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

**A inibição do crescimento radicular pelo peptídeo hormonal
AtRALF1 é dependente da interação com a proteína AtCML38, uma
proteína secretada semelhante a calmodulina**

Wellington Ferreira Campos

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

**Piracicaba
2013**

Wellington Ferreira Campos
Bacharelado em Ciências Biológicas

A inibição do crescimento radicular pelo peptídeo hormonal AtRALF1 é dependente da interação com a proteína AtCML38, uma proteína secretada semelhante a calmodulina

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

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

Piracicaba
2013

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

Campos, Wellington Ferreira

A inibição do crescimento radicular pelo peptídeo hormonal AtRALF1 é dependente da interação com a proteína AtCML38, uma proteína secretada semelhante a calmodulina / Wellington Ferreira Campos.- - Piracicaba, 2013.
104 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Peptídeo hormonal 2. RALF 3. CML 4. Via secretória 5. Inibição do crescimento radicular I. Título

CDD 581.192456
C198i

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

Dedicatória

***Dedico aos meus pais, Valdemir e Irene, a
minha família, aos amigos e mestres.***

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Daniel Scherer de Moura, pela orientação, aprendizado e crescimento profissional;

Ao Prof. Dr. Marcio de Castro Silva Filho, pela fundamental disponibilização do seu laboratório para realização deste trabalho;

Ao CNPq e ESALQ/USP, pela bolsa concedida e infraestrutura disponibilizada;

Ao Rafael Colombi, Antônio Amaral, Valentina de Fátima, pelo apoio técnico no desenvolvimento da tese;

Ao Dr. Chris Hawes, por gentilmente ceder o plasmídeo STtmd-mRFP;

Aos meus sábios pais, Valdemir Campos e Irene Campos, e aos falecidos avós (Marta e Pedro), pela confiança e apoio fundamentais, e por depositarem em mim todo seu amor e educação acadêmica que pouco tiveram;

À minha família como um todo, simplesmente pelo fato de existirem e fazerem parte da minha vida, tornando-a mais importante e significativa;

Aos inseparáveis amigos(as): Davi Suisso, Mário Luiz, Leandro de Matos, Nelson Barbosa, Alan Branco, Valéria Marques, Juliana Ferreira, Carlos Eduardo, Thiago Freitas, Paulo, Charles Campos, pelo companheirismo, compreensão, ensinamento e inúmeros momentos de alegria;

Aos meus amigos(as) conquistados durante o doutorado Enéas Konzen, Juan Abad, Ezio Nalin, Eustorgio Jaen, Dennis Goss, Onildo Nunes, Carlos Batista, Renata Dias, Paulo Ceciliato, Keini Dressano, Geraldo Silva pelo companheirismo, ensinamentos, alegrias e apoio. Em especial, ao Enéas e Juan por serem excelentes amigos e homens de honra;

À Carolina Grando, que encontrei no final da caminhada do doutorado e que marcou o início de uma nova etapa pessoal. Com seu carinho e humanidade singulares, ela veio para completar e adicionar na minha vida;

Aos colegas do Lab. Biol. Mol. de Plantas: Juliana Matos, Marcela Joaquim, Larissa Spoladore, Luíza, Christine Petrina, Celso Fiori, Flávia Franco, Poliene Costa, Elaine Castelhana, Fabiana Mingossi, Thais Paula, Williane Garcia, Marcos Araújo, Lucas Lopes, Aline Borges, Ricardo Augusto, Marcelo Brandão, Horacio Montenegro, pela agradável e divertida convivência, regada com apoio e discussões científicas;

Aos colegas do Lab. de Bioquímica de Proteínas: Amanda Morato, Bianca Ribeiro, Tábata Bergonci, Lucas Claus, Fausto Andrés, Marina Soriano, pela paciência, cumplicidade, apoio, ajuda, discussões científicas e diversos momentos de diversão. Assim como os colegas do LBMP, vocês também contribuíram para o meu amadurecimento pessoal, formação acadêmica, científica e profissional;

À todos os funcionários, colegas e professores que, embora não citados, não deixaram de ser importantes para minha formação e para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

“Só há duas opções nesta vida: se resignar ou se indignar. E eu não vou me resignar nunca.”

Darcy Ribeiro

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Peptídeos hormonais.....	17
2.2 Peptídeo hormonal RALF.....	17
2.2.1 Estrutura primária e localização sub-celular do peptídeo RALF.....	19
2.2.2 Atividades biológicas e transdução de sinais do peptídeo RALF.....	21
2.3 Proteínas semelhantes a calmodulina (CML).....	23
2.3.1 Sinalização e percepção de Ca^{2+}	23
2.3.2 Expressão gênica e alvos das CaMs.....	25
2.3.3 Localização sub-celular de CaMs e CMLs.....	27
2.3.4 CMLs associadas com respostas biológicas.....	28
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Material vegetal e condições de crescimento.....	33
3.2 Análises <i>in silico</i>	33
3.3 Extração de DNA genômico de <i>Arabidopsis</i>	34
3.4 Extração de RNA total, tratamento com DNase I e síntese de cDNA.....	35
3.5 Extração e purificação de DNA plasmidial de <i>Escherichia coli</i>	36
3.5.1 Purificação de plasmídeo usando Kit QIAGEN.....	36
3.5.2 Purificação de plasmídeo usando lise alcalina.....	37
3.6 Digestão e purificação de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose.....	37
3.7 Clonagens.....	38
3.8 Transformação de <i>E. coli</i>	38
3.8.1 Preparação de células eletrocompetentes de <i>E. coli</i>	38
3.8.2 Eletroporação de <i>E. coli</i>	39
3.9 Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	39
3.9.1 Preparação de células eletrocompetentes de <i>A. tumefaciens</i>	39
3.9.2 Eletroporação de <i>A. tumefaciens</i>	40
3.10 Localização sub-celular e ensaios de BiFC em folhas de <i>N. benthamiana</i>	40
3.11 Microscopia confocal.....	42
3.12 Expressão e purificação de proteínas fusionadas a GST.....	42

3.13 Expressão e purificação do peptídeo HisAtRALF1 recombinante.....	43
3.14 Ensaios de interação <i>in vitro</i> (GST Pull-Down).....	44
3.15 Purificação do peptídeo AtRALF1 maduro de plantas transgênicas.....	45
3.16 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	45
3.17 Imunodetecção (<i>Western Blot</i>).....	46
3.18 Ensaio de inibição de crescimento de raiz e do alongamento do hipocótilo.....	46
3.19 Tratamento com o peptídeo HisAtRALF1 para análise de expressão gênica.....	47
3.20 Transformação estável de <i>Arabidopsis</i>	48
3.21 Hibridação.....	48
4 RESULTADOS.....	51
4.1 <i>AtRALF1</i> e <i>AtCML38</i> são co-expressos em raízes de <i>Arabidopsis</i>	51
4.2 Localização sub-celular da proteína AtCML38.....	52
4.3 AtCML38 interage com o peptídeo AtRALF1 <i>in planta</i> e <i>in vitro</i>	58
4.4 O mutante T-DNA <i>cml38</i> é insensível ao peptídeo HisAtRALF1	62
4.5 AtCML38 é essencial para a inibição do crescimento radicular causado pelo peptídeo AtRALF1.....	67
4.6 <i>AtCML38</i> é induzido pelo peptídeo HisAtRALF1	74
5 DISCUSSÃO.....	77
6 CONCLUSÕES.....	83
REFERÊNCIAS.....	85
ANEXOS.....	97

RESUMO

A inibição do crescimento radicular pelo peptídeo hormonal AtRALF1 é dependente da interação com a proteína AtCML38, uma proteína secretada semelhante a calmodulina

O fator de alcalinização rápida ou RALF (do inglês, *Rapid Alkalinization Factor*) é um peptídeo hormonal ubíquo que induz a atividade de uma MAP quinase, bem como um aumento rápido do pH extracelular do meio de cultura de células em suspensão. O AtRALF1, uma das 37 isoformas de RALF presentes em *Arabidopsis thaliana*, é um peptídeo secretado de 5 kDa, que inibe o crescimento radicular e causa uma rápida mobilização de Ca^{2+} extra e intracelular. Em células eucarióticas, calmodulinas são proteínas bem caracterizadas por mediar a transdução de sinais de Ca^{2+} intracelular. Entretanto, em várias espécies vegetais incluindo *Arabidopsis*, também existem relatos de calmodulinas secretadas com funções ainda desconhecidas. Neste trabalho, foi caracterizada a AtCML38, uma proteína de *Arabidopsis* semelhante a calmodulina e que interage com o peptídeo AtRALF1. Análises *in silico* e por RT-PCR semi-quantitativo mostram a co-expressão de ambos os genes *AtRALF1* e *AtCML38* em raízes de plântulas de *Arabidopsis*. Apesar da ausência de um peptídeo sinal típico na proteína AtCML38, a localização sub-celular demonstra que esta é secretada através da via secretória RE-Golgi. O uso de uma versão truncada da AtCML38, cujos 87 primeiros aminoácidos foram retirados, indicou que o N-terminal é essencial para o seu direcionamento. Por meio de ensaios de complementação fluorescente bimolecular, foi demonstrado que AtCML38 interage com AtRALF1 no apoplasto de folhas de tabaco. Ensaios de *pull-down* indicam que esta interação é específica e dependente de Ca^{2+} e do pH. Um mutante por inserção de T-DNA, que não produz a proteína AtCML38 (*cm138*), mostrou-se insensível ao peptídeo AtRALF1 aplicado exogenamente, e suas raízes cresceram normalmente. Plantas transgênicas de *Arabidopsis* super-expressando o gene *AtRALF1* (35S:AtRALF1) têm um fenótipo semi-anão com pronunciada redução do crescimento radicular. Contudo, quando plantas 35S:AtRALF1 foram cruzadas com o mutante *cm138*, suas progênieis exibiram fenótipo e crescimento radicular normais, apesar do acúmulo do peptídeo AtRALF1. Juntos, os resultados mostram que AtCML38 interage com o peptídeo hormonal AtRALF1, e que a proteína AtCML38 é essencial para inibição do crescimento radicular causado pelo peptídeo.

Palavras-chave: Peptídeo hormonal; RALF; CML; Via secretória; Inibição do crescimento radicular

ABSTRACT

Root growth inhibition by peptide hormone AtRALF1 is dependent of the interaction with the AtCML38, a secreted calmodulin-like protein

Rapid alkalization factor (RALF) is a ubiquitous peptide hormone that induces a MAP kinase and a rapid increase in the pH of the extracellular media of cell suspension cultures. AtRALF1, one of the 37 RALF isoforms of *Arabidopsis thaliana*, is a secreted peptide of 5 kDa that inhibits root growth and causes a rapid mobilization of extra and intracellular Ca^{2+} . In eukaryotic cells, calmodulin proteins are well-characterized to mediate intracellular Ca^{2+} signal transduction. Nevertheless, in several plant species including *Arabidopsis*, there are also reports of calmodulins being secreted with still unknown function. In this work, we characterized the AtCML38, a calmodulin-like protein from *Arabidopsis* as an AtRALF1-interacting protein. Analyses *in silico* and semiquantitative RT-PCR show co-expression of both *AtCML38* and *AtRALF1* genes in roots of *Arabidopsis* seedlings. Despite the fact that AtCML38 lacks a typical signal peptide, subcellular localization demonstrates that AtCML38 is secreted via the ER-Golgi secretory pathway. A truncated AtCML38, without the first 87 amino acids indicates that the N-terminal is essential for targeting. Through bimolecular fluorescence complementation assays, we showed that AtCML38 protein interacts with AtRALF1 in the apoplast of epidermal cells from tobacco leaves. Pull down assays indicate that this interaction is specific, Ca^{2+} - and pH-dependent. A T-DNA insertion mutant defective in the AtCML38 protein (*cml38*) was insensitive to exogenously applied AtRALF1 peptide and their roots grow just as the wild type plants. Transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing the *AtRALF1* gene (35S:AtRALF1) have a semi-dwarf phenotype with a pronounced reduction in the root growth. However, when 35S:AtRALF1 plants are crossed with the mutant *cml38*, their progenies are normal looking and exhibit normal root growth in spite of the high accumulation of AtRALF1 peptide. Taken together, the results show that AtCML38 interacts with the peptide hormone AtRALF1 and that the protein AtCML38 is essential for the root growth inhibition caused by the peptide.

Keywords: Peptide hormone; RALF; CML; Secretory pathway; Root growth inhibition

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento radicular é regulado por diversas moléculas sinalizadoras, incluindo os peptídeos hormonais (MURPHY; SMITH; SMETA, 2012; YAMADA; SAWA, 2013). O peptídeo hormonal RALF (do inglês, *Rapid ALkalinization Factor*) foi primeiramente isolado em tabaco e é encontrado em todo reino vegetal (PEARCE et al., 2001). Este peptídeo atua como regulador do desenvolvimento vegetal por meio de um mecanismo ainda não caracterizado, tendo o papel no alongamento celular sido proposto por diferentes trabalhos (PEARCE et al., 2001; MINGOSSI et al., 2010; COVEY et al., 2010).

De acordo com a última versão do genoma de *Arabidopsis thaliana*, a família gênica *RALF* nesta espécie é composta por 37 genes (LAMESCH et al., 2012). Dentre estes, *AtRALF1* é a única isoforma predominantemente expressa em raízes, fato este comprovado por análise do promotor fusionado a proteína repórter β -glucuronidase (HARUTA et al., 2008). A super-expressão do *AtRALF1* causa forte redução do crescimento radicular (MATOS et al., 2008). Além disso, *AtRALF1* induz o aumento dos níveis de Ca^{2+} citoplasmático por meio de uma rápida mobilização de Ca^{2+} extra e intracelular (HARUTA et al., 2008). Outras evidências indicam que o peptídeo RALF regula negativamente o desenvolvimento vegetal por meio de uma via mediada por receptor (SCHEER; PEARCE; RYAN, 2005; HARUTA et al., 2008).

A via de sinalização e os mecanismos moleculares de ação e de percepção do peptídeo hormonal RALF permanecem desconhecidos. Na busca do complexo receptor de *AtRALF1* ou de proteínas que fazem parte da sua via de sinalização, foi isolado um cDNA que codifica uma proteína semelhante a calmodulina 38 (*Calmodulin-like 38*) de *Arabidopsis* (*AtCML38*), por meio de sistema de duplo-híbrido de levedura.

O objetivo deste trabalho foi investigar o papel da proteína *AtCML38* no mecanismo de ação do peptídeo *AtRALF1*. Especificamente, procurou-se: (a) definir a localização sub-celular da *AtCML38*; (b) determinar a especificidade e condições da interação *AtRALF1*-*AtCML38*; e (c) analisar o papel da *AtCML38* no mecanismo de ação do peptídeo *AtRALF1*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Peptídeos hormonais

O desenvolvimento multicelular vegetal é dependente da comunicação intercelular. Os hormônios auxinas, citocininas, giberelinas, brassinosteróides, etileno e ácido abscísico estão bem estabelecidos como moléculas sinalizadoras, mediando de maneira complexa e intrincada esta comunicação (VERT; CHORY, 2011; PETRICKA; WINTER; BENFEY, 2012; GARAY-ARROYO et al., 2012; PUIG et al., 2012). Os peptídeos hormonais também estão envolvidos nesta comunicação, participando de respostas de defesa, organização meristemática, desenvolvimento de anteras e pólen, auto-incompatibilidade, desenvolvimento de raiz primária e lateral, densidade estomática, desenvolvimento vascular, desenvolvimento nodular e abscisão (MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 2006; MURPHY; SMITH; SMETA, 2012).

A sistemina foi o primeiro peptídeo hormonal descoberto (PEARCE et al., 1991). Este peptídeo de 18 aminoácidos foi isolado inicialmente em folhas de tomate e participa da sinalização em resposta a ferimento. Posteriormente, outros peptídeos hormonais foram descobertos, isolados e caracterizados, dentre eles fitosulfoquinas (MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 1996), CLAVATA3 (FLETCHER et al., 1999), ENOD40 (*Early Nodulin 40*) (VAN DE SANDE et al., 1996), POLARIS (TOPPING; LINDSEY, 1997), SCRs (*Secreted Cys-Rich proteins*) (SCHOPFER; NASRALLAH; NASRALLAH, 1999), RALF (PEARCE et al., 2001), IDA (*Inflorescence Deficient in Abscission*) (BUTENKO et al., 2003), ROTUNDIFOLIA4 (NARITA et al., 2004), Stomagen (SUGANO et al., 2010), e RGF/GLV (Root Growth Factor/GOLVEN) (MATSUZAKI et al., 2010; WHITFORD et al., 2012).

2.2 Peptídeo hormonal RALF

O peptídeo RALF foi primeiramente isolado a partir de extrato foliar de plantas de tabaco, durante a procura por peptídeos envolvidos na resposta contra herbivoria. Seu isolamento se deu usando o ensaio de alcalinização. Neste ensaio, moléculas sinalizadoras interagem potencialmente, com receptores da superfície celular mediando um aumento mensurável no pH do meio de cultura de células em suspensão (PEARCE et al., 2001). Estes autores também mostraram que, em baixa

concentração (< 2 nM), o peptídeo RALF de tabaco causa forte e rápido aumento do pH extracelular de células de tabaco em suspensão. Os mesmos autores também isolaram o peptídeo RALF a partir de extratos de folhas de tomate (*Solanum lycopersicum*) e alfafa (*Medicago sativa*), ambos apresentaram atividade alcalinizadora semelhante ao peptídeo de tabaco.

O cDNA que codifica o peptídeo RALF de tabaco foi isolado por meio de triagem em biblioteca de cDNA de folhas de tabaco (PEARCE et al., 2001). Semelhantemente a outros peptídeos hormonais, tais como sistemina (PEARCE et al., 1991) e fitosulfoquinas (MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 1996), os genes *RALF* não possuem íntrons e codificam um polipeptídeo precursor que necessita ser processado para a liberação de um peptídeo maduro e biologicamente ativo (PEARCE et al., 2001). Detalhes da estrutura primária e do processamento do precursor do peptídeo RALF serão detalhados no tópico 2.2.1.

Análises *in silico* indicam que os genes *RALF* são conservados entre espécies, e seus ortólogos são encontrados ubiquamente no reino vegetal (PEARCE et al., 2001). Neste contexto, os genes *RALF* foram identificados e/ou isolados em diferentes espécies, e em distintas estruturas vegetativas e reprodutivas incluindo raízes e folhas de *Arabidopsis* (PEARCE et al., 2001; MATOS et al., 2008; HARUTA et al., 2008; SRIVASTAVA et al., 2009); raízes de *Nicotiana attenuata* (WU et al., 2007) e *M. truncatula* (COMBIER et al., 2008); folhas do híbrido *Populus trichocarpa* x *Populus deltoide* (HARUTA; CONSTABEL, 2003) e de *Saccharum* spp. (MINGOSSI et al., 2010); flores de *Brassica oleracea* (ZHANG; WU; WANG, 2010) e de *B. campestris* (LI; NIE; CAO, 2011); ovário e óvulo de *S. chacoense* (GERMAIN et al., 2005; CHEVALIER; LOUBERT-HUDON; MATTON, 2013); pólen de *S. lycopersicum* (COVEY et al., 2010), *Arabidopsis* (BECKER et al., 2003), *Primula vulgaris* (MCCUBBIN; LEE; HETRICK, 2006) e *Glycine max* (HAERIZADEH et al., 2009).

O número de genes *RALF* varia amplamente de espécie para espécie. No genoma de *N. attenuata* foi encontrada apenas uma cópia do gene *RALF* (WU et al., 2007). Pelo menos 4 genes *RALF* estão presentes no genoma de álamo (híbrido *P. trichocarpa* x *P. deltoide*), e 2 destes foram isolados bioquimicamente (HARUTA; CONSTABEL, 2003). Recentemente, Cao e Shi (2012) identificaram 23, 16 e 19 genes *RALF*, respectivamente, nos genomas de álamo, arroz e milho. Ortólogos do gene *RALF* também foram encontrados em *Physcomitrella patens* (3 cópias) e

Selaginella moellendorffii (2 cópias) (CAO; SHI, 2012), duas espécies da base da árvore filogenética de plantas.

Quatro cDNAs que codificam precursores do peptídeo RALF foram encontrados em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), sendo 2 destes isolados bioquimicamente (MINGOSSI et al., 2010). A família gênica *RALF* de *S. chacoense* é composta por pelo menos 5 membros (GERMAIN et al., 2005), sendo o membro *ScRALF3* recentemente caracterizado (CHEVALIER; LOUBERT-HUDON; MATTON, 2013). Em *S. lycopersicum*, 5 RALFs foram identificados e apenas um foi caracterizado em pólen (PEARCE et al., 2001; COVEY et al., 2010). O peptídeo MtRALF1 de *M. truncatula* é membro de uma família multigênica composta por 40 membros (SILVERSTEIN et al., 2007; COMBIER et al., 2008).

Em *Arabidopsis*, a família *RALF* é constituída de 37 genes distribuídos em todos os 5 cromossomos do gênero (LAMESCH et al., 2012; CAO; SHI, 2012). Cao e Shi (2012) sugerem que mecanismos de duplicação em *tandem* tiveram papel dominante na expansão da família gênica *RALF* de *Arabidopsis*. Dentro desta família, um sub-grupo de 9 genes *RALF* (AtRALF1, 4, 19, 22, 23, 24, 31, 33 e 34) possuem alta identidade de sequência de aminoácidos com o peptídeo originalmente isolado de tabaco (RYAN et al., 2002). Dentre estes 9 genes, a isoforma AtRALF1 é a única predominantemente expressa em raízes de *Arabidopsis* (HARUTA et al., 2008).

2.2.1 Estrutura primária e localização sub-celular do peptídeo RALF

O gene *RALF* de tabaco codifica um prepropeptídeo (preproRALF) de 115 aminoácidos, o qual inclui, na extremidade N-terminal, um peptídeo sinal típico de uma proteína secretada (PEARCE et al., 2001). Uma representação esquemática do preproAtRALF1 pode ser vista no Anexo B. Cao e Shi (2012) também demonstraram, por predição *in silico* que os peptídeos RALF estão localizados no apoplasto predominantemente.

A localização sub-celular do peptídeo RALF foi determinada experimentalmente em folhas de *N. benthamiana*. cDNAs sintetizados a partir de RNA extraído de raízes de *N. benthamiana* foram fusionados aleatoriamente à proteína de fluorescência verde (GFP) e, por meio de um sistema de transformação viral, a localização sub-celular foi analisada em folhas de tabaco. Quatro dias após a

infecção viral, a proteína quimérica contendo o cDNA do gene RALF fusionado a GFP foi detectada no retículo endoplasmático (RE). Após 5 dias a fluorescência foi detectada no RE e no apoplasto, e, passados mais 2 dias, apenas no apoplasto (ESCOBAR et al., 2003).

