluorescência em estruturas que se assemelham ao complexo de Golgi (NELSON; CAAI; NEBENFÜHR, 2007) e também no apoplasto (Fig 2C-D, seta em 2C indica provável complexo de Golgi e seta em 2D indica plasmólise). Raízes de plantas superexpressando AtSBT1.4 fusionada a GFP localiza a proteína no retículo endoplasmático (RE), porém não foi visualizada fluorescência no apoplasto sugerindo que a mesma não é secretada (Figura 2E-F). A fluorescência nas células por vezes mostrou um padrão difuso (Figura 2F). Um padrão difuso pode ser indicativo da presença da GFP no citosol, porém, GFP no citosol apresenta um tropismo muito grande para o núcleo (CHIU et al., 1996), como nunca foi visualizada fluorescência no núcleo, a fluorescência difusa foi também atribuída ao RE. A subtilase AtSBT2.6 quando fusionada a GFP mostrou um padrão semelhante a AtSBT5.3, ou seja, formação de estruturas semelhantes ao complexo de Golgi e presença de fluorescência no apoplasto (Figura 2G). Para essas plantas não foram obtidas imagens de células plasmolisadas. O mesmo padrão observado para a AtSBT1.4 foi visualizado com a AtSBT1.7 fusionada a GFP (Figura 2H-I), a proteína foi detectada no RE mas não no apoplasto. Quando a AtSBT6.1 fusionada a GFP foi visualizada no microscópio confocal observou-se a presença de fluorescência em estruturas semelhantes ao complexo de Golgi e também no apoplasto de células plasmolisadas, padrão semelhante a AtSBT5.3 e AtSBT2.6 (Figura 2J-K).

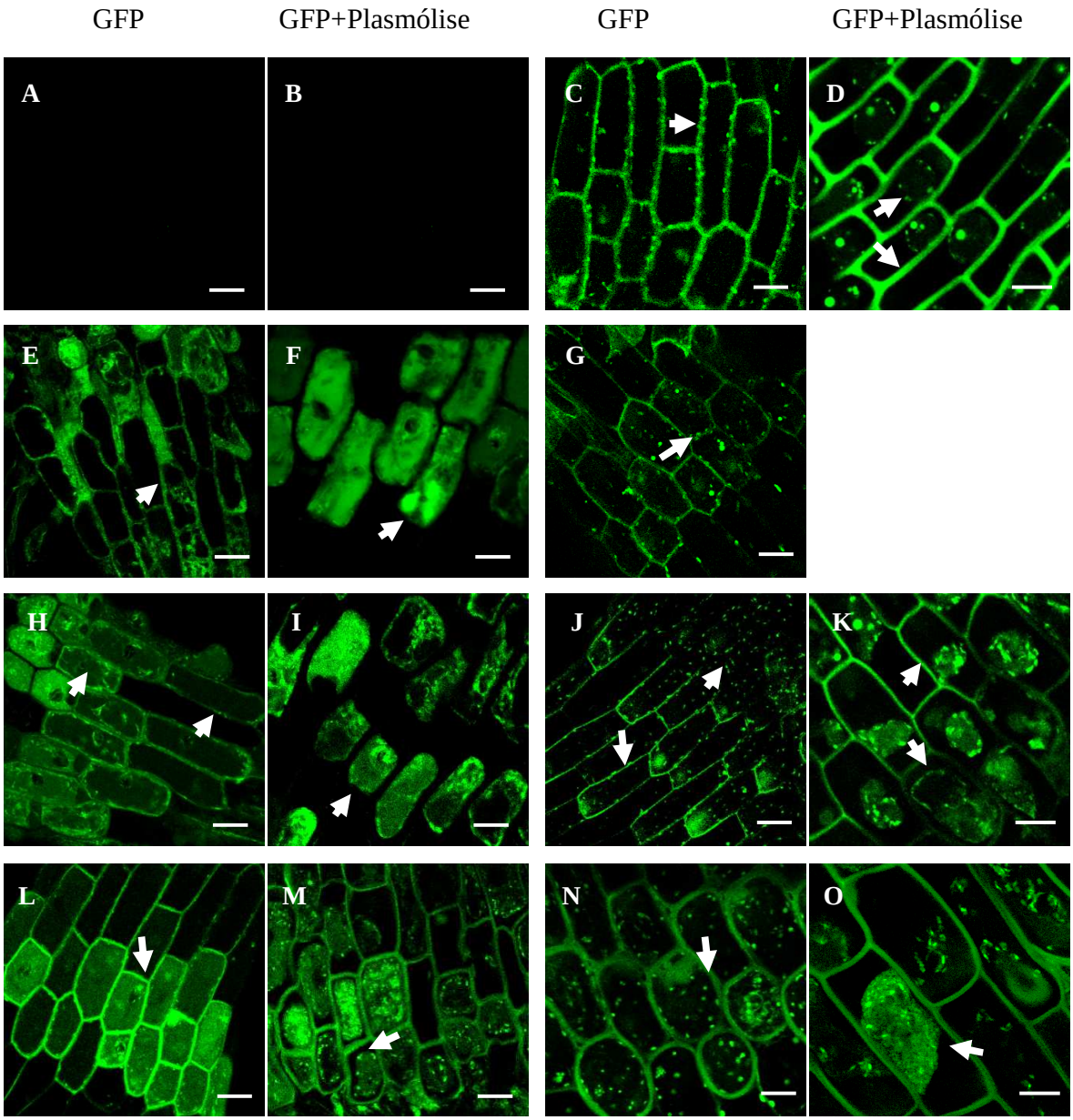


Figura 2 - Localização subcelular das subtilases com a proteína verde fluorescente (GFP). (A-B) controle (wt). (C-D) 35S:AtSBT5.3:GFP. (E-F) 35S:AtSBT1.4:GFP. (G) 35:AtSBT2.6:GFP. (H-I) 35S:AtSBT1.7:GFP. (J-K) 35S:AtSBT6.1:GFP. (L-M) 35S:AtSBT1.8:GFP. (N-O) 35S:AtSBT4.12:GFP. Plantas de Arabidopsis, com os vetores contendo os transgenes mostram em raiz a localização das subtilases. Barra = 20µ

Padrão semelhante também é observado em plantas que superexpressam AtSBT1.8 e AtSBT4.12, ambas mostram fluorescência em estruturas que lembram o complexo de Golgi para ATSBT4.12 (Figura N), retículo endoplasmático (RE) para AtSBT1.8 (Figura L) e em células plasmolisadas aparecem no apoplasto para ambas (Figura 2M e O).

