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

Interação do AtRALF1 com o receptor quinase1 associado ao BRI1 (BAK1)

Keini Dressano

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

Piracicaba
2015

Keini Dressano
Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas

Interação do AtRALF1 com o receptor quinase1 associado ao BRI1 (BAK1)

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

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

Piracicaba
2015

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

Dressano, Keini

Interação do AtRALF1 com o receptor quinase1 associado ao BRI1 (BAK1) / Keini
Dressano. - - Piracicaba, 2015.
126 p. : il.

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

1. Peptídeo hormonal 2. RALF 3. Brassinosteróides 4. BAK1 5. Expansão celular
6. Inibição do crescimento radicular I. Título

CDD 581.19256
D773i

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

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais Walter e Lenita, ao meu marido Paulo, à minha família e aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador, professor Daniel Scherer de Moura, pela incrível oportunidade, por todos os ensinamentos e por me lapidar profissionalmente;

Aos professores Helaine Carrer, Márcio de Castro Silva Filho e Lázaro Peres, pela disponibilização de seus laboratórios, o que foi fundamental para a realização de muitos experimentos;

A pesquisadora Dra. Joanne Chory, do SALK Institute (CA), por me receber durante 6 meses em seu laboratório, permitindo assim a realização de vários experimentos e por disponibilizar uma ampla coleção de mutantes de arabidopsis. Ao seu pós-doutorando Jonathan Gilkerson, que me auxiliou muito neste tempo e a todos os demais estudantes, por toda a ajuda, conselhos, amizade e gentileza;

Aos técnicos de laboratório Antônio Amaral, Valentina de Fátima e Cássia Regina, por todo o auxílio com os experimentos;

Aos meus pais Walter e Lenita, por todo o amor e educação, por me ensinarem a ser quem sou e por não medirem esforços para fazer tudo o que puderam para me ver feliz; e a minha falecida avó Helena, por todo o amor e carinho;

Ao meu marido Paulo, por todo o companheirismo e amor, por me ajudar nos meus experimentos, dar excelentes ideias e principalmente, por ser minha fonte de inspiração. E à sua família, que hoje também se tornou minha, por me receberem de "braços abertos" e por todo o carinho.

As minhas amadas amigas "Esalqueanas", Aline Bombo, Aline Guidolin, Eveline Calderan, Juliana Matos, Mariana da Silva Azevedo e Thais Degasperi, por estarem sempre ao meu lado; e as inseparáveis amigas Bruna Rossin, Carolina Nobile, Jacqueline Lafratta, Kellyn de Almeida, Mariana Beraldo e Tathiane Zulini, por todo o apoio e amizade sincera.

Ao pessoal do laboratório de Bioquímica de Proteínas, Akemi, Ana, Bianca, Juan, Larissa, Lucas, Marina e Tabata, por todos os momentos compartilhados. E

principalmente, aos grandes amigos Fausto Andrés Ortiz Morea e Wellington Ferreira Campos, pela parceria e pelas risadas.

A todos os demais professores, funcionários e colegas não citados, que também foram muito importantes para a realização deste trabalho.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pela bolsa concedida. Ao CNPq e CAPES, pelo financiamento para pesquisas em nosso laboratório.

À ESALQ (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"), por toda a infraestrutura disponibilizada.

EPÍGRAFE

“Não deixe que a saudade sufoque, que a rotina acomode, que o medo impeça de tentar. Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando, porque embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu.”

Luis Fernando Veríssimo

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Interação dos hormônios vegetais clássicos com seus receptores	21
2.2 Interação dos “novos” hormônios vegetais com seus receptores	23
2.2.1 Brassinosteróides	25
2.2.1.1 BAK1	27
2.3 Peptídeos hormonais e seus receptores	28
2.4 Peptídeo hormonal RALF	30
2.5 Relação do peptídeo RALF com hormônios vegetais	33
2.5.1 Relação do peptídeo RALF com brassinosteróides	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Material vegetal e condições de crescimento	35
3.2 Extração de DNA genômico de arabidopsis	35
3.3 Extração de RNA total de arabidopsis e síntese de cDNA	35
3.4 Transformação de <i>Escherichia coli</i>	36
3.4.1 Preparação de células eletrocompetentes de <i>E. coli</i>	36
3.4.2 Eletroporação de <i>E. coli</i>	37
3.5 Extração de DNA plasmidial de <i>E. coli</i>	37
3.6 Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	38
3.6.1 Preparação de células eletrocompetentes de <i>A. tumefaciens</i>	38
3.6.2 Eletroporação de <i>A. tumefaciens</i>	38
3.7 Produção e purificação dos peptídeos AtRALFs	38

3.8 Inibição de crescimento de raiz primária com AtRALF1 em meio líquido	40
3.9 Inibição do crescimento de raiz primária de plantas de arabidopsis em placa vertical	40
3.10 Obtenção e análises genética/fenotípica de plantas híbridas de arabidopsis ..	41
3.11 Extração e isolamento do peptídeo AtRALF1 maduro de plantas de arabidopsis	41
3.12 <i>Western blot</i> para detecção das proteínas	42
3.13 Inibição de alongamento de hipocótilo com AtRALF1.....	42
3.14 Análise da expansão celular: medições do comprimento celular na endoderme de raiz primária de arabidopsis	43
3.15 Digestão e purificação de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose	43
3.16 Clonagem e ensaio de duplo híbrido em leveduras	44
3.17 Confirmação da produção das proteínas em levedura	44
3.18 Produção e identificação da proteína BAK1 (domínio extracelular).....	45
3.18.1 Clonagem, purificação e análise em HPLC da proteína BAK1 (domínio extracelular)	45
3.18.2 Digestão da proteína BAK1 (domínio extracelular) com tripsina e análise por espectrometria de massas	46
3.19 Ensaio de co-imunoprecipitação das proteínas recombinantes BAK1 e AtRALF1 <i>in vitro</i>	46
3.20 Construção do plasmídeo p35S-BAK1:GFP	47
3.21 Transformação transiente de células foliares de <i>Nicotiana benthamiana</i>	47
3.22 Ensaio de co-imunoprecipitação entre AtRALF1 e BAK1:GFP	48
3.23 Análise de expressão de genes induzidos por AtRALF1 por PCR semiquantitativo	48
3.24 Análise de expressão de genes induzidos por AtRALF1 por PCR quantitativo (qRT-PCR)	49
3.25 Análise do pH da rizosfera através de gel indicador	49
3.26 Ensaio de sensibilidade de plantas ao LiCl	50

3.27 Ensaio de mobilização de Ca^{2+}	50
3.28 Marcação e purificação dos peptídeos AtRALF1 e AtRALF34 com éster de acridínio	50
3.29 Ligação de acriAtRALF1 e acriAtRALF34 em plantas de arabidopsis.....	51
3.30 Análises estatísticas	52
4 RESULTADOS	53
4.1 Efeito do AtRALF1 na inibição da raiz primária de mutantes da via dos brassinosteróides	53
4.2 Hipocótilos de mutantes <i>bak1</i> apresentam menor sensibilidade ao AtRALF1	63
4.3 AtRALF1 requer BAK1 para inibir a expansão celular em raiz	64
4.4 AtRALF1 interage com o domínio extracelular de BAK1 no sistema de duplo-híbrido em levedura	66
4.5 AtRALF1 interage com BAK1 <i>in vitro</i>	70
4.5.1 Produção e purificação da proteína recombinante BAK1 (domínio extracelular)	70
4.5.2 Ensaio de co-imunoprecipitação entre AtRALF1 e BAK1DE-HA <i>in vitro</i>	71
4.6 O fenótipo semi-anão de plantas que superexpressam AtRALF1 é dependente da proteína BAK1	73
4.7 Genes responsivos a AtRALF1 não são induzidos em mutantes <i>bak1</i>	77
4.8 AtRALF1 induz a expressão de <i>BAK1</i>	79
4.9 Envolvimento de BAK1 com a alcalinização do meio extracelular e a mobilização de Ca^{2+}	81
4.10 A ligação do peptídeo AtRALF1 marcado com éster de acridínio é menor em mutantes <i>bak1</i> em relação a plantas selvagens	85
5 DISCUSSÃO	91
6 CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS	99
ANEXOS	117

RESUMO

Interação do AtRALF1 com o receptor quinase1 associado ao BRI1 (BAK1)

Os peptídeos hormonais vegetais, que vêm sendo caracterizados em plantas desde a década de 90, podem estar relacionados com defesa, reprodução, crescimento e desenvolvimento de plantas. O peptídeo RALF (*Rapid Alkalinization Factor*), ubíquo no reino vegetal, está envolvido com o desenvolvimento de plantas. Em *arabidopsis* há 37 genes que codificam peptídeos RALF (AtRALFs). A isoforma mais estudada é a AtRALF1, a qual regula de maneira negativa a expansão celular, inibindo o crescimento de raiz primária e o alongamento de hipocótilo quando aplicado exogenamente. Recentemente, demonstrou-se a existência de uma relação antagônica entre AtRALF1 e a via de brassinosteróides (BRs) no desenvolvimento de raízes. Quando mutantes da via de sinalização do BR foram avaliados quanto a sua resposta ao peptídeo AtRALF1, descobriu-se que mutantes para o receptor quinase1 associado ao BRI1 (*bak1*) são insensíveis a AtRALF1. Experimentos utilizando o sistema de duplo híbrido em levedura, a co-imunoprecipitação e a indução de genes marcadores em mutantes *bak1* foram realizados e confirmaram o envolvimento da proteína BAK1 na percepção do peptídeo. Plantas transgênicas que superexpressam AtRALF1 apresentam um fenótipo semi-anão, no entanto, quando as mesmas foram cruzadas com o mutante *bak1*, suas progênes apresentaram um fenótipo similar ao de plantas selvagens. Ainda, quando plantas deste cruzamento foram novamente cruzadas com plantas selvagens, plantas com fenótipo semi-anão foram observadas na prole. Ensaio de ligação usando o peptídeo AtRALF1 marcado com éster de acridínio foram realizados e mostraram que em mutantes *bak1*, a ligação do AtRALF1 é menor em aproximadamente 30% quando comparada com plantas selvagens. Os dados obtidos mostram que a proteína BAK1 interage fisicamente com o AtRALF1, está envolvida na percepção do peptídeo, é essencial para a inibição do crescimento da raiz primária causada pelo AtRALF1 e é necessária para a indução dos genes responsivos ao AtRALF1.

Palavras-chave: Peptídeo hormonal; RALF; Brassinosteróides; BAK1; Expansão celular; Inibição do crescimento radicular

ABSTRACT

Interaction of AtRALF1 with the BRI1-associated receptor kinase1 (BAK1)

The plant peptides, which have been characterized in plants since the 90's, can be related to defense, reproduction, growth and development of plants. The RALF (Rapid Alkalinization Factor) peptide, ubiquitous in the plant kingdom, is related to the development of plants. In arabidopsis plants, there are 37 genes encoding RALF peptides (AtRALFs). AtRALF1 is the most studied isoform, which negatively regulate cell expansion, inhibiting primary root growth and hypocotyl elongation when it is applied exogenously. Recently, an antagonistic relationship between AtRALF1 and the brassinosteroids (BRs) to control root development had been demonstrated. When the response of mutants related to the BR signaling pathway to AtRALF1 peptide was investigated, it was found that mutants lacking the BRI1-associated receptor kinase1 (*bak1*) are insensitive to AtRALF1. Experiments using the two-hybrid system in yeast, co-immunoprecipitation, and the induction of marker genes in *bak1* mutants were carried out, and confirmed the involvement of the BAK1 protein in the perception of AtRALF1 peptide. Transgenic plants overexpressing AtRALF1 are semi-dwarf. However, when those transgenic plants were crossed with *bak1* mutant, their progeny showed a wild-type phenotype. Besides, when plants from this progeny were crossed again with wild-type plants, semi-dwarf phenotype plants were obtained in the offspring. Binding assays using AtRALF1 labeled with acridinium-ester were performed, and showed that in *bak1* mutants, the AtRALF1 binding was reduced approximately 30% when compared to wild-type plants. All data indicate that BAK1 protein interacts physically with AtRALF1, it's involved with the peptide perception, essential for the primary root growth inhibition caused by AtRALF1, and required to the induction of genes responsive to AtRALF1.

Keywords: Hormonal peptide; RALF; Brassinosteroids; BAK1; Cell expansion; Inhibition of root growth

LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS E SEUS RESPECTIVOS SIGNIFICADOS

Abreviação ou símbolo	Significado
BR	Brassinosteróide
BL	Brassinolide
E	Einstein
°C	Graus Celsius
L	Litro
d	Dia
h	Hora
min	Minuto
s	Segundo
Ω	Ohm
F	Farad
kV	kilovolt
g	Gramma
x g	Aceleração da gravidade
rpm	Rotação por minuto
U	Unidade
ABS	Absorbância
~	Aproximadamente
kDa	Kilodalton
Psi	libra força por polegada quadrada
OD	Densidade óptica
V	Volts
M	Mol
m	metro
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
URL	Unidade Relativa de Luminescência

1 INTRODUÇÃO

RALF (*Rapid ALkalinization Factor*) é um peptídeo hormonal vegetal que está envolvido com a regulação da expansão celular (MATOS et al., 2008; MINGOSSI et al., 2010; HARUTA et al., 2014, BERGONCI et al., 2014). A expansão celular, essencial para o desenvolvimento vegetal, é um aumento no tamanho celular que ocorre devido à expansão do vacúolo, aumento da pressão de turgor e síntese e deposição de novos componentes da parede celular existente (COSGROVE, 2005). Outros hormônios tais como a auxina, giberelina, etileno, citocinina e brassinosteróide (BR) também regulam o tamanho e a proliferação de células (HEPWORTH; LENHARD, 2014).

AtRALF1 e BR relacionam-se de forma antagônica (BERGONCI et al., 2014; BERGONCI; SILVA-FILHO; MOURA, 2014). Plantas que superexpressam AtRALF1 são insensíveis a BR; além disso, o tratamento de plantas com AtRALF1 induz os genes reprimidos por BR, *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHISM AND DWARFISM (CPD)* e *DWARF4 (DWF4)*, e reprime o gene induzido por BR, *EXPANSINA A5* (BERGONCI et al., 2014; BERGONCI; SILVA-FILHO; MOURA, 2014). Quando plantas são tratadas com AtRALF1 e BR simultaneamente, a expressão de genes responsivos ao peptídeo diminui, indicando que ambas as vias podem estar competindo por componentes em comum (BERGONCI et al., 2014).

Tal relação antagônica entre AtRALF1 e BR levou a uma investigação de outros componentes da via de resposta a BR que poderiam ser afetados por AtRALF1. Para isso, avaliando-se a resposta de mutantes da via de sinalização do BR ao peptídeo AtRALF1, descobriu-se que mutantes para a proteína quinase1 associada ao BRI1 (*bak1*) são insensíveis ao efeito inibitório do AtRALF1 em raízes.

Assim, este trabalho teve como principal objetivo investigar através de ferramentas genéticas e bioquímicas uma interação entre as proteínas AtRALF1 e BAK1. Analisou-se o papel de BAK1 no mecanismo de ação do AtRALF1 buscando uma melhor compreensão da relação entre o peptídeo hormonal AtRALF1 e o hormônio brassinosteróide, principalmente no que diz respeito a ambos utilizarem a proteína BAK1 como parte integrante do mecanismo de percepção.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Interação dos hormônios vegetais clássicos com seus receptores

Plantas desenvolveram mecanismos para perceberem sinais externos e integrá-los a vias de sinalização endógenas, coordenando assim o desenvolvimento. Hormônios vegetais são reguladores essenciais do desenvolvimento de plantas, relacionados com respostas a uma ampla variedade de estímulos externos.

Ferramentas genéticas e bioquímicas vêm sendo amplamente usadas a fim de desvendar como diferentes estímulos hormonais são percebidos pelas plantas. Receptores para os hormônios clássicos auxina, citocinina, giberelina, etileno e ácido abscísico já são conhecidos na planta modelo *arabidopsis*.

O hormônio vegetal auxina é considerado um regulador essencial para muitos aspectos do crescimento e desenvolvimento (ZHAO, 2010). Já se sabe de três receptores independentes para auxina, explicando assim a grande variedade de respostas a este hormônio. Um dos receptores mais estudados é o TRANSPORT INHIBITOR RESISTANT1, TIR1 (DHARMASIRI; DHARMASIRI; ESTELLE, 2005; KEPINSKI; LEYSER, 2005). TIR1 é uma proteína F-box identificada como uma sub-unidade de um complexo ubiquitina E3 ligase, denominado *SKP-Cullin F-box*, SCF (RUEGGER et al., 1998). A auxina promove a ligação entre o TIR1 com proteínas da família AUXIN/INDOLE ACETIC ACID (Aux/IAA), o que resulta na ubiquitinação dessas proteínas, posteriormente degradadas no proteassoma 26S (TAN et al., 2007; CALDERON et al., 2012). A degradação das Aux/IAA promove a liberação dos fatores de transcrição AUXIN RESPONSE FACTORS (ARFs), que irão promover a transcrição de genes responsivos a auxina (GUILFOYLE; HAGEN, 2007).

O segundo receptor da auxina em *arabidopsis* é a proteína S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN 2A, SKP2A (JURADO et al., 2010). A SKP2A é também um regulador do ciclo celular e, sob altas concentrações de auxina, está envolvida com a degradação de pelo menos dois fatores do ciclo celular: DPB e E2FC (DEL POZO et al., 2006; JURADO et al., 2008).

Um terceiro receptor para auxina seria a AUXIN BINDING PROTEIN1 (ABP1), uma proteína solúvel localizada principalmente no retículo endoplasmático, que se liga a auxina e é tida como responsável por mediar respostas rápidas, não transcrpcionais, à auxina (SAUER; KLEINE-VEHN, 2011; XU et al., 2014). Contudo,

recentemente foi mostrado que ABP1 não é necessária para a sinalização da auxina e tão pouco o desenvolvimento vegetal é afetado em plantas que não possuem ABP1 (GAO et al., 2015). Estes novos resultados demandam uma revisão sobre o papel da ABP1 na percepção da auxina.

A citocinina é um importante regulador do desenvolvimento radicular em geral (CARY; LIU; HOWELL, 1995). Este hormônio é percebido pelos receptores ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE2, 3 e 4 [(AHK2, AHK3 e AHK4 ou WOODENLEG (WOL)/ CYTOKININ RESPONSE1 (CRE1)], pertencentes a uma família de receptores transmembrana do tipo histidina quinase (HWANG; SHEEN 2001; INOUE et al., 2001; RIEFLER et al., 2006), localizados na membrana plasmática e no retículo endoplasmático (SHI; RASHOTTE, 2012; NONGPIUR et al., 2012).

A giberelina é essencial em diversos processos de desenvolvimento, incluindo o desenvolvimento de raiz, alongamento de órgãos e o controle no florescimento (YAMAGUCHI et al., 2008). O receptor da giberelina, GID1, foi descoberto primeiramente em arroz, através de um estudo de mutantes, em que o mutante *gibberellin-insensitive dwarf1* (*gid1*) mostrou ser completamente insensível ao tratamento com giberelina (UEGUCHI-TANAKA et al., 2005). GID1 é uma proteína solúvel localizada no núcleo (UEGUCHI-TANAKA et al., 2005). Em arabidopsis, foram encontrados três genes ortólogos, *GID1a*, *GID1b* e *GID1c* (NAKAJIMA et al. 2006). O triplo mutante *gid1a-c* é completamente insensível ao tratamento com giberelina (GRIFFITHS et al., 2006). Também foi descoberto que o receptor GID1 interage com as proteínas DELLA na presença do hormônio (UEGUCHI-TANAKA et al., 2005; NAKAJIMA et al. 2006; GRIFFITHS et al., 2006). As proteínas DELLA regulam negativamente as respostas a giberelina, interagindo com os fatores de transcrição PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR3 e 4 (PIF3 e PIF4) e os sequestrando para complexos inativos (DE LUCAS et al., 2008; FENG et al., 2008). O acúmulo de giberelina desestabiliza as proteínas DELLA, liberando os fatores de transcrição PIF3 e PIF4 para ativarem a transcrição de seus genes alvo.

O etileno é um hormônio vegetal gasoso requerido para vários processos como germinação de sementes, senescência foliar, amadurecimento de frutos, abscisão e respostas a estresses abióticos e bióticos (ABELES et al., 2004). Estudos com mutantes revelaram que este hormônio é percebido por 5 receptores presentes na membrana do retículo endoplasmático (CHEN; ETHERIDGE; SCHALLER, 2005;

STEPANOVA et al., 2005; HALL; SHAKEEL; SCHALLER, 2007) que apresentam alta similaridade de sequência ao sistema regulatório de dois componentes bacteriano (WANG et al., 2006; HALL; SHAKEEL; SCHALLER, 2007). Os receptores são: ETHYLENE RESPONSE SENSOR1 (ERS1), ETHYLENE RESPONSE SENSOR2 (ERS2), ETHYLENE RECEPTOR1 (ETR1), ETHYLENE RECEPTOR2 (ETR2) e ETHYLENE INSENSITIVE4 (EIN4). Os mesmos atuam como reguladores negativos da sinalização do etileno (HUA; MEYEROWITZ, 1998; QU et al., 2007). Na ausência do etileno, os receptores reprimem as respostas a este hormônio através da proteína quinase CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE1, CTR1 (Kieber et al., 1993); mas quando o etileno está presente, os receptores deixam de reprimir estas respostas (CHEN; ETHERIDGE; SCHALLER, 2005; HALL; SHAKEEL; SCHALLER, 2007). A proteína repressora CTR1 age reprimindo o regulador positivo ETHYLENE INSENSITIVE2, EIN2 (ALONSO et al., 1999). EIN2 transmite o sinal de etileno para fatores de transcrição específicos, que irão ativar a expressão de genes responsivos ao etileno (SOLANO et al., 1998).

O ácido abscísico (ABA) regula respostas adaptativas ao estresse hídrico em plantas (CUTLER et al., 2010; KIM et al., 2010), além de participar de vários processos fisiológicos durante o desenvolvimento, tais como embriogênese, desenvolvimento e dormência de sementes (FINKELSTEIN et al., 2008). O modelo atual propõe que os receptores do ABA são as proteínas solúveis PYRABACTIN RESISTANCE1 (PYR)/ PYR1-like (PYL)/ REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR (RCAR) (PARK et al., 2009; MA et al., 2009), membros de uma família denominada START (IYER; KOONIN; ARAVIND, 2001). Os receptores PYR/PYL/RCAR regulam negativamente as PROTEIN PHOSPHATASE2C (fosfatases PP2C), as quais regulam diretamente SnRK2 quinases, ou SUCROSE NON-FERMENTING1-RELATED PROTEIN KINASE2 (PARK et al., 2009; MA et al., 2009).

2.2 Interação dos “novos” hormônios vegetais com seus receptores

No final do século passado, vários compostos orgânicos foram identificados com características hormonais e que, por vezes, são chamados na literatura de novos hormônios. Dentre estes novos compostos estão o ácido jasmônico, o ácido salicílico, a estrigolactona, os brassinosteróides (BRs) e os peptídeos hormonais.