Os últimos 49 aminoácidos do preproRALF de tabaco correspondem ao peptídeo maduro e ativo, cujo peso molecular é 5332 Da (PEARCE et al., 2001). Na estrutura primária do preproAtRALF1 (ANEXO B), antes do peptídeo maduro, há um sítio dibásico (Arg68-Arg69) essencial para o seu processamento (MATOS et al., 2008). Plantas transgênicas de *Arabidopsis* super-expressando o gene *AtRALF1* apresentam um fenótipo semi-anão e uma redução no crescimento radicular. Uma das evidências da importância do sítio dibásico para o processamento, foi a não obtenção do fenótipo semi-anão em plantas super-expressando o preproAtRALF1 contendo uma substituição do aminoácido Arg69 por Ala (MATOS et al., 2008). De forma análoga, a substituição de 2 argininas por 2 glicinas do sítio dibásico do preproAtRALF23 também não acarretou no fenótipo semi-anão quando super-expresso (SRIVASTAVA et al., 2009). Estes autores também mostraram que a serino protease AtS1P semelhante a subtilase é responsável pelo processamento do preproAtRALF23.

O peptídeo RALF maduro de tabaco apresenta 4 resíduos de cisteína que estão envolvidos com a formação de 2 pontes dissulfeto (Cys84-Cys94 e Cys107-Cys113) essenciais para sua atividade (PEARCE et al., 2001). As duas pontes dissulfeto presentes no peptídeo AtRALF1 maduro estão indicadas no Anexo B. Pearce et al. (2010) fizeram um estudo de estrutura-atividade usando o peptídeo RALF maduro de *S. lycopersicum* (SIRALF). As versões truncadas SIRALF(1-16) e SIRALF(17-49), individualmente ou combinadas, não alcalinizam o meio de cultura de suspensões celulares de *S. lycopersicum*. A adição de 4 aminoácidos ao peptídeo truncado RALF(17-49) mostrou que o domínio YISY é essencial para atividade alcalinizadora. A substituição da isoleucina deste domínio por uma alanina (I6A), e a deleção de uma leucina na posição 11, promoveram uma redução da atividade de alcalinização. Os peptídeos SIRALF truncados não inibiram o crescimento radicular de plântulas de tomate, indicando que estes aminoácidos são essenciais para a atividade inibitória do peptídeo RALF.

2.2.2 Atividades biológicas e transdução de sinais do peptídeo RALF

A alcalinização do meio extracelular de suspensões celulares de tabaco foi uma das primeiras atividades biológicas relatadas para o peptídeo RALF. Caracteristicamente, a alcalinização se deu de maneira forte (incremento acima de 1 unidade de pH) e rápida (5 minutos). A atividade de uma proteína quinase ativada por mitógeno (*MAP kinase*) também foi induzida de forma rápida em células em suspensão de tabaco após o tratamento com o peptídeo RALF (PEARCE et al., 2001).

Respostas de alcalinização têm sido relacionadas às respostas de defesa vegetal (BOLWELL, 1995). Todavia, RALF não induz a síntese de proteínas de defesa como os inibidores de proteases de folhas de tabaco (PEARCE et al., 2001). Sua atividade alcalinizadora é mais rápida do que a induzida por moléculas associadas com defesa, tais como flg22, sistemina ou quitosana (PEARCE et al., 2001; HARUTA; CONSTABEL, 2003).

O aumento de pH do meio de cultura em resposta ao peptídeo sistemina é uma resposta mediada por receptor, que resulta da inibição de uma H⁺-ATPase de membrana (MEINDL; BOLLER; FELIX, 1998; STRATMANN; SCHEER; RYAN, 2000). Embora esta relação ainda não tenha sido estabelecida para o peptídeo RALF, na superfície de células de *S. lycopersicum* o peptídeo SIRALF interagiu especificamente com duas proteínas integrais de membrana, uma de 25 kDa e outra de 120 kDa. Possivelmente, estas proteínas fazem parte de um complexo receptor ligado à percepção e transdução de sinais deste peptídeo (SCHEER; PEARCE; RYAN, 2005).

Silverstein et al. (2007) mostraram que o peptídeo RALF pode ter papel importante na formação de nódulos em leguminosas. A isoforma *MtRALF1* de *M. truncatula* é regulada por fatores Nod, o que sugere sua participação na formação de nódulos nas etapas iniciais da interação entre *M. truncatula* e *Sinorhizobium meliloti*. Além disso, plantas transgênicas de *M. truncatula* super-expressando *MtRALF1* possuem menor número de nódulos, sendo os poucos nódulos formados pequenos, estruturalmente anormais e com pobre colonização por rizóbios (COMBIER et al., 2008).

Pouco se sabe sobre a relação do RALF com outros hormônios vegetais. O gene *AtRALF23* foi reprimido em plântulas de *Arabidopsis* tratadas com

brassinosteróide (BR), hormônio este envolvido com a expansão celular (SRIVASTAVA et al., 2009; YANG et al., 2011). Os hormônios auxina e citocinina não alteraram o nível de expressão dos genes *PtdRALF1* e *PtdRALF2* em suspensões celulares de álamo (híbrido *P. trichocarpa* x *P. deltoide*). Entretanto, ambos foram reprimidos na presença de metil-jasmonato, especialmente *PtdRALF2* (HARUTA; CONSTABEL, 2003). Diferentemente de álamo, auxina induziu a expressão de *ScRALF3* em ovários de *S. chacoense* (CHEVALIER; LOUBERT-HUDON; MATTON, 2013).

As evidências indicam o envolvimento do peptídeo RALF na regulação do crescimento e desenvolvimento radicular. O peptídeo RALF de tabaco inibiu o crescimento radicular de plântulas de tomate e de *Arabidopsis* quando aplicado exogenamente (PEARCE et al., 2001). Plantas transgênicas de *Arabidopsis* super-expressando os peptídeos AtRALF1 e AtRALF23 mostraram um fenótipo semi-anão com redução no crescimento radicular e foliar (MATOS et al., 2008; SRIVASTAVA et al., 2009). O silenciamento da única cópia do gene *RALF* em *N. attenuata* causou o aumento do comprimento radicular, da zona de alongamento da raiz, reduziu o número e o comprimento dos pelos radiculares, como também afetou a capacidade de regulação do pH no apoplasto (WU et al., 2007).

No nível celular, os peptídeos RALF estão envolvidos em processos de expansão celular. Os peptídeos SacRALF de cana-de-açúcar, particularmente o SacRALF1, regulam a expansão celular de raízes e de folhas. A expressão gênica de *SacRALF1* se dá preferencialmente na zona de alongamento da raiz, tendo baixa expressão na zona meristemática. O peptídeo SacRALF1 maduro inibiu o alongamento de células derivadas de microcalo de cana-de-açúcar cultivadas em suspensão e reduziu o alongamento do hipocótilo de plântulas de *Arabidopsis* crescidas no escuro (MINGOSSÍ et al., 2010). Suportando a proposta do envolvimento do peptídeo RALF na regulação do alongamento celular, Covey et al. (2010) também demonstraram que o peptídeo SIPRALF, uma isoforma específica de pólen de tomate (*S. lycopersicum*), atua como regulador negativo do alongamento do tubo polínico.

Zhang, Wu e Wang (2010) identificaram em flores de *B. oleracea* o peptídeo BoRALF1, cujo gene foi expresso apenas em anteras maduras, especificamente em grãos de pólen, sugerindo um possível papel no desenvolvimento de anteras ou pólen. Recentemente, foi mostrado que a isoforma ScRALF3 tem papel importante

na regulação do desenvolvimento do gametófito feminino. Plantas transgênicas com o gene *ScRALF3* silenciado produzem frutos pequenos com poucas sementes (CHEVALIER; LOUBERT-HUDON; MATTON, 2013). Os autores sugerem que *ScRALF3* atua regulando, ou pelo menos em parte, a arquitetura do saco embrionário.

O cálcio (Ca^{2+}) atua como mensageiro secundário em diferentes aspectos do desenvolvimento vegetal e de diversos processos regulatórios, tais como estresses abióticos, hormônios e patógenos (KUDLA; BATISTIC; HASHIMOTO, 2010; BOUDSOCQ et al., 2010). Na raiz, o alongamento celular requer um influxo de Ca^{2+} do estoque extracelular (CRAMER; JONES, 1996). Haruta et al. (2008) mostraram que o peptídeo *AtRALF1* provoca de maneira rápida, saturável e específica, um aumento de Ca^{2+} no citoplasma de células da raiz de *Arabidopsis*. O Ca^{2+} é mobilizado a partir de estoques extra e intracelulares.

2.3 Proteínas semelhantes a calmodulina (CML)

2.3.1 Sinalização e percepção de Ca^{2+}

O cálcio é um importante mensageiro secundário e atua como modulador de diversas cascatas de sinalização em eucariotos. Seu papel como sinalizador vem sendo intensamente investigado tanto em plantas quanto em animais (BOUCHÉ et al., 2005; BOUDSOCQ et al., 2010). Este íon bivalente é um macro-nutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento vegetal (WHITE; BROADLEY, 2003; HELPER, 2005). Nas plantas, o Ca^{2+} é transportado pelo apoplasto. A transpiração impulsiona o seu transporte através do xilema da raiz para a parte aérea, onde é descarregado na folha e distribuído no meio extracelular. Dentro do apoplasto, a maioria do Ca^{2+} liga-se as cargas negativas dos grupos carboxílicos dos ácidos galacturônicos (pectinas) e oxalatos (WHITE, 2001; SATTELMACHER, 2001), com o Ca^{2+} residual permanecendo livre no apoplasto para atuar como sinalizador (HIRSCHI, 2004).

Altos níveis de Ca^{2+} intracelular são prejudiciais para a célula, uma vez que este íon pode se precipitar com o fosfato inorgânico e afetar o sistema de energia baseado em fosfato. Consequentemente, Ca^{2+} é constantemente bombeado do citosol para o meio extracelular ou para compartimentos intracelulares (RE e

vacúolo) para manter baixo os níveis de Ca^{2+} ($\sim 10^{-7}$ M) no interior celular (CHIN; MEANS, 2000). O transportador de Ca^{2+} CAX1 ($\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -antiporter), cujo gene preferencialmente se expressa em folhas, atua como regulador da concentração de Ca^{2+} no apoplasto, por meio da sua compartimentalização no vacúolo de células do mesófilo. A perda desta regulação resultou na redução da extensibilidade da parede celular, da abertura estomática, da transpiração, da assimilação de CO_2 e da taxa de crescimento foliar (CONN et al., 2011). Posteriormente, foi demonstrado que CAX1 e CAX3, também contribuem para a regulação do pH no apoplasto (CHO et al., 2012).

Como mensageiro secundário, o Ca^{2+} está envolvido em diversas respostas de plantas a estímulos bióticos e abióticos, incluindo interações planta-microorganismo, hormônios, temperatura, toque, seca, salinidade, luminosidade, frio, calor, estresse oxidativo, radiação solar e processos relacionados ao desenvolvimento (SANDERS; BROWNLEE; HARPER, 1999; BOUCHÉ et al., 2005; KUDLA; BATISTIC; HASHIMOTO, 2010). Geralmente as respostas que empregam o Ca^{2+} como mensageiro secundário são investigadas em sistemas de apenas uma célula, tais como células-guarda, tubo polínico ou pelo radicular. Porém, a resposta final da planta ao estímulo manifesta-se pela regulação de complexos processos em distintos tecidos e órgãos (KUDLA; BATISTIC; HASHIMOTO, 2010).

Os estímulos induzem a mobilização do Ca^{2+} estocado, resultando num localizado, rápido e dramático aumento de Ca^{2+} intracelular, caracterizando uma onda de Ca^{2+} . A propagação espaço-temporal dos sinais de Ca^{2+} , como também a frequência da onda, são elementos da informação contida nestes sinais, que precisam ser decodificadas pela maquinaria celular para permitir que a planta responda adequadamente (BOUCHÉ et al., 2005). Diferentes estímulos disparam respostas diferentes e apropriadas, que usam o mesmo Ca^{2+} como mensageiro secundário. Desta forma, a maquinaria celular responsável pela transdução de sinais necessita identificar com precisão as alterações de concentração de Ca^{2+} causada por cada estímulo. Neste sentido, um importante parâmetro que define a especificidade do sinal de Ca^{2+} é denominado “assinatura de Ca^{2+} ”, que se refere à frequência, amplitude e domínio do Ca^{2+} (MCAINSH; PITTMAN, 2009).

Existem proteínas que atuam como “sensores” de Ca^{2+} e adicionam mais um nível de especificidade as “assinaturas de Ca^{2+} ”. O Ca^{2+} se liga a estas proteínas que, por sua vez, podem interagir com seu alvo e propagar o sinal de Ca^{2+} para determinar uma resposta celular apropriada ao estímulo inicial (DAY et al., 2002;

YANG; POOVAIAH, 2003; BOUCHÉ et al., 2005; DODD; KUDLA; SANDERS, 2010). Tais proteínas são constituídas por 2 pares de estruturas globulares, cada um com 2 sítios de ligação ao Ca^{2+} . O sítio é composto de duas α -hélices, chamadas de hélices E e F, que flanqueiam um íon de Ca^{2+} por meio de uma volta. A estrutura de duas hélices conectadas por uma volta lembra os dedos polegar e indicador de uma mão humana, por isso o nome mão-EF, do inglês *EF-hand*, para o domínio de ligação ao Ca^{2+} (CHIN; MEANS, 2000; MCCORMACK; TSAI; BRAAM, 2005; CLAPHAM, 2007).

Ao todo, foram identificados 250 e 243 genes que codificam proteínas com o domínio *EF-hand* em *Arabidopsis* e *Oryza sativa* respectivamente (DAY et al., 2002; BOONBURAPONG; BUABOOCHA, 2007). A calmodulina (CaM) é uma classe de proteínas que se ligam ao Ca^{2+} e é ubíqua entre os eucariotos, sendo altamente conservada entre plantas e animais (YANG; POOVAIAH, 2003; CLAPHAM, 2007) e também é essencial para diversos processos celulares (CHIN; MEANS, 2000; PEROCHON et al., 2011). Além disso, as CaMs não possuem atividade enzimática e sua função reside, em parte, na habilidade de se ligar ao Ca^{2+} , alterando conformacionalmente sua estrutura para possibilitar a interação e, conseqüentemente, a modulação do(s) seu(s) alvo(s) (CHIN; MEANS, 2000; MCCORMACK; TSAI; BRAAM, 2005; DODD; KUDLA; SANDERS, 2010; PEROCHON et al., 2011).

Evidências experimentais demonstram a funcionalidade dos domínios *EF-hand* preditos nas proteínas AtCML8 (PARK et al., 2010), AtCML9 (KOHLER; NEUHAUS, 2000), AtCML3, AtCML30 (CHIGRI et al., 2012), AtCML24 (DELK et al., 2005), AtCML37, AtCML38, AtCML39 (VANDERBELD; SNEDDEN, 2007), AtCML42, AtCML43 (CHIASSEON et al., 2005), OsMSR2 (XU et al., 2011), além de outras 3 OsCaM e 8 OsCML de arroz (CHINPONGPANICH et al., 2011).

2.3.2 Expressão gênica e alvos das CaMs

Os genes *CaM* de *Arabidopsis* codificam proteínas com 149 aminoácidos que apresentam 4 domínios *EF-hand* e cujas estruturas primárias são ricas em resíduos de metionina (MCCORMACK; BRAAM, 2003). Cada domínio é composto por 12 resíduos de aminoácidos, que formam uma estrutura para a ligação do Ca^{2+} . Esta estrutura é conservada e apresenta sempre um resíduo de cisteína na posição 27 no

primeiro domínio *EF-hand*, e um resíduo de lisina na posição 116 entre os *EF-hands* 3 e 4. Considerando estas características, a família gênica *CaM* de *Arabidopsis* é composta por 7 *loci*, que codificam 3 isoformas verdadeiras (MCCORMACK; BRAAM, 2003; MCCORMACK; TSAI; BRAAM, 2005) enquanto a família *CaM* de arroz possui 5 membros (BOONBURAPONG; BUABOOCHA, 2007).

Um aspecto curioso na sinalização por Ca^{2+} é a extensão da família gênica *CaM* para um grande número de proteínas semelhantes a *CaM* (*CML*, *calmodulin-like*) encontradas exclusivamente no reino vegetal (BOUCHÉ et al., 2005). Cinquenta genes compõem a família *CML* de *Arabidopsis*, e apenas 13 destes apresentam íntrons. As *CMLs* possuem de 83 a 330 aminoácidos, são compostas quase que inteiramente por domínios *EF-hand*, no mínimo 2, e não possuem outros domínios funcionais evidentes. As *CMLs* apresentam pelo menos 16% de similaridade de aminoácidos com uma proteína *CaM* padrão (MCCORMACK; BRAAM, 2003). A família gênica *CML* de arroz é constituída por 32 genes (BOONBURAPONG; BUABOOCHA, 2007).

Um mapeamento da expressão gênica de 7 *CaMs* e 42 *CMLs* durante o desenvolvimento de *Arabidopsis* indica que os transcritos *CaM* podem ser encontrados em todos os órgãos da planta. Por outro lado, apenas 13 *CMLs* se expressam em múltiplos órgãos, enquanto duas *CMLs* são altamente expressas em células cultivadas em suspensão, 11 são exclusivas de órgãos florais, 10 mostram alta expressão em folhas, cotilédones e sépalas, e outras 10 têm expressão localizada na raiz. Isto sugere a participação das *CMLs* na regulação de vários processos relacionados ao desenvolvimento de *Arabidopsis* (MCCORMACK; TSAI; BRAAM, 2005; BOUCHÉ et al., 2005).

Em resposta a diferentes estímulos, os genes *CaM* não mostraram alterações significativas na sua expressão (MCCORMACK; TSAI; BRAAM, 2005). Já para os genes *CMLs*, a expressão de 35 *CMLs* de *Arabidopsis* foi significativamente alterada mais fortemente por ciclohexamida, ozônio, metil-jasmonato e salinidade (MCCORMACK; TSAI; BRAAM, 2005). Outro estudo mostrou que muitos genes *CML* de *Arabidopsis* comportam-se semelhantemente aos genes *TCH* (*Touch*), sendo regulados tanto por toque (estímulo mecânico) (12 genes *CML*) quanto por escuro (10 genes *CML*). Por outro lado, estes 2 estímulos não reduziram o nível de expressão de nenhum dos genes *CML* (LEE; POLISENSKY; BRAAM, 2005). Os genes *OsCaM* e *OsCML* de arroz também exibiram padrões de expressão diferentes

entre os tecidos/órgãos, além de responderem a estresses abióticos, tais como déficit hídrico e salinidade (CHINPONGPANICH et al., 2012). Estes trabalhos mostram que os genes *CMLs* de *Arabidopsis* e de arroz têm expressão limitada a pequenos subconjuntos de órgãos e dramática variação em resposta a uma variedade de estímulos.

As *CMLs* quando comparadas as *CaMs* diferem nos modos de ação causando impacto na especificidade pelo alvo, localização sub-celular e afinidade ao Ca^{2+} . Assim, estas *CMLs* possuem uma diversidade de papéis na sinalização de Ca^{2+} que, para melhor compreendê-los, é necessário a identificação precisa de seus alvos. (BOUCHÉ et al., 2005; MCCORMACK; BRAAM, 2003; MCCORMACK; TSAI; BRAAM, 2005). Em plantas, *CaMs* e *CMLs* regulam uma variedade de alvos incluindo quinases, proteínas metabólicas, proteínas do citoesqueleto, canais e bombas de íons, fatores transcricionais e proteínas receptoras semelhantes a quinases (RLKs, *Receptor-Like Kinases*) (BOUCHÉ et al., 2005; KUDLA; BATISTIC; HASHIMOTO, 2010). Popescu et al. (2007) mostraram que proteínas *CaM* e *CML* podem compartilhar alvos, porém, também possuem um repertório específico de proteínas para interação. Casos específicos de *CMLs* com seus alvos e processos biológicos a elas relacionados serão detalhados no tópico 2.3.4.

2.3.3 Localização sub-celular de *CaMs* e *CMLs*

A grande maioria das *AtCaMs* e *AtCMLs* são preditas como citosólicas ou possivelmente nucleares (MCCORMACK; BRAAM, 2003). As proteínas *AtCML9* e *AtCML42*, foram encontrados no citosol e no núcleo respectivamente (PEROCHON et al., 2010; VADASSERY et al., 2012). A proteína *OsMSR2*, uma *CML* de arroz, foi observada apenas no citosol de células epidérmicas de cebola (XU et al., 2011).

Biro et al. (1984) relataram pela primeira vez a presença de *CaM* extracelular em extrato solúvel de parede celular de coleóptilo de aveia. Posteriormente, Cui et al. (2005) confirmaram a presença da proteína *AtCaM2* no meio de cultura e também ligada à parede celular de células em suspensão de *Arabidopsis*. Cui et al. (2005) e Wang et al. (2009) mostraram a presença de proteínas na membrana plasmática de células em suspensão de *Arabidopsis* e de tabaco que são alvos de *CaM*. Foi demonstrado que a *AtCaM2* liga-se especificamente a 2 proteínas de membrana plasmática, uma de 117 kDa e outra de 41 kDa.

Apesar da ausência de um aparente peptídeo sinal de direcionamento para o vacúolo, um ensaio de proteção contra protease mostrou a presença de AtCML18 no lúmen vacuolar de leveduras expressando AtCML18. Protoplastos foliares de *Arabidopsis* transformados com AtCML18-GFP confirmaram a presença de AtCML18 no vacúolo de plantas (YAMAGUCHI et al., 2005).

Chigri et al. (2012) mostraram que as proteínas AtCML3 e AtCML30 são direcionadas para os peroxissomos e mitocôndria respectivamente. A extremidade C-terminal da AtCML3 contém um tripeptídeo (Ser-Asn-Leu) incomum semelhante a um sinal de direcionamento para o peroxissomo do tipo 1 (PTS1, *Peroxisomal Targeting Signal Type 1*) (Ser-Lys-Leu). Por outro lado, a AtCML30 utiliza um peptídeo sinal N-terminal não clivável, que também pode ser de duplo-direcionamento para a mitocôndria e citosol, dependendo de qual códon para metionina é usado para iniciar a tradução.

2.3.4 CMLs associadas com respostas biológicas

Folhas de *Arabidopsis* quando tocadas passam por rápida alteração da expressão gênica. Entre os genes induzidos, o *TCH1* (*Touch 1*) codifica a proteína AtCaM2. *TCH1* também é induzido em resposta ao escuro, ao frio e ao calor. Outros 2 genes *TCH3* e *TCH2* são responsivos aos mesmos estímulos e codificam AtCML12 e AtCML24 respectivamente (BRAAM; DAVIS, 1990, MCCORMACK; BRAAM, 2003).

A atividade mitogênica de células de *Arabidopsis* diminuiu ao serem tratadas com anticorpo anti-CaM, ou com um antagonista específico para CaM. Entretanto, esta atividade foi gradualmente retomada à medida que a proteína AtCaM2 recombinante foi adicionada ao meio extracelular. Isto indica que a AtCaM2 extracelular desempenha um papel essencial na proliferação de células em suspensão de *Arabidopsis* (CUI et al., 2005). Em outro trabalho, a perda de função de AtCaM2 causou a redução significativa da germinação de grãos de pólen, indicando que o gene *AtCaM2* desempenha, também, um papel neste processo (LANDONI et al., 2010).