Embora não tenha sido feita uma avaliação quantitativa das plantas transgênicas que superexpressam as subtilases fusionadas com a proteína repórter GFP, não foi detectado nenhum fenótipo que as diferenciasse das plantas de *Arabidopsis* selvagens. (Apêndice B)

4.3 Análise de mutantes com baixa expressão ou nocautes nas subtilases potencialmente envolvidas no processamento do AtRALF1

Com o objetivo de avaliar os efeitos da ausência das diferentes subtilases candidatas responsáveis pelo processamento, linhagens nocautes por inserção de T-DNA derivadas da coleção do instituto SALK (http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress) foram solicitadas e avaliadas. Das 7 subtilases selecionadas, foram obtidas linhagens nocautes por inserção de T-DNA para os genes AtSBT1.8, AtSBT4.12, AtSBT5.3, AtSBT1.4, AtSBT2.6 e AtSBT6.1. Um diagrama com a localização das inserções de T-DNA para cada uma das linhagens obtidas é mostrado na Figura 3A. A presença do T-DNA foi comprovada pela ausência de expressão gênica para cada uma das subtilases (Figura 3B). Somente para uma subtilase, AtSBT1.7, não foi encontrada uma linhagem nocaute por inserção de T-DNA. Para a SBT1.7 foi feita uma construção gênica para geração de RNA dupla fita e consequente silenciamento. Dezenove linhagens transgênicas foram obtidas e, com base nos níveis de expressão, duas foram selecionadas, T2-L3(6) e T2-L4(2). Na Figura 3C é mostrado o resultado da análise da expressão por RT-PCR do gene AtSBT1.7 em ambas linhagens. Enquanto uma forte banda é observada em uma planta selvagem (wt), na linhagen T2-L3(6) não é detectada a expressão do gene e na T2-L4(2) ocorre um silenciamento parcial. A detecção do gene AtRALF34 é utilizada como controle da síntese do cDNA. Após a confirmação dos nocautes e linhagens RNAi procedeu-se a análise fenotípica das linhagens. Não foi observada diferença significativa quanto ao crescimento de raízes nas linhagens nocaute ou nas linhagens silenciadas (Figura 3D).

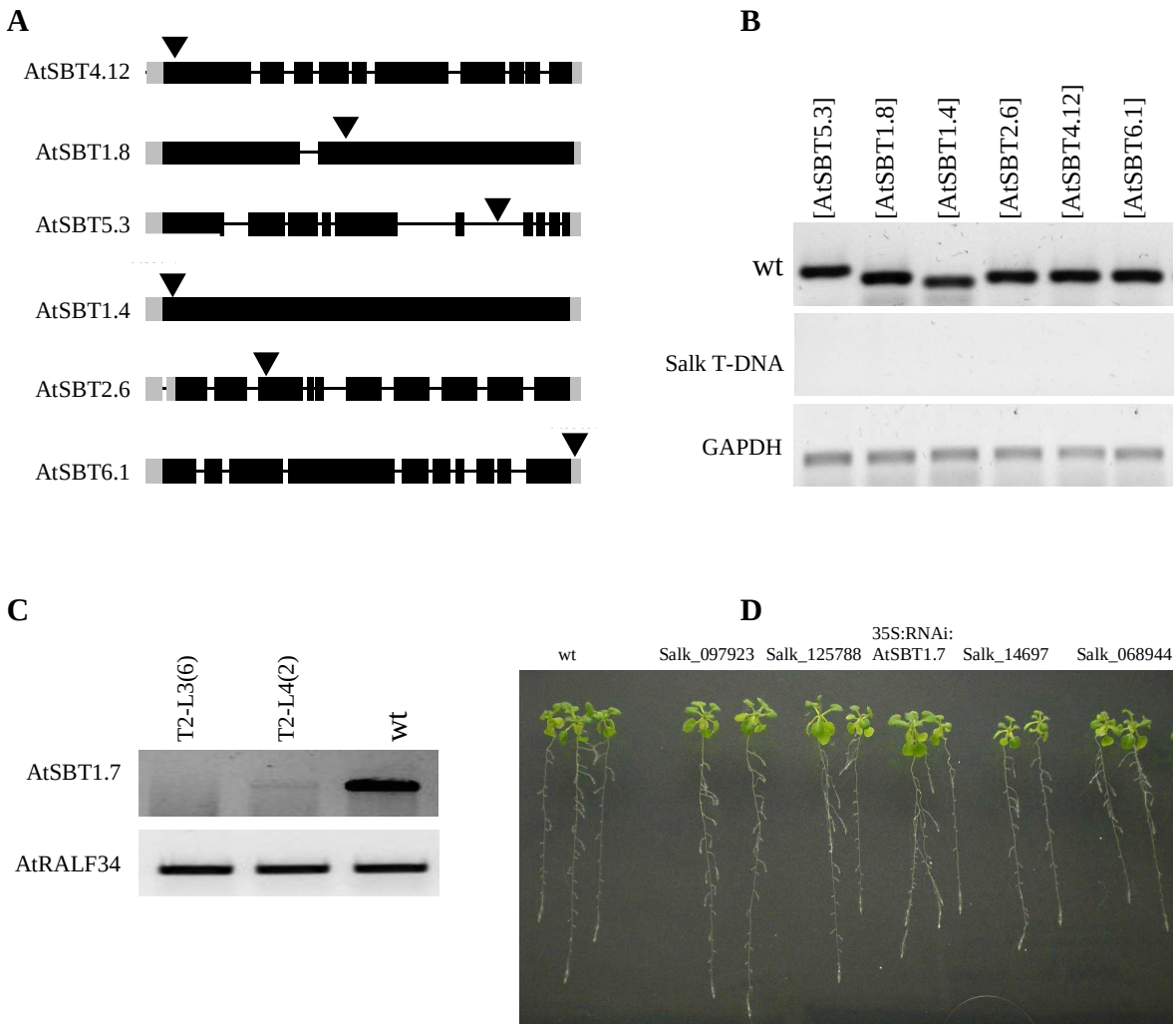


Figura 3- Linhagens nocaute por inserção de T-DNA e de baixa expressão gênica para as subtilases selecionadas. (A) Esquema com a representação dos genes das subtilases e os pontos de inserção do T-DNA (triângulo invertido). Blocos cinzas representam as regiões 5' e 3' não traduzidas. Blocos pretos representam exons e traços introns. (B) Análise da expressão gênica por RT-PCR das linhagens nocaute por inserção de T-DNA. Iniciadores específicos para cada uma das linhagens nocaute indicadas acima de cada canaleta foram utilizados. Os cDNAs foram gerados a partir de RNA de plantas selvagens (wt) e plantas nocaute (SalkT-DNA). Iniciadores específicos para o gene GAPDH foram utilizados como controle positivo para a síntese do cDNA de plantas nocaute (GAPDH). (C) Análise da expressão gênica do AtSBT1.7 em duas plantas silenciadas, T2-L3(6) e T2-L4(2). O gene AtRALF34 foi utilizado como controle para a síntese de cDNA (D) Fenótipos representativos das linhagens nocaute por inserção de T-DNA e da linhagem silenciada para o gene AtSBT1.7, T2-L3(6)