O ácido jasmônico, também conhecido como jasmonato, é um importante mediador de respostas a estresses bióticos e abióticos e regulador de crescimento e desenvolvimento vegetal (WASTERNAK et al., 2007). A partir de estudos com o mutante *coi1* (*Arabidopsis coronatine-insensitive1*), descobriu-se que o receptor dos jasmonatos é a proteína COI1, uma F-box SCF (*SKP-Cullin F-box*) assim como o TIR1 (XIE et al., 1998). Na presença do hormônio jasmonato, o complexo SCF-CO1 promove a degradação dos repressores denominados proteínas JASMONATO ZIM-DOMAIN, JAZ, que interagem com CO1 *in vitro* e *in vivo* (CHINI et al., 2007; THINES et al., 2007; YAN et al., 2007). O jasmonato conjugado com isoleucina (JA-Ile), que é a molécula ativa, se liga no receptor COI1 e estabiliza a interação entre esta proteína F-box e seu substrato (KATSIR et al., 2008). A degradação das proteínas JAZ acarreta na liberação do fator de transcrição MYC2, que irá promover a transcrição de genes responsivos a JA-Ile (CHINI et al., 2007).

O ácido salicílico é sintetizado por plantas em resposta a diversos microrganismos fitopatógenos e é essencial para o estabelecimento da resistência local e sistêmica adquirida (SAR), ou seja, em toda a planta (LOAKE; GRANT, 2007). Estudos com mutantes revelaram que a proteína NONEXPRESSER OF PR GENES1, NPR1, é a reguladora principal de respostas mediadas pelo ácido salicílico. NPR1 foi inicialmente apontado como o receptor do ácido salicílico (WU et al., 2012). No mesmo ano, Fu et al. (2012) mostraram que os verdadeiros receptores para o ácido salicílico são as proteínas NPR3 e NPR4, homólogas a NPR1. Quando há o ataque de patógenos, o ácido salicílico produzido no local da infecção é detectado pelos receptores NPR3 e NPR4, que funcionam como adaptadores para a Cullin- E3 ubiquitina ligase para regular a degradação NPR1. Em seguida, NPR1 é degradada no local da infecção, deixando de inibir o efector desencadeador de defesa e morte celular, enquanto que NPR1 se acumula nas células vizinhas para promover a resistência mediada por este hormônio (FU et al., 2012).

As estrigolactonas são hormônios vegetais que derivam dos carotenóides, desencadeiam a germinação de sementes vegetais parasíticas e estimulam as simbiontes micorrizas fúngicas (AKIYAMA; MATSUZAKI; HAYASHI, 2005). Estudos com mutantes *max* (*more axillary growth*) em *arabidopsis* permitiram concluir que este hormônio vegetal age como inibidor da ramificação de raízes e da parte aérea (GOMEZ-ROLDAN et al., 2008; UMEHARA et al., 2008). A proteína F-box chamada de MORE AXILLARY GROWTH (MAX2) / RAMOSUS (RMS4) é requerida para

respostas a estrigolactona (STIRNBERG; VAN DE SANDE; LEYSER, 2002; JOHNSON et al., 2006); no entanto, ainda não se sabe se MAX2/RMS4 é de fato seu receptor.

Os BRs e os peptídeos hormonais serão abordados em itens separados.

2.2.1 Brassinosteróides

A atividade hormonal dos esteróides em plantas foi descoberta há aproximadamente três décadas atrás em extratos de pólen da espécie *Brassica napus*, em que um composto denominado brassinolide (BL) foi atribuído como estimulador do crescimento polínico (GROVE et al., 1979). A partir disso, esteróides com estrutura e função similares a BL têm sido identificado em várias espécies vegetais e são chamados BRs (CLOUSE; SASSE, 1998).

Através de estudos com mutantes da planta modelo *arabidopsis*, foi possível investigar as funções biológicas dos BRs. Atualmente, sabe-se que os BRs são hormônios que controlam vários processos fisiológicos, tais como alongamento celular, crescimento radicular, respostas a luz, diferenciação vascular, resistência a estresses e senescência (KIM; WANG, 2010; YANG et al., 2011).

A via de sinalização de BR tem sido muito estudada. BL se liga ao domínio extracelular de uma proteína de membrana receptora quinase com repetições ricas em leucina (LRR) denominada BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1, BRI1 (LI; CHORY, 1997). Esta ligação induz uma associação entre BRI1 e seu co-receptor BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE1 (BAK1), outra proteína de membrana quinase rica em leucina (LI et al., 2002; NAM; LI, 2002). Reações de transfosforilação entre BRI1 e BAK1 levam a ativação/inativação de proteínas quinase que resultam no acúmulo dos fatores de transcrição BRASSINAZOLE RESISTANT1 (BZR1) e BRASSINAZOLE RESISTANT2 / *bri1*-EMS SUPPRESSOR1 (BZR2/BES1) no núcleo, que por sua vez ativam os genes responsivos a BR (YIN et al., 2002; MORA-GARCIA et al., 2004). De maneira detalhada, as reações de transfosforilação entre BRI1 e seu co-receptor BAK1, induzidas pela presença do BL, promovem a fosforilação das BR SIGNALING KINASES, BSKs (TANG et al., 2008), que ativam a proteína BRI1-SUPPRESSOR1 (BSU1) fosfatase (MORA-GARCIA et al., 2004). A BSU1 fosfatase desfosforila e conseqüentemente inativa a BR INSENSITIVE2 (BIN2), que codifica uma GSK3 quinase, a qual sofre

degradação proteossomal. Isto permite o acúmulo dos fatores de transcrição desfosforilados BZR1 e BZR2/BES1 no núcleo (VERT; CHORY, 2006; PENG et al., 2008).

Na ausência de BL, o receptor de membrana BRI1 está ligado com a proteína localizada na membrana plasmática BRI1 KINASE INHIBITOR1 (BKI1), a qual regula negativamente BRI1, impedindo-a de interagir com reguladores positivos da via (NAM; LI, 2004; WANG; CHORY, 2006). Assim, quinases BSKs não são fosforiladas e não ativam a proteína BSU1 fosfatase. Com isso, BIN2 permanece ativa, com ação de fosforilação constitutiva dos fatores de transcrição BZR1 e BZR2/BES1, os quais permanecem no citoplasma ou são exportados do núcleo e consequentemente são degradados nos proteossomos (KIM; WANG, 2010).

A proteína BIK1, inicialmente identificada como *Botrytis*-INDUCED KINASE1 por mediar a resistência de plantas a fungos patógenos necrotróficos (VERONESE et al., 2006), também se associa com o receptor BRI1 e regula negativamente a via de BR. BIK1 interage com BRI1 e só se dissocia do mesmo quando há a ligação do BL, que resulta na fosforilação de BIK1 pelo BRI1 (LIN et al., 2013).

Também é importante mencionar a importância das proteínas SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE4 (BAK7/ SERK4), SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1 (SERK1), TRANSTHYRETIN-LIKE (TTL) e 14-3-3 nesta via. BAK7/SERK4 é uma proteína de membrana homóloga a BAK1, também componente da via de sinalização de BRs, podendo atuar de maneira redundante a BAK1 (JEONG et al., 2010). A proteína SERK1 também está envolvida com a via de BRs por interagir com a proteína BRI1, sendo que o hormônio esteróide BL age como uma "cola molecular" entre BRI1 e SERK1, interagindo com ambos (KARLOVA et al., 2006; SANTIAGO; HENZLER; HOTHORN, 2013).

A proteína de membrana TTL interage com o receptor BRI1 e é fosforilada por ele. Plantas mutantes e plantas superexpressoras de *TTL* se assemelham com as de *BKI1*: as plantas mutantes são maiores e as que superexpressam estes genes são semi-anãs; demonstrando inibição destes genes na via de BR. No entanto, diferentemente de BSK1, TTL interage fortemente com o domínio quinase ativo de BRI1, mais que o inativo, sugerindo que TTL pode inibir a sinalização do BRI1 após sua ativação (NAM; LI, 2004; WANG; CHORY, 2006).

Finalmente, a proteína 14-3-3 (proteína de ligação a fosfopeptídeo) interage com BZR1 e BZR2/BES1, retendo estes fatores de transcrição fosforilados no citoplasma (GAMPALA et al., 2007; RYU et al., 2007).

2.2.1.1 BAK1

BAK1 foi identificada como co-receptora da proteína de membrana BRI1 (LI et al., 2002; NAM; LI, 2002). Conforme citado anteriormente, BRI1 é receptor de BR (LI; CHORY, 1997). Tanto BRI1 como BAK1 são proteínas receptoras quinases com repetições ricas em leucina (LRR-RLKs), que pertencem à uma família com pelo menos 216 membros em arabidopsis (DIEVART; CLARK, 2004). Além disso, BAK1 também é conhecida como SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE3 (SERK3) e faz parte de uma sub-família constituída por cinco membros em arabidopsis: SERK1 a SERK5 (LI et al., 2002; NAM; LI, 2002).

A função de BAK1 não está restrita ao desenvolvimento vegetal regulado por BR, pois esta proteína de membrana também é importante para defesa vegetal contra patógenos. As plantas possuem mecanismos de defesa inatos para se protegerem dos ataques por patógenos, tais como receptores de membrana responsáveis por perceberem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS) e ativarem respostas de defesa. Uma destas respostas é conhecida como defesa basal ou *PAMP-triggered immunity*, PTI (SCHWESSINGER; ZIPFEL, 2008; JONES; DANGL, 2006). Um dos receptores de membrana que reconhecem PAMPS é o FLAGELLIN-SENSING2 (FLS2), responsável por perceber o peptídeo bacteriano de 22 aminoácidos derivado da flagelina (flg22) e iniciar uma cascata de fosforilação que irá culminar em respostas de defesa (GOMEZ-GOMEZ; BOLLER, 2000; ZIPFEL et al., 2004). Sabe-se que BAK1 é co-receptor de FLS2: na presença de flg22, FLS2 se liga a BAK1 e ambos são fosforilados (CHINCHILLA et al., 2007). Outro receptor conhecido é o ELONGATION FACTOR TU RECEPTOR, EFR, que percebe o fator de alongamento bacteriano EF-tu e também interage com seu co-receptor BAK1 (CHINCHILLA et al., 2007; SCHULZE et al., 2010). Outro trabalho que mostra a importância biológica de BAK1 foi realizado por HEESE et al. (2007), no qual foi demonstrado que bactérias e fungos patogênicos se proliferam melhor em plantas de arabidopsis e *Nicotiana benthamiana* mutantes perda-de-função para BAK1.

Além disso, BAK1 também é importante para defesa vegetal contra a herbivoria em *arabidopsis*; plantas também possuem receptores de membrana responsáveis por perceberem padrões moleculares associados a herbívoros (HAMPS) e ativarem respostas de defesa. Exemplos disso são as proteínas de membrana específicas de *arabidopsis* PEP1 RECEPTOR1 e 2 (PEPR1 e PEPR2), que reconhecem o peptídeo elicitor endógeno AtPep1, o qual é induzido por ferimentos na planta causados pelos herbívoros (YAMAGUCHI; PEARCE; RYAN, 2006; YAMAGUCHI et al., 2010). BAK1 se associa com as proteínas de membrana PEPR1/2 quando o peptídeo AtPep1 está presente, participando assim deste mecanismo de defesa (POSTEL et al., 2010).

Desta forma, BAK1 não regula apenas respostas de desenvolvimento de plantas depende de BRs, mas também modula vias envolvidas com respostas de defesa ao ataque de patógenos e herbívoros.

2.3 Peptídeos hormonais e seus receptores

O primeiro peptídeo hormonal descoberto em plantas foi a sistemina, a qual é liberada pelas plantas como uma resposta de defesa contra ferimentos causados por insetos herbívoros. A sistemina, composta por 18 aminoácidos, é encontrada somente em solanáceas. Este peptídeo é liberado no local do ferimento e tem a capacidade de induzir uma resposta sistêmica (PEARCE et al., 1991).

Acreditava-se que o receptor para a sistemina era uma proteína de membrana denominada SR160/SIBRI1, o mesmo receptor do hormônio BR em tomateiro (SCHEER; RYAN, 2002). Passados 5 anos, foi demonstrado que plantas de tomateiro mutantes para o receptor SIBRI1 (CU3/tBRI1) ainda respondiam a ferimentos, assim como as plantas selvagens, indicando que a percepção deste peptídeo é possivelmente desempenhada por outro receptor (HOLTON et al., 2007). Ainda hoje, este assunto continua dividindo opiniões dos cientistas e especula-se que a interação da sistemina com SIBRI1 seja apenas um artefato da superexpressão do peptídeo (MALINOWSKI et al., 2009, HIND et al., 2010).

A fitosulfoquina (PSK) é um peptídeo constituído por 5 aminoácidos, inicialmente identificado por promover a proliferação celular *in vitro* (MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 1996). Outras funções foram, posteriormente descobertas: estímulo a diferenciação de elementos traqueários (MATSUBAYASHI

et al., 1999), indução da embriogênese somática (HANAI et al., 2000) e germinação de pólen (CHEN; MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 2000). Os receptores para PSK, PSKR1 e PSKR2 são do tipo receptora quinase com repetições ricas em leucina (LRR-RK) e estão localizados na membrana celular (MATSUBAYASHI et al., 2002; MATSUBAYASHI et al., 2006; AMANO et al., 2007). O peptídeo de 18 aminoácidos PSY1, assim como a fitosulfoquina, promove a proliferação e expansão celular e também é percebido pelos receptores PSKR1 e PSKR2 (AMANO et al., 2007; MOSHER et al., 2013).

A clavata 3 (CLV3) é um peptídeo com 13 aminoácidos que, resumidamente, promove o balanço entre a renovação do meristema celular apical e sua diferenciação (FLETCHER et al., 1999; OHYAMA et al., 2009). Os receptores de CLV3 são CLV1 e CLV2, que formam um complexo (TROTOCHAUD et al., 1999; ROJO et al., 2003). CLV1 possui um domínio extracelular do tipo LRR, um domínio transmembrana e um domínio quinase intracelular do tipo serina-treonina quinase (CLARK et al., 2001). O receptor CLV2 se assemelha ao CLV1, porém, sem o domínio quinase intracelular (JEONG; TROTOCHAUD; CLARK, 1999).

O peptídeo TDIF, com 12 aminoácidos, apresenta importante papel na manutenção da manutenção da população de células do meristema vascular (ITO et al., 2006). A estrutura primária do peptídeo maduro TDIF é igual a dos peptídeos CLE41 e CLE44 de *arabidopsis* (OHYAMA; OGAWA; MATSUBAYASHI, 2008). O receptor do TDIF/CLE41/CLE44 é o TDIF RECEPTOR (TDR)/ PHLOEM INTERCALATED WITH XYLEM-1 (PXY), uma proteína LRR-RK expressa em células do procâmbio (FISHER; TURNER, 2007; HIRAKAWA et al., 2008; ETCHELLS; TURNER, 2010).

IDA é um peptídeo envolvido com o processo de abscisão, cuja estrutura correspondente ao peptídeo maduro ainda não foi caracterizada. O peptídeo IDA foi produzido sinteticamente, contendo 21 aminoácidos e abrangendo um domínio altamente conservado entre a família de peptídeo IDA-LIKE (IDL). Quando este peptídeo sintético foi aplicado em altas concentrações em plantas de *arabidopsis*, o mesmo promoveu abscisão floral precoce (STENVIK et al., 2003). O IDA é ligante de HAESA (HAE) e HAESA-LIKE2 (HSL2), receptores do tipo LRR-RK (JINN et al., 2000; STENVIK et al., 2003).

AtPep1 é um peptídeo com 23 aminoácidos, encontrado em *arabidopsis*, que induz genes de defesa contra patógenos (HUFFAKER et al., 2003; HUFFAKER et

al., 2007; RYAN; HUFFAKER; YAMAGUCHI, 2007). Os receptores do AtPep1 são proteínas do tipo LRR-RK, denominadas PEPR1 e PEPR2 (KROL et al., 2010). A proteína BAK1 interage com PEPR1 e PEPR2 (PEP RECEPTOR 1 e 2) e atua como co-receptora de AtPep1 (POSTEL et al., 2010).

O peptídeo RALF e seu receptor serão abordados a seguir.

2.4 Peptídeo hormonal RALF

Os processos fisiológicos de crescimento, desenvolvimento, defesa e reprodução são coordenados basicamente por comunicação intercelular. Em plantas, a caracterização genética e bioquímica de uma nova classe de sinalizadores celulares, denominados peptídeos hormonais, tem sido fundamental para a descoberta de novos cenários fisiológicos (MOURA; SILVA-FILHO, 2006; MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 2006; GHORBANI et al., 2014).

Peptídeos hormonais vêm sendo amplamente estudados na última década e apresentam função de sinalização celular semelhante aos hormônios vegetais tradicionais. Nosso grupo de pesquisa está interessado em entender como o peptídeo hormonal RALF (*Rapid ALkalinization Factor*) age em plantas, mais especificamente, qual é a via de sinalização utilizada pelo mesmo e com quais proteínas interage.

RALF é um peptídeo de características hormonais, ubíquo em plantas e que está envolvido com desenvolvimento vegetal (MOURA et al., 2006). Atualmente já se sabe que este peptídeo hormonal está relacionado com a regulação da expansão celular (MATOS et al., 2008; MINGOSSO et al., 2010; HARUTA et al., 2014, BERGONCI et al., 2014). RALF é um peptídeo de 5 kDa, isolado pela primeira vez de folhas de tabaco, inicialmente descoberto por causar uma rápida alcalinização do meio de cultivo de suspensões celulares e por inibir o crescimento e desenvolvimento de raízes. Além da indução de uma rápida alcalinização do meio extracelular, a ativação de uma MAP quinase em células de tabaco também foi identificada (PEARCE et al., 2001).

Este peptídeo hormonal é secretado e processado. O peptídeo ativo, isolado de 49 aminoácidos, deriva de uma porção C-terminal de uma preproteína de 115 aminoácidos, que possui um peptídeo sinal de 23 aminoácidos na porção N-terminal e uma porção intermediária com 43 aminoácidos, cuja função ainda é desconhecida.

Em um estudo de transporte de proteínas em tabaco, Escobar et. al (2003) expressaram o gene precursor do RALF fusionado a GFP em plantas de tabaco e mostraram que, num primeiro momento, RALF estava localizado no retículo endoplasmático e, em análise posterior, o mesmo foi encontrado na parede celular.

Peptídeos RALF foram encontrados e caracterizados em diversas espécies vegetais. Analisando bibliotecas de cDNA de ovário e óvulos fertilizados da espécie *Solanum chacoense*, 5 isoformas de RALF (ScRALF1-5) com expressão diferenciada nos diferentes estágios de desenvolvimento foram identificadas (GERMAIN et al., 2005). A espécie de tabaco selvagem *Nicotiana attenuata* possui somente uma isoforma de RALF e o silenciamento da mesma resultou em um aumento no comprimento radicular e alteração do desenvolvimento de pêlos radiculares (WU et al., 2007). A isoforma MtRALF1, encontrada em *Medicago truncatula*, está envolvida com o processo de nodulação (COMBIER et al., 2008). Em *Brassica oleracea*, uma isoforma de grãos de pólen maduros foi identificada e relacionada com o desenvolvimento do tubo polínico (ZHANG et al., 2010). Na espécie *Solanum lycopersicum*, uma isoforma também encontrada em pólen é responsável por inibir tanto o crescimento do tubo polínico quanto a germinação do grão de pólen (COVEY et al., 2010). Na monocotiledônea *Saccharum* spp (cana-de-açúcar), foram identificadas quatro isoformas de RALF que estão relacionadas com a expansão e alongamento celular (MINGOSSO et al., 2010). Em outra espécie da família Solanaceae, *Solanum chacoense*, uma isoforma é responsável por regular a comunicação intercelular entre o esporófito e o gametófito (CHEVALIER; LOUBERT-HUDON; MATTON, 2013). Em *Arabidopsis thaliana*, 37 genes semelhantes ao RALF (AtRALFs) foram identificados (LAMESCH et al., 2011), sendo que nove deles formam um subgrupo com uma maior identidade de estrutura primária com o RALF previamente isolado de tabaco (MORATO DO CANTO et al., 2014). Estudando a atividade biológica dessas nove isoformas de AtRALFs, foi demonstrado que, com exceção da isoforma específica de pólen AtRALF4, todas as demais são capazes de inibir o crescimento de raízes e expansão de hipocótilos (MORATO DO CANTO et al., 2014). Além disso, a isoforma mais estudada de arabidopsis (AtRALF1) promove um aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular de maneira rápida (HARUTA et al., 2008; MORATO DO CANTO et al., 2014).

A superexpressão de genes que codificam peptídeos RALF indica a sua função negativa na regulação da expansão celular. Plantas que superexpressam

AtRALF1, isoforma expressa predominantemente em raízes (BIRNBAUM et al., 2003; HARUTA et al., 2008), são semi-anãs e uma mutação no sítio dibásico (dupla arginina) que antecede o peptídeo ativo é suficiente para impedir o correto processamento da proteína precursora, fazendo com que plantas que superexpressam o gene AtRALF1 mutado não exibam o fenótipo semi-anão (MATOS et al., 2008). Plantas que superexpressam AtRALF23 também são semi-anãs e apresentam crescimento radicular e foliar reduzido (SRIVASTAVA et al., 2009). A isoforma AtRALF8, não integrante do grupo das nove isoformas semelhantes ao RALF de tabaco, também gera um fenótipo semi-anão quando o gene é superexpresso (ATKINSON; LILLEY; URWIN, 2013).

Alguns genes responsivos a AtRALF1 foram descobertos. Dentre eles, segundo Bergonci et al. (2014), quatro genes induzidos por AtRALF1 estão relacionados com o rearranjo de parede celular em arabidopsis: dois que codificam proteínas ricas em prolina (*AtPRP1*, At1g54970 e *AtPRP3*, At3g62680), um que codifica uma glicoproteína rica em hidroxiprolina (*AtHRGP2*, At5g19800) e por último, um que codifica a proteína xiloglucana endotransglucosilase TOUCH4 (*TCH4*, At5g57560).

A via de percepção do RALF vem sendo pesquisada desde a descoberta do peptídeo. RALF alcaliniza o meio extracelular em células em suspensão e ativa uma MAP quinase (Pearce et al., 2001). Estudando células em suspensão de *Lycopersicon peruvianum*, duas proteínas de membrana foram encontradas, uma de 120 e outra de 25 kDa, as quais apresentaram alta afinidade pelo peptídeo RALF de tomate (SCHEER; PEARCE; RYAN, 2005). O peptídeo AtRALF1 também causa um aumento de Ca^{2+} citoplasmático (HARUTA et al., 2008; MORATO DO CANTO et al., 2014).