O gene *AtCML9* é induzido por frio, salinidade, ferimento, estresse hídrico e tratamento com ácido abscísico (ABA). A perda de função de AtCML9 resultou em plantas hipersensíveis a ABA, com menor tolerância à salinidade e déficit hídrico,

sugerindo que esta CML desempenha múltiplos papéis na modulação das respostas ao estresse, promovendo tolerância à salinidade e à seca (MAGNAN et al., 2008). AtCML9 também está relacionada com resposta a estresses bióticos, participando da resposta imune inata de plantas contra *Pseudomonas syringae*. A indução do gene *AtCML9* por *P. syringae* e flagelina, bem como análises funcionais, indicam que AtCML9 atua como regulador positivo de processos celulares e moleculares durante a resposta de defesa vegetal à bactéria fitopatogênica, por meio de uma via de sinalização dependente de flagelina e de ácido salicílico (LEBA et al., 2012). Um estudo de interactoma em *Arabidopsis* demonstrou que 113 proteínas podem ser potenciais alvos da AtCML9 (POPESCU et al., 2007). PRR2, uma proteína com várias características típicas de fatores transcripcionais, interagiu com AtCML9 e ambas são direcionadas para o núcleo (PEROCHON et al., 2010).

Em arroz, o gene *OsMSR2* é responsivo aos estresses de frio, calor, salinidade e seca. O acúmulo de OsMSR2 em plantas transgênicas de *Arabidopsis* aumentou sua tolerância aos estresses salinos e hídrico, e sua sensibilidade ao ABA, indicando que esta CML poderia mediar a transdução de sinais para regular alguns genes induzidos por estresse numa via mediada por ABA (XU et al., 2011).

Yamaguchi et al. (2005) relatam que a AtCML18 (também chamada AtCaM15) interage e regula AtNHX1 (Na^+/H^+ exchanger 1) no lúmen vacuolar com dependência de Ca^{2+} e pH. AtNHX1 tem um papel importante na manutenção do pH celular, homeostase iônica e regulação do transporte intercelular de proteínas.

Estímulos tais como toque, escuro, calor, frio e os hormônios ABA e auxina induzem o gene *AtCML24*. A germinação e o crescimento de sementes de mutantes com perda de função de *AtCML24* são insensíveis ao ABA, e a transição para o florescimento ocorre tardiamente. Isto indica que AtCML24 regula positivamente a inibição por ABA e tem papel na transição para o florescimento (DELK et al., 2005). Foi demonstrado que AtCML24 e seu parólogo AtCML23 regulam a transição para o florescimento e o acúmulo de óxido nítrico (NO). O mutante *cml24* possui maior número de folhas e um florescimento tardio, sugerindo que AtCML24 age como regulador estimulando o florescimento. O duplo mutante (*cml23/cml24*) indica que *AtCML23* e *AtCML24* estão acima do gene *FLC* (*Flowering Locus*) na via, para inibir sua expressão e assim promover o florescimento (TSAI et al., 2007). A AtCML24 também está envolvida na sinalização de resposta imune em plantas onde foi

associada com a geração de NO e com a reação de hipersensibilidade (MA et al., 2008).

AtCML24 pode desempenhar um papel na raiz em resposta ao estímulo mecânico, por meio da regulação da orientação dos microtúbulos na zona de alongamento radicular (WANG et al., 2011). Recentemente, foi demonstrado que, por meio da interação e da regulação da atividade da cisteíno-protease ATG4b, a proteína AtCML24 afeta a progressão da autofagia. ATG4b possui duas atividades antagônicas com respeito a regulação da autofagia. Na primeira, ATG4b processa ATG8 e promove a autofagia. Na segunda, remove ATG8 da membrana de autofagossomos inibindo a autofagia (TSAI et al., 2013).

Os genes *AtCML37*, *AtCML38* e *AtCML39* estão associados ao desenvolvimento e são responsivos a vários estímulos bióticos e abióticos (MCCORMACK; TSAI; BRAAM, 2005). A estrutura primária da proteína AtCML37 possui 51,4 e 52,2% de identidade com a da AtCML38 e AtCML39 respectivamente, enquanto entre AtCML38 e AtCML39 há 76,1% de identidade. Entre AtCML38 e AtCaM2 existe 28,8% de identidade de aminoácidos (MCCORMACK; BRAAM, 2003). O maior nível de conservação entre as proteínas AtCaM2, AtCML38 e AtCML39 está dentro da porção C-terminal (ANEXO C), e todas as 3 proteínas contêm 4 domínios *EF-hand* de acordo com a ferramenta SMART (LETUNIC; DOERKS; BORK, 2012).

A atividade da β -glucuronidase (gene *uidA/GUS*) sob o controle dos promotores dos genes *AtCML37*, *AtCML38* e *AtCML39* indica que estes genes se expressam principalmente em tecidos jovens. As 3 CMLs se expressam em raiz. Entretanto, padrões distintos de expressão foram observados em flores. *AtCML39*, por exemplo, tem expressão pólen-específica. Em folhas maduras, *AtCML38* se expressa menos que *AtCML37*, enquanto não foi detectada a expressão de *AtCML39*. Os hormônios relacionados ao estresse, ABA e ácido salicílico, não alteraram a expressão dos genes *AtCML37*, *AtCML38* e *AtCML39*, mas uma resposta a estresse salino e à interação com bactéria fitopatogênica indicam o envolvimento destas CMLs com respostas aos estímulos abióticos e bióticos (VANDERBELD; SNEDDEN, 2007).

Em folhas de *Arabidopsis* com 3 semanas de idade, os genes *AtCML37* e *AtCML38* estão entre os genes induzidos por toque (LEE; POLISENSKY; BRAAM, 2005). Os genes *UBA2* respondem ao estímulo mecânico causado por ferimento. A

super-expressão dos genes *UBA2* causa uma senescência foliar e morte celular prematuras por meio do aumento dos níveis de expressão de diversos genes. Entre estes o gene *AtCML38* foi fracamente induzido pelos genes *UBA2a*, *UBA2b* e *UBA2c*, sugerindo o envolvimento desta CML nos processos de senescência induzida por ferimento/morte celular (KIM; BOVE; ASSMANN, 2008).

Entre as 50 CMLs preditas em *Arabidopsis*, as proteínas AtCML37, AtCML38 e AtCML39 possuem alta similaridade de sequência de aminoácidos com a proteína rgs-CaM (BOUCHÉ et al., 2005; VANDERBELD; SNEDDEN, 2007). A proteína rgs-CaM (*regulator of gene silencing*-CaM) possui 3 domínios *EF-hands* e foi isolada em tabaco por meio de sistema de duplo-híbrido de levedura usando HC-Pro (*helper component protease*) como isca. HC-Pro é uma proteína viral que suprime o silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS), um mecanismo de defesa antiviral em plantas. A super-expressão de HC-Pro em plantas transgênicas de tabaco e/ou a infecção viral induzem a expressão de rgs-CaM e suprimem PTGS. O fenótipo de plantas super-expressando rgs-CaM foi semelhante à super-expressão de HC-Pro, e altos níveis de rgs-CaM diminuem a capacidade de silenciamento gênico, indicando que rgs-CaM atua como regulador negativo da PTGS (ANANDALAKSHMI et al., 2000).

A interação entre *P. syringae* pv. *tomato* e plantas resistentes de tomate induziu o gene *APR134* que codifica uma CML. O silenciamento deste gene compromete a resposta de tomate a *P. syringae*. *AtCML42* e *AtCML43* são 2 genes ortólogos de *APR134* em *Arabidopsis* e apenas *AtCML43* foi induzido por *P. syringae*. A super-expressão do gene *AtCML43* acelerou a reação de hipersensibilidade, indicando que *APR134* e *AtCML43* têm papéis na defesa contra patógenos de tomate e de *Arabidopsis* respectivamente (CHIASSON et al., 2005).

No início do desenvolvimento de *Arabidopsis*, a *AtCML42* desempenha um papel na regulação do número de ramificações do tricoma. Enquanto em raízes a expressão de *AtCML42* foi restrita ao tecido maduro, na parte aérea houve expressão em folhas jovens, principalmente nos anéis celulares ao redor de tricomas em desenvolvimento. Os tricomas são células unicelulares com 3 ramificações, entretanto, mutantes com perda de função de *AtCML42* possuem mais de 4 ramificações. O alvo da *AtCML42* é a proteína KIC (*Kinesin-Interacting Ca²⁺-binding protein*), um regulador negativo da ramificação em tricomas (DOBNEY et al., 2009).

Na resposta à herbivoria o gene *AtCML42* é especificamente ativado por moléculas elicitoras presentes na secreção oral do inseto generalista *Spodoptera littoralis*. A perda de função da *AtCML42* (mutante *cml42*) reduz o ganho de peso de larvas de *S. littoralis*, e torna a planta mais sensível a jasmonato (JA). Isto indica que *AtCML42* atua como regulador negativo da defesa vegetal, diminuindo a percepção de JA e, subsequentemente, a expressão de genes responsivos a JA (VADASSERY et al., 2012). *AtCML42* também coordena a percepção de estresses abióticos. Plantas do mutante *cml42* são menos resistentes a estresse por radiação UV-B, indicando que *AtCML42* atua de maneira positiva na regulação da resposta contra este estresse. Por outro lado, *AtCML42* afeta negativamente a biossíntese de ABA, uma vez que o mutante *cml42* acumula mais ABA durante o estresse hídrico (VADASSERY et al., 2012).

Os diferentes trabalhos aqui citados evidenciam o envolvimento das CMLs em vias distintas de transdução de sinais moduladas por Ca^{2+} . Porém, existem poucas evidências ligando-as a vias específicas do desenvolvimento celular, incluindo a expansão celular, tornando-se necessário a identificação dos alvos das proteínas CMLs e a caracterização dos seus mecanismos de atuação.

Para entender o mecanismo molecular pelo qual o peptídeo *AtRALF1* regula o crescimento radicular de *Arabidopsis*, buscou-se, por meio do sistema de duplo híbrido de levedura, identificar proteínas que poderiam interagir com *AtRALF1*. Durante a triagem, foi isolado um fragmento de cDNA (327 pb) correspondente a extremidade 5' do *locus* At1g76650, o qual codifica parte (109 aminoácidos) da proteína *AtCML38*. Foi demonstrado que o peptídeo *AtRALF1* maduro é suficiente para interagir com a proteína *AtCML38* completa (177 aminoácidos) em duplo-híbrido de levedura. O peptídeo *AtRALF34* maduro apresenta 54% de identidade com o peptídeo *AtRALF1* e apesar disso, o peptídeo *AtRALF34* maduro não interagiu com a proteína *AtCML38* completa indicando uma especificidade de interação entre *AtCML38* e *AtRALF1* (FIORI, 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e condições de crescimento

Plantas de *A. thaliana* do ecótipo Columbia-0 foram usadas como selvagem. Os mutantes com inserção de T-DNA no *locus* AtCML38 (*cml38*, SALK_066538) e no *locus* AtCML39 (*cml39*, SALK_078400) foram adquiridos através do Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) da Ohio State University (ALONSO et al., 2003). Todas as linhagens mutantes são oriundas do ecótipo Columbia-0. Os genótipos homozigotos foram confirmados por PCR usando DNA genômico e analisados por RT-PCR semi-quantitativo. As sequências dos iniciadores usados para genotipagem e RT-PCR podem ser visualizadas no Anexo A. Plantas transgênicas de *Arabidopsis* transformadas com o preproAtRALF1, sob o controle do promotor *Cauliflower Mosaic Virus* 35S para super-expressão do peptídeo AtRALF1 (35S:AtRALF1), foram geradas anteriormente (MATOS et al., 2008).

As condições de crescimento das plantas de *Arabidopsis* foram descritas anteriormente (BOYES et al., 2001). Brevemente, sementes de *Arabidopsis* foram primeiro tratadas com frio (4°C) por 4 dias e então germinadas no solo (2:1, substrato organo-solo Basaplant:vermiculita expandida). As plantas foram cultivadas em câmaras de crescimento Conviron sob fotoperíodo controlado (16 horas de luz, 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 8 horas de escuro) a 22°C. Plantas de *N. benthamiana* utilizadas nos experimentos de expressão gênica transiente foram crescidas no solo (1:1, substrato organo-solo Basaplant:vermiculita expandida) sob 14 horas de luz (60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e 10 horas de escuro a 23-25°C (SPARKES et al., 2006).

3.2 Análises *in silico*

As sequências gênicas dos peptídeos e das proteínas usadas neste trabalho podem ser encontradas no banco de dados do TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*, www.arabidopsis.org) ou no GenBank/EMBL com os seguintes números de acesso: AtRALF1 (*locus* At1g02900; GenBank NM_100171), AtRALF34 (*locus* At5g67070; GenBank NM_126107), AtCML38 (*locus* At1g76650; GenBank NM_106315), AtCML39 (*locus* At1g76640; GenBank NM_106314) e GAPDH (*locus* At1g13440; GenBank NM_180013).

O alinhamento das sequências de aminoácidos foi feito com o programa CLC Sequence Viewer 6 Software. Os números de acesso no GeneBank das sequências de aminoácidos são NP_171789 (AtRALF1), NP_850344 (AtCaM2), NP_177791 (AtCML38) e NP_177790 (AtCML39). A identificação dos domínios *EF-hand* na estrutura primária das proteínas AtCaM2, AtCML38 e AtCML39 foi feita usando a ferramenta SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*) (LETUNIC; DOERKS; BORK, 2012).

Dados públicos de microarranjo foram explorados usando a ferramenta “eFP Browser” (WINTER et al., 2007). As ferramentas “TargetP 1.1” (EMANUELSSON et al., 2007), “Cell eFP Browser” (WINTER et al., 2007), “SignalP 4.0” (PETERSEN et al., 2011) e “SecretomeP 2.0” (BENDTSEN et al., 2004) foram usadas para as análises de predição da localização sub-celular de proteínas.

3.3 Extração de DNA genômico de *Arabidopsis*

Para extração e purificação de DNA genômico foi utilizado o reagente Plant DNAzol (Life Technologies) de acordo com as recomendações do fabricante. Aproximadamente 100 mg de tecido foliar foram macerados com um pistilo na presença de N₂ líquido dentro de um tubo de 1,5 mL. O tecido macerado foi homogeneizado em 300 µL de Plant DNAzol. A solução foi misturada gentilmente por inversão e incubada a 25°C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados à solução 300 µL de clorofórmio, agitando vigorosamente para posterior incubação a 25°C por 5 minutos. A fase aquosa foi coletada após centrifugação a 12000g por 10 minutos e transferida para um novo tubo. Para precipitar o DNA, foi adicionado 225 µL de etanol 100%. A solução foi misturada por inversão e incubada à temperatura ambiente por 5 minutos. O DNA precipitado foi sedimentado a 5000g por 4 minutos e lavado 2 vezes, primeiramente com a solução Plant DNAzol-etanol e, em seguida, com etanol 75% (v/v). Após a retirada do etanol, o DNA sedimentado foi seco em temperatura ambiente e ressuspenso em volume adequado de água ultra-pura autoclavada.

Para a genotipagem foi utilizado o DNA genômico de *Arabidopsis* extraído de acordo com Kasajima et al. (2004). Para tanto, uma folha (tipicamente 3-5 mg) foi macerada com um pistilo na presença de N₂ líquido dentro de um tubo de 1,5 mL. O tecido macerado foi homogeneizado com 200 µL de tampão de extração [20 mM

Tris-HCl pH 7,5, 25 mM NaCl, 2,5 mM EDTA, 0,05% SDS (p/v)]. Em seguida, o extrato foi centrifugado a 13400g por 10 minutos a 4°C, sendo 1 µL do sobrenadante usado na PCR.

3.4 Extração de RNA total, tratamento com DNase I e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído usando TRIzol (Life Technologies) de acordo com as recomendações do fabricante. O tecido foi macerado com um pistilo na presença de N₂ líquido dentro de um tubo de 1,5 mL. Aproximadamente 50-100 mg de tecido foram homogeneizados com 1 mL de TRIzol. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, foram adicionados 200 µL de clorofórmio à amostra, agitando-a vigorosamente, e colocando-a para incubar novamente à temperatura ambiente por 5 minutos. Para separar as fases, a amostra foi centrifugada a 12000g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado para precipitação de RNA, com a adição de 500 µL de isopropanol. A amostra foi homogeneizada suavemente por inversão, incubada à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugada a 12000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o RNA sedimentado lavado com etanol 75% (v/v). Após agitação vigorosa, a amostra foi centrifugada a 7500g por 5 minutos a 4°C, deixando secar à temperatura ambiente por 10 minutos. O RNA total sedimentado foi ressuspenso em água tratada com DEPC e, em seguida, tratado com DNase I.

A DNase I livre de RNase (Thermo Scientific) foi usada para remover eventual contaminação por DNA genômico. O RNA total foi tratado com DNase I (3 U) em tampão de reação (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 2,5 mM MgCl₂, 0,1 mM CaCl₂) por 1 hora a 37°C. A DNase I foi inativada adicionando 1 µL de EDTA 50 mM e incubando a 65°C por 10 minutos. A ausência de contaminação de DNA genômico foi verificada por PCR usando os iniciadores (ANEXO A) que flanqueiam um íntron do gene *CLC2* (At2g40060). Subsequentemente, a qualidade ($ABS_{260}/ABS_{280} = 1,8-2,0$) e a concentração do RNA total tratado com DNase I foram verificados com NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

A síntese de cDNA foi realizada com ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega) segundo recomendações do fabricante. O RNA total (1 µg) foi combinado com 1 µL de OligodT 50 µM e incubado por 5 minutos a 70°C. Imediatamente após este período, a amostra foi colocada em gelo por 5 minutos. Em seguida, foi

adicionado uma solução contendo tampão ImProm-II 1X, 1,5 mM MgCl₂, dNTPmix (0,5 mM dATP, 0,5 mM dGTP, 0,5 mM dCTP e 0,5 mM dTTP) e ImProm-II Reverse Transcriptase (1 unidade). 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 usado como alvo em uma PCR padrão. O transcrito do gene *GAPDH* (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) foi usado como controle interno da expressão gênica (CZECHOWSKI et al., 2005). As sequências dos iniciadores para *GAPDH* podem ser vistas no Anexo A.

3.5 Extração e purificação de DNA plasmidial de *Escherichia coli*

3.5.1 Purificação de plasmídeo usando Kit QIAGEN

Para a obtenção de DNA plasmidial, utilizou-se o *Plasmid Midi Kit* (QIAGEN). Para tanto, inoculou-se um colônia isolada de *E. coli* em 100 mL de meio Luria-Bertani (LB) líquido (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) suplementado com os antibióticos apropriados. As células foram cultivadas a 37°C por 16-18 horas sob agitação (180 rpm). Descartou-se o meio de cultura após centrifugação a 5524g por 6 minutos. O sedimentado celular foi ressuspenso em 4 mL de tampão (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg mL⁻¹ RNase A). Em seguida, adicionou-se 4 mL de tampão de lise [200 mM NaOH, 1% SDS (p/v)], misturando vigorosamente por inversão, e a solução foi incubada à temperatura ambiente por 5 minutos. Foram adicionados 4 mL de tampão de neutralização (Acetato de potássio 3 M, pH 5,5), misturando-se vigorosamente a solução por inversão, sendo a mesma incubada em gelo por 15 minutos. O lisado bacteriano foi clarificado por centrifugação a 20000g por 15 minutos a 4°C. Aplicou-se o sobrenadante na coluna QIAGEN-tip 100 pré-equilibrada com 4 mL de tampão de equilíbrio [750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15% isopropanol (v/v), 0,15% Triton X-100 (v/v)]. A coluna foi lavada duas vezes com 10 mL de tampão de lavagem [1 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15% isopropanol (v/v)]. O DNA foi eluído após a adição de 5 mL de tampão de eluição [1,25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 15% isopropanol (v/v)] e, para precipitação, foram adicionados 3,5 mL de isopropanol. Após centrifugação a 15000g por 30 minutos a 4°C, o DNA sedimentado foi lavado com 2 mL de etanol 70% (v/v) e centrifugado novamente sob as mesmas condições anteriores por 10 minutos. O

sedimentado foi deixado secar à temperatura ambiente por 10 minutos, sendo, em seguida, ressuspenso em volume apropriado de água ultra-pura autoclavada.

3.5.2 Purificação de plasmídeo usando lise alcalina

Uma colônia isolada de *E. coli* foi colocada em 5 mL de meio LB líquido com os antibióticos apropriados. Após 16-18 horas de crescimento a 37°C sob agitação (180 rpm), 1 mL de cultura bacteriana foi centrifugado a 13400g sob temperatura ambiente. As células sedimentadas foram ressuspensas em 100 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA), adicionando-se em seguida 200 µL de tampão TENS [10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 100 mM NaOH, 0,5% SDS (p/v)]. Após agitação por inversão, incubou-se a solução por 5 minutos em gelo. Em seguida, foram adicionados 150 µL de acetato de potássio 3 M (pH 5,2), agitando a solução por inversão, sendo novamente a mistura incubada em gelo por 5 minutos. O lisado foi centrifugado a 13400g a 4°C por 20 minutos para coletar o sobrenadante, o qual foi tratado com 3 µL de RNase (10 µg µL⁻¹) a 37°C por 20 minutos. O DNA plasmidial foi precipitado com a adição de 1 mL de etanol 100% e sedimentado por centrifugação a 13400g a 4°C por 30 minutos. O plasmídeo sedimentado foi lavado com 1 mL de etanol 70% (v/v). Após centrifugação de 13400g a 4°C por 15 minutos o sedimentado foi seco a 37°C por 30 minutos e ressuspenso em volume adequado de água ultra-pura autoclavada.

3.6 Digestão e purificação de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose

As reações de digestão (clivagem) enzimática do DNA foram realizadas com tampão de reação enzimática apropriado, diluído 10 vezes e utilizando-se, no mínimo, 1 unidade de enzima por micrograma de DNA. As amostras foram deixadas por 30 minutos a 37°C e submetidas a altas temperaturas para paralisar a reação.

As amostras digeridas foram aplicadas em gel de agarose 1% (p/v) e os fragmentos foram purificados a partir do gel de agarose usando *QIAEX II Gel Extraction Kit* (QIAGEN). Blocos de agarose contendo os fragmentos de DNA (até 4 kb) foram cortados do gel e pesados. Três volumes do tampão QXI foi adicionado para cada 100 mg de gel juntamente com 10 µL de QIAEX II. Incubou-se a amostra a 50°C por 10 minutos, com agitação por inversão a cada 2 minutos para completa

dissolução da agarose. A amostra foi centrifugada a 13400g por 30 segundos e, após retirada do sobrenadante, a resina foi lavada 2 vezes, primeiramente com 500 µL de tampão QXI e em seguida com 500 µL de tampão PE. A resina foi seca em temperatura ambiente por 30 minutos e o DNA foi eluído com o volume adequado de água ultra-pura autoclavada.

3.7 Clonagens

Todas as clonagens foram realizadas de acordo com os procedimentos básicos descritos anteriormente (SAMBROOK; RUSSEL, 2001), com exceção das clonagens nos vetores de destino do sistema Gateway de recombinação (Life Technologies) que seguiram recomendações do fabricante. Para cada ensaio houve uma clonagem específica, a qual foi descrita com mais detalhes nos tópicos abaixo. Todas as construções foram confirmadas por PCR usando um iniciador específico para o gene e um iniciador cujo sítio de anelamento está no vetor. Por fim, todas as construções foram conferidas por sequenciamento.