4.4 Hibridações entre plantas superexpressoras do AtRALF1 (35S:AtRALF1) e as linhagens nocaute ou de baixa expressão para as subtilases selecionadas

Plantas que superexpressam o prepropeptídeo AtRALF1 (35S:AtRALF1) possuem um fenótipo semi-anão como uma característica e acentuada inibição do crescimento das raízes. Plantas transformadas com a mesma construção, mas que foram modificadas de maneira a não processar o prepropeptídeo (35S:AtRALF1-A69) possuem fenótipo idêntico ao tipo selvagem (MATOS et al., 2008). Com base nessa relação entre processamento do prepropeptídeo e presença do fenótipo de inibição de raízes, elaborou-se uma estratégia para identificar a subtilase responsável pelo processamento. A estratégia é baseada no fato de que se o prepropeptídeo AtRALF1 estiver sendo superexpresso, como é o caso de plantas 35S:AtRALF1, na ausência da convertase(s) específica(s) para o seu processamento, o fenótipo das plantas deve ser selvagem e não semi-anão. Procedeu-se então o cruzamento das linhagens nocaute e de baixa expressão com a 35S:AtRALF1. A obtenção de uma planta de fenótipo normal, porém superexpressora do AtRALF1 e nocaute para uma subtilase, seria evidência de que a subtilase em questão estaria envolvida no processamento do AtRALF1. Metodologia semelhante foi utilizada para a identificação da subtilase que processa AtRALF23 (SRIVASTAVA et al., 2009). Foram feitos, em média, 25 cruzamentos entre plantas nocaute ou de baixa expressão das subtilases com plantas 35S:AtRALF1. As plantas 35S:AtRALF1 foram utilizadas em todos cruzamentos como doadoras de pólen para simplificar a identificação de plantas híbridas nas gerações seguintes. Na tabela 1 estão o número de plantas F1 obtidas de cada cruzamento e o número de plantas F2 avaliadas. Essas últimas confirmadas para superexpressão do AtRALF1 e ausência de expressão da convertase por RT-PCR. Hibridações dos nocautes para as subtilases AtSBT1.8 e AtSBT4.12 com plantas superexpressoras do AtRALF1 geraram plantas F1 com dificuldades no crescimento, razão pela qual não foram levadas para a geração F2. Para as demais cinco subtilases obteve-se sucesso nos cruzamentos e procedeu-se a análise conforme planejado.

Tabela 1 – Distribuição de cruzamentos realizados entre linhagens nocautes ou de baixa expressão e 35S:AtRALF1

♂	♀	Total de plant./ cruzamento F1	Total de plant. F1 confirmadas por PCR	Total de plant. F2 Avaliadas por PCR	Total de plant. F2 confirmadas por PCR
35S:AtRALF1 X	**Salk_097923**	9	4	20	4
	Salk_020799	10	5	--	--
	Salk_068944	6	3	20	4
	Salk_045125	7	4	--	--
	Salk_147962	12	5	20	6
	Salk_125788	8	4	20	5
	RNAi - Linh. 3(6)	8	2	20	2

Plantas híbridas F2 que apresentaram a presença de acúmulos elevados de transcritos AtRALF1(35SAtRALF1) e ausência da expressão das subtilases AtSBT6.1, AtSBT5.3 mantiveram um fenótipo normal nas raízes comparadas com os controles selvagens e plantas 35S:AtRALF1 (Figura 4A). O desenvolvimento das raízes dos híbridos F2 sugere que as subtilases AtSBT6.1 e AtSBT5.3, ambas, estão envolvidas no processamento do prepropeptídeo AtRALF1. Plantas híbridas F2 que na ausência das subtilases mantiveram o mesmo fenótipo de plantas superexpressoras do AtRALF1, caso das subtilases AtSBT1.7, AtSBT1.4 e AtSBT2.6, são indicativas de que essas subtilases não participam do processamento (Figura 4A). A análise da expressão por RT-PCR dos híbridos mostra a superexpressão do gene AtRALF1 em nível igual a de plantas 35S:AtRALF1 e a ausência da expressão das respectivas subtilases (Figura 4B). Iniciadores para o gene GAPDH foram utilizados como controle da síntese do cDNA.