O peptídeo RALF é reconhecido por FERONIA, uma proteína de membrana com domínio quinase que possui um domínio malectina (HARUTA et al., 2014). Em arabidopsis, mutantes perda-de-função para FERONIA apresentam um crescimento exacerbado do tubo polínico (ESCOBAR-RESTREPO et al., 2007). Haruta e colaboradores (2014) mostraram que AtRALF1 se liga no receptor FERONIA e desencadeia uma cascata de fosforilação que resulta na inibição da atividade da bomba de próton-ATPase AHA2, aumentando assim o pH do apoplasto, e também resulta na redução da expansão celular. O mutante de perda de função para FERONIA (*fer4*) mostrou-se insensível ao efeito inibitório do crescimento de raízes

quando as plantas foram expostas a baixas concentrações do peptídeo. No entanto, em concentrações maiores, os mutantes tiveram o crescimento de raízes inibido. Quando o peptídeo AtRALF1 marcado com o radioisótopo ^{125}I foi exposto a um preparado de membrana plasmática do mutante *fer4*, foi observada uma redução da marcação de membranas da ordem de 40% quando comparada com o mesmo preparado de membranas de plantas selvagens (HARUTA et al., 2014). A insensibilidade condicionada a baixas concentrações do peptídeo e o fato da marcação com ^{125}I -AtRALF1 apresentar uma redução de somente 40% sugerem a existência de mais de uma proteína receptora do peptídeo AtRALF1. Além disso, de maneira controversa, foi demonstrado em outro trabalho que FERONIA é requerida para o alongamento celular durante o desenvolvimento (GUO et al., 2009). Assim, a descoberta de um outro(s) receptor(es) do peptídeo AtRALF1 poderia(m) explicar estas contradições.

2.5 Relação do peptídeo RALF com outros hormônios vegetais

Pouco se sabe sobre a relação entre os peptídeos RALF e os demais hormônios. HARUTA e CONSTABEL (2003), estudando genes que codificam peptídeos RALF em álamo (*Populus trichocarpa* x *Populus deltoides*), não encontraram efeito significativo na expressão dos genes *RALF* após o tratamento com os hormônios benzil adenina e ácido naftaleno acético. Porém, quando células em suspensão foram tratadas com metil jasmonato, houve uma inibição na expressão dos genes *RALF*. No entanto, quando ovários de *Solanum chacoense* foram tratados com auxina, a expressão gênica de RALF foi induzida (CHEVALIER; LOUBERT-HUDON; MATTON, 2013).

O nível de expressão do gene que codifica para a isoforma AtRALF8 de *Arabidopsis* foi maior em mutantes *ein3-1* (*ethylene-insensitive*), totalmente insensíveis a etileno. E por fim, plantas de *Arabidopsis* tratadas com AtRALF1 apresentaram algumas mudanças no perfil transcricional de alguns genes envolvidos com as vias da auxina, giberelina e também do etileno (HARUTA et al., 2014). Os genes *SMALL AUXIN UP RNA* (*SAUR63*) e *GIBBERELIN 3-OXIDASE* (*GA3OX*) - normalmente induzidos pelo tratamento com auxina e giberelina, respectivamente - são reprimidos pelo tratamento com o peptídeo AtRALF1. Além disso, AtRALF1 induz o gene *ETHYLENE RESPONSE FACTOR* (*ERF*), que codifica para um fator

de transcrição envolvido com a via de transdução de sinal do etileno e o gene *AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLIC AND SYNTHASE (ACS)*, que codifica para uma enzima envolvida com a biossíntese do etileno (HARUTA et al., 2014).

2.5.1 Relação do peptídeo RALF com brassinosteróides

A expressão do gene que codifica o AtRALF23 de *arabidopsis* é reprimida quando plantas são expostas a BL. Plantas que superexpressam o AtRALF23 não alongam o hipocótilo quando tratadas com BL (SRIVASTAVA et al., 2009).

Diferentemente do AtRALF23, AtRALF1 não é reprimido pelo tratamento com BL. Porém, plantas que superexpressam AtRALF1 são insensíveis ao tratamento com BL e não apresentam respostas típicas ao hormônio esteróide, tais como estímulo ao alongamento de raízes, alongamento de hipocótilo e indução de raízes laterais (BERGONCI et al., 2014). Além disso, também foi mostrado que AtRALF1 induz genes que são reprimidos por BL na via de brassinosteróides - citocromo P450 mono-oxigenases *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHISM AND DWARFISM (CPD)* e *DWARF4 (DWF4)* - e reprime o gene induzido por BR, *EXPANSINA A5* (BERGONCI et al., 2014; BERGONCI; SILVA-FILHO, MOURA, 2014). O tratamento de plantas de *arabidopsis* com AtRALF1 e BL acarretou na diminuição da expressão de genes responsivos ao AtRALF1, mostrando que uma via interfere na outra e indicando que ambas podem competir por componente(s) em comum (BERGONCI et al., 2014).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e condições de crescimento

Plantas selvagens de *Arabidopsis thaliana* do ecótipo Columbia-0, chamadas de Col-0, foram usadas nos experimentos.

As condições de crescimento das plantas de arabidopsis e tabaco foram descritas por Boyes et al. (2001). Resumidamente, as sementes foram incubadas a 4°C por 3 d e germinadas em solo (2:1 substrato:vermiculita). O cultivo das plantas foi feito em câmaras de crescimento sob fotoperíodo controlado [16 h de luz, 150 $\mu\text{E m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (E, Einstein; 1 E = 1 mol de fótons) e 8 h de escuro] a 23°C.

3.2 Extração de DNA genômico de arabidopsis

O reagente Plant DNAzol (Life Technologies) foi utilizado para extração e purificação de DNA genômico de plantas de arabidopsis, seguindo instruções dos fabricante. Resumidamente, 50 mg de tecido vegetal foram macerados e homogeneizados em 1 mL do reagente. A solução foi centrifugada por 10 min a 4°C, 10000 x g. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e o DNA foi precipitado com a adição de 0,5 mL de etanol 100%. Após 3 min, a solução foi centrifugada por 2 min a 4°C, 4000 x g. O DNA foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 75% e eluído em água ultra-pura autoclavada.

3.3 Extração de RNA total de arabidopsis e síntese de cDNA

Para a extração de RNA total de arabidopsis, o reagente TRIzol (Life Technologies) foi utilizado. O tecido vegetal (50-100 mg) foi macerado com o auxílio de nitrogênio líquido e homogeneizado em 1 mL de TRIzol. Após 5 min de incubação em temperatura ambiente, 200 μL de clorofórmio foram adicionados à amostra, agitando vigorosamente por 15 s. Após 5 min de incubação em temperatura ambiente, a amostra foi centrifugada a 12000 x g por 15 min, 4°C. A fase superior foi coletada e transferida para novo tubo de 1,5 mL. Foram adicionados 500 μL de isopropanol e a solução foi incubada em temperatura ambiente por 10 min e em seguida, centrifugada a 12000 x g por 10 min, 4°C para precipitação do RNA. O

sobrenadante foi descartado e o RNA lavado com etanol 75%. Após agitação, a amostra foi centrifugada a 7500 x g por 5 min, 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet seco foi eluído em água ultra-pura autoclavada.

A síntese de cDNA foi realizada usando-se o kit *ImProm-IITM Reverse Transcriptase* (Promega), de acordo com as recomendações dos fabricantes. O RNA total (1 µg) mais 1 µL de OligodT (50 µM) foram incubados a 70°C por 5 min e em seguida, 5 min no gelo. Uma solução contendo tampão *ImProm-II* 1X, 1,5 mM MgCl₂, dNTPmix (10 mM) e *ImProm-II Reverse Transcriptase* (1 U) foi adicionada. A reação foi incubada a 25°C por 5 min, 42°C por 60 min e 70°C por 15 min. 1,5 µL de cada cDNA sintetizado foi utilizado em reações de PCR.

3.4 Transformação de *Escherichia coli*

3.4.1 Preparação de células eletrocompetentes de *E. coli*

Células desarmadas de *E. coli* cepa TOP10 ou DH5α (Life Technologies) foram estriadas em placa contendo meio 2xYT (16 g/L triptona, 10 g/L extrato de levedura e 5 g/L NaCl) mais 16 g/L de ágar, a qual foi incubada por 16 h a 37°C. Uma colônia isolada foi pré-inoculada em 50 mL de meio 2xYT líquido sem antibióticos por 16 h a 200 rpm, 37°C. Em seguida, a cultura do pré-inóculo foi adicionada em 500 mL de meio 2xYT líquido. Este inóculo foi incubado a 37°C sob agitação de 200 rpm até atingir a densidade óptica (ABS₆₀₀) de 0,6. As células foram sedimentadas a 1100 x g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 500 mL de água ultra-pura autoclavada gelada. As células foram novamente sedimentadas a 1100 x g por 10 min a 4°C e lavadas mais uma vez com 250 mL de água ultra-pura autoclavada gelada. Após a centrifugação a 1600 x g por 10 min a 4°C, a última lavagem das células foi realizada com 10 mL de glicerol 10% gelado. As células foram sedimentadas novamente a 1600 x g por 10 min a 4°C e ressuspensas em 3-5 mL de glicerol 10% gelado. Foram feitas alíquotas de 70 µL, as quais foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C.

3.4.2 Eletroporação de *E. coli*

A fim de inserir os vetores em células de *E. coli*, o vetor de interesse foi adicionado a 70 µL de células competentes. A mistura foi colocada em uma cubeta de eletroporação (largura da ranhura, 2 mm, BioRad) previamente resfriada. A eletroporação foi efetuada no eletroporador *Gene Pulse II* (BioRad) usando resistência 200 Ω, capacitância 25 µF e voltagem 2,5 kV. Em seguida, 1 mL de meio 2xYT foi adicionado na cubeta e a solução foi transferida para tubo de 1,5 mL e incubada por 1 h a 37°C, 200 rpm. A solução foi centrifugada a 4000 x g por 5 min, 800 µL do sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas nos 200 µL de meio restante. Por fim, os 200 µL da solução bacteriana foram plaqueados em meio 2xYT contendo ágar (16 g/L) mais antibióticos apropriados (ANEXO A). A placa foi incubada a 37°C por 16 h.

3.5 Extração de DNA plasmidial de *E. coli*

Colônias isoladas de *E. coli* foram crescidas em 5 mL de meio 2xYT líquido com os antibióticos apropriados (ANEXO A) por 16 h a 37°C, sob agitação de 200 rpm. Em seguida, 1 mL de cultura bacteriana foi centrifugado a 13000 x g em TA. As células sedimentadas foram ressuspensas em 100 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 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). Após agitação por inversão, a solução foi incubada por 3 min em temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 150 µL de acetato de potássio 3 M (pH 5,2), agitando a solução por inversão e incubando por 5 min no gelo. O lisado foi centrifugado a 13000 x g por 20 min, 4°C, e o sobrenadante tratado com 3 µL de RNase (10 U/µL) a 37°C por 20 min. A precipitação do DNA plasmidial foi feita com a adição de 1 mL de etanol 100% e a sedimentação por centrifugação a 13000 x g por 5 min, 4°C. O plasmídeo foi lavado com 1 mL de etanol 70%. Após centrifugação de 13000 x g por mais por 5 min, 4°C, o DNA foi seco a 37°C por 20 min e ressuspenso em água ultra-pura autoclavada.

3.6 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

3.6.1 Preparação de células eletrocompetentes de *A. tumefaciens*

Células desarmadas de *A. tumefaciens* cepa GV3101 foram estriadas em placa contendo meio 2xYT mais 16 g/L de ágar suplementado com os antibióticos gentamicina e rifampicina, ambos na concentração 50 µg/mL. A placa foi incubada por 48 h a 28°C. Após este período, uma colônia isolada foi pré-inoculada em 50 mL de meio 2xYT líquido com os mesmos antibióticos por 18 h a 180 rpm, 28°C. Em seguida, a cultura do pré-inóculo foi adicionada em 500 mL de meio 2xYT líquido contendo os antibióticos. Este inóculo foi incubado a 37°C sob agitação de 200 rpm até atingir a densidade óptica (ABS₆₀₀) de 0,6. Desta etapa em diante, as células eletrocompetentes de agrobactéria foram preparadas como descrito anteriormente para as células de *E. coli*.

3.6.2 Eletroporação de *A. tumefaciens*

A eletroporação de células competentes de *A. tumefaciens* com os vetores de interesse foi realizada conforme descrito para eletroporação de células competentes de *E. coli*. No entanto, após a eletroporação, a solução com meio de cultura foi incubada por 2 h a 28°C, 180 rpm. A solução foi centrifugada a 4000 x g por 5 min, 800 µL do sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200 µL de meio restante. Por fim, os 200 µL da solução bacteriana foram plaqueados em meio 2xYT contendo ágar (16 g/L) mais antibióticos gentamicina e rifampicina (50 µg/mL). A placa foi incubada a 28°C por 2-3 d.

3.7 Produção e purificação dos peptídeos AtRALFs

As sequências codificadoras para os peptídeos ativos das isoformas AtRALF1 (At1g02900) e AtRALF34 (At5g67070) foram obtidas através de reações de PCR a partir de DNA genômico usando iniciadores específicos (ANEXO B). Neste caso, o DNA genômico foi utilizado pelo fato desses genes não possuírem íntrons. AtRALF1 e AtRALF34 foram clonados entre os sítios de restrição *Nde*I e *Hind*III no vetor pET28b. Todos os peptídeos foram fusionados a uma sequência de histidinas. Os

vetores foram introduzidos em *E. coli* cepa BL21 ou Rosetta DE3. As clonagens foram confirmadas por sequenciamento.

Para a produção dos peptídeos, colônias contendo os vetores de interesse foram crescidas em 5 mL de meio LB (10 g/L triptona, 5 g/L extrato de levedura e 10 g/L NaCl) líquido contendo o antibiótico canamicina (50 µg/mL) por 16 h a 37°C, sob agitação de 200 rpm. Em seguida, as culturas foram transferidas para 500 mL de meio LB líquido sob as mesmas condições até atingir a densidade óptica (OD) de 0,6. Posteriormente, foi adicionado 1 mM do indutor IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo) por 4 h a 37°C, 200 rpm. As culturas foram transferidas para tubos de centrífuga, centrifugadas em temperatura ambiente a 5000 rpm por 8 min e congeladas. As células bacterianas foram ressuspensas em tampão (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M uréia, pH 8,0) sob agitação por 40 min e lisadas sob pressão de 1500 psi em bomba de ruptura celular por pressão de gás nitrogênio (Parr Instruments Co), seguido de centrifugação por 40 min a 4°C, 12000 rpm. Os sobrenadantes foram aplicados em coluna de cromatografia de afinidade com resina de níquel (Ni-NTA, Qiagen) previamente equilibrada com 10 volumes de tampão de ligação (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M uréia, pH 8,0). As colunas foram lavadas com 5 volumes de tampão de lavagem (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M uréia, pH 6,3) e as proteínas de interesse foram eluídas com 3 mL de tampão de eluição (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M uréia, pH 3,3). As proteínas recombinantes purificadas foram dialisadas contra 4 L de solução 0,2% de ácido fórmico, em 6 etapas de aproximadamente 12 h cada (4°C, sob leve agitação). Após a diálise, as amostras foram liofilizadas e 10% do total de proteínas foi ressuspensado em 0,1% de ácido fórmico e aplicado em HPLC com coluna de fase reversa C18 (8-mm 4,6 x 25 cm Kromasil®) previamente equilibrada com 0,1% de ácido fórmico. Após este procedimento, as proteínas foram eluídas com 30 min de gradiente de 0 a 50% acetonitrila/ 0,1% ácido fórmico; o fluxo da bomba usado foi de 1 mL/min.

3.8 Inibição de crescimento de raiz primária com AtRALF1 em meio líquido

Os ensaios de inibição de crescimento de raízes de plantas de arabidopsis foram previamente descritos por PEARCE et al. (2001). As sementes de arabidopsis foram esterilizadas superficialmente com hipoclorito de sódio 50% por 20 min e em seguida lavadas quatro vezes com água milli-Q esterilizada. As sementes desinfetadas foram mantidas por 3 d a 4°C e em seguida colocadas para germinar em meio contendo sais MS 0,5X sem vitaminas e sacarose, pH 5,6, durante 48 h em placas de 24 poços. Em seguida, foram submetidas a fotoperíodo 16 h de luz ($150 \mu\text{E m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), 8 h de escuro, a 24°C. Após a germinação, foi adicionado o peptídeo AtRALF1 (em alguns ensaios foi adicionado outro peptídeo recombinante ou peptídeo sintético inativo) no meio na concentração de 10 μM e o crescimento de raízes foi medido em 48 h após a adição dos mesmos com o auxílio do programa ImageJ (National Institutes of Health, USA).

3.9 Inibição do crescimento de raiz primária de plantas de arabidopsis em placa vertical

Sementes de arabidopsis (mutantes e selvagens) foram germinadas em placa vertical com 0,5X de meio MS pH 5,8 (MURASHIGE; SKOOG, 1962) contendo 6 g/L de ágar. As placas foram incubadas por 5 d em temperatura ambiente com intensidade de luz de $150 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Em seguida, as plantas foram transferidas para placas com o mesmo meio de cultura acrescentados de 0 μM , 0,5 μM , 1 μM , 5 μM e 10 μM de AtRALF1. O mesmo procedimento foi realizado usando-se 0,1 μM da citocinina BAP (6-Benzilaminopurina) ou 0,1 μM da auxina NAA (ácido naftil acético) ao invés de AtRALF1.

As análises do tamanho das raízes foram feitas após 8 d de tratamento. Para a análise dos dados quantitativos, foi usada a metodologia descrita por Weigel e Glazebrook (2002) e o programa ImageJ (National Institutes of Health, USA).

3.10 Obtenção e análises genética/fenotípica de plantas híbridas de arabidopsis

Plantas transgênicas de arabidopsis superexpressando AtRALF1 (p35S-AtRALF1; Matos et al., 2008) foram cruzadas com mutantes *bak1-4*, conforme descrito (WEIGEL; GLAZEBROOK, 2002). Para selecionar as plantas com características genéticas desejáveis, uma análise de expressão por PCR semi-quantitativo foi realizada utilizando os procedimentos já descritos. Os genes analisados foram *AtRALF1* e *BAK1*. Os iniciadores para esta análise estão descritos no ANEXO B. Plantas que superexpressam AtRALF1 e homozigotas mutantes *bak1* foram selecionadas até a geração T3. Estas plantas híbridas que superexpressam AtRALF1 e são homozigotas mutantes *bak1* foram cruzadas com plantas de arabidopsis selvagens. Os híbridos resultantes deste cruzamento foram selecionados até a geração T1.

Para analisar o fenótipo de todas as plantas híbridas, as mesmas foram crescidas por 8 d em placa vertical, conforme já relatado em procedimentos anteriores. As análises quantitativas do tamanho da raiz foram feitas usando-se ImageJ (National Institutes of Health, USA).

3.11 Extração e isolamento do peptídeo AtRALF1 maduro de plantas de arabidopsis

A extração e o isolamento do peptídeo maduro de plantas selvagens, transgênicas p35S:AtRALF1 e transgênicas híbridas p35S:AtRALF1/*bak1-4* foram realizados de acordo com MATOS et al. (2008), com modificações. Plantas selvagens e transgênicas foram maceradas com nitrogênio líquido, homogeneizadas em ácido fórmico 1% e o macerado foi incubado por 10 min em temperatura ambiente para a extração ácida de proteínas totais. Em seguida, o extrato foi clarificado com no mínimo duas centrifugações a 13000 x g por 15 min, 4°C. O sobrenadante foi injetado na coluna de fase reversa Resource 3 mL HPLC (Amersham) previamente equilibrada com 0,1% de ácido fórmico. Um gradiente de 30 min que partiu de 0 a 80% de acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico foi usado. Para o estabelecimento de um padrão, o peptídeo AtRALF1 sintético maduro foi injetado previamente para determinar o intervalo de coleta da fração que contém o

peptídeo. Após a injeção dos extratos clarificados, as frações contendo o peptídeo foram coletadas entre 9 e 16 min, liofilizadas e analisadas por *Western blot* usando o anticorpo primário anti-RALF.

3.12 *Western blot* para detecção das proteínas

Para a detecção das proteínas de interesse, as amostras foram individualmente ressuspensas em tampão de corrida SDS-PAGE contendo 10% de β -mercaptoetanol, aquecidas a 95°C por 8 min, aplicadas em gel SDS-PAGE (NuPAGE 10-20% Tris-tricine Gel - Life Technologies) e em seguida o gel foi transferido para membrana de nitrocelulose por 1 h a 100 V. A análise por *Western Blot* foi realizada utilizando o seguinte procedimento: lavagem da membrana 2 vezes com solução TBS-T (TBS contendo Tween 0,1%) por 5 min cada; bloqueio da membrana em solução TBS-T com 5% de leite por 1 h; incubação por 2 h com o anticorpo primário em solução de TBS-T com 2% de leite; lavagem da membrana 5 vezes com solução TBS-T por 5 min cada; incubação por 1 h com o anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina anti-igG ou à peroxidase (1:10000, Zymed) em solução de TBS-T com 2% de leite; lavagem da membrana 5 vezes com solução TBS-T por 5 min cada; incubação com o substrato *Lumi-Phos WB Chemiluminescent Substrate* (Pearce) ou *Super Signal® West Pico Maximum Chemiluminescent* (Thermo Scientific) por 5 min no escuro e revelação usando o filme apropriado após 1 h de exposição.

3.13 Inibição de alongamento de hipocótilo com AtRALF1

Sementes de *arabidopsis* desinfestadas foram mantidas por 3 d a 4°C e colocadas em meio contendo sais MS 0,5X sem vitaminas e sacarose (pH 5,6) em placas de 24 poços. Em seguida, foram submetidas à luz ($150 \mu\text{E m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) por 1 h e no escuro por 24 h, a 24°C. Após este tempo, foi adicionado 1 μM , 5 μM e 10 μM do peptídeo AtRALF1 e o alongamento do hipocótilo foi medido em 48 h após a adição do mesmo, com o auxílio do programa ImageJ (National Institutes of Health, USA).

3.14 Análise da expansão celular: medições do comprimento celular na endoderme de raiz primária de arabidopsis

Sementes de arabidopsis foram superficialmente esterilizadas como já descrito e crescidas por 2 d em meio MS 0,5X sem vitaminas e sacarose, pH 5,6, sob luz constante ($150 \mu\text{E m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) a 24°C. Em seguida, 10 μM do peptídeo AtRALF1 foi adicionado e o comprimento das células da endoderme na zona de diferenciação foi medido 2 d após o tratamento. As plantas controles foram mantidas sob as mesmas condições em meio isento de peptídeo. Para corar a parede celular, as plantas foram tratadas com uma solução de 1 mg/mL de iodeto propiônico (Sigma) durante 15 min no escuro, e lavadas duas vezes com água. As células foram visualizadas e mensuradas através de microscopia confocal (Olympus FV1000). Para células coradas com iodeto propiônico (Sigma), os comprimentos de onda de excitação e de emissão usados foram 555 e 655 nm, respectivamente. Cerca de trinta plantas por genótipo e pelo menos 5 células por raiz foram analisadas.

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

As reações de digestão do DNA usando enzimas de restrição foram realizadas usando tampão para reação enzimática apropriado (diluído 10 X) e 5 U de enzima por μg de DNA. As digestões do DNA foram feitas por no mínimo 30 min a 37°C. Após a reação, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% e os fragmentos de interesse foram purificados com o auxílio do Kit QIAEX II *Gel Extraction* (QIAGEN), seguindo as recomendações dos fabricantes.