3.8 Transformação de *E. coli*

3.8.1 Preparação de células eletrocompetentes de *E. coli*

Inicialmente, células desarmadas de *E. coli* cepa TOP10 (Life Technologies) foram estriadas em placa contendo meio LB com ágar (16 g L^{-1}). As placas foram colocadas a 37°C durante 16 horas. Em seguida, foi feito um pré-inóculo com uma colônia isolada em 50 mL de meio LB líquido sem antibióticos, e incubando-se a 37°C durante 16 horas sob agitação (180 rpm). Após este período, 20 mL de cultura do pré-inóculo foram adicionados em 500 mL de meio 2XYT líquido (17 g L^{-1} triptona, 10 g L^{-1} , extrato de levedura, 5 g L^{-1} NaCl). O crescimento também ocorreu a 37°C sob agitação (180 rpm), e a densidade óptica (ABS_{600}) foi acompanhada até o ideal, entre 0,5 e 0,6.

As células foram sedimentadas a 5524g por 6 minutos a 4°C. O meio de cultura foi removido e as células foram ressuspensas suavemente em 500 mL de água ultra-pura autoclavada gelada (4°C). As células foram sedimentadas a 5524g por 6 minutos a 4°C, e lavadas mais uma vez com 250 mL de água ultra-pura

autoclavada gelada (4°C). Após centrifugação a 5524g por 6 minutos a 4°C, a última lavagem das células foi realizada com 10 mL de glicerol 10% (v/v) autoclavado gelado (4°C). As células foram sedimentadas novamente a 5524g por 6 minutos a 4°C e ressuspensas em 3 mL de glicerol 10% (v/v) autoclavado gelado (4°C). Por fim, foram feitas alíquotas de 70 µL, as quais foram armazenadas em freezer -80°C.

3.8.2 Eletroporação de *E. coli*

Para inserir as construções em células de *E. coli*, foi adicionado um volume adequado de recombinação ou ligação a 70 µL de células eletrocompetentes, agitando-se suavemente a mistura e colocando-a em gelo por 1 minuto. A mistura foi colocada em uma cubeta de eletroporação (largura da ranhura 2 mm, BioRad) previamente resfriada em gelo. Em seguida foi efetuada a eletroporação nas seguintes condições: capacitância 25 µF, resistência 200 Ω, voltagem 2,5 kV e o eletroporador utilizado foi *Gene Pulse II* (BioRad). Após a eletroporação foi adicionado 1 mL de meio LB líquido. As células, em seguida, foram incubadas a 37°C por 1 hora sob agitação (180 rpm). Por fim, após centrifugação de 5524g por 1 minuto, as células foram ressuspensas em 200 µL de LB líquido e plaqueadas em meio LB contendo ágar e os antibióticos apropriados, sendo incubadas a 37°C por 16-18 horas.

3.9 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

3.9.1 Preparação de células eletrocompetentes de *A. tumefaciens*

Inicialmente, células desarmadas de *A. tumefaciens* cepa GV3101 (pMP90) foram estriadas em placa contendo meio LB com ágar (16 g L⁻¹) suplementado com os antibióticos gentamicina (50 µg mL⁻¹) e rifampicina (50 µg mL⁻¹). As placas foram colocadas a 30°C durante 48 horas. Em seguida, foi feito um pré-inóculo com uma colônia isolada em 50 mL de meio LB líquido com antibióticos, incubando-se a 30°C durante 18 horas sob agitação (180 rpm). Após este período, 20 mL de cultura do pré-inóculo foram adicionados em 500 mL de meio 2XYT líquido contendo antibióticos. O crescimento também ocorreu a 30°C sob agitação (180 rpm) e a densidade óptica (ABS₆₀₀) foi acompanhada até o ideal, entre 0,5 e 0,6. Nesta

densidade, as células eletrocompetentes de agrobactéria foram preparadas como descrito anteriormente para as células de *E. coli*.

3.9.2 Eletroporação de *A. tumefaciens*

A introdução de construções em células de *A. tumefaciens* foi feita com combinação de vetores binários (150-300 ng) em 70 μ L de células eletrocompetentes. A mistura foi agitada suavemente e colocada em gelo por 2 minutos. Colocou-se a mistura na cubeta de eletroporação (largura da ranhura 2 mm, BioRad) previamente resfriada em gelo, e a eletroporação foi feita nas seguintes condições: capacitância 25 μ F, resistência 200 Ω , voltagem de 2,5 kV e o eletroporador utilizado foi *Gene Pulse II* (BioRad). Imediatamente após a eletroporação, foi adicionado 1 mL de meio LB líquido e as células foram incubadas a 30°C por 2 horas sob agitação (180 rpm). Por fim, foram plaqueados 200 μ L de cultura celular em meio LB contendo ágar e os antibióticos apropriados. As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas.

3.10 Localização sub-celular e ensaios de BiFC em folhas de *N. benthamiana*

Para as análises de localização sub-celular, a região gênica que codifica a proteína AtCML38 foi inserida no vetor pENTR/D-TOPO (Life Technologies) e posteriormente transferida por recombinação para o vetor binário pK7FWG2 (KARIMI; INZE; DEPICKER, 2002) usando LR Clonase II Enzyme Mix (Life Technologies). Neste vetor, a proteína AtCML38 foi fusionada ao N-terminal da proteína fluorescente verde aprimorada (eGFP, *Enhanced Green Fluorescent Protein*) e colocada sob o controle do promotor 35S, resultando na proteína recombinante AtCML38-eGFP. De maneira semelhante uma versão truncada da AtCML38 sem a porção N-terminal (Met1-Ser87) foi recombinada com o vetor binário pK7FWG2 e fusionada ao N-terminal da proteína eGFP (AtCML38^{ΔN}-eGFP). O marcador STtmd-mRFP de complexo de Golgi (OSTERRIEDER et al., 2010) foi generosamente fornecido pelo Dr. Chris Hawes (School of Life Sciences, Oxford Brookes University of Gypsy Lane, Headington, Oxford, OX3 0BP, UK).

Para realizar os ensaios de complementação fluorescente bimolecular (BiFC, *Bimolecular Fluorescence Complementation*) (WALTER et al., 2004) o gene do

precursor do peptídeo AtRALF1 foi fusionado à metade N-terminal (1-155 aminoácidos) da proteína fluorescente amarela (YFP, *Yellow Fluorescent Protein*) usando os sítios de restrição *Bam*HI e *Kpn*II do vetor pSPYNE-35S. Do mesmo modo, a região codificante do gene *AtCML38* foi fusionada à metade C-terminal (156-239 aminoácidos) da YFP, usando os sítios de restrição *As*cl e *Xho*I do vetor pSPYCE-35S. Desta forma, foram geradas as proteínas recombinantes AtRALF1-YFP^N e AtCML38-YFP^C. As sequências dos iniciadores utilizados para amplificar os genes *AtRALF1* e *AtCML38* a partir de DNA genômico de *Arabidopsis* podem ser vistas no Anexo A. Todos os vetores binários aqui construídos ou adquiridos foram introduzidos por eletroporação em *A. tumefaciens* e usados para os ensaios de expressão transiente.

As proteínas recombinadas foram transientemente expressas em folhas de *N. benthamiana* como descrito anteriormente (SPARKES et al., 2006; WAADT; KUDLA, 2008) usando transformação mediada por agrobactéria. As agrobactérias contendo os vetores binários recombinados foram crescidas individualmente durante a noite (16-18 horas) sob agitação (180 rpm) a 30°C em 5 mL de meio LB líquido suplementado com os antibióticos apropriados (gentamicina 50 µg mL⁻¹, canamicina 50 µg mL⁻¹, espectinomicina 50 µg mL⁻¹).

Um mililitro de cultura celular foi centrifugado a 2300g por 5 minutos à temperatura ambiente (23-25°C). As bactérias sedimentadas foram ressuspensas em 1 mL de tampão de ativação (10 mM MES-KOH pH 5,6, 10 mM MgCl₂, 200 µM acetoseringona) e incubadas à temperatura ambiente por 3 horas. A densidade óptica (ABS₆₀₀) foi medida e subsequentemente ajustada com tampão de ativação para a densidade óptica final de 0,2 para cada cepa. As células ativadas foram infiltradas no lado abaxial de folhas completamente expandidas de *N. benthamiana* com 5-6 semanas após a germinação, usando uma seringa de 1 mL sem agulha. Após a infiltração, as plantas foram mantidas dentro do laboratório até serem analisadas no microscópio confocal. A proteína p19, um supressor do silenciamento gênico derivado do *Tomato Bushy Stunt Virus* (VOINNET et al., 2003; LAKATOS et al., 2004), foi co-infiltrada com todos os vetores binários recombinados, a fim de permitir um nível de expressão gênica adequado.

3.11 Microscopia confocal

Células epidérmicas de folhas de *N. benthamiana* foram analisadas 2-3 dias após a agroinfiltração para as análises de localização sub-celular ou 7 dias para os ensaios de BiFC utilizando um microscópio invertido (*Confocal Laser Scanning Olympus FluoView 1000*). As imagens foram coletadas usando uma lente objetiva UPlanApo 60x/1.2 de imersão em água. Ajustes no zoom digital e na intensidade do sinal foram feitos com o programa Olympus FluoView.

As proteínas eGFP e YFP foram excitadas com laser de íons de argon, respectivamente, a 488 nm e a 514 nm, e a fluorescência emitida foi detectada no intervalo de 505-530 nm para eGFP e 530-600 nm para YFP. A proteína monomérica fluorescente vermelha (mRFP, *Monomeric Red Fluorescent Protein*) foi excitada a 543 nm com laser de íon de hélio e a fluorescência emitida foi detectada no intervalo de 560-615 nm.

3.12 Expressão e purificação de proteínas fusionadas a GST

A sequência codante completa do gene *AtCML39* foi amplificada a partir de DNA genômico de *Arabidopsis* usando iniciador gene-específico (ANEXO A) e inserida no vetor pENTR/D-TOPO (Life Technologies). Posteriormente os genes *AtCML38* e *AtCML39* foram transferidos por recombinação para o vetor pDEST15 (Life Technologies) usando LR Clonase II Enzyme Mix (Life Technologies). Ambos foram fusionados ao C-terminal da proteína glutathione S-transferase (GST). As construções GST-*AtCML38* e GST-*AtCML39* foram inseridas em *E. coli* cepa BL21 (DE3) Codon Plus por eletroporação. Em seguida, as cepas transformadas foram crescidas sob agitação (180 rpm) a 30°C em meio LB líquido suplementado com os antibióticos apropriados (canamicina 30 µg mL⁻¹, cloranfenicol 34 µg mL⁻¹, ampicilina 100 µg mL⁻¹), até a densidade ótica (ABS₆₀₀) de 0,4-0,6. Para induzir a produção de proteínas foi adicionado 0,5 mM de IPTG (isopropil β-D-1-tiogalatopiranosídeo), sendo as células incubadas por 4 horas.

As proteínas fusionadas à GST foram purificadas por afinidade utilizando *beads* de agarose-glutathione (Thermo Scientific), como descrito anteriormente com poucas modificações (FRANGIONI; NEEL, 1993; ARAZI et al., 1995). Inicialmente, as células induzidas foram sedimentadas a 2300g por 10 minutos a 4°C e

ressuspensas em tampão de lise gelado (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 2 mg mL⁻¹ lisozima, 1 mM PMSF, 0,3 µM aprotinin, 10 µM leupeptin, 1 µM pepstatin, 100 µM TPCK). Após 30 minutos, foi adicionado DNase (5 unidades mL⁻¹) e RNase (50 µg mL⁻¹), incubado por 20 minutos, seguida das adições de sarcosil 1% (v/v) e Triton X-100 2% (v/v). O lisado celular foi clarificado por centrifugação a 13400g por 30 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi incubado durante 30 minutos a 4°C sob agitação suave com as *beads* de agarose-glutationa (200 µL) pré-equilibradas com tampão de lise. As *beads* foram lavadas 5 vezes com 5 volumes de tampão de lise gelado, e as proteínas foram eluídas com a adição de 1 mL de tampão de eluição gelado (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM glutatona reduzida). A glutatona reduzida foi removida das proteínas purificadas por meio de diálise contra 20 mM de bicarbonato de amônio. Posteriormente, as proteínas fusionadas à GST foram liofilizadas e ressuspensas em tampão PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4). A concentração de proteínas foi determinada usando reagente de Bradford e a proteína BSA como padrão (BRADFORD, 1976).

3.13 Expressão e purificação do peptídeo _{His}AtRALF1 recombinante

A região madura do peptídeo AtRALF1 foi amplificada a partir de DNA genômico de *Arabidopsis* usando iniciadores gene-específico (ANEXO A) e inserida entre os sítios de restrição *Nde*I e *Hind*III do vetor pET28b (Novagen), para fusioná-la ao C-terminal de um *tag* contendo 6 resíduos de histidinas (His). Em seguida, a construção _{His}AtRALF1 foi inserida por eletroporação em *E. coli* cepa Rosetta (DE3) Codon Plus. As bactérias foram crescidas em meio LB líquido suplementado com os antibióticos (ampicilina 100 µg mL⁻¹, canamicina 30 µg mL⁻¹, cloranfenicol 34 µg mL⁻¹) sob agitação (180 rpm) a 37°C, até a densidade óptica (ABS₆₀₀) de 0,4–0,6. A expressão do peptídeo recombinante foi induzida durante 4 horas após a adição de IPTG 1 mM.

O peptídeo _{His}AtRALF1 foi purificado usando resina Ni-NTA (*Nickel-Nitrilotriacetic acid*) (QIAGEN) sob condições desnaturantes. As células induzidas foram sedimentadas por centrifugação a 2300g por 10 minutos a 4°C, ressuspensas em tampão de lise (100 mM NaH₂PO₄, 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 8 M ureia) e lisadas por 1 hora em temperatura ambiente sob agitação suave. O lisado foi clarificado por centrifugação a 13400g por 30 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi

incubado durante 1 hora sob agitação suave em temperatura ambiente com a resina Ni-NTA pré-equilibrada com o tampão de lise. Em seguida, a resina foi separada do lisado por centrifugação a 1250g por 1 minuto e lavada 3 vezes com 5 volumes de tampão de lavagem (100 mM NaH₂PO₄, 20 mM Tris-HCl pH 6,3, 8 M ureia). O peptídeo foi eluído com tampão de eluição (100 mM NaH₂PO₄, 20 mM Tris-HCl pH 3,3, 8 M ureia).

Para retirar a ureia, o eluído foi submetido à diálise contra ácido fórmico 0,2% (v/v, pureza de 85%) durante 4 dias a 4°C. Após este período, o peptídeo dialisado foi tratado com ácido fórmico 1% (v/v, pureza de 96%) para precipitação de impurezas. O precipitado foi retirado por centrifugação a 13400g por 20 minutos e o sobrenadante foi coletado para liofilização. O peptídeo liofilizado foi ressuspenso em água ultra-pura autoclavada e quantificado em HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*). Para a quantificação, uma alíquota (~50 µL) do peptídeo recombinante HisAtRALF1 purificado foi diluído em ácido fórmico 0,1% (v/v, pureza de 96%). A amostra foi injetada em uma coluna C18-HPLC previamente equilibrada com ácido fórmico 0,1% (v/v, pureza de 96%) em água. Em seguida, um gradiente de 30 minutos foi aplicado de 0 a 50% de acetonitrila (v/v) em 0,1% de ácido fórmico (v/v). O fluxo usado foi de 1 mL minuto⁻¹ e a eluição foi monitorada por absorbância a 214 nm. A área integrada do pico equivalente ao peptídeo recombinante purificado foi usada para quantificação, tomando como referência uma reta padrão anteriormente definida.

3.14 Ensaios de interação *in vitro* (GST Pull-Down)

As proteínas fusionadas a GST purificadas foram combinadas com o peptídeo recombinante HisAtRALF1 em um volume final de 200 µL de tampão de interação [8 mM NaH₂PO₄ pH 6,5, 2,7 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1 mM PMSF, 0,05% Tween-20 (v/v)], suplementado com 1 mM CaCl₂ ou 10 mM EGTA e incubado sob suave agitação por 16 horas a 4°C. Similarmente, a proteína GST sozinha foi usada como controle negativo. Após o período de interação, foram adicionados 50 µL de *beads* de glutationa-agarose (Thermo Scientific) pré-equilibradas com tampão de interação, e incubadas sob agitação suave por 30 minutos a 4°C. As *beads* foram lavadas 5 vezes (1 mL por lavagem) com o tampão de interação. As proteínas foram

eluídas com a adição de 40 µL de tampão de eluição gelado (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM glutathiona reduzida) e analisadas por *Western Blot*.

3.15 Purificação do peptídeo AtRALF1 maduro de plantas transgênicas

A purificação do peptídeo AtRALF1 maduro de plantas selvagens, transgênicas 35S:AtRALF1 e do híbrido *cm/38/35S:AtRALF1* foi realizada de acordo com Matos et al. (2008), com poucas modificações. As sementes superficialmente esterilizadas foram colocadas para germinar em meio MS 0,5X (MURASHIGE; SKOOG, 1962) (pH 5,8, ajustado com KOH) líquido sem sacarose e após 7 dias as plântulas (~5000) foram maceradas na presença de N₂ líquido. O macerado foi homogeneizado com ácido fórmico 1% (v/v, pureza de 96%) e incubado à temperatura ambiente por 10 minutos para extração ácida de proteínas totais. O extrato foi clarificado com duas centrifugações a 13400g por 15 minutos a 4°C, e então injetado na coluna de fase reversa Resource 3 mL HPLC (Amersham) previamente equilibrada com 0,1% de ácido fórmico (v/v). Um gradiente de 30 minutos que partiu de 0 a 80% de acetonitrila (v/v) em 0,1% de ácido fórmico (v/v) foi aplicado após a injeção do extrato clarificado. Como padrão, o peptídeo AtRALF1 sintético maduro foi injetado anteriormente para determinar o intervalo de coleta das frações. Após a injeção do extrato clarificado, frações de 1 mL foram coletadas entre 9 e 16 minutos, liofilizadas e analisadas por *Western Blot*.

3.16 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida (12 ou 15%) como descrito anteriormente (LAEMMLI, 1970), empregando o sistema *Mini Protean R tetra Cell* (BioRad). Para visualização das proteínas os géis foram colocados em solução de coloração [50% metanol (v/v), 10% ácido acético (v/v), 0,2% Coomassie Blue R-250 (p/v)] durante 1 hora. Para descoloração, os géis foram colocados na mesma solução, mas sem o corante.

3.17 Imunodeteção (*Western Blot*)

As proteínas separadas em géis de SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (0,45 μm , Santa Cruz) para imunodeteção. Para tanto, foi montado um cassete de transferência, no qual a transferência foi realizada em tampão contendo Tris-base (3 g L^{-1}), glicina (14,4 g L^{-1}) e metanol (200 mL L^{-1}). A transferência foi conduzida por 1 hora a 100 volts em temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas com TBS-T [20 mM Tris-base, 500 mM NaCl, 0,1% Tween-20 (v/v)] por 8 minutos, e então bloqueadas por 1 hora em 5% (p/v) de leite desnatado dissolvido em TBS-T sob agitação suave. As membranas bloqueadas foram incubadas durante a noite (12–16 horas) a 4°C sob agitação suave com o anticorpo primário policlonal anti-AtRALF1 (1:2000 ou 1:5000) ou anti-AtCML38 (1:5000), diluído em 2% (p/v) de leite desnatado dissolvido em TBS-T. As membranas foram rapidamente lavadas 2 vezes com TBS-T e mais 4 vezes com maior tempo de lavagem (8 minutos por lavagem). Em seguida, as membranas foram incubadas à temperatura ambiente por 3 horas, com o anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina anti-IgG de coelho (1:30000, Zymed) diluído em 2% (p/v) de leite desnatado dissolvido em TBS-T. Após incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram rapidamente lavadas 2 vezes com TBS (sem Tween-20) e mais 4 vezes com maior tempo de lavagem (8 minutos por lavagem). As membranas foram incubadas com *Lumi-Phos WB Chemiluminescent Substrate* (Pierce) e expostas a filme por 1 hora ou durante a noite à temperatura ambiente.

3.18 Ensaio de inibição de crescimento de raiz e do alongamento do hipocótilo

Sementes de *Arabidopsis* foram esterilizadas superficialmente com hipoclorito de sódio 50% (v/v) por 15 minutos, sendo submetidas em seguida a 5 lavagens com água ultra-pura autoclavada e ao tratamento com frio (4°C) por 4 dias.

Os ensaios de inibição do crescimento radicular foram realizados como descrito anteriormente (PEARCE et al., 2001; MATOS et al., 2008). Sementes esterilizadas superficialmente foram germinadas em meio MS 0,5X (MURASHIGE; SKOOG, 1962) (pH 5,8, ajustado com KOH) líquido sem sacarose sob agitação suave e sob foto-período de 16 horas luz (60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e de 8 horas de escuro a 24°C. Três dias após a germinação, foi adicionado 1 ou 5 μM do peptídeo

recombinante $_{\text{His}}\text{AtRALF1}$ ao meio líquido. O crescimento da raiz primária das plântulas foi mensurado 4 dias após a adição do peptídeo.

O ensaio de inibição do alongamento de hipocótilo foi realizado como descrito anteriormente (MINGOSSI et al., 2010). Quatro dias após incubação a 4°C, as sementes superficialmente esterilizadas foram colocadas em meio MS 0,5X líquido sem sacarose. As sementes foram submetidas à luz por 4 horas para induzir a germinação e mantidas no escuro para induzir o alongamento do hipocótilo. Dois dias após a germinação numa sala completamente escura, 1 μM do peptídeo $_{\text{His}}\text{AtRALF1}$ foi adicionado no meio líquido. O comprimento do hipocótilo foi medido 4 dias após a adição do peptídeo.

Para analisar o crescimento de raiz sem o tratamento com o peptídeo $_{\text{His}}\text{AtRALF1}$, sementes superficialmente esterilizadas foram germinadas e crescidas verticalmente em meio MS 0,5X contendo fitagel (9 g L⁻¹). O comprimento da raiz primária foi medido 7 dias após a germinação. O alongamento do hipocótilo sem o tratamento com o peptídeo $_{\text{His}}\text{AtRALF1}$ foi induzido como descrito anteriormente, e aferido 2 e 4 dias após a germinação. Todas as medições foram feitas usando o programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

3.19 Tratamento com o peptídeo $_{\text{His}}\text{AtRALF1}$ para análise de expressão gênica

Sementes superficialmente esterilizadas e tratadas com frio foram colocadas para crescer verticalmente em meio MS 0,5X contendo fitagel (9 g L⁻¹). Após 10-14 dias de germinação, as plantas fisiologicamente saudáveis (análise visual), com pelo menos 2 folhas verdadeiras emitidas, foram transferidas para placas de 24 poços contendo 2 mL de meio MS 0,5X líquido. Para cada tratamento, foram utilizadas 3-4 plantas. As plantas nas placas foram colocadas sob luz (60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e suave agitação durante 1 hora para adaptação à nova condição. Em seguida, as raízes foram tratadas com o peptídeo $_{\text{His}}\text{AtRALF1}$ e coletadas após um determinado período de tratamento para a análise de RT-PCR semi-quantitativo. As concentrações de $_{\text{His}}\text{AtRALF1}$, como também os períodos de tratamento com o peptídeo, estão indicados no texto, nas legendas ou na própria figura. Os dados de densitometria foram obtidos usando o programa ImageJ.