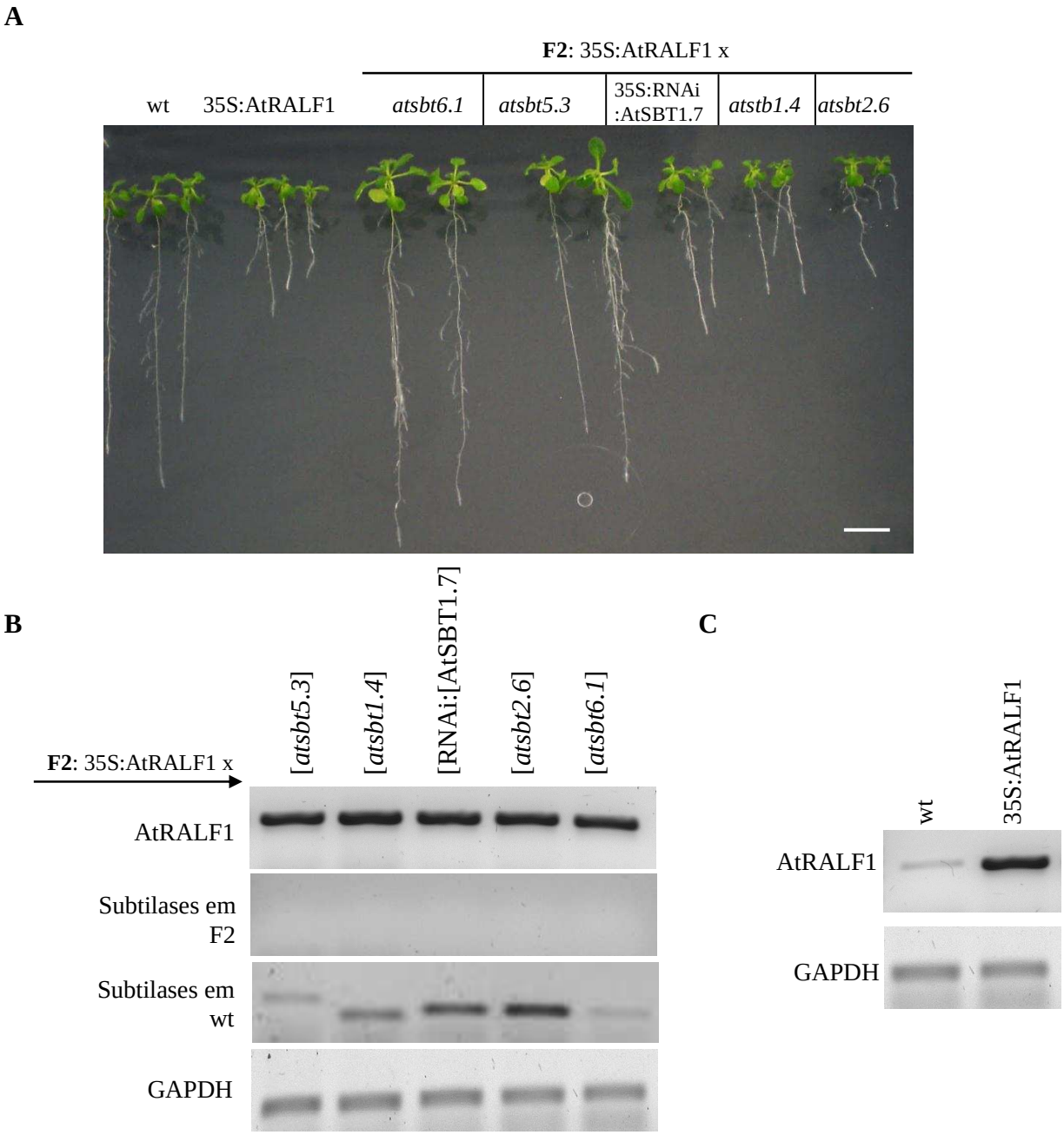


Figura 4 - Análise dos híbridos F2 dos cruzamentos entre mutantes nocaute ou plantas de baixa expressão das subtilases e plantas que superexpressam o gene AtRALF1. (A) Plantas F2 crescidas por 20 dias em placas verticais. Arabidopsis selvagem (wt) e superexpressoras do AtRALF1 (35S:AtRALF1) foram colocadas para comparação. Barra=1cm (B) Análise da expressão gênica por RT-PCR feita nas raízes das plantas F2, resultado dos cruzamentos. (C)Análise de expressão gênica por RT-PCR feitas em raiz de *Arabidopsis* selvagem (wt) e superexpressoras do AtRALF1

5 DISCUSSÃO

5.1. Seleção e localização subcelular das subtilases

Nosso esforço em encontrar subtilases que estejam envolvidas no processamento do prepropeptideo AtRALF1, partindo de um genoma estimado em 25000 genes, começa com a identificação em *Arabidopsis*, de uma família de proteases do tipo subtilases formada por 56 membros (RAUTENGARTEN el al., 2005). A predição subcelular associada a análise detalhada da expressão gênica em raízes de *Arabidopsis* (BIRNBAUM et al., 2003) permitiu a redução do número de subtilases candidatas de 56 para 7 (Figura 1A-B). A expressão gênica das subtilases, tanto em plantas selvagens quanto em plantas 35S:AtRALF1, não apresentou diferenças significativas. Esse resultado indica que a superexpressão do prepropeptídeo AtRALF1, provavelmente não leva a superexpressão da enzima responsável pelo seu processamento (Figura 1B). A fusão com a proteína repórter (GFP) permitiu estabelecer os locais para onde as subtilases são direcionadas. Assim, a subtilase AtSBT5.3 é localizada no Golgi (Figura 2C), proteína que ainda não foi reportada nessa organela. Neuteboom et al. (1999) mostraram que a subtilase AtSBT5.3 desempenha uma atividade catalítica na parede celular, debilitando as conexões entre as células que promovem a emergência lateral de raízes. Essa subtilase pertence a família *AIR3* (*Root Induced Auxin*), um fator que responde aos estímulos externos de auxina. A visualização da proteína no apoplasto confirma que ela é exportada para parede celular (Figura 2D). Observações similares foram feitas nas subtilases AtSBT6.1 e AtSBT2.6. Liu et al. (2007) mostraram que a subtilase AtSBT6.1 está relacionada a resposta ao estresse salino, catalisando o processamento de uma proteína precursora do fator transcricional AtbZIP17. As subtilases AtSBT1.8 e AtSBT4.12 são exportadas para o apoplasto (Figura 2M e 2O) e possivelmente localizadas no Golgi em AtSBT4.12 (Figura 2N) e no retículo endoplasmático (Figura 2L). Estudos recentes mostraram que a subtilase AtSBT4.12 sob a regulação do GUS, uma proteína repórter, é ubíqua no xilema de pelos radiculares (KUROHA et al., 2009). Aplicações exógenas de metil jasmonato tornam ela mais ativa atribuindo a ela uma função na resposta ao estresse. Outro grupo é formado pelas subtilases AtSBT1.4 e AtSBT1.7, que localizam-se no RE e, segundo nossa avaliação microscópica, não são secretadas, a presença de um sinal de retenção no RE não foi detectada.

A superexpressão das subtilases fusionadas com a proteína repórter GFP não apresentam fenótipos distintos de plantas selvagens (Apêndice B). Isso pode indicar tanto a ausência de efeito associado a uma maior presença das subtilases quanto a talvez a inatividade das subtilases uma vez fusionadas a GFP.

5.2. Mais de uma subtilase é responsável pelo processamento do prepropeptideo AtRALF1

Na procura da subtilase envolvida no processamento do AtRALF23, Srivastava et al. (2009) mostraram que a subtilase AtSBT6.1 estava envolvida no processamento do AtRALF23. Além da descoberta foi também previsto que a subtilase também poderia estar envolvida no processamento de outras isoformas, através do reconhecimento do sítio dibásico RRILL, conservado e presente em outras isoformas tais como AtRALF1, AtRALF22 e AtRALF33. Nossos resultados confirmam essa previsão, também acrescentam que existe a participação de outra subtilase, algo comum em sistemas animais (CANAF et al., 1999). Esse fato foi comprovado em híbridos F2 que apresentam ausência da convertase (AtSBT6.1 ou AtSBT5.3) e superexpressaõ da isoforma AtRALF1 (Figuras 4A e 4B). Essas plantas apresentam um desenvolvimento radicular normal, maiores que em plantas superexpressoras do peptídeo AtRALF1. A ausência do fenótipo de inibição de raízes é causada pela ausência das convertases que não clivam o prepropeptídeo, consequentemente, não liberando o peptídeo ativo (PEARCE et al., 2001b; MATOS et al., 2008). Um fato curioso é que, se ambas são responsáveis pelo processamento, o que se está visualizando em termos de fenótipo é ainda pelo menos parcial, visto que os nocautes são individuais e não foi ainda testado o duplo mutante.