Basicamente, os blocos de agarose contendo os fragmentos de DNA foram cortados e pesados. Três volumes do tampão QXI foi adicionado para cada 100 mg de gel juntamente com 10 μL de QIAEX II. A amostra foi incubada a 50°C por aproximadamente 10 min até a completa dissolução de agarose. A amostra foi centrifugada a 12000 x g por 30 s e após a 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 (com etanol). A resina foi seca a 37°C por 20 min e o DNA foi eluído com 20 μL de água ultra-pura autoclavada.

3.16 Clonagem e ensaio de duplo híbrido em leveduras

Os fragmentos de DNA desejados - codificadores dos peptídeos ativos AtRALF1 e AtRALF34 e dos domínios extracelulares das proteínas BAK1, BAK7, BRI1 e FLS2 - foram obtidos por intermédio de reações padrão de PCR utilizando iniciadores específicos contendo os sítios de restrição *NdeI* e *BamHI* (ANEXO B). Após a amplificação, os fragmentos foram digeridos, purificados e clonados nos vetores pGADT7 e/ou pGBKT7 (Clontech Laboratories) com a enzima T4 DNA ligase. As construções foram confirmadas por PCR e sequenciamento.

A transformação e crescimento da levedura *Sacharomyces cerevisiae* foram realizados conforme descrito por Gietz e Woods (2002). Suscintamente, uma colônia de levedura cepa AH109 crescida em placa contendo meio YPDA (10 g/L extrato de levedura, 20 g/L peptona, 20 g/L glicose, 1 mg adenina e 20 g/L ágar) foi inoculada no mesmo meio líquido por 24 h, 180 rpm a 30°C. No dia seguinte, 1 mL da cultura foi centrifugada por 30 s a 8000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 µL de água ultra-pura autoclavada. Após a lavagem e nova centrifugação sob mesmas condições, os seguintes componentes foram adicionados: 50% PEG 3500, 1 M LiAc, 2 mg/mL espermidina e 500 mg de DNA plasmidial de interesse. Após 40 min de incubação em banho-maria a 42°C, a reação foi centrifugada novamente e o sobrenadante foi descartado. O pellet de células de levedura foi ressuspensionado em 50 µL de água ultra-pura e plaqueado em meio TRAFO (6,5 mg/L nitrogênio base, 20 g/L glicose, 2 g/L Dropout, 20 g/L ágar, pH 5,6) sem leucina e triptofano para seleção das células de levedura que sofreram transformação. A placa foi incubada a 30°C por 4 d. As células de levedura transformadas com os vetores de interesse foram selecionadas em meio TRAFO sem leucina, triptofano e histidina e também em meio TRAFO sem leucina, triptofano e adenina para testar as interações.

3.17 Confirmação da produção das proteínas em levedura

Células de levedura transformadas com os vetores de interesse foram inoculadas em meio YPDA, crescidas por 16 h a 28°C e extraídas conforme descrito por Kushnirov (2000). Suscintamente, 1 mL da cultura de levedura foi centrifugada a 5000 x g por 5 min, temperatura ambiente e ressuspensionada em 100 µL de água ultra-

pura autoclavada. Em seguida, foi adicionado mais 100 μ L de NaOH (0,2 M) e a solução foi incubada por 5 min em temperatura ambiente. Uma centrifugação final foi realizada a 5000 x g por 5 min, em temperatura ambiente.

Para a detecção das proteínas extraídas, as mesmas foram individualmente ressuspensas em tampão de corrida SDS-PAGE contendo 10% de β -mercaptoetanol, aquecidas a 95°C por 8 min, aplicadas em gel SDS-PAGE (NuPAGE 10-20% Tris-tricine Gel - Life Technologies) e em seguida o gel foi transferido para membrana de nitrocelulose por 1 h a 100 V. Foram feitos dois *Western Blots* para detecção das proteínas fusionadas com o epítipo Myc ou HA, usando os anticorpos primários anti-Myc (Anti-myc-HRP Antibody, # R951-25 - Life Technologies) ou anticorpo HA (anti-HA, HA Antibody, HRP conjugate, #PA1-29751 - Thermo Scientific) nas concentrações de 1:5000 e 1:1000, respectivamente.

3.18 Produção e identificação da proteína BAK1 (domínio extracelular)

3.18.1 Clonagem, purificação e análise em HPLC da proteína BAK1 (domínio extracelular)

A fim de se expressar o domínio extracelular da proteína BAK1 (At4g33430), foi utilizado o sistema gateway (Invitrogen). A região codante do domínio extracelular de BAK1 de *Arabidopsis* foi amplificada via PCR, clonada no vetor de entrada pENTR D-TOPO (Invitrogen) e recombina no vetor pDEST17, o qual possui uma extensão de histidinas na extremidade N-terminal. O vetor pDEST17 contendo o DNA de interesse foi inserido na cepa Roseta de *Escherichia coli* para a expressão. A clonagem foi confirmada por sequenciamento.

O mesmo procedimento descrito para a purificação dos peptídeos AtRALFs foi realizado para a purificação da proteína BAK1 (domínio extracelular). Em relação a análise em HPLC, a proteína foi eluída com 40 min de gradiente de 0 a 80% acetonitrila/0,1% ácido fórmico; o fluxo da bomba usado também foi de 1 mL/min.

3.18.2 Digestão da proteína BAK1 (domínio extracelular) com tripsina e análise por espectrometria de massas

A digestão com tripsina do domínio extracelular da proteína BAK1 foi realizada após sua separação em HPLC. O pico majoritário correspondente à proteína de interesse foi coletado e incubado com 75 nM de bicarbonato de amônio em 40% (v/v) de etanol por 60 min em temperatura ambiente. Após este tempo, 5 mM de Ditioneitol (DTT) em 25 mM de bicarbonato de amônio foi adicionado por 30 min a 60°C para a redução da proteína, seguida de uma reação de alquilação usando 55 mM de Iodoacetamida em 25 mM de bicarbonato de amônio por mais 30 min em temperatura ambiente e no escuro. Para a reação de digestão, uma solução contendo 40 mg/mL de tripsina em 50 mM de bicarbonato de amônio foi adicionada por 45 min no gelo, seguida de uma incubação a 30°C por 16 h. A reação final foi seca à vácuo e enviada para a Central Analítica da Universidade de São Paulo (USP) para análise usando a técnica de ESI-TOF (*Electrospray Ionization-Time of Flight*).

3.19 Ensaio de co-imunoprecipitação das proteínas recombinantes BAK1 e AtRALF1 *in vitro*

Para analisar a interação *in vitro* entre as proteínas recombinantes AtRALF1 (peptídeo ativo) e BAK1 (domínio extracelular, fusionado ao epítipo HA), foi realizado um ensaio de imunoprecipitação. Para tal, 100 nM de ambas as proteínas recombinantes (produzidas de maneira heteróloga) foram incubadas por 16 h em temperatura ambiente sob agitação em tampão de interação (100 mM NaCl; 1mM PmSF; detergente CHAPS 1% X-100; 2,7 mM KCl; 8 mM NaH₂PO₄ e 2 mM KH₂PO₄, pH 6,3). Logo depois foi adicionado 10 µL de esferas de agarose anti-HA (EZviewTM Red Anti-HA Affinity Gel - SIGMA- ALDRICH) em cada reação (BAK1 mais AtRALF1, BAK1 somente e AtRALF1 somente) e incubado por 20 min em temperatura ambiente, sob agitação. Posteriormente, as esferas de agarose foram lavadas no mínimo cinco vezes com o mesmo tampão por 5 min cada em temperatura ambiente. As esferas de agarose foram ressuspensas em tampão de corrida 1x contendo 10% de β-mercaptoetanol, fervidas a 95°C por 8 min, aplicadas em gel SDS-PAGE (NuPAGE 10-20% Tris-tricine Gel - Life Technologies) e em seguida o

gel foi transferido para membrana de nitrocelulose por 1 h a 100 V. Foram feitos dois *Western Blots* para detecção das proteínas AtRALF1 e BAK1, utilizando os anticorpos primários anti-RALF e anti-HA (anti-HA, HRP conjugate, #PA1-29751 - Thermo Scientific).

3.20 Construção do plasmídeo p35S-BAK1:GFP

Para a construção de vetor contendo a proteína de interesse BAK1 fusionada à GFP, foi usado o sistema Gateway (Life Technologies), no qual este gene foi clonado no vetor de entrada pENTR/D-TOPO e recombinado no vetor de destino pK7FWG2 (KARIMI; INZÉ; DEPICKER, 2002). Os iniciadores utilizados para a amplificação dos genes de interesse são mostrados no ANEXO B. Células competentes de *A. tumefaciens* cepa GV3101 foram transformadas com este vetor.

3.21 Transformação transiente de células foliares de *Nicotiana benthamiana*

Os vetores de transformação de plantas com os genes de interesse foram introduzidos em *A. tumefaciens* cepa GV3101 via eletroporação e usados nos ensaios de expressão transiente em tabaco.

As proteínas de interesse foram expressas em folhas de *N. benthamiana* usando transformação mediada por agrobactéria (agroinfiltração), conforme já descrito (SPARKES et al., 2006). Resumidamente, colônias de agrobactérias contendo os vetores de interesse foram crescidas por 16 h sob agitação de 180 rpm a 30°C em 5 mL de meio LB líquido contendo os antibióticos gentamicina (50 µg/mL), canamicina (50 µg/mL) e espectinomicina (50 µg/mL). Em seguida, 1 mL da cultura de agrobactérias foi centrifugada a 2500 x g por 5 min em temperatura ambiente e ressuspensas em 1 mL de tampão de ativação (10 mM MES-KOH pH 5,6; 10 mM MgCl₂; 200 µM acetoseringona) e incubadas em temperatura ambiente entre 2 e 4 h. A densidade óptica (OD) de cada cultura foi mensurada e ajustada com tampão de ativação para a OD final de 0,3. As folhas de *N. benthamiana* foram agroinfiltradas na superfície abaxial com o auxílio de uma seringa de 1 mL desprovida de agulha.

O vetor p19 que contém a proteína supressora do silenciamento gênico (VOINNET et al., 2003; LAKATOS et al., 2004) também foi co-infiltrado com os

outros vetores para transformação de plantas. As plantas que sofreram agroinfiltração foram mantidas em laboratório a 23°C por 3 a 5 d, e analisadas em microscópio confocal (FV1000, Olympus). O fluoróforo utilizado foi GFP, comprimento de onda para excitação de 488 nm e para emissão de 540 nm.

3.22 Ensaio de co-imunoprecipitação entre AtRALF1 e BAK1:GFP

O ensaio de co-imunoprecipitação foi realizado conforme descrito por Haruta et al. (2014), com modificações. Folhas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*) foram agroinfiltradas com *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 carregando o vetor p35S:BAK1:GFP ou p19. A agroinfiltração foi realizada conforme descrito por Sparkes et al. (2006). Após 3-4 d, as folhas foram maceradas com nitrogênio líquido e ressuspendidas em tampão (300 mM sacarose, 100 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, 25 mM NaF, 1 mM Na₂MoO₄, 1 mM PMSF, 1 mM DTT e coquetel de inibidores de proteases, pH 6,2). O homogeneizado foi centrifugado a 1000 x g por 10 min, 4°C e o sobrenadante foi centrifugado a 100.000 x g por 50 min, 4°C, para separação da fração microssomal. A fração microssomal precipitada foi ressuspensa no mesmo tampão acrescido de 0,5% Triton-X e incubada com 600 nM de AtRALF1 ou 600 nM de [A⁶]AtRALF1(5-49) por 1 h a 4°C. Os complexos protéicos foram incubados com o anticorpo anti-GFP (sc-8334, Santa Cruz Biotechnology) e esferas de agarose mais Proteína A (Life Technologies) por 16 h a 4°C. Em seguida, as esferas foram lavadas 5 vezes com o mesmo tampão. As proteínas co-imunoprecipitadas foram analisadas por *Western blot* usando os anticorpos primários anti-RALF para detecção de AtRALFs e anti-GFP GFP (1:5000; sc-8334, Santa Cruz Biotechnology) para detecção de BAK1 fusionado com GFP.

3.23 Análise de expressão de genes induzidos por AtRALF1 por PCR semiquantitativo

Plantas de arábida foram crescidas por 10 d em placa vertical contendo meio MS 0,5X pH 5,6, sem sacarose ou vitaminas, acrescido de 6 g/L de ágar. As condições de crescimento foram luz constante (150 $\mu\text{E m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) a 24°C. Para análises de PCR semi-quantitativo, aproximadamente 20 plantas foram submetidas ao mesmo meio MS líquido e tratadas por 1 h com 1 μM de AtRALF em temperatura

ambiente. Plantas controle foram incubadas nas mesmas condições sem o peptídeo. Em seguida, o RNA total foi isolado de raízes usando o reagente Trizol (Life Technologies), seguindo recomendações dos fabricantes. O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA usando o sistema *ImProm-II Reverse Transcription* (Promega). 1,5 µL de cDNA foi usado nas reações de PCR, realizadas por 29 ciclos usando iniciadores específicos, descritos no ANEXO B.

3.24 Análise de expressão de genes induzidos por AtRALF1 por PCR quantitativo (qRT-PCR)

A análise de qRT-PCR foi realizada usando cDNA diluído 10 vezes, *Maxima SyBR Green Rox/qPCR Master Mix* (Thermo Scientific) e um *StepOne™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Foram analisados os genes induzidos por AtRALF1: um gene que codifica proteína rica em prolina (*AtPRP3*, At3g62680), um gene que codifica uma glicoproteína rica em hidroxiprolina (*AtHRGP2*, At5g19800), *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHISM AND DWARFISM (CPD)*, At5g05690) e *DWARF4 (DWF4)*, At3g50660). O gene *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)*, At1g13440) foi usado novamente como controle. Reações sem cDNA foram usadas como controle negativo. Três replicatas foram analisadas para cada amostra biológica. Duas amostras biológicas foram utilizadas. O ciclo limiar foi determinado automaticamente pelo aparelho e a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) foi usada para calcular o nível de expressão de cada gene. O valor arbitrário 1 foi atribuído aos tratamentos controle.

3.25 Análise do pH da rizosfera através de gel indicador

O gel indicador de pH foi elaborado conforme descrito (WU et al., 2007), com poucas modificações. Plantas de *arabidopsis* foram crescidas por 7 d em placa vertical contendo meio MS 0,5X acrescido de 12 g/L de Phytigel®, pH 5,6. As raízes das plantas foram tratadas com 10 µM de AtRALF1 ou água (controle) por 15 min. Foram utilizadas aproximadamente 25 plantas por tratamento. Em seguida, as plantas foram transferidas para o gel indicador de pH (0,006% de *bromocresol purple*, 1 mM de CaSO₄, pH 5,7). O registro da mudança de coloração no gel foi realizado em até 30 min após o tratamento.

3.26 Ensaio de sensibilidade de plantas ao LiCl

Este experimento foi conduzido conforme Haruta et al. (2014). Plantas de *arabidopsis* foram crescidas em placa vertical contendo meio MS 0,5X acrescido de 12 g/L de Phytigel® pH 5,6 por 3 d. Em seguida, foram transferidas para o mesmo meio, na presença ou ausência de 18 mM de LiCl, e crescidas por mais 4 d.

3.27 Ensaio de mobilização de Ca^{2+}

O ensaio de mobilização de cálcio em plantas de *arabidopsis* foi realizado conforme descrito (HARUTA et al. 2008; MORATO DO CANTO et al. 2014). Para avaliar a mudança no nível de Ca^{2+} , uma linhagem de *arabidopsis* transgênica contendo uma única inserção do transgene que codifica para a proteína citoplasmática aequorina controlada pelo promotor 35S foi usada (LEWIS et al., 1997), aqui denominada aeq-Col-0. Também foram usadas plantas transgênicas expressando aequorina no *background* mutante *bak1-3*, chamada de aeq-*bak1-3*, obtidas pelo cruzamento entre plantas aeq-Col-0 e *bak1-3*. As plantas aeq-*bak1-3* foram selecionadas até a geração T3 e confirmadas por PCR semi-quantitativo usando iniciadores específicos (ANEXO B). Sementes dessas plantas transgênicas foram superficialmente esterilizadas e germinadas em meio de cultura líquido. Após 4 d, plantas foram transferidas para uma placa de 96 poços (1 planta/poço) contendo meio MS 0,5X pH 5,6, sem sacarose e vitaminas, suplementado por 2,5 mM de coelenterazina cp (Interprise). A placa foi incubada no escuro por 16 h, 24°C. Em seguida, diferentes concentrações do peptídeo (não marcado ou marcado com éster de acridínio, conforme item 3.30) foram adicionadas em cada poço. A emissão da luminescência resultante foi monitorada usando-se um leitor de microplaca específico (Biotec ELx 800) por aproximadamente 160 s (20 leituras).

3.28 Marcação e purificação dos peptídeos AtRALF1 e AtRALF34 com éster de acridínio

A marcação dos peptídeos recombinantes AtRALF1 e AtRALF34 com éster de acridínio foi realizada conforme instruções do fabricante (Cayman Chemical Company), com modificações. Resumidamente, 150 µg de AtRALF foi incubado com

300 µL do tampão *Acridinium Labeling Solution* (0,1 M tampão fosfato de sódio pH 6,3 e 0,15 M NaCl) mais 9 µL de solução de éster de acridínio (9:1 dimetilformamida/éster de acridínio) por 30 min em temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, foi adicionado 100 µL do tampão *Acridinium Quench Solution* (0,1 M tampão fosfato de sódio pH 6,3; 0,15 M NaCl; 1% glicina) e a solução foi incubada mais 30 min em temperatura ambiente. Terminada a marcação, foi feita a dessalinização da solução final em coluna contendo Sephadex G25-80 (Sigma) equilibrada com 0,1% de ácido fórmico, no qual 10 tubos individuais contendo 1 mL cada foram coletados. Foi feita a quantificação de cada tubo em nanodrop e aqueles que apresentaram os maiores valores de absorbância a 220 nm foram purificados em HPLC com coluna de fase reversa C18 (8-mm 4,6 x 25 cm Kromasil®) previamente equilibrada com 0,1% de ácido fórmico. O peptídeo foi eluído com 60 min de gradiente de 0 a 40% acetonitrila/ 0,1% ácido fórmico; o fluxo da bomba usado foi de 1 mL/min. Através da HPLC foi possível separar o peptídeo AtRALF não marcado do marcado com éster de acridínio. Apenas o peptídeo AtRALF marcado com éster de acridínio (acriAtRALF) foi coletado e concentrado em liofilizador.

3.29 Ligação de acriAtRALF1 e acriAtRALF34 em plantas de arabidopsis

Plantas selvagens de arabidopsis e mutantes *bak1-1*, *bak1-3*, *bak1-4* e *bak7* crescidas por 5 d em meio MS 0,5X semi-sólido pH 5,6 foram incubadas com AtRALF1 marcado com éster de acridínio (acriAtRALF1) na presença ou ausência de AtRALF1, AtRALF9-49 e AtRALF34 não marcado por pelo menos 15 min a 4°C. Todas as incubações foram realizadas em 1 mL de meio MS 0,5X líquido pH 5,6. Após o tempo de incubação, as plantas foram lavadas no mínimo três vezes. Foram usadas 5 plantas por tratamento. O mesmo procedimento foi realizado usando acriAtRALF34.

Ésteres de acridínio se decompõem de maneira rápida e estequiométrica na presença de peróxido de hidrogênio mais hidróxido de sódio, emitindo um flash de luz que pode ser quantificado através de um luminômetro (JOSS; TOWBIN, 1994). Para avaliar e quantificar a ligação do acriAtRALF1 em plantas selvagens e mutantes, as emissões de luminescência resultantes foram monitoradas usando-se um leitor de microplaca específico (Biotec ELx 800) ajustado para ler 0,1 s após a

adição de uma solução de 20 mM de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em 100 mM de NaOH.

3.30 Análises estatísticas

O *software Infostat Statistics Base package* (version 2012e, Córdoba, Argentina) foi usado para as análises estatísticas. A comparação das médias foi realizada usando o teste de Tukey HSD (*Honestly Significant Difference*), juntamente com análise de variância (STEEL et al., 1996). Para a comparação de médias, o teste de Student T (http://www.chem.uoa.gr/applets/AppletTtest/AppI_Ttest2.html) foi usado com significância de $P < 0,1$; 0,05 e 0,01.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito do AtRALF1 na inibição do crescimento da raiz primária de mutantes da via dos brassinosteróides

AtRALF1 antagoniza os efeitos dos brassinosteróides (BRs) e, com a finalidade de investigar melhor a relação deste peptídeo com os BRs, decidiu-se analisar o comportamento de diferentes mutantes relacionados com a via dos BRs quando expostos ao AtRALF1. Plantas transgênicas que superexpressam genes relacionados a via dos BRs também foram investigadas. Foram testados os mutantes com sensibilidade reduzida a BR, *bsk3-1*, *bri1-301* e *bak1-4*, os mutantes com ganho de função, *BRI1^{sud1}*, *bes1-1D* e *bzr1-1D*, e as plantas transgênicas *BRI1-OX* e *DWF4-OX*. O mutante *bsk3-1* (*BR-signaling kinase3*) é deficiente na produção da proteína quinase BSK3, um dos substratos do receptor dos BRs (KIM; WANG, 2010). O *bri1-301* (*BR-insensitive1*) apresenta perda parcial da função do gene que codifica para o receptor dos BRs, BRI1 (XU et al., 2008). O *bak1-4* (*bri1-associated kinase1*) é deficiente na produção da proteína co-receptora dos BRs, BAK1 (LI et al., 2002; NAM; LI et al., 2002). Mutantes *BRI1^{sud1}* se comportam como plantas que superexpressam o receptor BRI1 (BELKHADIR et al., 2012). Plantas *bes1-1D* e *bzr1-1D* acumulam, respectivamente, os fatores de transcrição BES1 e BZR1 no núcleo e são insensíveis ao inibidor de BR Brassinazole (WANG et al., 2002; YIN et al., 2002). As plantas transgênicas *BRI1-OX* superexpressam o gene que codifica o receptor BRI1 fusionado com a proteína GFP (WANG et al., 2001) e as plantas *DWF4-OX* superexpressam o gene que codifica a enzima da biossíntese de brassinosteróides citocromo P450 monooxigenase; ambas comportam-se como superprodutoras de BRs (CHOE et al., 1998).