3.20 Transformação estável de *Arabidopsis*

O gene *AtCML38* inserido no vetor pENTR/D-TOPO, foi transferido por recombinação para o vetor pK7WG2 (KARIMI; INZE; DEPICKER, 2002) usando LR Clonase II Enzyme Mix (Life Technologies), colocado-o assim sob o controle do promotor 35S. A construção 35S:*AtCML38* foi introduzida em *A. tumefaciens* por eletroporação e utilizada para transformação estável de plantas selvagens de *Arabidopsis* pelo método do *floral dip* (CLOUGH; BENT, 1998). Uma colônia isolada de agrobactéria foi inoculada em 10 mL de meio LB líquido contendo os antibióticos adequados (gentamicina 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, espectinomicina 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e incubada a 30 °C por 16 horas sob agitação (180 rpm). Dois mililitros do pré-inóculo foram adicionados em 200 mL de meio LB líquido suplementado com os antibióticos apropriados, incubando a 30 °C por 48 horas sob agitação (180 rpm). À cultura foi então adicionada sacarose (250 g L^{-1}) e Silwet L-77 (160 $\mu\text{L L}^{-1}$).

Antes da transformação, os botões florais abertos de plantas com idade entre 25-30 dias foram removidos, mantendo-se apenas os fechados. Em seguida, a solução de agrobactéria foi individualmente e diretamente colocada com o auxílio de uma pipeta *Pasteur* em cada botão floral. Após a transformação, as plantas foram acondicionadas em uma câmara úmida feita com plástico, e deixadas no escuro por 24 horas. O plástico foi retirado após 48 horas da inoculação para que as plantas recebessem os cuidados necessários até a maturação das sementes. As sementes da geração T1 foram superficialmente esterilizadas e selecionadas em meio MS 0,5X contendo ágar e canamicina 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As plântulas transformadas foram identificadas em placa como descrito anteriormente (HARRISON et al., 2006), e isoladas para posterior análise de expressão usando RT-PCR semi-quantitativo. As linhas com nível desejado de expressão foram conduzidas até a geração T3 para obtenção de plantas homozigotas.

3.21 Hibridação

Para obter o híbrido *cm138/35S:AtRALF1*, foi realizado um cruzamento entre o mutante T-DNA homozigoto *cm138* e a planta transgênica 35S:*AtRALF1*. O cruzamento foi realizado de acordo com os procedimentos descritos anteriormente (WEIGEL; GLAZEBOOK, 2002). Plantas super-expressando *AtRALF1* e

heterozigotas para a inserção do T-DNA foram selecionadas por meio de PCR e RT-PCR na geração F1. Na geração F2, foram selecionadas plantas super-expressando AtRALF1, homozigotas para a inserção do T-DNA e que mostravam ausência de transcritos do gene *AtCML38*.

4 RESULTADOS

4.1 *AtRALF1* e *AtCML38* são co-expressos em raízes de *Arabidopsis*

Análises de dados públicos de expressão gênica de diferentes estágios do desenvolvimento de *Arabidopsis* mostraram que os genes *AtRALF1* e *AtCML38* são co-expressos em raízes (Figura 1). Em outros tecidos, tais como o cotilédone, o transcrito *AtRALF1* não foi detectado (Figura 1A), mas houve expressão do gene *AtCML38* (Figura 1B). No hipocótilo, a expressão de *AtCML38* foi menor do que *AtRALF1*. Na roseta foliar a expressão de *AtRALF1* foi nula, enquanto houve expressão de *AtCML38* principalmente em tecidos jovens como as folhas 1 e 2. Em comparação as folhas, o nível de expressão de *AtCML38* foi maior nas raízes (Figura 1B). As análises *in silico* de expressão mostram a presença dos transcritos *AtRALF1* e *AtCML38* em raízes de *Arabidopsis*.

Figura 1 – Valores de expressão relativa para os genes (A) *AtRALF1* e (B) *AtCML38* em estágios do desenvolvimento de *Arabidopsis*. Os dados públicos de expressão mostram que os genes *AtRALF1* e *AtCML38* são co-expressos em raízes jovens. Os gráficos podem ser gerados com os respectivos números de *locus* usando a ferramenta “eFP Browser”

4.2 Localização sub-celular da proteína AtCML38

As ferramentas “TargetP 1.1” (EMANUELSSON et al., 2007) e “Cell eFP Browser” (WINTER et al., 2007) não foram capazes de determinar a localização sub-celular da proteína AtCML38 (Figura 2A e 2B). Estas ferramentas mostraram também, que o precursor do peptídeo AtRALF1 é direcionado para o apoplasto pela via secretória convencional (RE-Golgi, retículo endoplasmático-complexo de Golgi) (Figura 2A e 2C). A ferramenta “SignalP 4.0” (PETERSEN et al., 2011) não apontou a presença de uma sequência sinal N-terminal clivável na proteína AtCML38 (Figura 2D) e apontou uma sequência de 26 aminoácidos no precursor AtRALF1 (Figura 2E). Na ferramenta “SecretomeP 2.0” (BENDTSEN et al., 2004) o *N-score* da AtCML38 (0,808) foi maior que 0,5 indicando que esta proteína seja secretada, apesar da ausência de um peptídeo sinal convencional.

Figura 2 – Predição *in silico* da localização sub-celular da proteína AtCML38. (A) Predição pelo “TargetP 1.1” com a proteína AtCML38 e o precursor AtRALF1. cTP, direcionamento para o cloroplasto; mTP, direcionamento para a mitocôndria; SP, peptídeo sinal; Loc, localização; S, via secretória; (B) Predição pela ferramenta “Cell eFP” da proteína AtCML38 e do (C) precursor AtRALF1. (D) “SignalP 4.0” não indicou a presença de peptídeo sinal na proteína AtCML38, (E) e aponta a presença no precursor de AtRALF1

Para investigar experimentalmente a localização sub-celular, a proteína AtCML38 foi fusionada ao N-terminal da proteína eGFP. A fusão AtCML38-eGFP foi colocada sob o controle do promotor 35S, e transientemente expressa em folhas de *N. benthamiana*. A proteína eGFP sozinha foi usada como controle negativo. As células da epiderme de folhas de tabaco puderam ser vistas por meio de microscopia de contraste de interferência diferencial ou DIC (Figura 3). Três dias após a agroinfiltração, o sinal de fluorescência da eGFP foi detectado na periferia das células expressando AtCML38-eGFP (Figura 3, painel 1) e eGFP sozinha

Figura 3 – A proteína AtCML38 é secretada. Imagens de microscopia confocal de células epidérmicas de folhas de *N. benthamiana* expressando transientemente AtCML38-eGFP ou eGFP sozinha (controle negativo). O sinal fluorescente da AtCML38-eGFP (painel 1) e da eGFP (painel 2) está restrito à periferia celular. Após plasmólise, o sinal da AtCML38-eGFP foi detectado no citosol e no apoplasto (painel 3, setas), enquanto a eGFP sozinha está restrita ao citosol (painel 4, seta). DIC, microscopia de contraste de interferência diferencial. Sobreposição, imagens de fluorescência da eGFP e DIC sobrepostas. As barras indicam a escala (20 μ m)

(Figura 3, painel 2). A sobreposição das imagens DIC e de fluorescência da eGFP mostram que o sinal da eGFP contorna a célula de tabaco (Figura 3, painéis 1 e 2).

As células epidérmicas de folhas de *N. benthamiana* foram plasmolisadas com manitol (0,8 M) para determinar se o sinal da fluorescência estava localizado no citosol, na membrana plasmática ou no apoplasto. A retração da membrana plasmática das células de tabaco, causado pelo tratamento com manitol, está indicada por setas nas imagens DIC dos painéis 3 e 4 da Figura 3. Após a plasmólise, o sinal fluorescente da proteína recombinante AtCML38-eGFP foi observado no apoplasto e no citoplasma (Figura 3, painel 3, setas), enquanto a proteína eGFP sozinha foi observada apenas no citoplasma (Figura 3, painel 4, seta). A sobreposição das imagens de fluorescência da eGFP e DIC mostra a presença da AtCML38-eGFP no apoplasto (Figura 3, painel 3, setas). Estes resultados mostram que a proteína AtCML38-eGFP foi direcionada para o apoplasto.

Durante as investigações da localização sub-celular, foi observado que o sinal fluorescente da proteína AtCML38-eGFP estava presente em estruturas pequenas semelhantes ao complexo de Golgi (Figura 4A, setas), enquanto a proteína eGFP encontrava-se difusa no citoplasma (Figura 4A). Para determinar a identidade destas estruturas pequenas a construção AtCML38-eGFP foi co-expressa transientemente em células epidérmicas de tabaco com o marcador de complexo de Golgi STtmd-mRFP (STtmd, domínio transmembrana da sialil transferase de rato), comumente usado em plantas (BOEVINK et al., 1998; OSTERRIEDER et al., 2010). Três dias após a agroinfiltração, ambas fluorescências, de AtCML38-eGFP e STtmd-mRFP encontravam-se em pequenas estruturas das células de tabaco como indicado por setas na Figura 4B. As imagens de fluorescência da AtCML38-eGFP e STtmd-mRFP sobrepostas (Figura 4B, setas) e a sobreposição dos picos de intensidade de fluorescência da eGFP e da mRFP (Figura 4C), mostram a localização da AtCML38-eGFP no complexo de Golgi.

Figura 4 – AtCML38 no complexo de Golgi. (A) Imagens de microscopia confocal mostrando o sinal fluorescente da eGFP em pequenas estruturas semelhantes ao complexo de Golgi (setas) de células foliares de tabaco expressando transientemente a proteína AtCML38-eGFP. A proteína eGFP sozinha (controle negativo) aparece difusa no citosol. (B) Co-expressão de AtCML38-eGFP com o marcador de complexo de Golgi, STtmd-mRFP. As setas indicam co-localização. Sobreposição, imagens de fluorescência da eGFP e da mRFP sobrepostas. As barras indicam a escala (20 μ m). (C) A intensidade do sinal de fluorescência da eGFP e da mRFP é mostrada para 3 complexos de Golgi, os quais são indicados em (B) pelas linhas 1, 2 e 3

Para investigar se a secreção da AtCML38-eGFP ocorre por uma via não convencional, foi adicionado o peptídeo KDEL na extremidade C-terminal da AtCML38-eGFP. A construção AtCML38-eGFP-KDEL foi agroinfiltrada em folhas de *N. benthamiana* e, após 3 dias, foram analisadas em microscópio confocal. O sinal fluorescente da AtCML38-eGFP-KDEL foi detectado na periferia celular (Figura 5,

painel 1) e em estruturas semelhantes ao retículo endoplasmático (RE) (Figura 5, painel 2). Após plasmólise, observou-se a retração da membrana plasmática (Figura 5, painel 3, setas) e a sobreposição das imagens não mostrou a presença do sinal fluorescente da AtCML38-eGFP-KDEL no apoplasto (Figura 5, painel 3). O sinal fluorescente da eGFP no contorno celular da imagem de sobreposição do painel 1 (Figura 5) não é observado no contorno celular após plasmólise (Figura 5, painel 3). Estes dados indicam que a proteína AtCML38 é direcionada para o apoplasto via RE-Golgi.

A ferramenta “SignalP 4.0” não identificou sítios de clivagem de peptídeo sinal na sequência de aminoácidos da proteína AtCML38 (Figura 2D). Para investigar se a extremidade N-terminal da proteína AtCML38 é importante para o seu direcionamento, a metade C-terminal (Asp88-Arg177) foi fusionada ao N-terminal da proteína eGFP. A versão truncada de AtCML38 sem o N-terminal (AtCML38^{ΔN}-eGFP) foi co-expressa transientemente com o marcador de complexo de Golgi

Figura 5 – A proteína AtCML38 retida no RE não é secretada. Imagens de microscopia confocal mostrando o sinal fluorescente da AtCML38-eGFP-KDEL em célula de tabaco. O sinal da eGFP foi observado na periferia celular (painel 1) e no RE (painel 2). Após plasmólise este não foi detectado no apoplasto (painel 3). As setas indicam a retração da membrana. eGFP, sinal fluorescente da eGFP. Clorofila, sinal fluorescente da clorofila. DIC, microscopia de contraste de interferência diferencial. Sobreposição, imagens de fluorescência da eGFP, Clorofila e DIC sobrepostas. As barras indicam a escala (20 μ m)

STtmd-mRFP em folhas de *N. benthamiana*. O sinal da fluorescência da AtCML38^{ΔN}-eGFP apresentou-se difusa no citoplasma (Figura 6A). A sobreposição das imagens de fluorescência da AtCML38^{ΔN}-eGFP e da STtmd-mRFP (Figura 6A) e os picos de intensidade de fluorescência da eGFP e da mRFP (Figura 6B) mostram que a versão truncada da proteína AtCML38 não co-localizou precisamente com o marcador de complexo de Golgi (comparar Figura 6B com a Figura 4C), indicando que a extremidade N-terminal é essencial para o seu direcionamento.

Figura 6 – A extremidade N-terminal da proteína AtCML38 é essencial para o seu direcionamento. (A) Imagens de microscopia confocal mostrando que o sinal fluorescente da AtCML38^{ΔN}-eGFP não co-localizou com o marcador de complexo de Golgi STtmd-mRFP em células de tabaco. Sobreposição, imagens de fluorescência da eGFP e da mRFP sobrepostas. As barras indicam a escala (20 μ m). (B) A intensidade do sinal de fluorescência da eGFP e da mRFP é mostrada para 3 complexos de Golgi, os quais são indicados em (A) pelas linhas 1, 2 e 3

4.3 AtCML38 interage com o peptídeo AtRALF1 *in planta* e *in vitro*

Anteriormente foi demonstrado que a proteína AtCML38 pode interagir com o peptídeo AtRALF1 maduro no sistema de duplo-híbrido de levedura (FIORI, 2010). Para confirmar a interação entre AtCML38 e AtRALF1 *in planta*, foram realizados ensaios de complementação fluorescente bimolecular, BiFC (WALTER et al., 2004). O domínio N-terminal não fluorescente da proteína fluorescente amarela (YFP) (YFP^N, 1-155 aminoácidos) e o domínio C-terminal da YFP (YFP^C, 156-239 aminoácidos) foram, respectivamente, fusionados as extremidades C-terminal do precursor de AtRALF1 e da proteína AtCML38. As proteínas fusionadas AtRALF1-YFP^N e AtCML38-YFP^C foram transientemente co-expressas em *N. benthamiana*, e o sinal de fluorescência da YFP nas células foliares foi examinado usando microscópio confocal. Após 7 dias da agroinfiltração o sinal da YFP foi detectado na periferia celular (Figura 7, painel 1), e, após a plasmólise, permaneceu no apoplasto (Figura 7, painel 2).

Nenhuma fluorescência foi encontrada em folhas co-expressando o vetor vazio YFP^C e a proteína recombinante AtRALF1-YFP^N (Figura 7, painel 3). A co-expressão das construções bZIP63-YFP^N e bZIP63-YFP^C foi usada como controle positivo. Está bem estabelecido que a interação destas proteínas ocorre no núcleo e pode ser observada em células de tabaco (Figura 7, painel 4). A co-expressão do vetor vazio YFP^N combinado com a construção AtCML38-YFP^C ou com o vetor vazio YFP^C também não geraram fluorescência (ANEXO D). De forma análoga, a proteína p19 sozinha ou co-expressa com a construção AtRALF1-YFP^N ou com AtCML38-YFP^C não gerou sinal fluorescente em células foliares de tabaco (ANEXO D). Estes dados demonstram que AtRALF1 e AtCML38 são capazes de reconstituir a proteína amarela fluorescente e sugere que ambas proteínas interagem no apoplasto.

Figura 7 – AtRALF1 interage com AtCML38 *in planta*. As proteínas AtRALF1-YFP^N e AtCML38-YFP^C foram co-expressas em folhas de tabaco. Sete dias após a agroinfiltração, o sinal fluorescente da YFP foi detectado na periferia celular (painel 1). Após plasmólise, este foi detectado no apoplasto. A retração da membrana é indicada pelas setas (painel 2). Como controle negativo, AtRALF1-YFP^N e o vetor vazio YFP^C foram co-infiltrados (painel 3). O sinal fluorescente da YFP do controle positivo, bZIP63-YFP^N/bZIP63-YFP^C, foi detectado apenas no núcleo. O núcleo indicado pela seta é visualizado em detalhe no lado superior direito (painel 4). YFP, sinal fluorescente da YFP. Sobreposição, imagens de fluorescência da YFP e DIC sobrepostas. As barras indicam a escala (20 μm)

A interação entre AtCML38 e AtRALF1 foi analisada *in vitro* por meio de ensaios de interação GST *pull-down*. Para tanto, a sequência codificante completa dos genes *AtCML38* e *AtCML39* foi fusionada ao C-terminal da proteína glutiona S-transferase (GST). A AtCML39 foi utilizada como teste de especificidade da interação, uma vez que a mesma apresenta elevada semelhança de estrutura primária com a AtCML38. A proteína GST sozinha foi utilizada como controle negativo. As construções GST, GST-AtCML38 e GST-AtCML39 foram inseridas em *E. coli* para expressão heteróloga e purificação de proteínas.

As proteínas fusionadas a GST foram purificadas em condições não desnaturantes por afinidade a *beads* de glutiona-agarose e analisadas em gel de

SDS-PAGE. As proteínas GST, GST-AtCML38 e GST-AtCML39 foram purificadas e apresentaram as massas moleculares esperadas (Figura 8A) que são 26166 Da, 48368 Da e 46401 Da respectivamente.

Anteriormente, foi gerado um anticorpo policlonal anti-AtCML38. Para definir a diluição de uso do anticorpo, e se este anticorpo reconhece as proteínas GST, GST-AtCML38 e GST-AtCML39, foram realizados *dot blots* e *Western blots*. O *dot blot* mostra que o anticorpo anti-AtCML38 na diluição de 1:10000 é ideal para a detecção das proteínas AtCML38 e AtCML39, enquanto a proteína GST não foi detectada em nenhuma das diluições (ANEXO E). O *Western blot* também mostrou que o anticorpo anti-AtCML38 reconhece ambas as proteínas AtCML38 e AtCML39 (Figura 8B).

Figura 8 – Purificação de proteínas fusionadas a GST. (A) As proteínas GST, GST-AtCML38 e GST-AtCML39 foram purificadas com *beads* de agarose-glutationa e submetidas a SDS-PAGE em gel de 12,5% e coloração com o corante Coomassie Blue. O padrão de massa molecular é mostrado ao lado direito. (B) *Western blot* mostrando que o anticorpo anti-AtCML38 reconhece também a proteína AtCML39. O padrão de massa molecular é mostrado ao lado esquerdo

O peptídeo AtRALF1 maduro (Ala72-Ser120) foi fusionado ao C-terminal de uma cauda de 6 histidinas. A construção $_{His}$ AtRALF1 foi inserida em *E. coli* para

expressão heteróloga. O peptídeo foi purificado em condições desnaturantes por afinidade a resina Ni-NTA e analisado em HPLC. O cromatograma do peptídeo HisAtRALF1 mostra a presença de apenas um pico com tempo de retenção em torno de 18 minutos (Figura 9), mostrando que o peptídeo foi purificado corretamente.

Figura 9 – Cromatograma do peptídeo recombinante HisAtRALF1 . O peptídeo HisAtRALF1 foi purificado com resina Ni-NTA e analisado em HPLC. A quantificação foi realizada com base em reta-padrão pré-estabelecida. A linha crescente representa a concentração de acetonitrila (ACN) durante a corrida. ABS, absorbância

O ensaio de GST *pull-down* foi realizado combinando a proteína recombinante GST-AtCML38 purificada com 10 nM de HisAtRALF1 , na presença e na ausência de Ca^{2+} . A imunodeteção mostra que o peptídeo recombinante HisAtRALF1 interagiu com a proteína GST-AtCML38 apenas na presença de Ca^{2+} (Figura 10A). As *beads* de glutationa-agarose e a proteína GST sozinha não precipitaram o peptídeo. Resultados similares foram obtidos com GST-AtCML38 ao utilizar 100 nM de HisAtRALF1 (Figura 10B). Por outro lado, HisAtRALF1 não interagiu com a proteína GST-AtCML39 (Figura 10B). Juntos, estes dados mostram que o peptídeo AtRALF1 interage com AtCML38 de maneira específica e dependente de Ca^{2+} .

O apoplasto em células vegetais normalmente é ácido (pH 6,5 aproximadamente) (GRIGNON; SENTENAC, 1991; BIBIKOVA et al., 1998). Os dados de BiFC indicam que a interação ocorre no apoplasto, neste sentido foi testado se a interação *in vitro* seria dependente de pH. Em pH 7,5, o peptídeo HisAtRALF1 não interagiu com a proteína GST-AtCML38, enquanto em pH 6,5 houve a interação (Figura 10C). Adicionalmente, GST-AtCML38 também interagiu com

$_{\text{His}}$ AtRALF1 sob pH mais ácido (pH 5,5) (Figura 10D). Os resultados mostram que a interação AtCML38-AtRALF1 também é dependente de pH.

Figura 10 – AtRALF1 interage com AtCML38 *in vitro*. (A) GST-AtCML38 foi combinada com 10 nM de $_{\text{His}}$ AtRALF1 na presença (1 mM CaCl_2) ou na ausência (10 mM EGTA) de Ca^{2+} . *Beads* e a proteína GST sozinha foram utilizadas como controle negativo. *Input*, controle positivo para *Western Blot* usando apenas $_{\text{His}}$ AtRALF1. A imunodeteção foi obtida com os anticorpos α -AtCML38 e α -AtRALF1. (B) GST-AtCML39 foi combinada com 100 nM de $_{\text{His}}$ AtRALF1 na presença de Ca^{2+} . (C) GST-AtCML38 foi combinada com $_{\text{His}}$ AtRALF1 *in vitro* na presença de Ca^{2+} , sob os pHs 7,5, 6,5 e (D) 5,5. Os painéis abaixo são membranas de nitrocelulose coradas com solução de Ponceau S indicando a presença das proteínas fusionadas à GST

4.4 O mutante T-DNA *cm/38* é insensível ao peptídeo $_{\text{His}}$ AtRALF1

Para testar se o efeito inibitório do crescimento de raízes, causado pelo peptídeo AtRALF1, requer a proteína AtCML38, foi isolado o mutante *cm/38* com a inserção de um T-DNA no éxon do gene *AtCML38* (Figura 11A). O nível de similaridade de sequência de aminoácidos entre as proteínas AtCML38 e AtCML39 sugerem uma redundância funcional entre si. Neste sentido, também foi isolado o

mutante *cm139* com a inserção de um T-DNA no éxon do gene *AtCML39* (Figura 11B). Os transcritos *AtCML38* e *AtCML39* não foram detectados em análises de RT-PCR semi-quantitativo usando o RNA total extraído de raízes de plantas mutantes *cm138* (Figura 11C) e *cm139* (Figura 11D), comprovando a ausência de transcritos *AtCML38* e *AtCML39*.