Os resultados aqui apresentados permitem sugerir que as subtilases AtSBT6.1 e AtSBT5.3 são responsáveis pelo processamento do propeptídeo AtRALF1. Evidências conclusivas poderão ser obtidas com a avaliação do acúmulo do propeptídeo AtRALF1 nas plantas híbridas, com a incapacidade (parcial ou não) das frações microssomais dos respectivos nocautes processarem *in vitro* o propeptídeo e também com a análise fenotípica, genética e proteica do duplo mutante para AtSBT6.1 e AtSBT5.3

6 CONCLUSÕES

- As proteases do tipo subtilases aqui investigadas apresentam diferentes localizações subcelulares que variam desde uma aparente retenção no RE ou Golgi até a secreção no apoplasto.

- O processamento de preprohormônios vegetais, a exemplo do que ocorre em animais, pode ser realizado por mais de uma enzima do tipo subtilase.

-As subtilases AtSBT6.1 e AtSBT5.3 estão envolvidas no processamento do prepropeptídeo AtRALF1.

REFERÊNCIAS

BAYDOUN, E.A.; F.R.Y, S.C. The immobility of pectic substances in injured tomato leaves and its bearing on the identity of the wound hormone. **Planta**, Berlin, v. 165, p. 269–276, 1985.

BERGEY, D.R.; RYAN, C.A. Wound- and systemin-inducible calmodulin gene expression in tomato leaves. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 40, p. 815–823, 1999.

BIRNBAUM, K.; SHASHA ,D.E.; WANG, J.Y.; JUNG, J.W.; LAMBERT, G.M.; GALBRAITH, D.W.; BENFEY, P.N. A gene expression map of the Arabidopsis root. **Science**. New York, v. 5652, p. 1956-1960, 2003.

BRAND, U.; GRÜNEWALD, M.; HOBE, M.; SIMON, R. Regulation of CLV3 expression by two homeobox genes in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 129, p. 565–575, 2002.

BUTENKO, M.A.; PATTERSON, S.E; GRINI, P.E.; STENVIK, G.E.; AMUNDSEN, S.S. Inflorescence deficient in abscission controls floral organ abscission in Arabidopsis and identifies a novel family of putative ligands in plants. **The Plant Cell**. Rockville, v. 15, p. 2296–2307, 2003.

CANAFF, L.; BENNETT, H.P.; HENDY, G.N. Peptide hormone precursor processing: getting sorted? **Molecular and Cellular Endocrinology,** Amsterdam, v. 1, p. 1-6, 1999.

CASSON, SA.; CHILLEY, PM.; TOPPING, J.F.; EVANS, I.M.; SOUTER, M.A.; LINDSEY, K. The POLARIS gene of Arabidopsis encodes a predicted peptide required for correct root growth and leaf vascular patterning. **The Plant Cell**. Rockville, v. 8, p. 1705-1721, 2002.

CHILLEY, P.M.; CASSON, S.A.; TARKOWSKI, P.; HAWKINS, N.; WANG, KL.; HUSSEY P.J.; BEALE, M.; ECKER, J.R.; SANDBERG, G.K.; LINDSEY, K. The POLARIS peptide of Arabidopsis regulates auxin transport and root growth via effects on ethylene signaling. **The Plant Cell**. Rockville, v. 11, p. 3058-3072, 2006.

CHARON, C.; SOUSA, C.; CRESPI, M.; KONDOROSI, A. Alteration of enod40 expression modifies *Medicago truncatula* root nodule development induced by Sinorhizobium meliloti. **The Plant Cell**. Rockville, v. 11, p. 1953–1966, 1999.

CHEN, Y.F.; MATSUBAYASHI, Y.; SAKAGAMI, Y. Peptide growth factor phytosulfokine-α contributes to the pollen population effect. **Planta,** Berlin. v. 211, p. 752–755, 2000.

CHIU, W.; NIWA, Y.; ZENG, W.; HIRANO, T.; KOBAYASHI, H.; SHEEN, J. Engineered GFP as a vital reporter in plants. **Current Biology**, London, v. 3, p. 325-330, 1996.

CLOUGH, S.J.; BENT, A.F. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 16, p. 735-743, 1998.

COMPAAN, B.; RUTTINK, T.; ALBRECHT, C.; MEELEY, R.; BISSELING, T.; FRANSSEN, H. Identification and characterization of a *Zea mays* line carrying a transposon-tagged ENOD40. **Biochimica et Biophysica Acta,** Amsterdam, v. 1629, p. 84–91, 2003.

CONSTABEL, C.P.; YIP, L.; RYAN, C.A. Prosystemin from potato, black nightshade, and bell pepper: primary structure and biological activity of predicted systemin polypeptides. **Plant Molecular Biology,** Boston, v. 36, p. 55–62, 1998.

COVEY, P.A.; SUBBAIAH, C.C.; PARSONS, R.L.; PEARCE, G.; LAY, FT.; ANDERSON, M.A.; RYAN, C.A.; BEDINGER, P.A. A pollen-specific RALF from tomato that regulates pollen tube elongation. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 2, p. 703-715, 2010.

DOUGLASS, J.; CIVELLI, O.; HERBERT, E. Polyprotein gene expression: generation of diversity of neuroendocrine peptides. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 53, p. 665-715, 1984.

DONNELLY, P.M.; BONETTA, D; TSUKAYA, H.; DENGLER, R.E.; DENGLER, N.G. Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of Arabidopsis. **Development Biology**, San Diego, v. 215, p. 407-419, 1999.

DODSON, G.; WLODAWER, A. Catalytic triads and their relatives. **Trends in Biochemical Sciences,** Amsterdam, v. 9, p. 347-352, 1998.

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

FELIX, G.; BOLLER, T. Systemin induces rapid ion fluxes and ethylene biosynthesis in Lycopersicon peruvianum cells. **The Plant Journal,** Oxford, v. 7, p. 381–389, 1995.

FIERS, M.; KU, K.L.; LIU, C.M. CLE peptide ligands and their roles in establishing meristems. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 1, p. 39-43, 2007.

GERMAIN, H.; CHEVALIER, E.; CARON, S.; MATTON, D.P. Characterization of five Ralf-like genes from Solanum Chacoense provides support for a developmental role in plants. **Planta**, Berlin, v. 200, p. 447-454, 2005.