Raízes primárias de plantas selvagens cresceram em média 0,11 cm e foram inibidas pelo peptídeo AtRALF1 em aproximadamente 50%. A inibição de raízes primárias de mutantes *bsk3-1*, que cresceram 0,074 cm, foi de aproximadamente 46%; de mutantes *bri1-301*, cujo crescimento foi de 0,095 cm, em torno de 58%. Em mutantes *bak1-4*, cujas raízes primárias cresceram somente 0,062 cm, AtRALF1 não afetou o crescimento de raízes. O crescimento radicular de *BRI1^{sud1}* foi de 0,195 cm e a porcentagem de inibição igual a 60,5%. Raízes primárias de *bes1-1D* e *bzr1-1D* cresceram 0,17 e 0,16 cm, respectivamente, e a inibição causada pelo peptídeo em

ambas foi em torno de 42%. Em plantas BRI1-OX, o crescimento radicular foi 0,13 cm e a porcentagem de inibição aproximadamente 35%. Nas plantas DWF4, o crescimento das raízes primárias foi de 0,2 cm e a inibição por volta de 32% (Figura 1). Todos os mutantes e transgênicos envolvidos com a sinalização de BR que foram testados, com exceção do *bak1-4*, tiveram suas raízes primárias inibidas por AtRALF1. O mutante *bak1-4* foi insensível ao tratamento.

Figura 1 - Análise do efeito do peptídeo AtRALF1 em mutantes e transgênicos relacionados com a via dos brassinosteróides. Ensaio de inibição de raiz primária com o peptídeo recombinante AtRALF1. As medições das raízes foram feitas após 48 h de tratamento com 10 μM do peptídeo. Col-0, plantas selvagens. Cada barra representa a média do comprimento de raiz de 20-40 plantas. Valores representam as médias mais o desvio padrão. Asteriscos triplos representam $P < 0,01$ (Teste de Student's T); ns, não significativo. Este experimento é representativo de três repetições com resultados similares

Para verificar se o peptídeo AtRALF1 afetaria o crescimento radicular de outros mutantes perda-de-função para os genes da mesma família do BAK1, os mutantes *serk1*, *serk2*, *bak1-1*, *bak1-3*, *bak7* (*serk4*) e *bak8* (*serk5*) foram avaliados nas mesmas condições descritas anteriormente. O crescimento das raízes primárias dos mutantes *serk1*, *serk2*, *bak1-1*, *bak1-3*, *bak7* e *bak8* foi de 0,09 cm, 0,133 cm, 0,057 cm, 0,06 cm, 0,118 cm e 0,081 cm, respectivamente (Figura 2). Os valores aproximados da porcentagem de inibição de raízes primárias dos mutantes *serk1*,

serk2, *bak7* e *bak8* foram de 49%, 46%, 48% e 47%, respectivamente. Nos mutantes *bak1-1* e *bak1-3*, o crescimento das raízes primárias não se alterou após o tratamento com o peptídeo (Figura 2). Os mutantes *bak1-1*, *bak1-3* e *bak1-4*, todos perda-de-função, apresentam inserção de T-DNA em diferentes regiões do gene BAK1 (ANEXO C).

Figura 2 - Ensaio de inibição de raiz primária dos mutantes *serk/bak* com o peptídeo recombinante AtRALF1. As medições das raízes de plantas selvagens (Col-0), mutantes *serk1* (SALK_053021), *serk2* (SALK_058020C), *bak1-1* (CS6125), *bak1-3* (SALK_034523), *bak7* (SALK_058093) e *bak8* (SALK_147275C) foram feitas após 48 h de tratamento com 10 μM do peptídeo. Cada barra representa a média do comprimento de raiz de 20-40 plantas. Valores representam as médias mais o desvio padrão. Asteriscos triplos representam $P < 0,01$ (Teste de Student's T); ns, não significativo. Este experimento é representativo de três repetições com resultados similares

Em seguida, verificou-se se a insensibilidade dos mutantes *bak1-1*, *bak1-3* e *bak1-4* seria específica para o AtRALF1 ou se seria uma resposta genérica para os peptídeos AtRALFs. Para testar a especificidade da resposta, o peptídeo AtRALF34 foi escolhido. Apesar de possuir a estrutura primária mais diferenciada dentre os nove AtRALFs mais parecidos com o originalmente isolado de tabaco, o AtRALF34 inibe o crescimento de raiz primária e alcaliniza o meio extracelular de suspensões celulares com a mesma intensidade que o AtRALF1 (MORATO DO CANTO et al., 2014).

O crescimento da raiz primária de plantas selvagens foi semelhante ao descrito nas Figuras 1 e 2 e a porcentagem de inibição de raiz causada pelo peptídeo AtRALF34 foi de aproximadamente 42% (Figura 3). Raízes primárias dos

mutantes *bak1-1*, *bak1-3* e *bak1-4* cresceram em torno de 0,6-0,7 cm. Diferentemente de AtRALF1, o peptídeo AtRALF34 inibiu o crescimento das raízes primárias dos três mutantes *bak1* em torno de 30% (Figura 3).

Figura 3 - Ensaio de inibição de raiz primária de mutantes *bak1* com o peptídeo AtRALF34. Raízes de mutantes *bak1-1* (CS6125), *bak1-3* (SALK_034523) e *bak1-4* (SALK_116202) são inibidas por AtRALF34. As medições das raízes foram feitas após 48 h de tratamento com 10 μM do peptídeo. Col-0, plantas selvagens. Cada barra representa a média do comprimento de raiz de 20-40 plantas. Valores representam as médias mais o desvio padrão. As médias com a mesma letra não são significativamente diferentes entre si (Teste de Tukey, $P \leq 0,01$). Este experimento é representativo de três repetições com resultados similares

Em meio líquido, as raízes primárias de mutantes *bak1-1*, *bak1-3* e *bak1-4* cresceram aproximadamente 54-60% do tamanho de raízes primárias de plantas selvagens (Figuras 1, 2 e 3). Para verificar se a insensibilidade de mutantes *bak1* ao peptídeo não poderia ser efeito de um desenvolvimento comprometido, o crescimento de raízes primárias dos mutantes *bak1* foi maximizado trocando-se o meio líquido por meio semi-sólido vertido em placas que, posteriormente, são colocadas na posição vertical para a germinação e crescimento das plantas.

Em placas verticais, as raízes de mutantes *bak1* cresceram em média 4 cm, que corresponde a aproximadamente 68% em relação a raízes de plantas selvagens. As raízes primárias dos três mutantes *bak1*, tratados ou não tratados com diferentes concentrações de AtRALF1, não diferiram significativamente entre si nas novas condições de placa vertical e meio semi-sólido (Figura 4A). As raízes primárias de plantas selvagens foram inibidas por AtRALF1 nas doses de 1, 5 e 10 μM em aproximadamente 20%, 50% e 60%, respectivamente. Imagens

representativas de plantas tratadas e não tratadas com diferentes concentrações de AtRALF1 após 8 d são mostradas (Figura 4B).

Figura 4 - Raízes primárias de mutantes *bak1-1* (CS6125), *bak1-3* (SALK_034523) e *bak1-4* (SALK_116202) não são inibidas pelo peptídeo AtRALF1. Col-0, plantas selvagens. Plantas crescidas por 5 d em meio MS 0,5X foram transferidas para o mesmo meio de cultura na presença de 0, 0,5, 1, 5 e 10 μ M do peptídeo por mais 8 d. (A) Medições de raízes primárias após 8 d de tratamento com diferentes concentrações do peptídeo. Cada barra representa a média do comprimento de raiz de 10 plantas. Valores representam as médias mais o desvio padrão. As médias com a mesma letra não são significativamente diferentes entre si (Teste de Tukey, $P \leq 0,01$). Este experimento é representativo de três repetições com resultados similares. (B) Ensaio de inibição em placa vertical (meio de cultura semi-sólido) após 8 d de tratamento com as concentrações 0, 0,5, 1, 5 e 10 μ M do peptídeo. As barras brancas representam 1 cm

Para verificar o crescimento radicular de plantas selvagens e mutantes *bak1* sob diferentes concentrações de AtRALF1 ao longo do tempo, o comprimento de raízes primárias das plantas foi mensurado nos 8 d de tratamento.

Plantas selvagens expostas a 0,5 μ M de AtRALF1 não tiveram o crescimento da raiz primária afetado. Nas concentrações de 1, 5 e 10 μ M, o peptídeo hormonal afetou negativamente o crescimento de raízes primárias de plantas selvagens a partir do terceiro dia de crescimento (Figura 5).

Figura 5 - Comprimento de raiz primária de plantas selvagens submetidas a diferentes concentrações do peptídeo AtRALF1 em 1 a 8 d após tratamento. Plantas crescidas por 5 d em meio MS 0,5X foram transferidas para o mesmo meio de cultura na presença de 0, 0,5, 1, 5 e 10 μ M do peptídeo por mais 8 d. Raízes de plantas selvagens são inibidas pelo peptídeo de maneira dose-depente. Cada barra representa a média do comprimento de raiz de 10 plantas. Valores representam as médias mais o desvio padrão. As médias com a mesma letra não são significativamente diferentes entre si (Teste de Tukey, $P \leq 0,01$). Este experimento é representativo de três repetições com resultados similares

Nos três mutantes *bak1-1*, *bak1-3* e *bak1-4*, nenhuma das concentrações testadas promoveu a inibição de raízes primárias. O crescimento radicular de plantas não tratadas, dose 0 μ M, foi similar ao de plantas tratadas com 0,5, 1, 5 e 10 μ M de AtRALF1 nos 8 d de tratamento (Figuras 6, 7 e 8).

Figura 6 - Comprimento de raiz primária de mutantes *bak1-1* submetidos a diferentes concentrações do peptídeo AtRALF1 em 1 a 8 d após tratamento. Plantas crescidas por 5 d em meio MS 0,5X foram transferidas para o mesmo meio de cultura na presença de 0, 0,5, 1, 5 e 10 µM do peptídeo por mais 8 d. Raízes mutantes *bak1-1* não são inibidas pelo peptídeo em nenhuma das doses testadas. Cada barra representa a média do comprimento de raiz de 10 plantas. Valores representam as médias mais o desvio padrão. As médias com a mesma letra não são significativamente diferentes entre si (Teste de Tukey, $P \leq 0,01$). Este experimento é representativo de três repetições com resultados similares

Figura 7 - Comprimento de raiz primária de mutantes *bak1-3* submetidos a diferentes concentrações do peptídeo AtRALF1 em 1 a 8 d após tratamento. Plantas crescidas por 5 d em meio MS 0,5X foram transferidas para o mesmo meio de cultura na presença de 0, 0,5, 1, 5 e 10 µM do peptídeo por mais 8 d. Raízes mutantes *bak1-3* não são inibidas pelo peptídeo em nenhuma das doses testadas. Cada barra representa a média do comprimento de raiz de 10 plantas. Valores representam as médias mais o desvio padrão. As médias com a mesma letra não são significativamente diferentes entre si (Teste de Tukey, $P \leq 0,01$). Este experimento é representativo de três repetições com resultados similares

Figura 8 - Comprimento de raiz primária de mutantes *bak1-4* submetidos a diferentes concentrações do peptídeo AtRALF1 em 1 a 8 d após tratamento. Plantas crescidas por 5 d em meio MS 0,5X foram transferidas para o mesmo meio de cultura na presença de 0, 0,5, 1, 5 e 10 µM do peptídeo por mais 8 d. Raízes mutantes *bak1-4* não são inibidas pelo peptídeo em nenhuma das doses testadas. Cada barra representa a média do comprimento de raiz de 10 plantas. Valores representam as médias mais o desvio padrão. As médias com a mesma letra não são significativamente diferentes entre si (Teste de Tukey, $P \leq 0,01$). Este experimento é representativo de três repetições com resultados similares

A proteína BAK7 é homóloga a BAK1 e apresenta redundância gênica com BAK1 (JEONG et al., 2010). Por isso, mutantes *bak7* foram usados novamente em ensaio de inibição de raiz primária pelo peptídeo AtRALF1 em placa vertical para verificação de especificidade de uma relação entre AtRALF1 e BAK1. A porcentagem de inibição do crescimento de raízes primárias de mutantes *bak7* causada por 10 µM de AtRALF1 é de aproximadamente 70% (Figura 9A). Os dados qualitativos também mostram raízes primárias de mutantes *bak7* inibidas após o tratamento com o peptídeo (Figura 9B).

Figura 9 - Raízes primárias de plantas mutantes *bak7* (SALK_058093) são inibidas pelo peptídeo AtRALF1. Plantas crescidas por 5 d em meio MS 0,5X foram transferidas para o mesmo meio de cultura na presença de 10 µM do peptídeo por mais 8 d. (A) Medições de raízes após 8 d de tratamento com 0 e 10 µM do peptídeo. Cada barra representa a média do comprimento de raiz de 10 plantas. Valores representam as médias mais o desvio padrão. Asteriscos triplos representam $P < 0,01$ (Teste de Student's T). (B) Ensaio de inibição em placas verticais após 8 d de tratamento com 0 µM e 10 µM do peptídeo. A barra branca representa 1 cm. Este experimento é representativo de duas repetições com resultados similares

Para avaliar se o crescimento de raízes primárias dos mutantes *bak1-1*, *bak1-3* e *bak1-4* pode ser inibido por outros hormônios e portanto, demonstrar a especificidade da insensibilidade ao AtRALF1, plantas foram crescidas em placas verticais na presença de 0,1 µM da citocinina BAP (6-Benzilaminopurina) ou 0,1 µM da auxina NAA (ácido naftil acético). Tanto BAP quanto NAA são hormônios vegetais que inibem o crescimento de raízes primárias nas concentrações utilizadas (MULKEY; KUZMANOFFB; EVANS, 1982; CARY; LIU; HOWELL, 1995).

A citocinina BAP inibiu o crescimento de raízes primárias de mutantes *bak1-1*, *bak1-3* e *bak1-4* em aproximadamente 52%. Em plantas selvagens, a inibição de raízes primárias por BAP foi em torno de 65% (Figura 10).

Figura 10 - Raízes primárias de plantas mutantes *bak1-1* (CS6125), *bak1-3* (SALK_034523) e *bak1-4* (SALK_116202) são inibidas pela citocinina BAP. Plantas crescidas por 5 d em meio MS 0,5X foram transferidas para o mesmo meio de cultura na presença de BAP por mais 8 d. Medições de raízes após 8 d de tratamento com 0,1 µM de BAP. Plantas selvagens, Col-0, foram usadas como controle. Cada barra representa a média do comprimento de raiz de 10 plantas. Valores representam as médias mais o desvio padrão. Asteriscos triplos representam $P < 0,01$ (Teste de Student's T). Este experimento é representativo de duas repetições com resultados similares

A inibição do crescimento de raízes primárias de mutantes *bak1-1*, *bak1-3* e *bak1-4* causada pela auxina NAA foi de aproximadamente 80%. Em plantas selvagens, a inibição de raízes primárias por NAA foi de aproximadamente 84% (Figura 11).

Em suma, os resultados acima indicam que a insensibilidade de mutantes *bak1-1*, *bak1-3* e *bak1-4* ao peptídeo AtRALF1 é específica, visto que estes mutantes são sensíveis a outros hormônios, como a auxina ou a citocinina.

Figura 11 - Raízes primárias de plantas mutantes *bak1-1* (CS6125), *bak1-3* (SALK_034523) e *bak1-4* (SALK_116202) são inibidas pela auxina NAA. Plantas crescidas por 5 d em meio MS 0,5X foram transferidas para o mesmo meio de cultura na presença de NAA por mais 8 d. Medições de raízes após 8 d de tratamento com 0,1 μM de NAA. Plantas selvagens, Col-0, foram usadas como controle. Cada barra representa a média do comprimento de raiz de 10 plantas. Valores representam as médias mais o desvio padrão. Asteriscos triplos representam $P < 0,01$ (Teste de Student's T). Este experimento é representativo de duas repetições com resultados similares

4.2 Hipocótilos de mutantes *bak1* apresentam menor sensibilidade ao AtRALF1

O peptídeo AtRALF1 inibe o alongamento do hipocótilo de plantas de *arabidopsis* crescidas no escuro (MINGOSSI et al., 2010; MORATO DO CANTO et al., 2014). O efeito da aplicação exógena de AtRALF1 no hipocótilo de plantas mutantes *bak1* foi investigado.

O alongamento de hipocótilo dos mutantes *bak1-1*, *bak1-3* e *bak1-4* não é inibido pelo tratamento com 1 μM de AtRALF1. Porém, usando maiores concentrações do peptídeo, é possível observar inibição do alongamento de hipocótilo em mutantes *bak1* de maneira dose-dependente (Figura 12). Na dose de 5 μM de AtRALF1, a porcentagem de inibição do alongamento de hipocótilo nos mutantes *bak1* é de aproximadamente 30%. Utilizando 10 μM do peptídeo, esta porcentagem de inibição aumentou para aproximadamente 50%.

Em plantas selvagens, a dose de 1 μM já foi o suficiente para inibir o alongamento de hipocótilos em torno de 20%, enquanto que as doses de 5 μM e 10

μM , de maneira similar com o observado em mutantes *bak1*, inibem por volta de 30% e 55%, respectivamente (Figura 12).

Figura 12 - Ensaio de inibição de alongamento de hipocótilo dos mutantes *bak1* com o peptídeo AtRALF1. Hipocótilos de mutantes *bak1-1* (CS6125), *bak1-3* (SALK_034523) e *bak1-4* (SALK_116202) não são inibidos por 1 μM de AtRALF1, mas são inibidos a 5 e 10 μM . As medições dos hipocótilos raízes foram feitos após 48 h de tratamento com o peptídeo. Col-0, plantas selvagens. Cada barra representa a média do comprimento de raiz de 20 plantas. Valores representam as médias mais o desvio padrão. As médias com a mesma letra não são significativamente diferentes entre si (Teste de Tukey, $P \leq 0.01$). Este experimento é representativo de três repetições com resultados similares

Os dados mostram que hipocótilos de mutantes *bak1* possuem menor sensibilidade ao peptídeo.

4.3 AtRALF1 requer BAK1 para inibir a expansão celular em raiz

O peptídeo hormonal AtRALF1 inibe a expansão celular em raiz (MATOS et al., 2008; HARUTA et al., 2014; BERGONCI et al., 2014). Para verificar se a proteína BAK1 é necessária para esta atividade biológica causada por AtRALF1, plantas mutantes *bak1-1*, *bak1-3* e *bak1-4* foram tratadas com o peptídeo recombinante. Posteriormente, o comprimento das células da endoderme da raiz primária destas plantas foi mensurado.

Neste caso, as células endodérmicas da raiz foram escolhidas devido ao alto nível de expressão endógena de *AtRALF1* nesta camada (*eFP-browser*, BIRNBAUM et al., 2003; WINTER et al., 2007).

Na zona de diferenciação da raiz, as células da endoderme de plantas selvagens tratadas com o peptídeo são em média 58% menores que as células da endoderme de plantas selvagens não tratadas. Enquanto que o comprimento de células endodérmicas dos mutantes *bak1-1*, *bak1-3* e *bak1-4* tratados e não tratados com *AtRALF1* não mostrou alteração (Figura 13).

Figura 13 - *AtRALF1* não afeta no tamanho de células endodérmicas de mutantes *bak1*. Comprimento de células endodérmicas de raízes de plantas mutantes *bak1-1* (CS6125), *bak1-3* (SALK_034523) e *bak1-4* (SALK_116202) tratadas com 10 μM de *AtRALF1* por 48 h ou não tratadas como controle. Plantas selvagens (Col-0), foram usadas como controle. As células da endoderme da zona de diferenciação da raiz foram mensuradas. Valores representam as médias ± desvio padrão de aproximadamente 150 células. Asteriscos triplos indicam $P < 0,01$ (Teste de Student's T); ns, não significativo. Este dado é a média de quatro experimentos independentes

Portanto, na ausência de BAK1, *AtRALF1* não inibe a expansão celular de células endodérmicas em raiz.

4.4 AtRALF1 interage com o domínio extracelular de BAK1 no sistema de duplo-híbrido em levedura

Fragmentos de DNA que codificam o peptídeo AtRALF1, o peptídeo AtRALF34 e os domínios extracelulares das proteínas BAK1, BAK7, BRI1 e FLS2 foram clonados em vetores específicos e analisados em sistema de duplo-híbrido para verificar a existência de interação entre as proteínas.

Os domínios extracelulares das proteínas BAK1 e BRI1 foram escolhidos por serem responsáveis pela percepção dos BRs (LI et al, 1997; NAM; LI, 2002). BAK7 é homólogo ao BAK1, apresenta redundância gênica com BAK1 e foi escolhido para verificação de especificidade da interação com BAK1 (JEONG et al.; 2010). FLS2 em conjunto com a proteína co-receptora BAK1 faz parte do complexo de percepção do peptídeo bacteriano flg22 e também foi escolhido como forma de verificar a especificidade da interação do peptídeo com outras proteínas receptoras de membrana (CHINCHILA et al., 2007).

No sistema de duplo-híbrido em leveduras, o peptídeo AtRALF1 interagiu com o domínio extracelular (DE) da proteína BAK1 e não interagiu com os domínios extracelulares de BAK7, BRI1 e FLS2 (Figura 14).

No mesmo sistema, o peptídeo AtRALF34 não interagiu com os domínios extracelulares das proteínas BAK1, BAK7, BRI1 e FLS2 (Figura 15).

Figura 14 - O peptídeo AtRALF1 interage com o domínio extracelular de BAK1 (BAK1DE) em levedura. O peptídeo AtRALF1 fusionado ao domínio de ligação de DNA GAL4 (AtRALF1-pGBKT7) foi usado como isca para testar a sua interação com o domínio extracelular das proteínas fusionadas ao domínio de ativação de GAL4 (pGADT7): BAK1 (BAK1DE), BAK7 (BAK7DE), BRI1 (BRI1DE) e FLS2 (FLS2DE). As leveduras co-transformadas com essas construções foram submetidas em meio sem leucina, triptofano e histidina para testar as interações. Este experimento é representativo de quatro repetições com resultados similares

Figura 15 - O peptídeo AtRALF34 não interage com nenhuma das proteínas analisadas em levedura. O peptídeo AtRALF1 fusionado ao domínio de ligação de DNA GAL4 (AtRALF1-pGBKT7) foi usado como isca para testar a sua interação com o domínio extracelular das proteínas fusionadas ao domínio de ativação de GAL4 (pGADT7): BAK1 (BAK1DE), BAK7 (BAK7DE), BRI1 (BRI1DE) e FLS2 (FLS2DE). As leveduras co-transformadas com essas construções foram submetidas em meio sem leucina, triptofano e histidina para testar as interações. Este experimento é representativo de quatro repetições com resultados similares

Para se determinar de maneira mais precisa qual a região do domínio extracelular da proteína BAK1 que é responsável pela interação com AtRALF1, foram feitas deleções no domínio extracelular de BAK1 (Figura 16).

Figura 16- Deleções nos domínios extracelulares de BAK1. Barras azuis representam as deleções partindo da região N-terminal da proteína e barras vermelhas representam as deleções partindo da região C-terminal, totalizando 12 fragmentos: LRR1 + LRR2 + LRR3 + LRR4 + LRR5 + Prorich, LRR2 + LRR3 + LRR4 + LRR5 + Prorich, LRR3 + LRR4 + LRR5 + Prorich, LRR4 + LRR5 + Prorich, LRR5 + Prorich e Prorich, Leu zippers + LRR1 + LRR2 + LRR3 + LRR4 + LRR5, Leu zippers + LRR1 + LRR2 + LRR3 + LRR4, Leu zippers + LRR1 + LRR2 + LRR3, Leu zippers + LRR1 + LRR2, Leu zippers + LRR1 e Leu zippers. LZ (Leu zippers), zíperes de leucina. LRR, região rica em leucina. Prorich, região rica em prolina

Os fragmentos contendo os motivos Leu zippers + LRR1 + LRR2 + LRR3 e Leu zippers + LRR1 + LRR2 interagiram com o AtRALF1 no sistema de duplo híbrido. Os demais fragmentos não interagiram com o peptídeo (Figura 17). Os resultados sugerem que a região de ligação ao peptídeo está localizada nos motivos LRR2 e LRR3 do domínio extracelular de BAK1.