Figura 11 – Confirmação dos mutantes *cm138* e *cm139*. (A e B) Representação esquemática da inserção dos T-DNAs dos mutantes *cm138* e *cm139* respectivamente. Iniciadores esquerdo (LP), direito (RP) e da borda do T-DNA (BP, LBb1.3) usados na genotipagem. (C e D) RT-PCR usando RNA total de raízes de plantas selvagem (wt) e dos mutantes *cm138* e *cm139* com os iniciadores LP e RP. *GAPDH* foi usado como controle interno

Os mutantes *cm138* e *cm139* foram usados em ensaios de inibição do crescimento radicular e do alongamento do hipocótilo. No ensaio de inibição do crescimento radicular, plântulas com 3 dias após germinação em meio MS líquido foram tratadas com o peptídeo recombinante $_{\text{His}}\text{ATR}\text{ALF1}$, e o crescimento radicular foi avaliado após 4 dias na presença do peptídeo. Quando as plântulas selvagens e os mutantes *cm138* e *cm139* foram tratadas com 1 μM de $_{\text{His}}\text{ATR}\text{ALF1}$, apenas o crescimento radicular do mutante *cm138* não foi inibido pelo peptídeo, enquanto o crescimento das raízes das plântulas do tipo selvagem e do mutante *cm139* foi inibido (Figura 12A e 12B). Resultados semelhantes foram obtidos no tratamento das plântulas com 5 μM de $_{\text{His}}\text{ATR}\text{ALF1}$ (Figura 12C e 12D).

Figura 12 – Ensaio de inibição do crescimento radicular. (A) Plântulas selvagens (wt) e os mutantes *cml38* e *cml39* crescidas em meio líquido sem (-) ou com (+) 1 μ M do peptídeo $_{\text{His}}$ ATRALF1. (B) Quantificação dos dados de (A). Comprimento da raiz primária de plântulas crescidas em meio líquido sem (coluna azul) ou com (coluna vermelha) 1 μ M do peptídeo $_{\text{His}}$ ATRALF1. Barras de erro indicam D.P. ($n = 35-60$ plantas). (C) Plântulas selvagens (wt) e mutantes *cml38* e *cml39* crescidas em meio líquido sem (-) ou com (+) 5 μ M do peptídeo $_{\text{His}}$ ATRALF1. (D) Quantificação dos dados de (C). Comprimento da raiz primária de plântulas crescidas em meio líquido sem (coluna azul) ou com (coluna vermelha) 5 μ M do peptídeo $_{\text{His}}$ ATRALF1. Barras de erro indicam D.P. ($n = 35-50$ plantas). Asteriscos indicam uma diferença significativa ($P < 0,05$, Teste de Duncan). n.s., não significativo

No ensaio de inibição do alongamento do hipocótilo, plântulas germinadas e mantidas no escuro durante 2 dias foram tratadas com o peptídeo $_{\text{His}}$ ATRALF1, e o alongamento foi avaliado após 4 dias na presença do peptídeo. O alongamento do hipocótilo induzido por escuro das plântulas selvagens e do mutante *cml39* foi inibido após tratamento com 1 μ M de $_{\text{His}}$ ATRALF1 (Figura 13A). Entretanto, o alongamento de hipocótilo do mutante *cml38* ocorreu normalmente na presença do peptídeo (Figura 13B). Juntos, estes resultados indicam que a proteína AtCML38 é requerida pelo peptídeo AtRALF1 para a inibição do crescimento radicular e do alongamento do hipocótilo.

Figura 13 – Ensaio de inibição do alongamento do hipocótilo. (A) Hipocótilos induzidos por escuro de plantas selvagens (wt) e dos mutantes *cml38* e *cml39* em meio líquido na ausência (-) ou na presença (+) de 1 μ M do peptídeo $_{\text{His}}$ AtRALF1. (B) Quantificação dos dados de (A). Comprimento do hipocótilo de plantas crescidas em meio líquido sem (coluna azul) ou com (coluna vermelha) 1 μ M do peptídeo $_{\text{His}}$ AtRALF1. Barras de erro indicam D.P. ($n = 39-80$ plantas). Asteriscos indicam uma diferença significativa ($P < 0,05$, Teste de Duncan). n.s., não significativo

Para investigar se a super-expressão do gene *AtCML38* causa uma hipersensibilidade ao peptídeo $_{\text{His}}$ AtRALF1, plantas selvagens de *Arabidopsis* foram transformadas com um vetor contendo o gene *AtCML38*, sob o controle do promotor 35S (35S:AtCML38). Análises de RT-PCR semi-quantitativo foram realizadas para determinar os níveis do transcrito *AtCML38* nas linhas transgênicas de *Arabidopsis*, nas gerações T1 e T2. *AtCML38* foi expresso nestas linhas, mas em diferentes níveis (ANEXO F).

Na geração T3, a super-expressão de *AtCML38* foi confirmada por RT-PCR semi-quantitativo em uma das linhas transgênicas (Figura 14A). Análises fenotípicas não mostraram diferenças no crescimento radicular (Figuras 14B e 14C), morfologia da roseta foliar e altura da inflorescência entre plantas selvagens e plantas transgênicas 35S:AtCML38 (Figura 14D).

Figura 14 – Super-expressão de *AtCML38*. (A) RT-PCR semi-quantitativo com RNA extraído de folhas de plantas selvagens (wt) e transgênicas 35S:AtCML38. O número de ciclos da RT-PCR é indicado no topo. *GAPDH* foi usado como controle interno. (B) Crescimento radicular de plantas selvagens e de plantas transgênicas 35S:AtCML38 após 15 dias de germinação. (C) Quantificação dos dados de (B). Barras de erro indicam D.P. ($n = 24$ plantas). (D) Roseta foliar (topo) e inflorescência (abaixo) de planta selvagem e da planta transgênica 35S:AtCML38. Barras = 1 cm

O tratamento com 1 μM de $_{\text{His}}$ ATRALF1 inibiu igualmente o crescimento radicular (Figura 15A) e o alongamento do hipocótilo (Figura 15B) de plântulas selvagens e 35S:AtCML38. Por outro lado, as baixas concentrações de $_{\text{His}}$ ATRALF1 (0,25 e 0,5 μM) não foram capazes de causar o efeito inibitório em plântulas selvagens e 35S:AtCML38 (Figura 15), indicando que a super-expressão de *AtCML38* não causou hipersensibilidade ao peptídeo.

Figura 15 – Plantas 35S:AtCML38 não são hipersensíveis ao peptídeo HisAtRALF1. (A) Comprimento de raiz primária de plantas selvagens (coluna azul) e transgênicas 35S:AtCML38 (coluna vermelha) crescidas em meio líquido na presença de HisAtRALF1. Barras de erro indicam D.P. ($n = 34-36$ plantas). (B) Comprimento de hipocótilo de plantas selvagens (coluna azul) e transgênicas 35S:AtCML38 (coluna vermelha) crescidas em meio líquido na presença de HisAtRALF1. Barras de erro indicam D.P. ($n = 43-80$ plantas). Asteriscos indicam uma diferença significativa ($P < 0,05$, Teste de Duncan). n.s., não significativo

4.5 AtCML38 é essencial para a inibição do crescimento radicular causado pelo peptídeo AtRALF1

Para determinar se a proteína AtCML38 é essencial para a inibição do crescimento radicular causado pelo peptídeo AtRALF1, plantas transgênicas de *Arabidopsis* super-expressando o precursor do peptídeo AtRALF1 (35S:AtRALF1) foram cruzadas com o mutante *cm/38*, resultando no híbrido *cm/38/35S:AtRALF1*. A inserção do T-DNA em homozigose no híbrido *cm/38/35S:AtRALF1* e no mutante *cm/38* foi confirmada por PCR usando DNA genômico (Figura 16A). A presença da construção 35S:AtRALF1 no genoma das plantas 35S:AtRALF1 e do híbrido *cm/38/35S:AtRALF1* também foi confirmada por PCR (Figuras 16B).

Figura 16 – Confirmação de cruzamento. (A) Confirmação da inserção do T-DNA em homozigose usando DNA genômico de plantas selvagem (wt), 35S:AtRALF1, do híbrido *cmI38/35S:AtRALF1* e do mutante *cmI38* e os iniciadores LBb1.3 (borda do T-DNA), *forward* e reverso (F+R) do gene. (B) Confirmação da presença da construção 35S:AtRALF1 usando DNA genômico e os iniciadores 35SF e reverso *AtRALF1*. *AtRALF34* foi usado como controle positivo

A super-expressão do peptídeo AtRALF1 causou a redução do crescimento radicular das plantas transgênicas 35S:AtRALF1, enquanto as raízes das plantas do híbrido *cmI38/35S:AtRALF1* cresceram e se desenvolveram normalmente (Figura 17A). Em comparação as raízes selvagens, o crescimento radicular das plantas 35S:AtRALF1 foi 50% menor (Figura 17B). Por outro lado, o comprimento das raízes das plantas do híbrido *cmI38/35S:AtRALF1* foi significativamente maior do que as plantas 35S:AtRALF1 e aproximadamente 47% maior que as raízes de plantas selvagens (Figura 17B). As raízes primárias das plantas do mutante *cmI38* foram aproximadamente 80% maior que as raízes das plantas selvagens (Figuras 17B).

Análises de RT-PCR semi-quantitativo usando o RNA total extraído de raízes confirmam a super-expressão do peptídeo AtRALF1 (Figuras 17C e 17D) e a ausência do transcrito *AtCML38* (Figuras 17C). Inesperadamente, foi observado um aumento da expressão do gene *AtCML38* em raízes de plantas 35S:AtRALF1 em

comparação a raízes de plantas selvagens (Figura 17C). Adicionalmente, o peptídeo AtRALF1 maduro foi isolado de plântulas por meio de extração ácida e fracionado por cromatografia de fase reversa (HPLC). Este peptídeo foi imunodetectado nas frações oriundas dos extratos de plantas transgênicas 35S:AtRALF1 e do híbrido *cmI38/35S:AtRALF1*, usando o anticorpo anti-AtRALF1 (Figura 17E). O crescimento radicular do mutante *cmI39* também foi avaliado (Figura 18A) e não foram observadas diferenças significativas no comprimento da raiz primária entre as plantas selvagens e as plantas do mutante *cmI39* (Figuras 18B).

Figura 17 – A Inibição do crescimento radicular, causada pelo peptídeo AtRALF1, é dependente da proteína AtCML38. (A) Crescimento radicular de plantas selvagem (wt), transgênica 35S:AtRALF1, híbrido *cmI38/35S:AtRALF1* e o mutante *cmI38* com 7 dias após germinação. (B) Quantificação dos dados mostrados em (A). Barras de erro indicam D.P. ($n = 34$ plantas). Asterisco indica uma diferença significativa ($P < 0,05$, Teste de Duncan). (C) RT-PCR semi-quantitativo com o RNA total extraído de raízes. Os cDNAs dos transcritos *AtRALF1* e *AtCML38* foram amplificados usando 20 e 30 ciclos respectivamente. *GAPDH* foi usado como controle interno. (D) Curva de ciclos (topo do gel) em RT-PCR mostrando a super-expressão de AtRALF1 em raízes. (E) Análise de Western blot para detectar o peptídeo AtRALF1 maduro fracionado por HPLC a partir de extrato protéico de plântulas. As frações onde o peptídeo foi detectado pelo anticorpo anti-AtRALF1 estão numeradas como I (frações 1-3), II (frações 4-6) e III (frações 7-10)

Figura 18 – Raízes do mutante *cm139*. (A) Crescimento radicular de plantas selvagem (wt) e do mutante *cm139* após 10 dias de germinação. (B) Quantificação dos dados mostrados em (A). Barras de erro indicam D.P. ($n = 54$ plantas). n.s., não significativo ($P < 0,05$, Teste de Duncan)

O acúmulo do peptídeo AtRALF1 maduro promoveu a redução do alongamento do hipocótilo de plântulas 35S:AtRALF1 com 2 e 4 dias de crescimento no escuro (Figuras 19A), enquanto o comprimento do hipocótilo do híbrido *cm138/35S:AtRALF1* e do mutante *cm138* foi semelhante as plântulas selvagens nos dois dias (Figuras 19B). A super-expressão do AtRALF1 e a ausência de transcritos do gene *AtCML38* foram confirmados em hipocótilos estiolados por meio de RT-PCR semi-quantitativo (Figura 19C e 19D). Assim como o observado em raízes, o nível de transcrito *AtCML38* aumentou em hipocótilos de plantas super-expressando o peptídeo AtRALF1 (Figuras 19C e 19D).

Figura 19 – A inibição do alongamento de hipocótilo, causada pelo peptídeo AtRALF1, é dependente da proteína AtCML38. (A) Alongamento de hipocótilo de plantas selvagens (wt), transgênicas 35S:AtRALF1, do híbrido *cmI38/35S:AtRALF1* e do mutante *cmI38* com 2 e 4 dias após germinação e crescimento no escuro. Barra = 5 mm. (B) Quantificação dos dados mostrados em (A). Barras de erro indicam D.P. ($n = 35-70$ plantas). Asterisco indica uma diferença significativa ($P < 0,05$, Teste de Duncan). (C) RT-PCR semi-quantitativo com o RNA total extraído de hipocótilo induzido por escuro usando 30, (D) 15, 20 e 25 ciclos como indicado no topo da figura. *GADPH* foi usado como controle interno

A expressão ectópica do gene *AtRALF1* na parte aérea causou a redução da roseta foliar em plantas transgênicas 35S:AtRALF1 com 10 e 21 dias após germinação (Figura 20). Por outro lado, a roseta foliar das plantas do híbrido *cmI38/35S:AtRALF1* e das plantas do mutante *cmI38* foram fenotipicamente semelhantes as plantas selvagens (Figura 20).

Figura 20 – O acúmulo do peptídeo AtRALF1 não causa o fenótipo semi-anão na ausência da proteína AtCML28. Comparação fenotípica das rosetas foliares das plantas selvagens (wt), transgênica 35S:AtRALF1, do híbrido *cmI38/35S:AtRALF1* e do mutante *cmI38* com 10 e 21 dias após germinação. Apenas plantas transgênica 35S:AtRALF1 apresentam fenótipo semi-anão. Barras = 1 cm

O comprimento da inflorescência foi mensurado para quantificar o fenótipo semi-anão causado pelo acúmulo do peptídeo AtRALF1. Diferentemente de plantas transgênicas 35S:AtRALF1, o híbrido *cmI38/35S:AtRALF1* e o mutante *cmI38* não apresentaram o fenótipo semi-anão e cresceram semelhantemente as plantas selvagens (Figura 21A). Em comparação as plantas selvagens, o comprimento da inflorescência das plantas transgênicas 35S:AtRALF1 foi significativamente menor, enquanto não houve diferenças entre o comprimento do híbrido *cmI38/35S:AtRALF1* e do mutante *cmI38* após 29, 31 e 37 dias da germinação (Figura 21B). Análises de RT-PCR semi-quantitativo usando o RNA total extraído de folhas confirmaram a super-expressão do precursor AtRALF1, e a ausência de expressão do gene *AtCML38*. Em folhas, a expressão ectópica do precursor do AtRALF1 também induziu a expressão do gene *AtCML38* (Figuras 21C e 21D).

A análise conjunta dos dados de raiz, hipocótilo e folha mostram que a proteína AtCML38 é essencial para a inibição do crescimento radicular e do alongamento do hipocótilo, e para o fenótipo semi-anão, causados pelo acúmulo do

peptídeo AtRALF1. Adicionalmente, os dados ainda indicam que o peptídeo AtRALF1 requer a proteína AtCML38 por meio da indução do seu gene.

Figura 21 – Na ausência da proteína AtCML38, o fenótipo semi-anão, causado pelo acúmulo do peptídeo AtRALF1, não é observado (A) Inflorescência das plantas selvagem (wt), transgênica 35S:AtRALF1, híbrido *cmI38/35S:AtRALF1* e do mutante *cmI38* com 29 e 37 dias após germinação. Barra = 5 cm. (B) Quantificação dos dados mostrados em (A) entre 29 e 37 dias após germinação. Barras de erro indicam D.P. ($n = 11$ plantas). Asterisco indica uma diferença significativa ($P < 0,05$, Teste de Duncan). (C) RT-PCR semi-quantitativo com o RNA total extraído de folhas de plantas com 20 dias após germinação usando 30, (D) 15, 20 e 25 ciclos como indicado no topo da figura. *GADPH* foi usado como controle interno

4.6 *AtCML38* é induzido pelo peptídeo HisAtRALF1

Foi investigado se a adição exógena do peptídeo recombinante HisAtRALF1 poderia afetar a expressão do gene *AtCML38* de plantas selvagens crescidas verticalmente em meio sólido. O RNA total foi extraído exclusivamente de raízes coletadas em diferentes tempos de tratamento e sob diferentes concentrações do peptídeo. Por fim, a expressão da *AtCML38* foi analisada por RT-PCR semi-quantitativo.

O gene *AtCML38* foi rapidamente (30 minutos) induzido (~6 vezes, dado de densitometria) após tratamento com 1 e 5 μM de HisAtRALF1 (Figura 22A). A indução foi transitória, pois o nível de expressão tende a retornar ao seu estado inicial a partir de 3 horas (Figura 22A). Estes dados mostram que o gene *AtCML38* é responsivo e positivamente regulado pelo peptídeo HisAtRALF1 exógeno.

O peptídeo RALF de tabaco promoveu rápida alcalinização (5 minutos) do meio de cultura de células em suspensão de tabaco (PEARCE et al., 2001). Para testar se *AtCML38* responde de maneira rápida, menos que 30 minutos, análises de expressão foram feitas em tempos menores. Um micromolar de HisAtRALF1 induziu (~3 vezes, dado de densitometria) a expressão de *AtCML38* após 10 e 20 minutos de tratamento (Figura 22B), suportando a hipótese de que *AtCML38* seja um gene de resposta imediata ao peptídeo HisAtRALF1 .

Relações de dose resposta são importantes e normalmente indicam uma relevância fisiológica (MUELLER et al., 2012). Neste sentido, para testar se a expressão de *AtCML38* é dose-dependente, foi conduzido um ensaio de dose-resposta. As concentrações de 0,01 e 0,1 μM de HisAtRALF1 afetaram fracamente a expressão de *AtCML38*, após 30 minutos de tratamento (Figura 22C). Entretanto, o nível de transcritos *AtCML38* aumentou progressivamente após a adição de 0,5 e 1 μM de HisAtRALF1 (Figura 22C). Com 5 μM de HisAtRALF1 , o nível de expressão de *AtCML38* diminuiu em relação a 1 μM (Figura 22C), semelhante ao observado com 30 minutos (comparar com Figura 22A). A análise conjunta destes dados mostra que *AtCML38* é um gene responsivo ao peptídeo *AtRALF1*, cuja expressão foi rápida, transitória e dependente de dose.

Figura 22 – Perfil de expressão do gene *AtCML38* em resposta ao tratamento com o peptídeo $_{\text{His}}\text{AtRALF1}$. (A) Raízes de plantas selvagens foram tratadas com 1 e 5 μM de $_{\text{His}}\text{AtRALF1}$. Análise de RT-PCR semi-quantitativo (27 ciclos) foi feita após 30 minutos, 3 e 6 horas de tratamento. Densidade relativa de cada banda está indicada abaixo, onde a densidade do controle negativo (0 μM) foi definida como 1. (B) Raízes de plantas selvagens foram tratadas com 1 μM de $_{\text{His}}\text{AtRALF1}$ e coletadas após 10, 20 e 30 minutos de tratamento para análise de RT-PCR. Densidade relativa de cada banda está indicada abaixo, onde a densidade do tempo zero foi definida como 1. (C) Ensaio de dose resposta com raízes de plantas selvagens tratadas com 0,01, 0,1, 0,5, 1 e 5 μM de $_{\text{His}}\text{AtRALF1}$. Após 30 minutos de tratamento, as raízes foram coletadas para análise de RT-PCR. Densidade relativa de cada banda está indicada abaixo, onde a densidade do controle negativo (0 μM) foi definida como 1. *GAPDH* foi usado como controle interno

5 DISCUSSÃO

O peptídeo hormonal RALF participa do desenvolvimento vegetal, provavelmente regulando o alongamento celular (PEARCE et al., 2001; MINGOSSO et al., 2010; COVEY et al., 2010). Entre as 37 isoformas de RALF presentes em *Arabidopsis*, a isoforma AtRALF1 atua na regulação do desenvolvimento radicular por meio de um mecanismo ainda não caracterizado (MATOS et al., 2008; HARUTA et al., 2008). Para caracterizá-lo o sistema de duplo-híbrido de levedura foi utilizado para encontrar proteínas que poderiam interagir com o peptídeo AtRALF1, e foi isolado um cDNA que codifica uma proteína semelhante a calmodulina de *Arabidopsis* (AtCML38) (FIORI, 2010). Neste trabalho, buscou-se investigar o papel da proteína AtCML38 no mecanismo de ação de AtRALF1. Foi demonstrado que o peptídeo AtRALF1 interage com a proteína AtCML38. Na ausência da AtCML38 o peptídeo AtRALF1 não causa a inibição radicular indicando que esta CML seja essencial para o seu mecanismo de ação.

Os genes *AtRALF1* e *AtCML38* são co-expressos em raízes de *Arabidopsis* (Figura 1). Em tecidos mais maduros, como a parte aérea, a expressão de *AtRALF1* foi nula, enquanto ainda há expressão da *AtCML38*, porém em níveis menores do que os encontrados em raízes (Figura 1). Pode-se supor que, em folhas maduras, a AtCML38 esteja envolvida com outros processos biológicos regulados por Ca^{2+} ou por pH. O ortólogo de *AtCML38* em folhas de tabaco atua como regulador negativo de PTGS em resposta à infecção viral (ANANDALAKSHMI et al., 2000; NAKAHARA et al., 2012). Por outro lado, o gene *AtRALF1* é predominantemente expresso em raízes jovens de *Arabidopsis* (HARUTA et al., 2008), onde a expressão de *AtCML38* foi mais evidente e relacionada ao desenvolvimento (VANDERBELD; SNEDDEN, 2007).

O peptídeo sinal N-terminal do precursor do peptídeo RALF de tabaco direciona-o para o apoplasto através da via secretória convencional (PEARCE et al., 2001; ESCOBAR et al., 2003). A localização sub-celular da AtCML38 não está definida e não pode ser predita *in silico* (Figura 2A e 2B). As análises de localização sub-celular mostram que a proteína AtCML38 está presente no apoplasto (Figura 3, painel 3). A presença de calmodulinas no meio extracelular foi inicialmente relatada em aveia (BIRO et al., 1984). Posteriormente, foi mostrado que AtCaM2 estava

ligada à parede celular e/ou secretada no meio de cultura de células em suspensão de *Arabidopsis* (CUI et al., 2005).

O RE juntamente com o complexo de Golgi (RE-Golgi) constitui basicamente a via secretória convencional (FORESTI; DENECKE, 2008; DENECKE et al., 2012). A AtCML38-eGFP não foi observada de maneira difusa no citoplasma e sim em pequenas estruturas (Figura 4A) que foram confirmadas como o complexo de Golgi por meio do marcador STtmd-mRFP (Figura 4B e 4C), sugerindo que AtCML38 seja uma proteína secretada através da via secretória RE-Golgi. Esta hipótese é suportada pela retenção da proteína AtCML38 no RE e ausência desta no apoplasto, após a adição do tetrapeptídeo KDEL (Figura 5, painel 3). Está bem estabelecido que a adição do peptídeo KDEL no C-terminal de proteínas secretadas causa sua retenção no RE ou o retardo ao longo da via secretória (DENECKE; RYCKE; BOTTERMAN, 1992; PAGNY et al., 1999).