HANAI, H.; MATSUNO, T.; YAMAMOTO, M.; MATSUBAYASHI, Y.; KOBAYASHI, T. A secreted peptide growth factor, phytosulfokine, acting as a stimulatory factor of carrot somatic embryo formation. **Plant Cell Physiology,** Tokyo, v. 41, p. 27–32, 2000.

HARUTA, M.; CONSTABEL, C.P. Rapid alkalinization factors in poplar cell cultures. Peptide isolation, cDNA cloning, and differential expression in leaves and methyl jasmonate-treated cells. **Plant Physiology**, London, v. 131, p. 814-823, 2003.

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

HOBE, M.; MULLER, R.; GRUNEWALD ,M.; BRAND, U.; SIMON, R.. Loss of CLE40, a protein functionally equivalent to the stem cell restricting signal CLV3, enhances root waving in Arabidopsis. **Development Genes and Evolution,** Berlin, v. 213, p. 371–381, 2003.

HOLLEY, S.R.; YALAMANCHILI, R.D.; MOURA, D.S.; RYAN, C.A.; STRATMANN, J.W. Convergence of signaling pathways induced by systemin, oligosaccharide elicitors, and ultraviolet-B radiation at the level of mitogen-activated protein kinases in *Lycopersicon peruvianum* suspension-cultured cells. **The Plant Physiology,** London, v. 132, p. 1728–1738, 2003.

HOWE, G.A.; RYAN, C.A. Suppressors of systemin signaling identify genes in the tomato wound response pathway. **Genetics,** Austin, v. 153, p. 1411–1421, 1999.

HUFFAKER, A.; RYAN, C.A. Endogenous peptide defense signals in Arabidopsis differentially amplify signaling for the innate immune response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,** Washington, v. 25, p. 10732-10736, 2007.

HUFFAKER, A.; PEARCE, G.; RYAN, C.A. An endogenous peptide signal in Arabidopsis activates components of the innate immune response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,** Washington, v. 26, p. 10098-10103, 2006.

IGASAKI, T.; AKASHI, N.; UJINO-IHARA, T.; MATSUBAYASHI, Y.; SAKAGAMI, Y.; SHINOHARA, K. Phytosulfokine stimulates somatic embryogenesis in *Cryptomeria japonica*. **The Plant Cell Physiology,** Tokyo, v. 44, p. 1412–1416, 2003.

IKEUCHI, M.; YAMAGUCHI, T.; KAZAMA, T.; ITO, T.; HORIGUCHI, G.; TSUKAYA, H. ROTUNDIFOLIA4 regulates cell proliferation along the body axis in Arabidopsis shoot. **Plant and Cell Physiology,** Kyoto. v. 1, p. 59-69, 2011.

JIANG, L.W.; ROGERS, J.C. Functional analysis of a Golgi-localized Kex2p-like protease in tobacco suspension culture cells. **The Plant Journal**, Oxford, v. 18, p. 23-32, 1999.

JINN, T.L.; STONE, J.M.; WALKER, J.C. An Arabidopsis leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. **Genes & Development,** Cold Spring Harbor, v. 14, p. 108–117, 2000.

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

KINAL, H.; PARK, C.M.; BERRY, J.O.; KOLTIN, Y.; BRUENN, J.A. Processing and secretion of a virally encoded antifungal toxin in transgenic tobacco plants – evidence for a Kex2p pathway in plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 7, p. 677-688, 1995.

KOBAYASHI, T.; EUN, C.; HANAI, H.; MATSUBAYASHI, Y.; SAKAGAMI, Y.; KAMADA, H. Phytosulphokine-a, a peptidyl plant growth factor, stimulates somatic embryogenesis in carrot. **Journal of Experimental Botany,** Oxford, v. 50, p. 1123–1128, 1999.

KONDO, T.; YOKOMINE, K.; NAKAGAWA, A.; SAKAGAMI, Y. Analogs of the CLV3 peptide: synthesis and structure-activity relationships focused on proline residues. **Plant & Cell Physiology,** Tokyo, v. 1, p. 30-36, 2011.

KROL, E.; MENTZEL, T.; CHINCHILLA, D.; BOLLER, T.; FELIX, G.; KEMMERLING, B. Perception of the Arabidopsis danger signal peptide 1 involves the pattern recognition receptor AtPEPR1 and its close homologue AtPEPR2. **The Journal of Biological Chemistry,** Baltimore, v. 285, p. 13471–13479, 2010.

KUROHA ,T.; OKUDA, A.; ARAI, M.; KOMATSU, Y.; SATO, S.; KATO, T.; TABATA, S.; SATOH, S. Identification of Arabidopsis subtilisin-like serine protease specifically expressed in root stele by gene trapping. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 3, p. 281-288, 2009.

LEE, G.I.; HOWE, G.A. The tomato mutant spr1 is defective in systemin perception and the production of a systemic wound signal for defense gene expression. **The Plant Journal,** Oxford, v. 33, p. 567–576, 2003.

LI, L.; LI, C.; HOWE, G.A. Genetic analysis of wound signaling in tomato: evidence for a dual role of jasmonic acid in defense and female fertility. **The Plant Physiology,** London, v. 127, p. 1414–1417, 2001

LIU, J.; SRIVASTAVA, R.; HOWELL, S. Overexpression of an Arabidopsis gene encoding a subtilase (AtSBT5.4) produces a clavata-like phenotype. **Planta**, Berlin, v. 230, p. 687–697, 2009.

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

MATSUBAYASHI, Y.; SAKAGAMI, Y. Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,** Washington, v. 93, p. 7623–7627, 1996.

_____. Peptide hormones in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 649–674, 2006.

MATSUBAYASHI, Y.; OGAWA, M.; MORITA, A.; SAKAGAMI, Y. An LRR receptor kinase involved in perception of a peptide plant hormone, phytosulfokine. **Science**, New York, v. 296, p. 1470–1472, 2002.

MATSUBAYASHI, Y.; TAKAGI, L.; OMURA, N.; MORITA, A.; SAKAGAMI, Y. The endogenous sulfated pentapeptide phytosulfokine-alpha stimulates tracheary element differentiation of isolated mesophyll cells of zinnia. **The Plant Physiology**. London, v. 120, p. 1043–1048, 1999.

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

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

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

MOYEN, C.; HAMMOND-KOSACK, K.E.; JONES, J.; KNIGHT, M.R.; JOHANNES, E. Systemin triggers an increase in cytoplasmic calcium in tomato mesophyll cells: Ca2+ mobilization from intra- and extracellular compartments. **Plant, Cell & Environment,** Oxford, v. 21, p. 1101–1111, 1998.