Figura 17 - Ensaio de duplo-híbrido em levedura: interações do peptídeo AtRALF1 com deleções no domínio extracelular de BAK1 em meio de cultura menos leucina, triptofano e histidina. Os fragmentos testados foram: LRR1 + LRR2 + LRR3 + LRR4 + LRR5 + Prorich, LRR2 + LRR3 + LRR4 + LRR5 + Prorich, LRR3 + LRR4 + LRR5 + Prorich, LRR4 + LRR5 + Prorich, LRR5 + Prorich e Prorich, Leu zippers + LRR1 + LRR2 + LRR3 + LRR4 + LRR5, Leu zippers + LRR1 + LRR2 + LRR3 + LRR4, Leu zippers + LRR1 + LRR2 + LRR3, Leu zippers + LRR1 + LRR2, Leu zippers + LRR1 e Leu zippers. LZ (Leu zippers), zíperes de leucina. LRR, região rica em leucina. Pro-rich, região rica em prolina. Este experimento é representativo de três repetições com resultados similares

Nenhuma deleção envolvendo a região N-terminal do domínio extracelular de BAK1 foi capaz de interagir com AtRALF1, indicando que a região N-terminal é essencial para a interação.

A imunodeteção dos domínios extracelulares de BAK1, BAK7, FLS2 e BRI1 utilizados no sistema de duplo-híbrido confirmou a produção das proteínas nas leveduras (Figura 18A). A produção dos peptídeos AtRALF1 e AtRALF34 nas leveduras foi também confirmada (Figuras 18B e 18C), assim como todas as deleções no domínio extracelular de BAK1 (Figura 18D).

Figura 18 - Imunodeteção para a confirmação da produção das proteínas em levedura. (A) Proteínas fusionadas com o epítipo HA: BAK1DE (~24,8 kDa), BAK7DE (~25 kDa), FLS2DE (~92,9 kDa), BRI1DE (~90,7 kDa), vetor vazio (pGADT7 sem inserção de proteína recombinante), utilizado como controle. (B) Proteína fusionada com o epítipo Myc: AtRALF1 (~8,4 kDa), vetor vazio (pGBKT7 sem inserção de proteína recombinante), utilizado como controle. (C) Proteína fusionada com o epítipo Myc: AtRALF34 (~8,4 kDa), vetor vazio (pGBKT7 sem inserção de proteína recombinante), utilizado como controle. (D) Deleções no domínio extracelular de BAK1 fusionado com o epítipo HA: 1, LRR1 + LRR2 + LRR3 + LRR4 + LRR5 + Prorich (~20,8 kDa); 2, LRR2 + LRR3 + LRR4 + LRR5 + Prorich (~18 kDa); 3, LRR3 + LRR4 + LRR5 + Prorich (~15,4 kDa); 4, LRR4 + LRR5 + Prorich (~12,8 kDa); 5, LRR5 + Prorich (~10 kDa); e 6, Prorich (~7,6 kDa); 7, Leu zippers + LRR1 + LRR2 + LRR3 + LRR4 + LRR5 (~21,4 kDa); 8, Leu zippers + LRR1 + LRR2 + LRR3 + LRR4 (~18,9 kDa); 9, Leu zippers + LRR1 + LRR2 + LRR3 (~16,2 kDa); 10, Leu zippers + LRR1 + LRR2 (~13,6 kDa); 11, Leu zippers + LRR1 (~10,9 kDa); e 12, Leu zippers (~8,2 kDa), C- vetor pGADT7 sem inserção de proteína recombinante, utilizado como controle. LZ (Leu zippers), zíperes de leucina. LRR, região rica em leucina. Pro-rich, região rica em prolina. Este experimento é representativo de duas repetições com resultados similares

4.5 AtRALF1 interage com BAK1 *in vitro*

4.5.1 Produção e purificação da proteína recombinante BAK1 (domínio extracelular)

Para a realização de ensaio de co-imunoprecipitação *in vitro*, o domínio extracelular da proteína BAK1, fusionado com o epítipo HA, foi produzido.

A produção de BAK1DE-HA foi de aproximadamente 2 mg por 1L de bactéria induzida. O tempo de retenção para a proteína BAK1DE-HA foi de aproximadamente 26 min e o perfil cromatográfico desta proteína apresentou um pico majoritário (Figura 19). A identidade desta proteína foi confirmada por espectrometria de massas (ANEXO D).

Figura 19 - Perfil cromatográfico da proteína BAK1DE-HA. Análise em HPCL, coluna C18: 50 µg da amostra purificada em cromatografia de afinidade foi usada. Linha tracejada mostra a porcentagem de acetonitrila no decorrer da análise

4.5.2 Ensaio de co-imunoprecipitação entre AtRALF1 e BAK1DE-HA *in vitro*

O ensaio de co-imunoprecipitação *in vitro* foi realizado para verificar a interação entre as proteínas AtRALF1 e BAK1.

Os peptídeos sintéticos RALF1(9-49) e RALF1(I6A) foram usados como controle negativo (PEARCE et al., 2010). Estes peptídeos inativos são mutados, o primeiro não possui o domínio YISY e o segundo apresenta uma mutação pontual neste domínio substituindo a isoleucina por uma alanina. Ambos os peptídeos mutados apresentaram perda da atividade inibitória de raiz (ANEXO E; PEARCE et al., 2010).

Somente o peptídeo AtRALF1 co-imunoprecipitou com BAK1DE-HA (Figura 20).

Figura 20 - Ensaio de co-imunoprecipitação (Co-IP) *in vitro* entre AtRALF1 o domínio extracelular de BAK1 (BAK1DE). A proteína recombinante AtRALF1 é co-imunoprecipitada por BAK1DE. A proteína BAK1DE foi detectada com anticorpo anti-HA. Os peptídeos RALFs foram detectados com o anticorpo anti-RALF. Os peptídeos sintéticos inativos RALF1(I6A) e RALF1(9-49) não foram co-imunoprecipitados. O controle AtRALF1 com esferas de agarose não mostrou interação. Os símbolos + e - indicam a presença ou ausência dos peptídeos, respectivamente. Pesos moleculares das proteínas: BAK1DE-HA, ~25 kDa; AtRALF1, ~7,6 kDa; RALF1(I6A) e RALF1(9-49), ~5 kDa. *Input*, carregamento das proteínas analisadas. Este experimento é representativo de três repetições com resultados similares

A proteína BAK1 fusionada a GFP foi expressa transientemente em folhas de *Nicotiana benthamiana* para confirmar *in planta* a interação AtRALF1/BAK1. Para isso, a fração microssomal de folhas expressando BAK1-GFP foi incubada com AtRALF1 recombinante ou com o peptídeo RALF1(I6A). O complexo protéico foi imunoprecipitado com anticorpo anti-GFP. A detecção do peptídeo imunoprecipitado foi realizada com anticorpo anti-RALF em análise de *Western blot*.

Somente o peptídeo ativo AtRALF1 se liga a BAK1 e foi co-imunoprecipitado. O peptídeo RALF1(I6A) e os demais controles usados não co-imunoprecipitaram o peptídeo AtRALF1 (Figura 21).

Os ensaios anteriores mostram que AtRALF1 e BAK1 interagem fisicamente.

Figura 21 - Ensaio de co-imunoprecipitação (Co-IP) entre BAK1 e AtRALF1 utilizando fração microsomal de folhas de tabaco. A proteína recombinante AtRALF1 se liga à BAK1 fusionada com GFP (BAK1-GFP) e é co-imunoprecipitada. A proteína BAK1-GFP foi detectada com anticorpo anti-GFP. Os peptídeos RALFs foram detectados com o anticorpo anti-RALF. O peptídeo RALF1(I6A) não se ligou em BAK1-GFP. Os controles AtRALF1 com vetor p19 e AtRALF1 com esferas de agarose não mostraram interação. Os símbolos + e - indicam a presença ou ausência dos peptídeos, respectivamente. Pesos moleculares das proteínas: BAK1-GFP, ~95 kDa; AtRALF1, ~7,6 kDa; RALF1(I6A), ~5 kDa. *Input*, carregamento das proteínas analisadas. Este experimento é representativo de três repetições com resultados similares

4.6 O fenótipo semi-anão de plantas que superexpressam AtRALF1 é dependente da proteína BAK1

Plantas que superexpressam AtRALF1 apresentam um fenótipo semi-anão (MATOS et al., 2008). Se BAK1 interage com AtRALF1 e está envolvido na percepção do peptídeo, a superexpressão do AtRALF1 no mutante *bak1* deve resultar em um fenótipo de planta selvagem.

Para testar tal hipótese, foram produzidos híbridos de arábida a partir do cruzamento entre plantas superexpressando AtRALF1 e plantas mutantes *bak1-4*. Foram obtidas quatro linhagens híbridas p35S-AtRALF1/*bak1-4*, doravante referidas como linhagens #13, #14, #16 e #19.

A análise de expressão gênica destas linhagens feita através de PCR semi-quantitativo confirmou a superexpressão do *AtRALF1* e a ausência de transcritos do *BAK1* (Figura 22).

Figura 22 - Análise de expressão dos genes *AtRALF1* e *BAK1* nas diferentes linhagens de plantas *p35S:AtRALF1/bak1-4* obtidas. A expressão gênica das linhagens #13, #14, #16 e #19 foi analisada e comparada com plantas selvagens (Col-0) e plantas superexpressando *AtRALF1* (*p35S:AtRALF1*). A expressão gênica de *GAPDH*, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (At1g13440), foi usada como controle. *AtRALF1* (At1g02900); *BAK1*, BRI1-Associated Receptor Kinase (At4g33430)

Todas as linhagens híbridas analisadas apresentaram fenótipo normal, com crescimento radicular semelhante ao de plantas selvagens. O crescimento das raízes primárias das linhagens #13, #14, #16 e #19 foi de aproximadamente 4,8 cm, 4,9 cm, 5,3 cm e 5,1 cm, respectivamente, assim como o de plantas selvagens, que foi de 5,2 cm (Figura 23A). Já o crescimento das raízes primárias de plantas que superexpressam *AtRALF1* (*p35S:AtRALF1*) foi severamente reduzido, apresentando aproximadamente 1,6 cm. Comparando qualitativamente o crescimento de plantas selvagens (Col-0), *p35S:AtRALF1* e uma linhagem representativa do híbrido, #19, foi possível visualizar que o híbrido possui o fenótipo semelhante ao de plantas selvagens (Figura 23B).

Figura 23 - Análise fenotípica das diferentes linhagens de plantas p35S:AtRALF1/*bak1-4* obtidas após 8 d de crescimento em placa vertical. (A) O comprimento de raiz primária das linhagens #13, #14, #16 e #19 foi mensurado e comparado com plantas selvagens (Col-0) e plantas que superexpressam AtRALF1 (p35S:AtRALF1). Valores representam as médias $\pm$ desvio padrão de 10 plantas. As médias com a mesma letra não são significativamente diferente entre si (Teste de Tukey, $P \leq 0,01$). (B) Comparação qualitativa das raízes primárias de híbridos p35S:AtRALF1/*bak1-4* linhagem #19 com Col-0 e p35S:AtRALF1

O acúmulo do peptídeo AtRALF1 em uma das linhagens também foi verificado (Figura 24). Para isso, o peptídeo AtRALF1 foi extraído das plantas e isolado por cromatografia de alta performance. A comparação do acúmulo do peptídeo na linhagem híbrida com o acúmulo em plantas transgênicas p35S:AtRALF1 revela que ambas possuem níveis semelhantes do peptídeo (Figura 24). Este resultado demonstra que a proteína AtRALF1 está sendo produzida em abundância nesta linhagem representativa dos híbridos obtidos.

Figura 24 - Análise da proteína AtRALF1 por *Western blot* usando o anticorpo anti-RALF. AtRALF1 (~5 kDa) foi detectado somente em extratos provenientes de plantas que superexpressam AtRALF1 (p35S:AtRALF1) e híbrido p35S:AtRALF1/*bak1-4* linhagem #19. Col-0, extrato de plantas selvagens

Para verificar a funcionalidade do peptídeo AtRALF1 expresso nos híbridos p35S-AtRALF1/*bak1-4*, cruzou-se estas plantas com Col-0 e avaliou-se para a presença do fenótipo semi-anão. Plantas resultantes deste cruzamento foram avaliadas e voltaram a apresentar o fenótipo semi-anão, com crescimento de raízes primárias reduzido (Figura 25A). Enquanto que o crescimento de raízes primárias de plantas selvagens foi de aproximadamente 5 cm, o de raízes primárias de plantas provenientes do cruzamento entre p35S:AtRALF1/*bak1-4* e Col-0 foi de aproximadamente 1,8 cm, igual ao de plantas p35S:AtRALF1. A análise qualitativa mostra que plantas provenientes do cruzamento entre p35S:AtRALF1/*bak1-4* e Col-0 assemelham-se fenotipicamente com plantas p35S:AtRALF1 (Figura 25B).

Estes resultados mostram que plantas que superexpressam AtRALF1 só são semi-anãs quando BAK1 está presente.

Figura 25 - Análise fenotípica de plantas resultantes do cruzamento entre p35S:AtRALF1/*bak1-4* e Col-0 (plantas selvagens), obtidas após 8 d de crescimento em placa vertical. (A) O comprimento de raiz primária foi mensurado e comparado com plantas selvagens (Col-0) e plantas que superexpressam AtRALF1 (p35S:AtRALF1). Valores representam as médias $\pm$ desvio padrão de 10 plantas. As médias com a mesma letra não são significativamente diferente entre si (Teste de Tukey, $P \leq 0,01$). (B) Comparação qualitativa das raízes primárias de p35S:AtRALF1/*bak1-4* X Col-0 com Col-0 e p35S:AtRALF1. Duas plantas representativas de cada genótipo foram escolhidas. Barra branca representa 1 cm

4.7 Genes responsivos a AtRALF1 não são induzidos em mutantes *bak1*

Os genes que codificam proteína rica em prolina 3 (*AtPRP3*), glicoproteína rica em hidroxiprolina (*AtHRGP2*) e citocromo P450 mono-oxigenases *PHOTOMORPHISM AND DWARFISM (CPD)* e *DWARF4 (DWF4)* são induzidos em raízes de *arabidopsis* após tratamento com o peptídeo AtRALF1 (BERGONCI et al., 2014). Decidiu-se investigar se os mesmos genes seriam induzidos por AtRALF1 em mutantes *bak1*.

Pela análise de PCR semi-quantitativo, verifica-se que nos mutantes *bak1-1*, *bak1-3* e *bak1-4*, os genes *AtPRP3*, *AtHRGP2*, *CPD* e *DWF4* não são induzidos após o tratamento com o peptídeo (Figura 26).

Figura 26 - Análise de expressão gênica por RT-PCR semi-quantitativo de genes induzidos por AtRALF1 em mutantes *bak1*. Plantas selvagens (Col-0) e mutantes *bak1-1* (CS6125), *bak1-3* (SALK_034523) e *bak1-4* (SALK_116202) foram tratados por 1 h com AtRALF1 (1 μ M). RT-PCR semi-quantitativo foi realizado usando o RNA total de raízes de plantas não tratadas (-) ou tratadas (+) com o peptídeo. A expressão gênica de *GAPDH*, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (At1g13440), foi usada como controle. *AtPRP3*, proteína rica em prolina 3 (At3g62680); *AtHRGP2*, glicoproteína rica em hidroxiprolina (At5g19800); *CPD* (At5g05690) e *DWF4*, DWARF4 (At3g50660), mono-oxigenases relacionadas com a via biossintética dos brassinólides. Este experimento é representativo de três repetições com resultados similares

Em plantas selvagens, a análise quantitativa da expressão dos genes *AtPRP3*, *AtHRGP2*, *CPD* e *DWF4* mostrou uma indução causada pelo peptídeo de aproximadamente 2, 3, 4 e 2 vezes o nível encontrado em plantas não tratadas, respectivamente. Mutantes *bak1-1*, *bak1-3* e *bak1-4* confirmaram os resultados da análise semi-quantitativa e não mostraram indução (Figura 27).

BAK1 é necessário para que os genes *AtPRP3*, *AtHRGP2*, *CPD* e *DWF4* sejam induzidos após o tratamento com AtRALF1.

Figura 27 - Análise de expressão gênica por qRT-PCR de genes induzidos por AtRALF1 em mutantes *bak1*. Plantas selvagens (Col-0) e mutantes *bak1-1* (CS6125), *bak1-3* (SALK_034523) e *bak1-4* (SALK_116202) foram tratados por 1 h com AtRALF1 (1 μ M). qRT-PCR foi realizado usando o RNA total de raízes de plantas não tratadas (-) ou tratadas (+) com o peptídeo. A expressão gênica de *GAPDH*, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (At1g13440), foi usada como controle. Valores representam as médias mais o desvio padrão. Asteriscos triplos representam $P < 0,01$ (Teste de Student's T); ns, não significativo. Este experimento é representativo de duas repetições com resultados similares

4.8 AtRALF1 induz a expressão de *BAK1*

Vários ligantes, como BR e AtPep1, induzem a expressão de seus respectivos receptores (JEONG et al., 2010; YAMAGUCHI et al., 2010). Para verificar se

AtRALF1 seria capaz de induzir *BAK1*, a expressão gênica do mesmo foi analisada em raízes de plantas de *Arabidopsis* selvagens tratadas com 1 μ M de AtRALF1. Através da análise de PCR semiquantitativo, é possível observar que há indução de *BAK1* em plantas tratadas com o peptídeo (Figura 28A). Os dados quantitativos de PCR em tempo real mostram que, de fato, o gene *BAK1* é induzido em raízes de plantas tratadas com o peptídeo por volta de 2 vezes (Figura 28B).

A expressão gênica de *BAK1* também foi avaliada em plantas que superexpressam AtRALF1 (p35S:AtRALF1), mostrando que nestas, *BAK1* também é induzido (Figura 28C). A análise de PCR em tempo real confirma a expressão de *BAK1* em plantas p35S:AtRALF1 em torno de 2 vezes o nível de transcrito encontrado em plantas selvagens (Figura 28B).

Figura 28 - Análise da expressão do gene *BAK1* em plantas de *Arabidopsis* tratadas com o peptídeo AtRALF1 e em plantas que superexpressam AtRALF1 (p35S:AtRALF1). Plantas selvagens (Col-0) foram tratadas por 1 h com AtRALF1 (1 μ M). RT-PCR semi-quantitativo (A) e qRT-PCR (B) foram realizados usando o RNA total de raízes de plantas não tratadas (-) ou tratadas (+) com o peptídeo. (C) Análise da expressão gênica de *AtRALF1* e *BAK1* em raízes de plantas selvagens e p35S:AtRALF1. A expressão gênica de *GAPDH*, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (At1g13440), foi usada como controle. *AtRALF1* (At1g02900); *BAK1*, BRI1-Associated Receptor Kinase (At4g33430). Asteriscos duplos e triplos representam $P < 0,05$ e $0,01$, respectivamente (Teste de Student's T); ns, não significativo. Este experimento é representativo de três repetições com resultados similares.

4.9 Envolvimento de BAK1 com a alcalinização do meio extracelular e a mobilização de Ca^{2+}

O peptídeo AtRALF1 alcaliniza o meio extracelular de células em suspensão de arabidopsis (PEARCE et al., 2001). Usando o gel indicador de pH (WU et al., 2007), é possível verificar que na presença de AtRALF1, as raízes primárias de plantas de arabidopsis selvagens alteraram a coloração do meio de amarelo para roxo, indicando um aumento do pH na rizosfera (Figura 29).

Figura 29 – O peptídeo AtRALF1 é capaz de promover a alcalinização da rizosfera de plantas de arabidopsis selvagens. Plantas de arabidopsis crescidas por 7 d em placa vertical contendo meio MS 0,5X foram tratadas com 10 μM do peptídeo AtRALF1 e analisadas em gel indicador de pH. Acidificação resulta na coloração amarela; alcalinização resulta na coloração roxa. Este experimento é representativo de três repetições com resultados similares

Para verificar se BAK1 é necessário para a atividade de alcalinização causada por AtRALF1, raízes primárias de mutantes *bak1-4* foram tratadas com AtRALF1 e analisadas em gel indicador de pH.

As raízes primárias de *bak1-4* tratadas com o peptídeo também alteraram a coloração do meio, de amarelo para roxo, indicando novamente aumento de pH (Figura 30).

Figura 30 – BAK1 não é requerido para a alcalinização do meio extracelular. O peptídeo AtRALF1 é capaz de promover a alcalinização da rizosfera de plantas mutantes *bak1-4* (SALK_116202). Plantas de arabidopsis crescidas por 7 d em placa vertical contendo meio MS 0,5X foram tratadas com 10 μ M do peptídeo AtRALF1 e analisadas em gel indicador de pH. Acidificação resulta na coloração amarela; alcalinização resulta na coloração roxa. Este experimento é representativo de três repetições com resultados similares

Para confirmar o resultado obtido acima, a sensibilidade de plantas selvagens e mutantes *bak1* ao cátion lítio foi analisada. O lítio é um cátion tóxico para as plantas e a captação de cátions é diretamente relacionada à atividade das bombas de próton-ATPase (GOOSSENS et al., 2000). Mutantes *bak1-4* crescidos em meio contendo LiCl não apresentaram alteração de sensibilidade ao cátion lítio e se desenvolveram neste meio de maneira similar as plantas selvagens (Figura 31).

Figura 31 - Mutantes *bak1-4* não apresentam hipersensibilidade ao lítio (Li). Plantas selvagens e mutantes *bak1-4* (SALK_116202) de 3 d foram crescidas por mais 4 d na ausência ou presença de 18 mM cloreto de lítio (LiCl). Este experimento é representativo de três repetições com resultados similares

O peptídeo AtRALF1 promove um aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular em raízes de plantas de *arabidopsis*. Isto pôde ser verificado usando como ferramenta a AEQUORINA, proteína que atua como um sensor luminescente de Ca^{2+} (HARUTA et al., 2008; MORATO DO CANTO et al., 2014). Para verificar se esta atividade biológica de AtRALF1 depende de BAK1, foram usadas plantas híbridas *aeq-bak1-3*. Estas plantas híbridas são decorrentes do cruzamento entre plantas transgênicas superexpressando AEQUORINA (*aeq-Col-0*; LEWIS et al., 1997) e mutantes *bak1-3*.

A análise de PCR semi-quantitativo mostra que plantas *aeq-bak1-3* expressam a AEQUORINA, assim como plantas *aeq-Col-0*, e não expressam BAK1, da mesma forma que o mutante *bak1-3* (Figura 32).