A estrutura primária da proteína AtCML38 não possui um peptídeo sinal N-terminal típico de proteínas secretadas (Figura 2D). A versão truncada da proteína AtCML38, com a extremidade N-terminal deletada (Met1-Ser87), apresentou uma distribuição citosólica, além de não co-localizar com o marcador de complexo de Golgi (Figura 6), indicando que o N-terminal contém uma sequência sinal incomum que a direciona para o apoplasto. O N-terminal da proteína AtCML38 contém uma sequência de 22 aminoácidos (Arg16-Gly37) que está ausente nas proteínas AtCaM2 e AtCML39 (ANEXO C), o que sugere uma sequência de direcionamento não convencional. Porém, outros estudos são necessários para definir se esta sequência sofre modificações pós-traducionais responsáveis pelo direcionamento ou se é o sítio de interação de outras proteínas capazes de direcionar a AtCML38 para a via RE-Golgi. Analogamente, a deleção dos primeiros 24 aminoácidos da proteína AtCML30 causou seu acúmulo no citosol e perda de direcionamento para a mitocôndria. Esta proteína também contém uma extensão N-terminal que se assemelha a uma sequência de direcionamento (CHIGRI et al., 2012). Desta maneira, os resultados indicam que a proteína AtCML38 é direcionada para o apoplasto através da via secretória RE-Golgi, possivelmente por meio de um peptídeo de direcionamento não convencional no N-terminal.

In planta AtRALF1 e AtCML38 interagem no apoplasto de células de tabaco (Figura 7). A observação da interação após 7 dias de transformação reflete o tempo necessário para o processamento e amadurecimento do peptídeo RALF (ESCOBAR

et al., 2003; MATOS et al., 2008). O pH do apoplasto de células vegetais está entre 5,0 e 6,5 (GRIGNON; SENTENAC, 1991; BIBIKOVA et al., 1998). *In vitro* o pH influenciou a interação entre AtCML38 e AtRALF1. Enquanto nenhum peptídeo AtRALF1 foi detectado na interação sob pH 7,5, em pHs menores (5,5 e 6,5) este peptídeo interagiu com AtCML38 (Figura 10C e 10D). O pH também foi essencial para a interação entre a proteína AtCML18 e o transportador do tonoplasto AtNHX1. Os pHs baixos (5,5 e 6,5) melhoraram a ligação entre AtCML18 e AtNHX1, enquanto o pH alto (7,5) a prejudicou (YAMAGUCHI et al., 2005).

Os ensaios *in vitro* demonstraram que a interação entre AtCML38 e AtRALF1 depende de Ca^{2+} (Figura 10A). O peptídeo AtRALF1 não interagiu com a AtCML39 (Figura 10B), apesar desta apresentar 76,1% de identidade de sequência de aminoácidos com AtCML38 (MCCORMACK; BRAAM, 2003). As proteínas AtCML42 e AtCML43 apresentam 79,6% de similaridade, porém AtCML43 não interagiu com a proteína KIC que é o alvo da AtCML42 (MCCORMACK; BRAAM, 2003; DOBNEY et al., 2009). Juntos os resultados mostram que AtRALF1 e AtCML38 interagem no apoplasto de maneira específica e dependente de Ca^{2+} e pH.

O apoplasto, onde AtRALF1 e AtCML38 interagem, é rico em cálcio (CHIN; MEANS, 2000), sugerindo que este íon não seja um fator limitante para a interação. Alterações no pH extracelular, por outro lado, tem sido considerado uma forma de regulação de processos fisiológicos (FELLE, 1998). Caracteristicamente, o peptídeo RALF pode rápida e fortemente alterar o pH extracelular (PEARCE et al., 2001). Pode-se supor que, sob condições fisiológicas, Ca^{2+} livre e pH ácido no apoplasto, o AtRALF1 pode interagir com a AtCML38. A alcalinização causada pelo peptídeo poderia, então, reduzir sua afinidade por AtCML38 funcionando como uma forma de autoregulação.

A relevância biológica da proteína AtCML38 para o efeito inibitório do peptídeo RALF (PEARCE et al., 2001; MATOS et al., 2008) foi investigada avaliando o crescimento dos mutantes *cml38* e *cml39*, defectivos para as proteínas AtCML38 e AtCML39 na presença do peptídeo AtRALF1 (Figura 11). O crescimento radicular de plântulas do mutante *cml38* mostrou-se insensível ao peptídeo AtRALF1 (Figura 12). Enquanto, o crescimento das raízes primárias de plântulas do mutante *cml39* foi inibido pelo peptídeo AtRALF1 semelhantemente as plântulas selvagens (Figura 12). O peptídeo AtRALF1 também inibiu o alongamento do hipocótilo de plântulas do mutante *cml39*, enquanto os hipocótilos do mutante *cml38* mostraram-se insensíveis

ao peptídeo (Figura 13). Juntos, estes resultados indicam que a proteína AtCML38 é requerida pelo peptídeo AtRALF1 para a inibição do crescimento radicular e do alongamento do hipocótilo.

Plantas super-expressando *AtRALF1* e *AtRALF23* apresentam fenótipo semi-anão e redução do crescimento radicular e do alongamento do hipocótilo (MATOS et al., 2008; SRIVASTAVA et al., 2009). O acúmulo do peptídeo AtRALF1 maduro em plantas do híbrido *cm/38/35S:AtRALF1* (Figura 17E), entretanto, não causou a redução do crescimento radicular (Figura 17A e 17B). Além disso, o comprimento das raízes foi maior no mutante *cm/38* que nas plantas selvagens (Figura 17B), enquanto não houve diferença entre raízes do mutante *cm/39* e de plantas selvagens (Figura 18). A redução do alongamento do hipocótilo (Figura 19A e 19B) e o fenótipo semi-anão com redução do crescimento da parte aérea não foram observados no híbrido *cm/38/35S:AtRALF1* (Figuras 20, 21A e 21B). Os dados mostram que na ausência da proteína AtCML38 o crescimento radicular ocorre semelhantemente as plantas selvagens, apesar da super-expressão de AtRALF1, indicando que a proteína AtCML38 desempenha um papel essencial no mecanismo de ação deste peptídeo.

A ausência de interação entre AtCML39 e AtRALF1 *in vitro* (Figura 10B), a sensibilidade do mutante *cm/39* ao peptídeo AtRALF1 (Figuras 12 e 13) e o crescimento radicular normal do mutante *cm/39* (Figura 18), indicam que AtCML39 não esteja associada com a regulação do desenvolvimento radicular desempenhada por AtRALF1. Embora os genes *AtCML38* e *AtCML39* sejam transcritos em raízes de *Arabidopsis* e exista alta similaridade de aminoácidos entre estas CMLs (MCCORMACK; BRAAM, 2003; VANDERBELD; SNEDDEN, 2007). Ambos os genes *AtCaM2* e *AtCaM3* são expressos em pólen, porém apenas *AtCaM2* está especificamente envolvida com a germinação de pólen (LANDONI et al., 2010).

A indução do gene *AtCML38* em raízes de plantas transgênicas super-expressando o peptídeo AtRALF1 (Figura 17C) indica que o gene *AtCML38* é responsivo a este peptídeo. O acúmulo de transcrito *AtCML38* em hipocótilo e folhas do transgênico 35S:AtRALF1 (Figuras 19C e 21C) sugere um efeito pleiotrópico causado pela expressão ectópica de *AtRALF1*. Entretanto, o tratamento de raízes de plantas selvagens com o peptídeo AtRALF1 exógeno induziu o gene *AtCML38* de maneira rápida (10 minutos), transiente e dependente de dose (Figura 22). A super-expressão do precursor da sistemina em folhas de tomate e o tratamento com o

peptídeo sistemina exógeno também induziram um gene *CaM* (BERGEY; RYAN, 1999). O tratamento de plantas de *Arabidopsis* com o peptídeo AtPep1, outro peptídeo hormonal, induziu em 30 minutos os genes dos seus receptores, *PEPR1* e *PEPR2*, e o nível de transcritos retorna gradualmente ao nível inicial ao longo de 4 horas (YAMAGUCHI et al., 2010).

Uma característica de alguns genes *CaM* e *CMLs*, é a indução por toque (BRAAM; DAVIS, 1990; LEE; POLISENSKY; BRAAM, 2005). Lee, Polisensky e Braam (2005) alertam que manipulações de laboratório podem afetar a expressão gênica e, portanto, confundir as análises. Há uma clara diferença entre tempos e tratamentos com peptídeo AtRALF1 (Figura 22), indicando que a manipulação não afetou a expressão de *AtCML38* em raízes. Apesar dos trabalhos terem estudado os genes relacionados ao toque em folhas maduras, não se pode excluir a possibilidade deste estímulo afetar a expressão gênica em raízes.

No modelo proposto para o mecanismo de ação de AtRALF1, a *AtCML38* na presença de Ca^{2+} e de pH adequado, interage com o peptídeo AtRALF1 no apoplasto para estabilizá-lo no seu receptor transmembrana (Figura 23). Tanto o peptídeo RALF quanto a proteína AtCaM2 possuem proteínas transmembrana onde se ligam especificamente (SCHEER; PEARCE; RYAN, 2005; CUI et al., 2005; WANG et al., 2009). Entretanto, para ambos os casos, o receptor não está definido. Cui et al. (2005) e Wang et al. (2009) defendem a ideia que uma calmodulina extracelular funcionaria como um sinal envolvido na regulação do desenvolvimento e crescimento celular mas, não excluem a possibilidade do envolvimento de outros ligantes.

A insensibilidade do mutante *cml38* ao peptídeo AtRALF1 e a restauração do fenótipo selvagem no híbrido *cml38/35S:AtRALF1* mostram *in vivo* que a interação AtRALF1-AtCML38 é essencial para a inibição do crescimento radicular e do alongamento do hipocótilo causado pelo peptídeo AtRALF1. Outras respostas ao peptídeo RALF incluem (Figura 23): (a) ativação direta de uma proteína MAPK (PEARCE et al., 2001); (b) aumento dos níveis de Ca^{2+} citoplasmático, por meio da mobilização de Ca^{2+} extra e intracelular (HARUTA et al., 2008) e (c) aumento do pH extracelular, por meio da inibição direta ou indireta de uma H^+ -ATPase de membrana (PEARCE et al., 2001).

A indução do gene *AtCML38* de maneira direta ou indireta pelo peptídeo AtRALF1 suporta a ideia que este peptídeo requer a proteína AtCML38 para

desencadear seus efeitos hormonais característicos (Figura 23). Qual(ais) via(s) de sinalização e/ou fatores de transcrição que regulam a expressão do gene *AtCML38* em resposta a *AtRALF1* ainda precisa ser definido. Por fim, a *AtCML38* é direcionada, através da via secretória (RE-Golgi) para o apoplasto (Figura 23).

Em resumo, provavelmente este é o primeiro estudo mostrando que um peptídeo hormonal de plantas interage com uma proteína semelhante a calmodulina. Embora, não se saiba se *AtCML38* interage com o ainda desconhecido receptor de *AtRALF1*, este estudo fornece evidências do papel essencial da *AtCML38* no mecanismo de ação do peptídeo *AtRALF1* para regular o desenvolvimento radicular.

Figura 23 – Modelo de ação proposto para o peptídeo *AtRALF1*. O peptídeo *AtRALF1* maduro liga-se a proteína *AtCML38* secretada para promover inibição do crescimento radicular e do alongamento do hipocótilo. Setas representam ativação e linhas com interseção indicam inibição. Para mais detalhes ver a Discussão

6 CONCLUSÕES

- Os genes *AtRALF1* e *AtCML38* são co-expressos em raízes jovens de *Arabidopsis*;
- A proteína AtCML38 é direcionada para a parede celular através da via RE-Golgi;
- A extremidade N-terminal é essencial para o correto direcionamento da proteína AtCML38;
- AtCML38 e AtRALF1 interagem *in planta* no apoplasto de células de tabaco;
- A interação AtCML38-AtRALF1 é específica e dependente de Ca^{2+} e pH;
- O mutante *cm/38* é insensível ao peptídeo AtRALF1 exógeno, enquanto o crescimento das raízes e o alongamento do hipocótilo do mutante *cm/39* é inibido por este peptídeo, mostrando especificidade e um requerimento da proteína AtCML38 para atuação do peptídeo;
- Plantas com o acúmulo do peptídeo AtRALF1 maduro, mas defectivas para a proteína AtCML38 não apresentam fenótipo semi-anão, redução do crescimento radicular e do alongamento do hipocótilo. Isto mostra que AtCML38 é essencial para o mecanismo de ação do peptídeo AtRALF1 na regulação do crescimento e desenvolvimento radicular;
- O gene *AtCML38* é induzido em raízes, hipocótilos estiolados e folhas de plantas com acúmulo do peptídeo AtRALF1 maduro;
- Em raízes de plantas selvagens de *Arabidopsis* a expressão do gene *AtCML38* é rápida e transientemente induzida em resposta ao peptídeo AtRALF1 exógeno de maneira dose-dependente;
- Um modelo de ação do peptídeo hormonal AtRALF1 é proposto. Nele foi incluído a AtCML38 como uma proteína essencial para atuação deste peptídeo.

REFERÊNCIAS

- ALONSO, J.M.; STEPANOVA, A.N.; LEISSE, T.J.; KIM, C.J.; CHEN, H.; SHINN, P.; STEVENSON, D.K.; ZIMMERMAN, J.; BARAJAS, P.; CHEUK, R.; GADRINAB, C.; HELLER, C.; JESKE, A.; KOESEMA, E.; MEYERS, C.C.; PARKER, H.; PREDNIS, L.; ANSARI, Y.; CHOY, N.; DEEN, H.; GERALT, M.; HAZARI, N.; HOM, E.; KARNES, M.; MULHOLLAND, C.; NDUBAKU, R.; SCHMIDT, I.; GUZMAN, P.; AGUILAR-HENONIN, L.; SCHMID, M.; WEIGEL, D.; CARTER, D.E.; MARCHAND, T.; RISSEEUW, E.; BROGDEN, D.; ZEKO, A.; CROSBY, W.L.; BERRY, C.C.; ECKER, J.R. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. **Science**, New York, v. 301, p. 653-657, 2003.
- ANANDALAKSHMI, R.; MARATHE, R.; GE, X.; HERR, J.M.J.; MAU, C.; MALLORY, A.; PRUSS, G.; BOWMAN, L.; VANCE, V.B. A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. **Science**, New York, v. 290, p. 142-144, 2000.
- ARAZI, T.; BAUM, G.; SNEDDEN, W.A.; SHELPS, B.J.; FROMM, H. Molecular and biochemical analysis of calmodulin interactions with the calmodulin-binding domain of plant glutamate decarboxylase. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 108, p. 551-561, 1995.
- BECKER, J.D.; BOAVIDA, L.C.; CARNEIRO, J.; HAURY, M.; FEIJO, J.A. Transcriptional profiling of *Arabidopsis* tissues reveals the unique characteristics of the pollen transcriptome. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 133, p. 713-725, 2003.
- BENDTSEN, J.D.; JENSEN, L.J.; BLOM, N.; VON HEIJNE, G.; BRUNAK, S. Feature based prediction of non-classical and leaderless protein secretion **Protein Engineering Design and Selection**, Oxford, v. 17, p. 349-356, 2004.
- 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.
- BIBIKOVA, T.N.; JACOB, T.; DAHSE, I.; GILROY, S. Localized changes in apoplastic and cytoplasmic pH are associated with root hair development in *Arabidopsis thaliana*. **Development**, Cambridge, v. 125, p. 2925-2934, 1998.
- BIRO, R.L.; DAYE, S.; SERLIN, B.S.; TERRY, M.E.; DATTA, N.; SOPORY, S. K.; ROUX, S.J. Characterization of oat calmodulin and radioimmunoassay of its subcellular distribution. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 75, p. 382-386, 1984.
- BOEVINK, P.; OPARKA, K.; SANTA CRUZ, S.; MARTIN, B.; BETTERIDGE, A.; HAWES, C. Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. **The Plant Journal**, Oxford, v. 15, p. 441-447, 1998.
- BOLWELL, J. Role of active oxygen species and NO in plant defense responses. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 2, p. 287-294, 1995.

BOONBURAPONG, B.; BUABOOCHA, T. Genome-wide identification and analyses of the rice calmodulin and related potential calcium sensor proteins. **BMC Plant Biology**, London, v. 7, p. 4, 2007.

BOUCHÉ, N.; YELLIN, A.; SNEDDEN, W.A.; FROMM, H. Plant-specific calmodulin-binding proteins. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 56, p. 435–466, 2005.

BOUDSOCQ, M.; WILLMANN, M.R.; MCCORMACK, M.; LEE, H.; SHAN, L.; HE, P.; BUSH, J.; CHENG, S-H.; SHEEN, J. Differential innate immune signalling via Ca^{2+} sensor protein kinases. **Nature**, London, v. 464, p. 418–422, 2010.

BOYES, D.C.; ZAYED, A.M.; ASCENZI, R.; MCCASKILL, A.J.; HOFFMAN, N.E.; DAVIS, K.R.; GÖRLACH, J. Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 13, p. 1499–1510, 2001.

BRAAM, J.; DAVIS, R.W. Rain-, wind-, and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in *Arabidopsis*. **Cell**, Maryland Heights, v. 60, p. 357–364, 1990.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, p. 248–254, 1976.

BUTENKO, M.A.; PATTERSON, S.E.; GRINI, P.E.; STENVIK, G.E.; AMUNDSEN, S.S.; MANDAL, A.; AALEN, R.B. 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. 296–307, 2003.

CAO, J.; SHI, F. Evolution of the *RALF* gene family in plants: gene duplication and selection patterns. **Evolutionary Bioinformatics**, Auckland, v. 8, p. 271–292, 2012.

CHEVALIER, E.; LOUBERT-HUDON, A.; MATTON, D.P. 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**, Oxford, v. 73, p. 1019–1033, 2013.

CHIASSEN, D.; EKENGREN, S.K.; MARTIN, G.B.; DOBNEY, S.L.; SNEDDEN, W.A. Calmodulin-like proteins from *Arabidopsis* and tomato are involved in host defense against *Pseudomonas syringae* pv. tomato. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 58, p. 887–897, 2005.

CHIGRI, F.; FLOSDORFF, S.; PILZ, S.; KÖLLE, E.; DOLZE, E.; GIETL, C.; VOTHKNECHT, U.C. The *Arabidopsis* calmodulin-like proteins AtCML30 and AtCML3 are targeted to mitochondria and peroxisomes, respectively. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 78, p. 211–222, 2012.

CHIN, D.; MEANS, A. R. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v. 8, p. 322–328, 2000.

CHINPONGPANICH, A.; WUTIPRADITKUL, N.; THAIRAT, S.; BUABOOCHA, T. Biophysical characterization of calmodulin and calmodulin-like proteins from rice, *Oryza sativa* L. **Acta Biochim Biophys Sin**, Shanghai, v. 43, p. 867-876, 2011.

CHINPONGPANICH, A.; LIMRUENGROJ, K.; PHEAN-O-PAS, S.; LIMPASENI, T.; BUABOOCHA, T. Expression analysis of calmodulin and calmodulin-like genes from rice, *Oryza sativa* L. **BMC Research Notes**, London, v. 5, p. 625, 2012.

CHO, D.; VILLIERS, F.; KRONIEWICZ, L.; LEE, S.; SEO, Y.J.; HIRSCHI, K.D.; LEONHARDT, N.; KWAK, J.M. Vacuolar CAX1 and CAX3 influence auxin transport in guard cells via regulation of apoplastic pH. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 160, p. 1293–1302, 2012.

CLAPHAM, D.E. Calcium signaling. **Cell**, Cambridge, v. 80, p 1041–1058, 2007.

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.

COMBIER, J.P.; KUSTER, H.; JOURNET, E.P.; HOHNJEC, N.; GAMAS, P.; NIEBEL, A. Evidence for the involvement in nodulation of the two small putative regulatory peptide-encoding genes MtRALFL1 and MtDVL1. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 21, p. 1118-1127, 2008.

CONN, S.J.; GILLIHAM, M.; ATHMAN, A.; SCHREIBER, A.W.; BAUMANN, U.; MOLLER, I.; CHENG, N.H.; STANCOMBE, M.A.; HIRSCHI, K.D.; WEBB, A.A.; BURTON, R.; KAISER, B.N.; TYERMAN, S.D.; LEIGH, R.A. Cell-specific vacuolar calcium storage mediated by CAX1 regulates apoplastic calcium concentration, gas exchange, and plant productivity in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 23, p. 240-257, 2011.

COVEY, P.A.; SUBBAIAH, C.C.; PARSONS, R.L.; PEARCE, G.; LAY, F.T.; ANDERSON, M.A.; RYAN, C.A.; BEDINGER, P.A. A pollen-specific RALF from tomato that regulates pollen tube elongation. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 153, p. 703–715, 2010.

CRAMER, G.R.; JONES, R.L. Osmotic stress and abscisic acid reduce cytosolic calcium activities in roots of *Arabidopsis thaliana*. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 19, p. 1291–1298, 1996.

CUI, S.; GUO, X.; CHANG, F.; CUI, Y.; MA, L.; SUN, Y.; SUN, D. Apoplastic calmodulin receptor-like binding proteins in suspension-cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 280, p. 31420–31427, 2005.

CZECHOWSKI, T.; STITT, M.; ALTMANN, T.; UDVARDI, M.K.; SCHEIBLE, W.R. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 139, p. 5-17, 2005.

DAY, I.S.; REDDY, V.S.; ALI, G.S.; REDDY, A.S.N. Analysis of EF-hand-containing proteins in *Arabidopsis*. **Genome Biology**, London, v. 3, p. 1-24, 2002.

DELK, N.A.; JOHNSON, K.A.; CHOWDHURY, N.I.; BRAAM, J. CML24, regulated in expression by diverse stimuli, encodes a potential Ca^{2+} sensor that functions in responses to abscisic acid, daylength, and ion stress. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 139, p. 240–253, 2005.

DENECKE, J.; RYCKE, R.D.; BOTTERMAN, J. Plant and mammalian sorting signals for protein retention in the endoplasmic reticulum contain a conserved epitope. **The EMBO Journal**, London, v. 11, p. 2345-2355, 1992.

DENECKE, J.; ANIENTO, F.; FRIGERIO, L.; HAWES, C.; HWANG, I.; MATHUR, J.; NEUHAUS, J.M.; ROBINSON, D.G. Secretory pathway research: the more experimental systems the better. **The Plant Cell**, Rockville, v. 24, p. 1316-1326, 2012.

DOBNEY, S.; CHIASSON, D.; LAM, P.; SMITH, S.P.; SNEDDEN, W.A. The calmodulin-related calcium sensor CML42 plays a role in trichome branching. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 284, p. 31647-31657, 2009.

DODD, A.N.; KUDLA, J.; SANDERS, D. The language of calcium signaling. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 61, p. 593-620, 2010.

EMANUELSSON, O.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related tools. **Nature Protocols**, London, v. 2, p. 953-971, 2007.

ESCOBAR, N.M.; HAUPT, S.; THOW, G.; 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.

FELLE, H.H. The apoplastic pH of the *Zea mays* root cortex as measured with pH-sensitive microelectrodes: aspects of regulation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 49, p. 987–995, 1998.

FIORI, C.S. **Identificação e caracterização de componentes da via de transdução de sinais do peptídeo hormonal RALF**. 2010. 110 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

FLETCHER, J.C.; BRAND, U.; RUNNING, M.P.; SIMON, R.; MEYEROWITZ, E.M. Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in *Arabidopsis* shoot meristems. **Science**, New York, v. 283, p. 1911-1914, 1999.