NARVAEZ-VASQUEZ, J.; FLORIN-CHRISTENSEN, J.; RYAN, C.A. Positional specificity of a phospholipase A activity induced by wounding, systemin, and oligosaccharide elicitors in tomato leaves. **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, p. 2249–2260, 1999.

NARVAEZ-VASQUEZ, J.; PEARCE, G.; OROZCO-CARDENAS, M.L.; FRANCESCHI, V.R.; RYAN, C.A. Autoradiographic and biochemical evidence for the systemic translocation of systemin in tomato plants. **Planta**, Berlin, v. 195, p. 593–600, 1995.

NARITA, N.N.; MOORE, S.; HORIGUCHI, G.; KUBO, M.; DEMURA, T.; FUKUDA, H.; GOODRICH, J.; TSUKAYA, H. Overexpression of a novel small peptide ROTUNDIFOLIA4 decreases cell proliferation and alters leaf shape in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 38, p. 699–713, 2004.

NELSON, B.K.; CAI, X.; NEBENFÜHR, A. A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. **The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology,** Oxford, v. 6, p. 1226-1236, 2007.

NEUTEBOOM, L.W.; VETH-TELLO, L.M.; CLUDESDALE, O.R.; HOOYKAAS, P.J.; van der ZAAL, B.J. A novel subtilisin-like protease gene from *Arabidopsis thaliana* is expressed at sites of lateral root emergence. **DNA Research**, Oxford, v. 6, p. 13-19, 1999.

NI, J.; CLARK, E. Evidence for functional conservation, sufficiency, and proteolytic processing of the CLAVATA3 CLE domain. **The Plant Physiology,** London, v. 140, p. 726-733, 2006.

OHYAMA, K.; SHINOHARA, H.; OGAWA-OHNISHI, M.; MATSUBAYASHI, Y. A glycopeptide regulating stem cell fate in *Arabidopsis thaliana*. **Nature Chemical Biology,** London, v. 5, p. 578–580, 2009.

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

PAPADOPOULOU, K.; ROUSSIS, A.; KATINAKIS, P. Phaseolus ENOD40 is involved in symbiotic and non-symbiotic organogenetic processes: expression during nodule and lateral root development. **Plant Molecular Biology,** Boston, v. 30, p. 403–417, 1996.

PEARCE, G.; MOURA, D.S.; STRATMANN, J.; RYAN, C.A. Production of multiple plant hormones from a single polyprotein precursor. **Nature**, London, v. 411, p. 817-820, 2001a.

_____. RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,** Washington, v. 98, p. 12843-12847, 2001b.

PEARCE, G.; YAMAGUCHI, Y.; MUNSKE, G.; RYAN, A. Sstructure-ativity studies of RALF, Rapid Alkalinization Factor, revel an essencial –YISY– motif. **Peptides**. New York, v. 31, p. 1973-1977, 2010.

POPOVIC, T.; PUIZDAR, V.; BRZIN, J. A novel subtilase from common bean leaves. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 530, p. 163-168, 2002.

RAUTENGARTEN, C.; STEINHAUSER, D.; BUSSIS, D.; STINTZI, A.; SCHALLER, A.; KOPKA, J.; ALTMANN, T. Inferring hypotheses on functional relationships of genes: analysis of the *Arabidopsis thaliana* subtilase gene family. **PLoS Computational Biology**, Göttingen, v. 1, p. 297-312, 2005.

ROCKWELL, N.C.; KRYSAN, D.J.; KOMIYAMA, T.; FULLER, R.S. Precursor processing by kex2/furin proteases. **Chemical Reviews**, Washington, v. 102, p. 4525-4548, 2002.

ROHRIG, H.; JOHN, M.; SCHMIDT, J. Modification of soybean sucrose synthase by Sthiolation with ENOD40 peptide A. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 325, p. 864–870, 2004.

RYAN, C.A. Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology,** Palo Alto, v. 28, p. 425–449, 1990.

RYAN, C.A.; MOURA, D.S. Systemic wound signaling in plants: a new perception. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,** Washington, v. 99, p.6519–6520, 2002.

RYAN, C.A.; PEARCE, G. SYSTEMIN: a polypeptide signal for plant defensive genes. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 14, p. 1-17, 1998.

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

SABLOWSKI, R. Flowering and determinacy in Arabidopsis**. Journal of Experimental Botany,**Oxford, v. 58, p. 899–907, 2007.

SCHALLER, A.; OECKING, C. Modulation of plasma membrane H+-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, p. 263–272, 1999.

SCHALLER, A.; RYAN, C.A. Identification of a 50-kDa Systemin-binding protein in tomato plasma membranes having Kex-2p-like properties. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,** Washington, v. 91, p. 11802-11806, 1994.

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

SRIVASTAVA, R.; LIU, J.; HOWELL, S.H. Proteolytic processing of a presursor protein for a growth-promoting peptide by a subtilisin serine protease in Arabidopsis. **The Plant Journal**. Oxford, v. 56, p. 219-227, 2008.

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

STENVIK, G.E.; TANDSTAD, N.M.; GUO, Y.; SHI, C.L.; KRISTIANSEN, W.; HOLMGREN, A.; CLARK, S.E.; AALEN, R.B.; BUTENKO, M.A. 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**, Rockville, v. 7, p. 1805-1817, 2008.

STENZEL, I.; HAUSE, B.; MAUCHER, H.; PITZSCHKE, A.; MIERSCH, O. Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle-specific generation of jasmonates in tomato-amplification in wound signalling. **The Plant Journal**, Oxford, v. 33, p. 577–589, 2003.

STRATMANN, J.W. Long distance run in the wound response–jasmonic acid is pulling ahead. **Trends in Plant Science,** Killington, v. 8, p. 247–50, 2003.

SUZUKI, G.; KAI N HIROSE, T.; FUKUI, K.; NISHIO, T. Genomic organization of the S locus: identification and characterization of genes in SLG/SRK region of S(9) haplotype of *Brassica campestris* (syn. rapa). **Genetics,** Austin, v. 153, p. 391–400, 1999.

TAKAYAMA, S.; SHIBA, H.; IWANO, M.; SHIMOSATO, H.; CHE, F.S. The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,** Washington, v. 97, p. 1920–1925, 2000.

TAKAYAMA, S.; SHIMOSATO, H.; SHIBA, H.; FUNATO, M.; CHE, F.S. Direct ligand-receptor complex interaction controls Brassica self-incompatibility. **Nature**, London, v. 413, p. 534–538, 2001.