Figura 32 - Análise de expressão dos genes *AEQUORINA* e *BAK1* em plantas de arabidopsis da geração T3, resultantes do cruzamento entre plantas transgênicas que expressam *AEQUORINA* e mutantes *bak1-3*. Plantas selvagens (*Col-0*), transgênicas que expressam *AEQUORINA* (*aeq-Col-0*) e mutantes *bak1-3* foram usadas como controle. A expressão gênica de *GAPDH*, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (At1g13440), foi usada como controle endógeno

O aumento do nível de Ca^{2+} intracelular em plantas de arabidopsis *aeq-Col-0* e *aeq-bak1-3* tratadas com 10 nM e 100 nM de AtRALF1 não mostrou alteração significativa (Figura 33), indicando que BAK1 também não é necessário para a atividade de mobilização de cálcio do peptídeo AtRALF1.

Figura 33 - Mobilização de Ca^{2+} induzida pelo peptídeo AtRALF1 em plantas *aeq-bak1-3*. Um total de 20 pontos-temporais foi mensurado utilizando 10 nM e 100 nM do peptídeo. Valores representam as médias $\pm$ desvio padrão de 10 plantas. Este experimento é representativo de três repetições com resultados similares

Os resultados sugerem que BAK1 não está envolvido com as atividades de alcalinização do meio extracelular e mobilização de Ca^{2+} promovidas pelo AtRALF1.

4.10 A ligação do peptídeo AtRALF1 marcado com éster de acridínio é menor em mutantes *bak1* em relação a plantas selvagens

A marcação de peptídeo com acridinium foi proposta como forma de investigar a relação ligante receptor em peptídeos hormonais de plantas (BUTENKO et al., 2014). O peptídeo recombinante AtRALF1 marcado com éster de acridínio (acri-AtRALF1) foi produzido e quantificado em HPLC. O tempo de retenção para a proteína acriAtRALF1 foi de aproximadamente 34 min e o perfil cromatográfico desta proteína apresentou um pico majoritário. O perfil cromatográfico do peptídeo AtRALF1 não marcado apresentou um pico majoritário e um tempo de retenção distinto, de aproximadamente 31 min (Figura 34).

Figura 34 - Perfil cromatográfico do peptídeo AtRALF1 marcado com éster de acridínio: acriAtRALF1. Toda a amostra foi purificada em cromatografia de afinidade por HPLC usando coluna C18, 220 nM. O perfil cromatográfico da amostra AtRALF1 (peptídeo não marcado) é usado como controle, representado no cromatograma menor acima. A linha tracejada mostra a porcentagem de acetonitrila no decorrer da análise. O valor da porcentagem de acetonitrila é mostrado no eixo Y à direita. A seta preta cheia indica o pico correspondente ao AtRALF1 (não marcado) e a seta preta tracejada indica o pico correspondente ao acriAtRALF1

Para verificar a atividade do peptídeo marcado, a atividade de mobilização de cálcio do peptídeo acriAtRALF1 foi analisada utilizando plantas transgênicas expressando a *AEQUORINA* (aeq-Col-0). Usando as concentrações de 1 nM, 5 nM e 10 nM dos peptídeos marcado e não marcado, observa-se que o peptídeo acriAtRALF1 é capaz de mobilizar cálcio, assim como o AtRALF1 não marcado, comprovando assim a sua atividade (Figura 35).

Figura 35 - Avaliação da atividade de mobilização de Ca^{2+} do peptídeo AtRALF1 marcado com éster de acridínio (acriAtRALF1). Diferentes concentrações do AtRALF1 foram usadas como controle positivo: 1, 5 e 10 nM. As concentrações 1, 5 e 10 nM do acriAtRALF1 foram testadas. Um total de 20 medidas foram feitas. Valores representam as médias $\pm$ desvio padrão de 2 plantas. Este experimento é representativo de três repetições com resultados similares

Uma vez que o peptídeo marcado foi constatado ativo, experimentos de ligação do acriAtRALF1 em plantas selvagens e mutantes *bak1* foram realizados. A ligação do acriAtRALF1 mensurada em plantas selvagens foi de aproximadamente 90000 URL (unidade relativa de luminescência). Quando um excesso de AtRALF1 não marcado (10 vezes) foi adicionado juntamente com o acriAtRALF1, a ligação reduziu aproximadamente 23%. Com um excesso de 100 vezes, a ligação reduziu aproximadamente 60%. O mesmo foi observado após a adição de AtRALF1 não marcado em uma concentração 500 vezes maior, indicando saturação. Quando os peptídeos AtRALF34 e RALF(9-49) foram adicionados em excesso (10 vezes), não houve redução no valor da ligação do acriAtRALF1. Em mutantes *bak1-1*, *bak1-3* e *bak1-4*, a ligação do acriAtRALF1 foi aproximadamente 30% menor em relação à selvagem. O acréscimo de AtRALF1 em excesso (10 e 100 vezes) resultou em uma

diminuição da ligação do acriAtRALF1 em torno de 33% e 60%, respectivamente. A adição do peptídeo não marcado em uma concentração 500 vezes maior também acarretou em uma ligação do peptídeo marcado 60% menor (Figura 36).

Figura 36 - O peptídeo AtRALF1 marcado com éster de acridínio (acriAtRALF1) se liga em BAK1. Ligação do acriAtRALF1 em plantas selvagens (Col-0) e mutantes *bak1-1* (CS6125), *bak1-3* (SALK_034523) e *bak1-4* (SALK_116202). As plantas foram tratadas por 15 min com acriAtRALF1 na ausência ou presença de um excesso de AtRALF34 não marcado (R34), RALF(9-49) não marcado (R9-49) e AtRALF1 não marcado (R1), conforme indicado. O acriAtRALF1 que se ligou nas plantas foi mensurado após a aplicação de uma solução de 20 mM de H₂O₂ em 0,1 M de NaOH. Ctr, peptídeo não marcado. Valores representam a média $\pm$ desvio padrão de duas replicatas técnicas. Este experimento é representativo de três repetições com resultados similares

Em mutantes *bak7*, a ligação do acriAtRALF1 foi igual ao de plantas selvagens. Em ambos, a adição concomitante de AtRALF1 em excesso (10, 100 e 500 vezes) reduziu a ligação do peptídeo marcado em torno de 22, 60 e 60% respectivamente (Figura 37).

Figura 37 - O peptídeo AtRALF1 marcado com éster de acridínio (acriAtRALF1) não se liga em BAK7. Ligação do acriAtRALF1 em plantas selvagens (Col-0) e mutantes *bak7* (SALK_058093). As plantas foram tratadas por 15 min com acriAtRALF1 na ausência ou presença de um excesso de AtRALF1 não marcado (R1), conforme indicado. O acriAtRALF1 que se ligou nas plantas foi mensurado após a aplicação de uma solução de 20 mM de H₂O₂ em 0,1 M de NaOH. Ctr, peptídeo não marcado. Valores representam a média $\pm$ desvio padrão de duas replicatas técnicas. Este experimento é representativo de três repetições com resultados similares

O peptídeo recombinante AtRALF34 foi marcado com éster de acridínio (acriAtRALF34) para utilização como controle da especificidade da ligação em plantas selvagens e mutantes *bak1*. A ligação de acriAtRALF34 em plantas selvagens e mutantes *bak1-1*, *bak1-3* e *bak1-4* foi de aproximadamente 150000 URL. Quando o peptídeo AtRALF1 foi adicionado em excesso (10 vezes), não houve redução no valor da ligação do acriAtRALF34. Quando o mesmo foi feito usando um excesso de AtRALF34, a redução foi de aproximadamente 35%. Aumentando a quantidade do AtRALF34 para 100 e 500 vezes em relação ao acriAtRALF34, a redução da ligação deste peptídeo marcado foi de aproximadamente 60% (Figura 38).

Figura 38 - O peptídeo AtRALF34 marcado com éster de acridínio (acriAtRALF34) não se liga em BAK1. Ligação do acriAtRALF34 em plantas selvagens (Col-0) e mutantes *bak1-1* (CS6125), *bak1-3* (SALK_034523) e *bak1-4* (SALK_116202). As plantas foram tratadas por 15 min com acriAtRALF34 na ausência ou presença de um excesso de AtRALF1 não marcado (R1) ou AtRALF34 não marcado (R34), conforme indicado. O acriAtRALF34 que se ligou nas plantas foi mensurado após a aplicação de uma solução de 20 mM de H₂O₂ em 0,1 M de NaOH. Ctr, peptídeo não marcado. Valores representam a média $\pm$ desvio padrão de duas replicatas técnicas. Este experimento é representativo de três repetições com resultados similares

5 DISCUSSÃO

Para compreender melhor a relação antagônica existente entre o peptídeo AtRALF1 e a via de brassinosteróides (BERGONCI et al., 2014), a resposta de diferentes mutantes relacionados com a via dos BRs quando expostos ao AtRALF1 foi investigada. Os mutantes perda-de-função para a via dos BRs apresentaram maior inibição de raiz primária do que plantas selvagens, exceto *bak1-4*, que foi insensível à ação de AtRALF1 (Figura 1), indicando uma possível relação entre AtRALF1 e BAK1. O contrário aconteceu com mutantes ganho-de-função e plantas transgênicas, que apresentaram menor inibição de raiz primária após o tratamento com o peptídeo, com exceção de *BRI1^{sud1}*. De acordo com Bergonci et al. (2014), este comportamento dos mutantes é o esperado, já que AtRALF1 e BRs apresentam efeitos opostos. Curiosamente, o mutante *BRI1^{sud1}*, cujo comportamento é similar ao de plantas que superexpressam *BRI1*, apresentou a maior inibição de raiz primária causada pelo peptídeo (Figura 1). *BRI1^{sud1}* também apresenta maior sensibilidade ao tratamento com flg22, que utiliza BAK1 como co-receptor (CHINCHILA et al., 2007). A hipótese levantada para este comportamento do *BRI1^{sud1}* é que o aumento na sinalização do BR inicializa tanto a via de BRs, quanto a via da flg22 através de BAK1 (BELKHADIR et al., 2012). Esta poderia ser a explicação do porquê *BRI1^{sud1}* também apresentou maior sensibilidade ao peptídeo: o aumento na sinalização do BR pode ter inicializado tanto a via de BRs, quanto a via do AtRALF1 através de BAK1.

Os resultados acima mostraram que plantas mais sensíveis a BRs apresentaram menor sensibilidade ao peptídeo AtRALF1, e vice-versa, indicando que este antagonismo entre AtRALF1 e BRs pode ser decorrente de uma competição de ambos por uma proteína em comum: BAK1.

Belkhadir et al. (2012) demonstraram que a superexpressão de *BRI1* prejudica as respostas de defesa desencadeadas por vias de sinalização que também utilizam BAK1 como proteína co-receptora. Estes autores também sugerem que o recrutamento de BAK1 por *BRI1* poderia comprometer estas respostas de defesa por haver competição por BAK1. Por outro lado, Albrecht et al. (2012) mostraram que BAK1 não é limitante e que BRs prejudicam as respostas de defesa independentemente de BAK1. No presente trabalho, propõe-se que há competição entre BRs e AtRALF1 por BAK1.

Os ensaios de inibição de raiz em meio líquido e em placa vertical usando outros mutantes, outro peptídeo (AtRALF34) e outros inibidores do crescimento radicular (Figuras 2 a 11) sugerem que há uma relação específica entre BAK1 e AtRALF1.

Os resultados aqui apresentados para *bak1* contrariam o relatado por Haruta et al. (2014). Estes autores observaram sensibilidade do mutante *bak1-4* no ensaio de inibição de raiz com AtRALF1, mesmo usando uma baixa concentração do peptídeo (1 μ M). Uma hipótese para esta discrepância de resultados seria o mutante utilizado por Haruta et al. (2014) não ser um verdadeiro *bak1-4*, já que a validação do mutante *bak1-4* não foi apresentada. Neste presente trabalho, a sensibilidade de raízes de três mutantes *bak1*, *bak1-1*, *bak1-3* e *bak1-4*, foi analisada usando altas concentrações de AtRALF1. Em todas as condições experimentais, os mutantes *bak1* mostraram-se insensíveis (Figuras 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 e 13).

O comprimento das células endodérmicas de raízes primárias dos mutantes *bak1* é igual ao de plantas selvagens (Figura 13). Neste contexto, dois diferentes cenários poderiam ser esperados. Um deles é que o tamanho das células dos mutantes *bak1* fosse menor pelo fato das raízes dos mutantes *bak1* crescerem menos que raízes de plantas selvagens (LI et al., 2002). O outro é que, como BAK1 é necessário para a atividade de inibição da expansão celular causada por AtRALF1, mutantes *bak1*, insensíveis ao peptídeo, apresentariam células com maior expansão celular. No entanto, BAK1 participa da sinalização de BR e peptídeos de defesa, como, por exemplo, flg22 (CHINCHILLA et al., 2007; LI et al., 2002; NAM; LI, 2002), o que torna difícil de inferir sobre o fenótipo dos mutantes *bak1*. Além disso, trabalhos apontam que mutantes defectivos para a via dos BRs possuem raízes menores por apresentarem um número de células reduzido no meristema radicular (GONZÁLEZ-GARCÍA et al., 2011; DU et al., 2012; GARAY-ARROYO et al., 2012), explicando assim o resultado obtido.

AtRALF1 e BAK1 interagem fisicamente de maneira específica em ensaios de duplo-híbrido em levedura e co-imunoprecipitação (Figuras 14, 15, 20 e 21) e a região N-terminal do domínio extracelular de BAK1 contendo os motivos LRR2 e LRR3 foi apontada como sendo a responsável pela interação com o peptídeo (Figuras 16 e 17). De maneira similar, Santiago et al. (2013) mostraram que a região N-terminal da proteína SERK1, pertencente à mesma família de BAK1, é essencial para a formação de um complexo protéico entre o BRI1 e SERK1 e para a ligação

do hormônio BL neste complexo. As regiões contendo os motivos Leu zippers mais os LRRs 1 a 4 e os motivos Leu zippers mais os LRRs 1 a 5, que possuem os domínios LRR2 e LRR3, não interagiram com AtRALF1. Se os motivos LRR2 e LRR3 realmente são a região de ligação ao peptídeo, a interação com estas proteínas deveria ser positiva. Uma explicação para este resultado ter sido negativo baseia-se na estrutura terciária destas proteínas, já que as deleções podem estar atrapalhando a montagem das mesmas e consequentemente, a interação.

Plantas que superexpressam *AtRALF1* são semi-anãs e apresentam redução do crescimento radicular (MATOS et al., 2008), assim como plantas que superexpressam *AtRALF23* e *AtRALF8* (SRIVASTAVA et al., 2009; ATKINSON; LILLEY; URWIN, 2013). O acúmulo do peptídeo AtRALF1 em plantas híbridas p35S-AtRALF1/*bak1-4* (Figura 24) não causou a redução do crescimento de raízes primárias (Figura 23), indicando que BAK1 desempenha um importante papel na percepção do AtRALF1. De fato, os genes *AtPRP3*, *AtHRGP2*, *CPD* e *DWRF4*, responsivos a AtRALF1 (BERGONCI et al., 2014), não foram induzidos em mutantes *bak1* (Figuras 26 e 27), indicando que na ausência desta proteína, AtRALF1 não é percebido e a via de transdução de sinal do AtRALF1 até a resposta de alguns genes é comprometida.

Como vários ligantes induzem seus receptores (JEONG et al., 2010; YAMAGUCHI et al., 2010), verificou-se se AtRALF1 seria capaz de induzir BAK1. O gene *BAK1*, além de ser induzido em plantas tratadas com o peptídeo, também é induzido em plantas que superexpressam AtRALF1 (Figura 28). Similarmente, Haruta et al. (2014) mostraram uma indução de *BAK1* na ordem de 1,56 vezes em plantas de *arabidopsis* tratadas com AtRALF1. O hormônio brassinolide também induz a expressão de *BAK1* em torno de 6 vezes (JEONG et al., 2010). O fato de tanto o brassinolide quanto o peptídeo AtRALF1 afetarem diretamente na expressão do mesmo gene sugere que BAK1 é compartilhado por ambas as vias.

De acordo com Haruta et al. (2014), AtRALF1 promove a fosforilação da bomba de próton-ATPase AHA2, culminando na inibição da mesma, explicando assim o mecanismo pelo qual AtRALF1 induz a alcalinização. Em *fer4*, mutante para o receptor do AtRALF1, FERONIA, a bomba de próton-ATPase AHA2 é mais ativa em relação a uma planta selvagem. Por este motivo, mutantes *fer4* acidificam o meio extracelular mais rapidamente que plantas selvagens e são hipersensíveis ao cloreto

de lítio. Aqui, foi demonstrado que BAK1 não está relacionado com a atividade de alcalinização do peptídeo e o fluxo de íons (Figuras 30 e 31).

FERONIA também é requerido para a atividade de mobilização de Ca^{2+} causada por AtRALF1 (HARUTA et al., 2014). Ao contrário de FERONIA, BAK1 não é necessário para esta atividade (Figuras 33 e 33). De maneira semelhante, BAK1 também não é necessário para a mobilização de Ca^{2+} induzido pelo tratamento com BR em plantas *bak1-3* (ZHAO et al., 2013).

HARUTA et al. (2014) demonstraram que a proteína FERONIA é responsável por aproximadamente 40% da ligação específica ao peptídeo AtRALF1, sugerindo a existência de outra(s) proteína(s) de membrana com função de percepção do peptídeo. Além disso, ensaios de saturação em células em suspensão também sugerem que há mais de um receptor para AtRALF1 (MORATO DO CANTO et al., 2014). Para avaliar se a ligação do peptídeo AtRALF1 em mutantes *bak1* seria menor que em plantas selvagens, utilizou-se o peptídeo marcado com éster de acridínio, o qual vem sendo usado como um eficiente marcador quimioluminescente de proteínas (WEEKS et al., 1983; WEEKS et al., 1986; MILLER; MORTON; TURKES, 1988; BUTENKO et al., 2014).

A ligação do peptídeo AtRALF1 marcado com éster de acridínio em plantas mutantes *bak1-1*, *bak1-3* e *bak1-4* reduziu aproximadamente 30% em comparação com plantas selvagens e demonstrou ser específica e saturável (Figuras 36, 37 e 38). Estes ensaios indicam que BAK1 pode ser, de fato, outro receptor do AtRALF1. Percebe-se que, apesar de saturável, o sinal do acriAtRALF1 nas plantas não é totalmente eliminado quando é feita a competição com altas concentrações de AtRALF1 não marcado. Isto também ocorreu quando Haruta et al. (2014) usou AtRALF1 marcado com ^{125}I em frações microssomais de plantas de arábidois.

Estudos mostraram que BAK1 desempenha um papel importante na sinalização de BR (LI et al, 2002; NAM; LI, 2002), e também no controle de respostas de defesa em arábidois (CHINCHILA et al., 2007; POSTEL et al, 2010; SCHULZE et al, 2010). Vale ressaltar que, nos trabalhos até agora publicados, BAK1 foi relacionada como um participante indireto na ligação de hormônio ou peptídeos. Neste trabalho, AtRALF1 é relatado como um ligante direto do domínio extracelular de BAK1. Semelhantemente, o hormônio BL se liga diretamente no domínio extracelular de SERK1, agindo como uma "cola molecular" entre o

complexo formado pelos receptores BRI1 e SERK1 (SANTIAGO; HENZLER; HOTHORN, 2013).

Futuros estudos devem ser realizados para analisar se FERONIA e BAK1 formam um complexo de reconhecimento do peptídeo AtRALF1 e compreender como essas proteínas de membrana levam a respostas biológicas semelhantes, como por exemplo, a inibição da expansão celular, e diferentes, como as atividades de alcalinização e mobilização de Ca^{2+} .

No caso de BRs, Zhao et al. (2013) mostram que há duas vias distintas e independentes de respostas: alguns genes responsivos são ativados através da sinalização de Ca^{2+} citoplasmático, enquanto outro grupo de genes são ativados pela cascata de fosforilação, a qual é bem conhecida. Este modelo acima poderia ser aplicado em relação à via de sinalização do peptídeo AtRALF1.

Desta forma, um modelo de como a percepção do AtRALF1 ocorre foi proposto, no qual o peptídeo se liga em FERONIA, causando majoritariamente a inibição da bomba de próton ATPase AHA2, um fluxo iônico e a indução da mobilização de Ca^{2+} , além de promover a indução de um grupo de genes e a expansão celular; e também se liga em BAK1, causando a indução de um outro grupo de genes, assim como a inibição da expansão celular (Figura 39).

Figura 39 - Modelo de ação proposto para o peptídeo AtRALF1. O peptídeo AtRALF1 se liga no receptor FERONIA (FER), inativa a bomba de próton ATPase AHA2, alcalinizando o meio extracelular por inibir o efluxo de prótons (H⁺). A ligação do peptídeo em FER também promove o aumento na concentração de cálcio (Ca²⁺) no citoplasma; indução de genes responsivos no núcleo; e inibição da expansão celular. AtRALF1 também se liga em BAK1, promovendo a indução de outros genes responsivos: *AtPRP3*, *AtHRGP2*, *CPD*, *DWRF4* e *BAK1*; e inibição da expansão celular. AtRALF1, quando percebido por seu receptor, ativa uma MAP quinase e desencadeia uma cascata de fosforilação. Setas representam ativação e linhas com interseção indicam inibição

6 CONCLUSÕES

- A proteína BAK1 é responsável pelo reconhecimento do peptídeo AtRALF1 e essencial para as atividades biológicas de inibição da expansão celular em raízes de *arabidopsis*. Os dados que sustentam esta conclusão são:

- Insensibilidade de mutantes *bak1* a altas concentrações de AtRALF1 de maneira específica;

- Ausência de inibição da expansão de células endodérmicas em raízes de mutantes *bak1* tratadas com o peptídeo;

- Restauração do fenótipo selvagem em plantas híbridas p35S-AtRALF1/*bak1-4*;

- Restauração do fenótipo semi-anão em plantas provenientes do cruzamento entre p35S-AtRALF1/*bak1-4* e plantas selvagens.

- O peptídeo AtRALF1 interage com a região N-terminal do domínio extracelular de BAK1 *in vivo*;

- AtRALF1 e BAK1 interagem *in vitro* e *in planta* de maneira específica;

- BAK1 é requerida por AtRALF1 para a indução de genes responsivos ao peptídeo;

- A expressão gênica de *BAK1* é induzida pelo peptídeo AtRALF1;

- A ligação de AtRALF1 em mutantes *bak1* é 30% menor em relação às plantas selvagens;

- Um modelo de ação do peptídeo hormonal AtRALF1 foi proposto, no qual há dois receptores, FERONIA e BAK1, resultando em respostas celulares diferentes e similares.

REFERÊNCIAS

ABELES, F.B.; MORGAN, P.W.; SALTVEIT, M.E.JR. **Ethylene in Plant Biology**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2004. p. 296.

AKIYAMA, K.; MATSUZAKI, K.; HAYASHI, H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. **Nature**, London, v. 435, p. 824-827, 2005.