FORESTI, O.; DENECKE, J. Intermediate organelles of the plant secretory pathway: identity and function. **Traffic**, Copenhagen, v. 9, p. 1599-1612, 2008.

FRANGIONI, J.V.; NEEL, B.G. Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. **Analytical Biochemistry**, Bethesda, v. 210, p. 179-187, 1993.

GARAY-ARROYO, A.; DE LA PAZ SÁNCHEZ, M.; GARCÍA-PONCE, B.; AZPEITIA, E.; ALVAREZ-BUYLLA, E.R. Hormone symphony during root growth and development. **Developmental Dynamics**, New York, v. 241, p. 1867-1885, 2012.

GERMAIN, H.; CHEVALIER, E.; CARON, S.; MATTON, D.P. Characterization of five RALF-like from *Solanun chacoense* provides support for a developmental role in plants. **Planta**, Berlin, v. 220, p. 447–454, 2005.

GRIGNON, C.; SENTENAC, H. pH and ionic conditions in the apoplast. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 42, p. 103-128, 1991.

HAERIZADEH, F.; WONG, C.E.; BHALLA, P.L.; GRESSHOFF, P.M.; SINGH, M.B. Genomic expression profiling of mature soybean (*Glycine max*) pollen. **BMC Plant Biology**, London, v. 9, p. 25-37, 2009.

HARRISON, S.J.; MOTT, E.K.; PARSLEY, K.; ASPINALL, S.; GRAY, J.C.; COTTAGE, A. A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. **Plant Methods**, London, v. 2, p. 19-25, 2006.

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

HARUTA, M.; MONSHAUSEN, G.; GILROY, S.; SUSSMAN, M.R. A 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.

HELPER, P.K. Calcium: a central regulator of plant growth and development. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, p. 2142-2155, 2005.

HIRSCHI, K.D. The calcium conundrum. Both versatile nutrient and specific signal. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 136, p. 2438–2442, 2004.

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

KASAJIMA, I.; IDE, Y.; OHKAMA-OHTSU, N.; HAYASHI, H.; YONEYAMA, T.; FUJIWARA, T. A protocol for rapid DNA extraction from *Arabidopsis thaliana* for PCR analysis. **Plant Molecular Biology Reporter**, Ottawa, v. 22, p. 49-52, 2004.

KIM, C.Y.; BOVE, J.; ASSMANN, S.M. Overexpression of wound-responsive RNA-binding proteins induces leaf senescence and hypersensitive-like cell death. **New Phytologist**, London, v. 180, p. 57-70, 2008.

KOHLER, C.; NEUHAUS, G. Characterisation of calmodulin binding to cyclic nucleotide-gated ion channels from *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 471, p. 133–136, 2000.

KUDLA, J.; BATISTIC, O.; HASHIMOTO, K. Calcium signals: the lead currency of plant information processing. **The Plant Cell**, Rockville, v. 22, p. 541–563, 2010.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680–685, 1970.

LAKATOS, L.; SZITTYA, G.; SILHAVY, D.; BURGYÁN, J. Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. **The EMBO Journal**, London, v. 23, p. 876–884, 2004.

LAMESCH, P.; BERARDINI, T.Z.; LI, D.; SWARBRECK, D.; WILKS, C.; SASIDHARAN, R.; MULLER, R.; DREHER, K.; ALEXANDER, D.L.; GARCIA-HERNANDEZ, M.; KARTHIKEYAN, A.S.; LEE, C.H.; NELSON, W.D.; PLOETZ, L.; SINGH, S.; WENSEL, A.; HUALA, E. The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 40, p. D1202-D1210, 2012.

LANDONI, M.; DE FRANCESCO, A.; GALBIATI, M.; TONELLI, C. A loss-of-function mutation in Calmodulin2 gene affects pollen germination in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 74, p. 235-247, 2010.

LEBA, L.J.; CHEVAL, C.; ORTIZ-MARTÍN, I.; RANTY, B.; BEUZÓN, C.R.; GALAUD, J.P.; ALDON, D. CML9, an *Arabidopsis* calmodulin-like protein, contributes to plant innate immunity through a flagellin-dependent signalling pathway. **The Plant Journal**, Oxford, v. 71, p. 976–989, 2012.

LEE, D.; POLISENSKY, D.H.; BRAAM, J. Genome-wide identification of touch- and darkness-regulated *Arabidopsis* genes: a focus on calmodulin-like and XTH genes. **New Phytologist**, London, v. 165, p. 429-44, 2005.

LETUNIC, I.; DOERKS, T.; BORK, P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 40, p. D302–D305, 2012.

LI, Y.; NIE, C.; CAO, J. Isolation and characterization of a novel BcMF14 gene from *Brassica campestris* ssp. *chinensis*. **Molecular Biology Reports**, Secaucus, v. 38, p. 1821–1829, 2011.

MA, W.; SMIGEL, A.; TSAI, Y-C.; BRAAM, J.; BERKOWITZ, G.A. Innate immunity signaling: cytosolic Ca²⁺ elevation is linked to downstream nitric oxide generation through the action of calmodulin or a calmodulin-like protein. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 148, p. 818–828, 2008.

MAGNAN, F.; RANTY, B.; CHARPENTEAU, M.; SOTTA, B.; GALAUD, J.P.; ALDON, D. Mutations in AtCML9, a calmodulin-like protein from *Arabidopsis thaliana*, alter plant responses to abiotic stress and abscisic acid. **The Plant Journal**, Oxford, v. 56, p. 575–589, 2008.

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**, Amsterdam, 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 United States of America**, Washington, v. 93, p. 7623–7627, 1996.

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

MATSUZAKI, Y.; OGAWA-OHNISHI, M.; MORI, A.; MATSUBAYASHI, Y. Secreted peptide signals required for maintenance of root stem cell niche in *Arabidopsis*. **Science**, New York, v. 329, p. 1065–1067, 2010.

MCAINSH, M.R.; PITTMAN, J.K. Shaping the calcium signature. **New Phytologist**, London, v. 181, p. 275–294, 2009.

MCCORMACK, E.; BRAAM, J. Calmodulins and related potential calcium sensors of *Arabidopsis*. **New Phytologist**, Oxford, v. 159, p. 585–598, 2003.

MCCORMACK, E.; TSAI, Y.C.; BRAAM, J. Handling calcium signaling: *Arabidopsis* CaMs and CMLs. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 10, p. 383–389, 2005.

MCCUBBIN, A.G.; LEE, C.; HETRICK, A. Identification of genes showing differential expression between morphs in developing flowers of *Primula vulgaris*. **Sexual Plant Reproduction**, New York, v. 19, p. 63–72, 2006.

MEINDL, T.; BOLLER, T.; FELIX, G. The plant wound hormone systemin binds with the N-terminal part to its receptor but needs the C-terminal part to activate it. **The Plant Cell**, Rockville, v. 10, p. 1561–570, 1998.

MINGOSS, 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.

MUELLER, K.; CHINCHILLA, D.; ALBERT, M.; JEHL, A.K.; KALBACHER, H.; BOLLER, T.; FELIX, G. Contamination risks in work with synthetic peptides: flg22 as an example of a pirate in commercial peptide preparations. **The Plant Cell**, Rockville, v. 24, p. 3193–3197, 2012.

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

MURPHY, E.; SMITH, S.; SMETA, I.D. Small signaling peptides in *Arabidopsis* development: how cells communicate over a short distance. **The Plant Cell**, Rockville, v. 24, p. 3198–3217, 2012.

NAKAHARA, K.S.; MASUTA, C.; YAMADA, S.; SHIMURA, H.; KASHIHARA, Y.; WADA, T.S.; MEGURO, A.; GOTO, K.; TADAMURA, K.; SUEDA, K.; SEKIGUCHI, T.; SHAO, J.; ITCHODA, N.; MATSUMURA, T.; IGARASHI, M.; ITO, K.; CARTHEW, R.W.; UYEDA, I. Tobacco calmodulin-like protein provides secondary defense by binding to and directing degradation of virus RNAsilencing suppressors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, p. 10113–10118, 2012.

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.

OSTERRIEDER, A.; HUMMEL, E.; CARVALHO, C.M.; HAWES, C. Golgi membrane dynamics after induction of a dominant-negative mutant Sar1 GTPase in tobacco. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 61, p. 405–422, 2010.

PAGNY, S.; LEROUGE, P.; FAYE, L.; GOMORD, V. Signals and mechanisms for protein retention in the endoplasmic reticulum. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 50, p. 157–164, 1999.

PARK, H.C.; PARK, C.Y.; KOO, S.C.; CHEONG, M.S.; KIM, K.E.; KIM, M.C.; LIM, C.O.; LEE, S.Y.; YUN, D.J.; CHUNG, W.S. AtCML8, a calmodulin-like protein, differentially activating CaM-dependent enzymes in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 29, p. 1297–304, 2010.

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

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

PEARCE, G.; YAMAGUCHI, Y.; MUNSKE, G.; RYAN, C.A. Structure–activity studies of RALF, Rapid Alkalinization Factor, reveal an essential – YISY – motif. **Peptides**, New York, v. 31, p. 1973–1977, 2010.

PEROCHON, A.; ALDON, D.; GALAUD, J.P.; RANTY, B. Calmodulin and calmodulin-like proteins in plant calcium signaling. **Biochimie**, Paris, v. 93, p. 2048–2053, 2011.

PEROCHON, A.; DIETERLE, S.; POUZET, C.; ALDON, D.; GALAUD, J.P.; RANTY, B. Interaction of a plant pseudo-response regulator with a calmodulin-like protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 398, p. 747-751, 2010.

PETERSEN, T.N.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, London, v. 8, p. 785-786, 2011.

PETRICKA, J.J.; WINTER, C. M.; BENFEY, P.N. Control of *Arabidopsis* root development. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 63, p. 563-590, 2012.

POPESCU, S.C.; POPESCU, G.V.; BACHAN, S.; ZHANG, Z.; SEAY, M.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M.; DINESH-KUMAR, S.P. Differential binding of calmodulin-related proteins to their targets revealed through high-density *Arabidopsis* protein microarrays. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, p. 4730–4735, 2007.

PUIG, J.; PAULUZZI, G.; GUIDERDONI, E.; GANTET, P. Regulation of shoot and root development through mutual signaling. **Molecular Plant**, Oxford, v. 5, p. 974-983, 2012.

RYAN, C.A.; PEARCE, G.; SCHEER, J.; MOURA, D.S. Polypeptide hormones. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. S251–S264, 2002.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 3 v.

SANDERS, D.; BROWNLEE, C.; HARPER, J.F. Communicating with calcium. **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, p. 691–706, 1999.

SATTELMACHER, B. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. **New Phytologist**, London, v. 149, p. 167–172, 2001.

SCHEER, J.M.; PEARCE, G.; RYAN, C.A. 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**, Berlin, v. 221, p. 667–674, 2005.

SCHOPFER, C.R.; NASRALLAH, M.E.; NASRALLAH, J.B. The male determinant of self-incompatibility in Brassica. **Science**, New York, v. 286, p. 1697-700, 1999.

SILVERSTEIN, K.A.T.; MOSKAL, W.A.; WU, H.C.; UNDERWOOD, B.A.; GRAHAM, M.A.; TOWN, C.T.; VANDENBOSCH, K.A. Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. **The Plant Journal**, Oxford, v. 51, p. 262-280, 2007.

SPARKES, I.A.; RUNIONS, J.; KEARNS, A.; HAWES, C. Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. **Nature Protocols**, London, v. 1, p. 2019-2025, 2006.

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.

STRATMANN, J.; SCHEER, J.M.; RYAN, C.A. 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 of the United States of America**, Washington, v. 97, p. 8862–8867, 2000.

SUGANO, S.S.; SHIMADA, T.; IMAI, Y.; OKAWA, K.; TAMAI, A.; MORI, M.; HARA-NISHIMURA, I. Stomagen positively regulates stomatal density in *Arabidopsis*. **Nature**, London, v. 463, p. 241–244, 2010.

TOPPING, J.F.; LINDSEY, K. Promoter trap markers differentiate structural and positional components of polar development in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, p. 1713–1725, 1997.

TSAI, Y.-C.; DELK, N.A.; CHOWDHURY, N.I.; BRAAM, J.B. Arabidopsis potential calcium sensors regulate nitric oxide levels and the transition to flowering. **Plant Signaling and Behavior**, Georgetown, v. 2, p. 446–454, 2007.

TSAI, Y.-C.; KOO, Y.; DELK, N.A.; GEHL, B.; BRAAM, J. Calmodulin-related CML24 interacts with ATG4b and affects autophagy progression in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 73, p. 325–335, 2013.

VADASSERY, J.; REICHEL, M.; HAUSE, B.; GERSHENZON, J.; BOLAND, W.; MITHÖFER, A. CML42-Mediated calcium signaling coordinates responses to *Spodoptera* herbivory and abiotic stresses in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 159, p. 1159–1175, 2012.

VAN DE SANDE, D.; PAWLOWSKI, K.; CZAJA, I.; WIENEKE, J.; SCHELL, J.; SCHMIDT, J.; WALDEN, R.; MATVIENKO, M.; WELLINK, J.; VAN KAMMEN, A.; FRANSSEN, J.; BISSELING, T. Modification of phytohormone response by a peptide encoded by ENOD40 of legumes and a nonlegume. **Science**, New York, v. 273, p. 370–373, 1996.

VAN DER BELD, B.; SNEDDEN, W.A. Developmental and stimulus-induced expression patterns of *Arabidopsis* calmodulin-like genes *CML37*, *CML38* and *CML39*. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 64, p. 683–697, 2007.

VERT, G.; CHORY, J. Crosstalk in cellular signaling: background noise or the real thing? **Developmental Cell**, Cambridge, v. 21, p. 985–991, 2011.

VOINNET, O.; RIVAS, S.; MESTRE, P.; BAULCOMBE, D. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. **The Plant Journal**, Oxford, v. 33, p. 949–956, 2003.

WAADT, R.; KUDLA, J. In planta visualization of protein interactions using bimolecular fluorescence complementation (BiFC). **Cold Spring Harbor Protocols**, New York, 2008. doi: 10.1101/pdb.prot4995.

WALTER, M.; CHABAN, C.; SCHUTZE, K.; BATISTIC, O.; WECKERMANN, K.; NAKE, C.; BLAZEVIC, D.; GREFEN, C.; SCHUMACHER, K.; OECKING, C.; HARTER, K.; KUDLA, J. Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. **The Plant Journal**, Oxford, v. 40, p. 428–438, 2004.

WANG, Q.; CHEN, B.; LIU, P.; ZHENG, M.; WANG, Y.; CUI, S.; SUN, D.; FANG, X.; LIU, C.M.; LUCAS, W.J.; LIN, J. Calmodulin binds to extracellular sites on the plasma membrane of plant cells and elicits a rise in intracellular calcium concentration. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 284, p. 12000–12007, 2009.

WANG, Y.; WANG, B.; GILROY, S.; CHEHAB, E.W.; BRAAM, J. CML24 is involved in root mechanoresponses and cortical microtubule orientation in *Arabidopsis*. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 30, p. 467–479, 2011.

WEIGEL, D.; GLAZEBROOK, J. **Arabidopsis: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2002. 354 p.

WHITE, P.J. The pathways of calcium movement to the xylem. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 891–899, 2001.

WHITE, P.J.; BROADLEY, M.R. Calcium in plants. **Annals of Botany**, Oxford, v. 92, p. 487–511, 2003.

WHITFORD, R.; FERNANDEZ, A.; TEJOS, R.; PÉREZ, A.C.; KLEINE-VEHN, J.; VANNESTE, S.; DROZDZECKI, A.; LEITNER, J.; ABAS, L.; AERTS, M.; HOOGEWIJS, K.; BASTER, P.; DE GROODT, R.; LIN, Y.C.; STORME, V.; VAN DE PEER, Y.; BEECKMAN, T.; MADDER, A.; DEVREESE, B.; LUSCHNIG, C.; FRIML, J.; HILSON, P. GOLVEN secretory peptides regulate auxin carrier turnover during plant gravitropic responses. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 22, p. 678–685, 2012.

WINTER, D.; VINEGAR, B.; NAHAL, H.; AMMAR, R.; WILSON, G.V.; PROVART, N. J. An “electronic fluorescent pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 2, p. e718, 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 attenuata*, is required for root hair development and plant growth in native soils. **The Plant Journal**, Oxford, v. 52, p. 877–890, 2007.

XU, G.Y.; ROCHA, P.S.; WANG, M.L.; XU, M.L.; CUI, Y.C.; LI, L.Y.; ZHU, Y.X.; XIA, X. A novel rice calmodulin-like gene, *OsMSR2*, enhances drought and salt tolerance and increases ABA sensitivity in *Arabidopsis*. **Planta**, Berlin, v. 234, p. 47–59, 2011.

YAMADA, M.; SAWA, S. The roles of peptide hormones during plant root development. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 16, p. 56-61, 2013.

YAMAGUCHI, T.; AHARON, G.S.; SOTTOSANTO, J.B.; BLUMWALD, E. Vacuolar Na^+/H^+ antiporter cation selectivity is regulated by calmodulin from within the vacuole in a Ca^{2+} - and pH-dependent manner. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, p. 16107–16112, 2005.

YAMAGUCHI, Y.; HUFFAKER, A.; BRYAN, A.C.; TAX, F.E.; RYAN, C.A. PEPR2 is a second receptor for the Pep1 and Pep2 peptides and contributes to defense responses in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 22, p. 508-522, 2010.

YANG, C.-J.; ZHANG, C.; LU, Y.-N.; JIN, J.-Q.; WANG, X.-L. The mechanisms of brassinosteroids action: from signal transduction to plant development. **Molecular Plant**, Oxford, v. 4, p. 588–600, 2011.

YANG, T.; POOVAIAH, B. W. Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 8, p. 505-512, 2003.

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

ANEXOS

ANEXO A - Lista com sequência de iniciadores usados neste estudo

Iniciador	Sequência (5'-3')	Objetivo
AtCML38-fwd	ATGAAGAATAATACTCAACCTCAATCATC	Genotipagem e RT-PCR
AtCML38-rev	TTAGCGCATCATAAGAGCAAACCTC	
AtCML39-fwd	ATGAAGAACAACCTCAACGTCAGTTATC	
AtCML39-rev	TTAGCGCATCATGAGGGCGAACTC	
AtRALF1-fwd	ATGGACAAGTCCTTTACTCTGTTCTTAACT	
AtRALF1-rev	CTAACTCCTGCAACGAGCAATTTTG	
AtRALF34-fwd	ATGGCAGCTTCGTCTCTCAATCTC	
AtRALF34-rev	CTATCTCCGGCATCGAGTGATC	
GAPDH-fwd	TTGGTGACAACAGGTCAAGCA	
GAPDH-rev	AAACTTGTCGCTCAATGCAATC	
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTCGGAAC	
CLC2-fwd	CCGTCCGAGATGGAAT CAGATGAG	
CLC2-rev	CTCTCTGTTAGCTGCTTTGTTGTTTTCAC	
AtRALF1- <i>Bam</i> HI-fwd	TCT GGATCC ATGGACAAGTCCTTTACTCTGTTC	Clonagem para BiFC
AtRALF1- <i>Kpn</i> I-rev	TCT GGTACC ACTCCTGCAACGAGCAATT	
AtCML38- <i>Ascl</i> -fwd	TATA AGGCGCGCC ATGAAGAATAATACTC	
AtCML38- <i>Xho</i> I- rev	TATA ACTCGAG GCGCATCATAAGAGCA	
AtCML38- pENTR-fwd	CACCAT GAAGAATAATACTCAACCTCAA	Clonagem para fusão a eGFP, His e GST
AtCML38-rev	TTAGCGCATCATAAGAGCAAACCTC	
AtCML38- (sem stop codon)-rev	GCGCATCATAAGAGCAAACCTCAT	
AtCML38- eGFP-KDEL- rev	TTAG AGTTTCATCCTT CTTGTACAGCTCG	
AtCML38 ^{ΔN} - eGFP-fwd	CACCAT GGATACGGACGGAGATG	
AtCML39- pENTR-fwd	CACCAT GAAGAACAACCTCAACGTCAGTTATC	
AtCML39-rev	TTAGCGCATCATGAGGGCGAACTC	
AtRALF1- <i>Ned</i> I- fwd	GGG CATATG GCGACCACAAAATACAT	
AtRALF1- <i>Hind</i> III-rev	TTG AAGCTT CTAACTCCTGCAACGAGCAAT	

ANEXO B – Precursor do peptídeo AtRALF1. (A) Representação esquemática do precursor preproAtRALF1. O precursor tem 120 aminoácidos, que incluem um peptídeo sinal N-terminal (Pre), e 49 aminoácidos no C-terminal representando o peptídeo maduro. (B) Estrutura primária de preproAtRALF1, indicando o peptídeo sinal (Met1-Ala26), sítio dibásico (Arg68-Arg69, underline), peptídeo maduro (Ala72-Ser120), domínio YISY (underline) e uma leucina (underline). (C) Modelo da estrutura secundária do peptídeo AtRALF1 maduro de *Arabidopsis*, indicando as duas pontes dissulfeto, e em negrito o domínio YISY e o resíduo de leucina

A

B

1 26
MDKSFTLFLTLILVVFIISSPPVQAGFANDLGGVAWATTGDNGSGCHGSI

69 72
AECIGAEEMDSEINRRILATTKYISYQSLKRNSVPCSRRGASYNCQNG

120
AQANPYSRGCSKIARCRS

C

ANEXO C – Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos das proteínas AtCaM2, AtCML38 e AtCML39 de *Arabidopsis*. O alinhamento foi realizado usando o programa CLC Sequence Viewer 6. As barras acima dos resíduos de aminoácidos indicam os domínios de ligação ao Ca^{2+} , *EF-hand* (EFh). O gráfico de barras indica a conservação de cada resíduo de aminoácido

ANEXO D – Controles negativos dos ensaios de BiFC. A fluorescência da YFP gerada pela combinação das construções bZIP63-YFP^N e bZIP63-YFP^C foi usada como controle positivo, o qual é observado no núcleo. O sinal fluorescente da YFP não foi detectado em folhas de *N. benthamiana* agroinfiltradas com as combinações de vetores indicadas na figura e a proteína p19. YFP^N e YFP^C são vetores vazios. YFP, sinal fluorescente da YFP. Clorofila, sinal fluorescente da clorofila. DIC, microscopia de contraste de interferência diferencial. Sobreposição, imagens de fluorescência da YFP, Clorofila e DIC sobrepostas. As barras indicam a escala (20 µm)

ANEXO E – Ensaio de *dot blot* para titulação de anticorpo policlonal anti-AtCML38. As proteínas purificadas GST, GST-AtCML38 e GST-AtCML39 foram plotadas em diferentes quantidades (100, 200 e 300 ng) em membrana de nitrocelulose, e incubadas com diluições (indicado acima de cada membrana) do anticorpo anti-AtCML38

ANEXO F – Análise de expressão de *AtCML38* em folhas de linhas transgênicas transformadas com a construção 35S:*AtCML38* e planta selvagem (WT). (A) RT-PCR semi-quantitativo de 9 linhas (L1-9) independentes na geração T1. O número de ciclos usado na RT-PCR está indicado acima de cada gel. M, marcador. (B) RT-PCR de 17 indivíduos (L1-17) independentes na geração T2. O número de ciclos usado nas PCR está indicado acima de cada gel

A

B