VANOOSTHUYSE, V.; MIEGE, C.; DUMAS, C.; COCK, J.M. Two large *Arabidopsis thaliana* gene families are homologous to the Brassica gene superfamily that encodes pollen coat proteins and the male component of the self-incompatibility response. **Plant Molecular Biology,** Boston, v. 46, p. 17–34, 2001.

WEN, J.; LEASE, K.A.; WALKER, J.C. DVL: a novel class of small polypeptides: overexpression alters Arabidopsis development. **The Plant Journal,** Oxford, v. 37, p. 668–677, 2004.

WHEATLEY, J.L.; HOLYOAK, T.; Differential P1 arginine and lysine recognition in the prototypical proprotein convertase Kex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,** Washington, v. 104, p. 6626-6631, 2007.

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

YAMAGUCHI, Y.; PEARCE, G.; RYAN, C.A. The cell surface leucine-rich repeat receptor for AtPep1, an endogenous peptide elicitor in Arabidopsis, is functional in transgenic tobacco cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,** Washington, v. 26, p. 10104-10109, 2006.

YAMAKAWA, S.; MATSUBAYASHI, Y.; SAKAGAMI, Y.; KAMADA, H.; SATOH, S. Promotive effects of the peptidyl plant growth factor, phytosulfokine-alpha, on the growth and chlorophyll content of Arabidopsis seedlings under high night-time temperature conditions**. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 63, p. 2240–2243, 1999.

YAMAKAWA, S.; SAKURAI, C.; MATSUBAYASHI, Y.; SAKAGAMI, Y.; KAMADA, H.; SATOH, S. The promotive effects of a peptidyl plant growth factor, phytosulfokine, on the formation of adventitious roots and expression of a gene for a root-specific cystatin in cucumber hypocotyls. **Journal of Plant Research,** Tokyo, v. 111, p. 453–458, 1998.

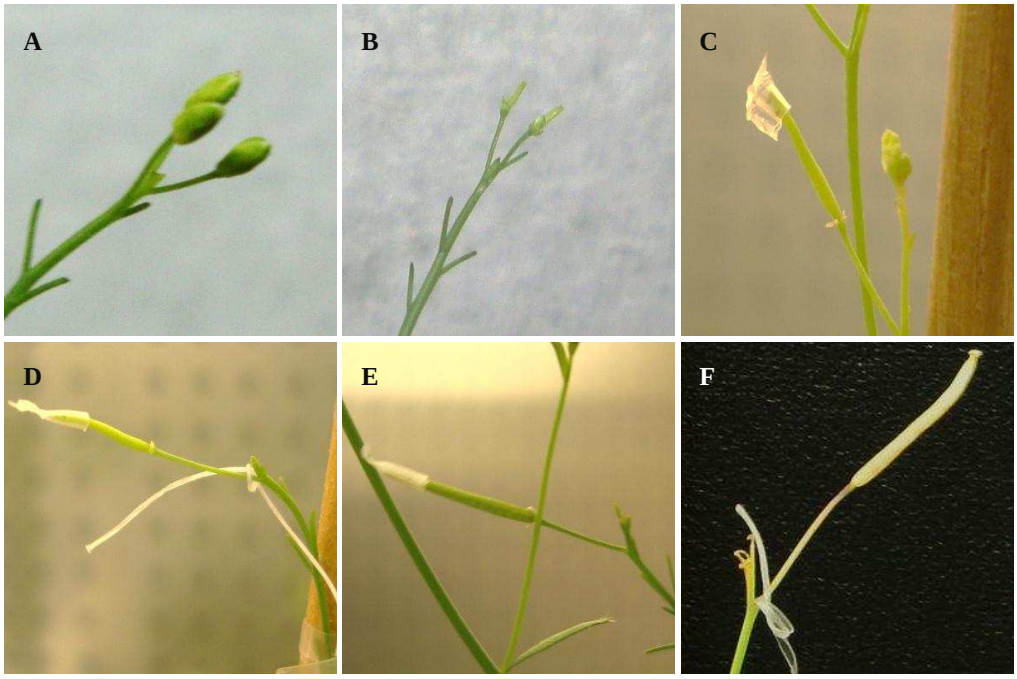
YANG, H.; MATSUBAYASHI, Y.; NAKAMURA, K.; SAKAGAMI, Y. *Oryza sativa* PSK gene encodes a precursor of phytosulfokine-alpha, a sulfated peptide growth factor found in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,** Washington, v. 96, p. 13560–13565, 1999.

_____. Diversity of Arabidopsis genes encoding precursors for phytosulfokine, a peptide growth factor. **The Plant Physiology,** London, v. 127, p. 842–51, 2001.

ZIPFEL, C. Early molecular events in PAMP-triggered immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, p. 414-420, 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Hibridação. (A) Seleção do botão floral. (B) Emasculação. (C) Inserção da microponteira contendo pólen maturo. (D) Desenvolvimento da sílica. (E) Formação de sementes. (F) Maturação da sílica



APÊNDICE B - Fenótipo das subtilases fusionadas a proteína repórter GFP

35S:AtSBT2.6:GFP

35S:AtSBT5.3:GFP

35S:AtSBT4.12:GFP

35S:AtSBT1.8:GFP

35S: AtSBT1.7 :GFP

35S: AtSBT1.4:GFP

35S:AtSBT6.1:GFP

APÊNDICE C - Sequência de iniciadores e terminadores utilizados para análise de expressão das subtilases em linhagens nocaute ou de baixa expressão

qPCR-At2g04160 F	*GTGTTTATGTCGCGGTGAAG*
qPCR-At2g04160 R	*CCACAATGGGACTTCTCACA*
qPCR-At2g05920 F	*CGTTTAAAAGCGTGGGAGAG*
qPCR-At2g05920 R	*ATGCAACGGGACTTCTCACT*
qPCR-At3g14067 F	*AAGGAGAAGAGCGTGTTGGA*
qPCR-At3g14067 R	*TGTTCACCGTCTGTCCATTC*
qPCR-At4g30020 F	*AATCGCCATCGAAGTGAGTC*
qPCR-At4g30020 R	*CCTCGGCTTCCTTTCAATGT*
qPCR-At5g19660 F	*TACCCGGTTATCATGGCATT*
qPCR-At5g19660 R	*ATTGAAAAGGCCTCCCAGAG*
qPCR-At5g59090 F	*TAGCATCAAGGTCACGCCTA*
qPCR-At5g59090 F	*ATGGGTACCGTCAGACCAAA*
qPCR-At5g67360 F	*CAGGAGTCAAGATTTCGGTTG*
qPCR-At5g67360 R	*CCCATCCGACCATTCAATAC*