ALBRECHT, C.; BOUTROT, F.; SEGONZAC, C.; SCHWESSINGER, B.; GIMENEZ-IBANEZ, S.; CHINCHILLA, D.; RATHJEN, J.P.; DE VRIES, S.C.; ZIPFEL, C. Brassinosteroids inhibit pathogen-associated molecular pattern-triggered immune signaling independent of the receptor kinase BAK1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, p. 303-308, 2012.

ALONSO, J.; HIRAYAMA, T.; ROMAN, G.; NOURIZADEH, S.; ECKER, J. EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. **Science**, New York, v. 284, p. 2148-2152, 1999.

AMANO, Y.; TSUBOUCHI, H.; SHINOHARA, H.; OGAWA, M.; MATSUBAYASHI, Y. Tyrosine-sulfated glycopeptide involved in cellular proliferation and expansion in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, p. 18333-18338, 2007.

ATKINSON, N.J.; LILLEY, C.J.; URWIN, P.E. Identification of genes involved in the response of *Arabidopsis* to simultaneous biotic and abiotic stresses. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 162, p. 2028-2041, 2013.

BEHR, T.M.; GOTTHARDT, M.; BECKER, W.; BEHE, M. Radioiodination of monoclonal antibodies, proteins and peptides for diagnosis and therapy. **Nuklearmedizin Nuclear Medicine**, New York, v. 41, p. 71-79, 2002.

BELKHADIR, Y.; JAILLAIS, Y.; EPPLE, P.; BALSEMÃO-PIRES, E.; DANGL, J.L.; CHORY, J. Brassinosteroids modulate the efficiency of plant immune responses to microbe-associated molecular patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, p. 297-302, 2012.

BERGONCI, T.; RIBEIRO, B.; CECILIATO, P.H.O.; GUERRERO-ABAD, J.C.; SILVA-FILHO, M.C.; MOURA, D.S. *Arabidopsis thaliana* RALF1 opposes brassinosteroid effects on root cell elongation and lateral root formation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, p. 2219-2230, 2014.

BERGONCI, T.; SILVA-FILHO, M.C.; MOURA, D.S. Antagonistic relationship between AtRALF1 and brassinosteroid regulates cell expansion-related genes. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v. 10, p. e976146, 2014.

BIRNBAUM, K.; SHASHA, D.E.; WANG, J.Y.; JUNG, J.W.; LAMBERT, G.M.; GALBRAITH, D.W.; BENFEY, P.N. A gene expression map of the *Arabidopsis* root. **Science**, New York, v. 302, p. 1956-1960, 2003.

BIRNBAUM, K.; SHASHA, D.E.; WANG, J.Y.; JUNG, J.W.; LAMBERT, G.M.; GALBRAITH, D.W.; BENFEY, P.N. A gene expression map of the *Arabidopsis* root. **Science**, New York, v. 302, p. 1956-1960, 2003.

BUTENKO, M.A.; WILDHAGEN, M.; ALBERT, M.; JEHL, A.; KALBACHER, H.; AALEN, R.B.; FELIX, G. Tools and Strategies to Match Peptide-Ligand Receptor Pairs. **The Plant Cell**, Rockville, v. 26, p. 1838-1847, 2014.

CALDERÓN VILLALOBOS, L.; LEE, S.; DE OLIVEIRA, C.; IVETAC, A.; BRANDT, W.; ARMITAGE, L.; SHEARD, L.B.; TAN, X.; PARRY, G.; MAO, H.; ZHENG, N.; NAPIER, R.; KEPINSKI, S.; ESTELLE, M. A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. **Nature Chemical Biology**, New York, v. 8, p. 477-485, 2012.

CARY, A.J.; LIU, W.; HOWELL, S.H. Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 107, p. 1075-1082, 1995.

CHEN, Y.; ETHERIDGE, N.; SCHALLER, G.E. Ethylene signal transduction. **Annals of Botany**, London, v. 95, p. 901-915, 2005.

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

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.

CHINCHILLA, D.; ZIPFEL, C.; ROBATZEK, S.; KEMMERLING, B.; NURNBERGER, T.; JONES, J.D.G.; FELIX, G.; BOLLER, T. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. **Nature**, London, v. 448, p. 497-500, 2007.

CHINI, A.; FONSECA, S.; FERNÁNDEZ, G.; ADIE, B.; CHICO, J.M.; LORENZO, O.; GARCÍA-CASADO, G.; LÓPEZ-VIDRIERO, I.; LOZANO, F.M.; PONCE, M.R.; MICOL, J.L.; SOLANO, R. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. **Nature**, London, v. 448, p. 666-671, 2007.

CHOE, S.; DILKES, B.P.; FUJIOKA, S.; TAKATSUTO, S.; SAKURAI, A.; FELDMANN, K.A. The DWF4 gene of *Arabidopsis* encodes a cytochrome P450 that mediates multiple 22 alpha-hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 10, p. 231-243, 1998.

CLARK, S.E. Cell signalling at the shoot meristem. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, England, v. 2, p. 276-284, 2001.

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.

CLOUSE, S.D.; SASSE, J.M. BRASSINOSTEROIDS: essential regulators of plant growth and development. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 49, p. 427-451, 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.

COSGROVE, D.J. Growth of the plant cell wall. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, England, v. 6, p. 850-861, 2005.

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 *Solanum lycopersicum* that regulates pollen tube elongation. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 153, p. 703-715, 2010.

CUTLER, S.R.; RODRIGUEZ, P.L.; FINKELSTEIN, R.R.; ABRAMS S.R. Absciscic acid: Emergence of a core signaling network. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 61, p. 651-679, 2010.

DE LUCAS M.; DAVIÈRE, J.M.; RODRÍGUEZ-FALCÓN, M.; PONTIN, M.; IGLESIAS-PEDRAZ, J.M.; LORRAIN, S.; FANKHAUSER, C.; BLÁZQUEZ, M.A.; TITARENKO, E. PRAT, S. A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. **Nature**, London, v. 451, p. 480-484, 2008.

DEL POZO, J.C.; DIAZ-TRIVINO, S.; CISNEROS, N.; GUTIERREZ C. The balance between cell division and endoreplication depends on E2FCDPB, transcription factors regulated by the ubiquitin-SCFSKP2A pathway in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 18, p. 2224-2235, 2006.

DHARMASIRI, N.; DHARMASIRI, S.; ESTELLE, M. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. **Nature**, London, v. 435, p. 441-445, 2005.

DIÉVART, A.; CLARK, S.E. LRR-containing receptors regulating plant development and defense. **Development**, Cambridge, v. 131, p. 251-261, 2004.

DIÉVART, A.; HYMES, M.J.; LI, J.; CLARK, S.E. Brassinosteroid-independent function of BRI1 / CLV1 chimeric receptors. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 33, p. 723-730, 2006.

DU, J.; YIN, H.; ZHANG, S.; WEI, Z.; ZHAO, B.; ZHANG, J.; GOU, X.; LIN, H.; LI, J. Somatic embryogenesis receptor kinases control root development mainly via brassinosteroid-independent actions in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Integrative Plant Biology**, Beijing v. 54, p. 388-399, 2012.

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.

ESCOBAR-RESTREPO J.M.; HUCK, N.; KESSLER, S.; GAGLIARDINI, V.; GHEYSELINCK, J.; YANG, W.C.; GROSSNIKLAUS, U. The FERONIA receptor-like kinase mediates male-female interactions during pollen tube reception. **Science**, New York, v. 317, p. 656-660, 2007.

ETCHELLS, J.P.; TURNER, S.R. The PXY-CLE41 receptor ligand pair defines a multifunctional pathway that controls the rate and orientation of vascular cell division. **Development**, England, v. 137, p. 767-774, 2010.

FENG, S.; MARTINEZ, C.; GUSMAROLI, G.; WANG, Y.; ZHOU, J.; WANG, F.; CHEN, L.; YU, L.; IGLESIAS-PEDRAZ, J.M.; KIRCHER, S.; SCHÄFER, E.; FU, X.; FAN, L.; DENG, X.W. Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. **Nature**, London, v. 451, p. 475-479, 2008.

FINKELSTEIN, R.R.; ROCK C.D. Absciscic acid biosynthesis and response. In *The Arabidopsis Book* 1: e0058, 2008. p. 52.

FISHER, K.; TURNER, S. PXY, a receptor-like kinase essential for maintaining polarity during plant vascular-tissue development. **Current Biology**, New York, v. 17, p. 1061-1066, 2007.

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.

FU, Z.Q.; YAN, S.; SALEH, A.; WANG, W.; RUBLE, J.; OKA N.; MOHAN, R.; SPOEL, S.H.; TADA, Y.; ZHENG, N.; DONG, X. NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. **Nature**, London, v. 486, p. 228-232, 2012.

GAMPALA, S.S.; KIM, T.W.; HE, J.X.; TANG, W.; DENG, Z.; BAI, M.Y.; GUAN, S.; LALONDE, S.; SUN, Y.; GENDRON, J.M.; CHEN, H.; SHIBAGAKI, N.; FERL, R.J.; EHRHARDT, D.; CHONG, K. An essential role for 14-3-3 proteins in brassinosteroid signal transduction in *Arabidopsis*. **Developmental Cell**, Cambridge, v.13, p.177-189, 2007.

GAO, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, D.; DAI, X.; ESTELLE, M.; ZHAO, Y. Auxin binding protein 1 (ABP1) is not required for either auxin signaling or *Arabidopsis* development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 112, p. 2275-2280, 2015.

GARAY-ARROYO, A.; SANCHEZ, M.D.L.P.; GARCBA-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 *Solanum chacoense* provides support for a developmental role in plants. **Planta**, Berlin, v. 220, p. 447-454, 2005.

GHORBANI, S.; FERNANDEZ, A.; HILSON, P.; BEECKMAN, T. Signaling Peptides in Plants. **Cell & Developmental Biology**, Foster City, v. 3, p.2, 2014.

GIETZ, R.D.; WOODS, R.A. Transformation of yeast by the liac/ss carrier DNA/PEG method. **Methods in Enzymology**, Bethesda, v. 350, p. 87-96, 2002.

GÓMEZ-GÓMEZ, L.; BOLLER, T. FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 5, p. 1003-1011, 2000.

GOMEZ-ROLDAN, V.; FERMAS, S.; BREWER, P.B.; PUECH-PAGES, V.; DUN, E.A.; PILLOT, J.P.; LETISSE, F.; MATUSOVA, R.; DANOUN, S.; PORTAIS, J.C.; BOUWMEESTER, H.; BECARD, G.; BEVERIDGE, C.A.; RAMEAU, C.; ROCHANGE, S.F. Strigolactone inhibition of shoot branching. **Nature**, London, v. 455, p.189-194, 2008.

GONZÁLEZ-GARCÍA, M.P.; VILARRASA-BLASI, J.; ZHIPONOVA, M.; DIVOL, F.; MORA-GARCÍA, S.; RUSSINOVA, E.; CAÑO-DELGADO, A.I. Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in *Arabidopsis* roots. **Development**, Cambridge, v. 138, p. 849-859, 2011.

GOOSSENS, A.; DE LA FUENTE, N.; FORMENT, J.; SERRANO, R.; PORTILLO, F. Regulation of yeast H(+)-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 20, p. 7654-7661, 2000.

GRIFFITHS, J.; MURASE, K.; RIEU, I.; ZENTELLA, R, ZHANG, Z.L.; POWERS, S.J.; GONG, F.; PHILLIPS, A.L.; HEDDEN, P.; SUN, T.; THOMAS, S.G. Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 18, p. 3399-3414, 2006.

GROVE, M.D.; SPENCER, G.F.; ROHWEDDER, W.K.; MANDAVA, N.B.; WORLEY, J.F.; WARTHEN, J.D.JR.; STEFFENS, G.L.; FLIPPEN-ANDERSON, J.L.; COOK, J.C.JR. Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. **Nature**, London, v. 281, p. 216-217, 1979.

GUILFOYLE, T.J.; HAGEN, G. Auxin response factors. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 10, p. 453-460, 2007.

GUO, H.; LI, L.; YE, H.; YU, X.; ALGREEN, A.; YIN, Y. Three related receptor-like kinases are required for optimal cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 106 p. 7648-7653, 2009.

HALL, B.; SHAKEEL, S.; SCHALLER, G.E. Ethylene receptors: ethylene perception and signal transduction. **The Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 26, p. 118-130, 2007.

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

HARUTA, M.; CONSTABEL, C.P. Rapid alkalization factor 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 Ca^{2+} 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.

HARUTA, M.; SABAT, G.; STECKER, K.; MINKOFF, B.B.; SUSSMAN, M.R. A peptide hormone and its receptor protein kinase regulate plant cell expansion. **Science**, New York, v. 343, p. 408-411, 2014.

HEESE, A.; HANN, D.R.; GIMENEZ-IBANEZ, S.; JONES, A.M.; HE, K.; LI, J.; SCHROEDER, J.I.; PECK, S.C.; RATHJEN, J.P. The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, p. 12217-12222, 2007.

HEPWORTH, J.; LENHARD, M. Regulation of plant lateral-organ growth by modulating cell number and size. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 17, p. 36-42, 2014.

HIND, S.R.; MALINOWSKI, R.; YALAMANCHILI, R.; STRATMANN, J.W. Tissue-type specific systemin perception and the elusive systemin receptor. **Plant Signaling and Behavior**, Austin, v. 5, p. 42-44, 2010.

HIRAKAWA, Y.; SHINOHARA, H.; KONDO, Y.; INOUE, A.; NAKANOMYO, I.; OGAWA, M.; SAWA, S.; OHASHI-ITO, K.; MATSUBAYASHI, Y.; FUKUDA, H. Non-cell-autonomous control of vascular stem cell fate by a CLE peptide/receptor system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.105, p.15208-15213, 2008.

HOLTON, N.; CAÑO-DELGADO, A.; HARRISON, K.; MONTOYA, T.; CHORY, J.; BISHOP, G.J. Tomato BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 is required for systemin induced root elongation in *Solanum pimpinellifolium* but is not essential for wound signalling. **The Plant Cell**, Rockville, v. 19, p. 1709-1717, 2007.

HUA, J.; MEYEROWITZ, E. Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Cell**, Maryland Heights, v. 94, p. 261-271, 1998.

HUFFAKER, A.; PEARCE, G.; RYAN, C.A. An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, p. 10098-10103, 2006.

HUFFAKER, A.; RYAN, C.A. Endogenous peptide defense signals in *Arabidopsis* differentially amplify signaling for the innate immune response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, 10732–10736, 2007.

HWANG, I.; SHEEN, J. Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. **Nature**, London, v. 413, p. 383-389, 2001.

INOUE, T.; HIGUCHI, M.; HASHIMOTO, Y.; SEKI, M.; KOBAYASHI, M.; KATO, T.; TABATA, T.; SHINOZAKI, K.; KAKIMOTO, T. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. **Nature**, London, v. 409, p. 1060-1063, 2001.

ITO, Y.; NAKANOMYO, I.; MOTOSE, H.; IWAMOTO, K.; SAWA, S.; DOHMAE, N.; FUKUDA, H. Dodeca-CLE peptides as suppressors of plant stem cell differentiation. **Science**, New York, v. 313, p. 842-845, 2006.

IYER, L.M.; KOONIN, E.V.; ARAVIND, L. Adaptations of the helix-grip fold for ligand binding and catalysis in the START domain superfamily. **Proteins**, New York, v. 43, p 134-144, 2001.

- JEONG, S.; TROTOCHAUD, A.E.; CLARK, S.E. The *Arabidopsis* CLAVATA2 gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the CLAVATA1 receptor-like kinase. **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, p. 1925-1934, 1999.
- JEONG, Y.J.; SHANG, Y.; KIM, B.H.; KIM, S.Y.; SONG, J.H.; LEE, J.S.; LEE, M.M.; LI, J.; NAM, K.H. BAK7 displays unequal genetic redundancy with BAK1 in brassinosteroid signaling and early senescence in *Arabidopsis*. **Molecules and Cells**, Seoul, v. 29, p. 259-266, 2010.
- JINN, T.L.; STONE, J.M.; WALKER, J.C. HAESA, an *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. **Genes & Development**, New York, v. 14, p.108-117, 2000.
- JOHNSON, X.; BRCICH, T.; DUN, E.A.; GOUSSOT, M.; HAUROGNÉ, K.; BEVERIDGE, C.A.; RAMEAU, C. Branching genes are conserved across species. Genes controlling a novel signal in pea are coregulated by other long-distance signals. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 142, p. 1014-1026, 2006.
- JONES, J.D.; DANGL, J.L. The plant immune system. **Nature**, London, v. 444, p. 323-329, 2006.
- JOSS, U.R.; TOWBIN, H. Acridinium ester labelled cytokines: receptor binding studies with human interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and interferon-gamma. **Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence**, Chichester, v. 9, p. 21-28, 1994.
- JURADO, S.; ABRAHAM, Z.; MANZANO, C.; LÓPEZ-TORREJÓN, G.; PACIOS, L.F.; DEL POZO, J.C. The *Arabidopsis* cell cycle F-box protein SKP2A binds to auxin. **The Plant Cell**, Rockville, v. 22, p. 3891-3904, 2010.
- JURADO, S.; DÍAZ-TRIVIÑO, S.; ABRAHAM, Z.; MANZANO, C.; GUTIERREZ, C.; DEL POZO, C. SKP2A, an F-box protein that regulates cell division, is degraded via the ubiquitin pathway. **The Plant Journal**, Oxford, v. 53, p. 828-841, 2008.
- KARIMI, M.; INZÉ, D.; DEPICKER, A. GATEWAYTM vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 7, p193-195, 2002.
- KARLOVA, R.; BOEREN, S.; RUSSINOVA, E.; AKER, J.; VERVOORT, J.; DE VRIES, S. The *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1 Protein Complex Includes BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1. **The Plant Cell**, Rockville, v. 18, p. 626-638, 2006.
- KATSIR, L.; SCHILMILLER, A.L.; STASWICK, P.E.; HE, S.Y.; HOWE, G.A. COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, p. 7100-7105, 2008.

KEPINSKI, S.; LEYSER, O. The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. **Nature**, London, v. 435, p. 446-451, 2005.

KIEBER, J.; ROTHENBERG, M.; ROMAN, G.; FELDMANN, A.; ECKER, J. CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases. **Cell**, Maryland Heights, v. 72, p. 427-441, 1993.

KIM, T.H.; BOHMER, M.; HU, H.H.; NISHIMURA, N.; SCHROEDER, J.I. Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 61, p. 561-591, 2010.

KIM, T.W.; WANG, Z.Y. Brassinosteroid Signal Transduction from Receptor Kinases to Transcription Factors. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 61, p. 681-704, 2010.

KROL, E.; MENTZEL, T.; CHINCHILLA, D.; BOLLER, T.; FELIX, G.; KEMMERLING, B.; POSTEL, S.; ARENTS, M.; JEWORUTZKI, E.; AL-RASHEID, K.A.; BECKER, D.; HEDRICH, R. Perception of the *Arabidopsis* danger signal peptide 1 involves the pattern recognition receptor AtPEPR1 and its close homologue AtPEPR2. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda v. 285, p. 13471-13479, 2010.

KUSHNIROV, V.V. Rapid and reliable protein extraction from yeast. **Yeast**, Davis, v. 16, p. 857-860, 2000.

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**, London, v. 40, p. 1202-1210, 2011.

LEWIS, B.D.; KARLIN-NEUMANN, G.; DAVIS, R.W.; SPALDING, E.P. Ca²⁺-activated anion channels and membrane depolarizations induced by blue light and cold in *Arabidopsis* seedlings. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 114 p. 1327-1334, 1997.

LI, J.; CHORY, J. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. **Cell**, Maryland Heights, v. 90, p. 929-938, 1997.

LI, J.; WEN, J.; LEASE, K.A.; DOKE, J.T.; TAX, F.E.; WALKER, J.C. BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. **Cell**, Maryland Heights, v. 110, p. 213-222, 2002.

LIN, W.; LU, D.; GAO, X.; JIANG, S.; MA, X.; WANG, Z.; MENGISTE, T.; HE, P.; SHAN, L. Inverse modulation of plant immune and brassinosteroid signaling pathways by the receptor-like cytoplasmic kinase BIK1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 110, p. 12114-12119, 2013.

LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, New York, v. 25, p. 402-408, 2001.

LOAKE, G.; GRANT, M. Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 10, p. 466-472, 2007.

MA, Y.; SZOSTKIEWICZ, I.; KORTE, A.; MOES, D.; YANG, Y.; CHRISTMANN, A.; GRILL, E. Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. **Science**, New York, v. 324, p. 1064-1068, 2009.

MALINOWSKI, R.; HIGGINS, R.; LUO, Y.; PIPER, L.; NAZIR, A.; BAJWA, V.S.; CLOUSE, S.D.; THOMPSON, P.R.; STRATMANN, J.W. The tomato brassinosteroid receptor BRI1 increases binding of systemin to tobacco plasma membranes, but is not involved in systemin signaling. **Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 70, p. 603-616, 2009.

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

MATSUBAYASHI, Y.; OGAWA, M.; KIHARA, H.; NIWA, M.; SAKAGAMI, Y. Disruption and overexpression of *Arabidopsis* phytosulfokine receptor gene affects cellular longevity and potential for growth. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 142, p. 45-53, 2006.

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.

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

MENGES, M.; MURRAY, J.A.H. Synchronous *Arabidopsis* suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. **The Plant Journal**, Oxford, v. 30 p. 203-212, 2002.

MILLER, S.A.; MORTON, M.S.; TURKES, A. Chemiluminescence immunoassay for progesterone in plasma incorporating acridinium ester labelled antigen. **Annals of Clinical Biochemistry**, London, v. 25 p. 27-34, 1988.

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

MORA-GARCIA, S.; VERT, G.; YIN, Y.; CANO-DELGADO, A.; CHEONG, H.; CHORY, J. Nuclear protein phosphatases with Kelch-repeat domains modulate the response to brassinosteroids in *Arabidopsis*. **Genes & Development**, New York, v. 18, p.448-460, 2004.

MORATO DO CANTO, A.M.; CECILIATO, P.H.O.; RIBEIRO, B.; ORTIZ-MOREA, F.A.; GARCIA, A.A.F.; SILVA-FILHO, M.C.; MOURA, D.S. Biological activity of nine recombinant AtRALF peptides: implications for their perception and function in *Arabidopsis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 75, p.45-54, 2014.

MOSHER, S.; SEYBOLD, H.; RODRIGUEZ, P.; STAHL, M.; DAVIES, K.A.; DAYARATNE, S.; MORILLO, S.A.; WIERZBA, M.; FAVERY, B.; KELLER, H.; TAX, F.E.; KEMMERLING, B. The tyrosine-sulfated peptide receptors PSKR1 and PSY1R modify the immunity of *Arabidopsis* to biotrophic and necrotrophic pathogens in an antagonistic manner. **The Plant Journal**, Oxford, v. 73, p.469-482, 2013.

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

MULKEY, T.J.; KUZMANOFF, K.M.; EVANS, M.L. Promotion of growth and shift in the auxin dose/response relationship in maize roots treated with the ethylene biosynthesis inhibitors aminoethoxyvinylglycine and cobalt. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v.1, p. 43-48, 1982.

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.

NAKAJIMA, M.; SHIMADA, A.; TAKASHI, Y.; KIM, Y.C.; PARK, S.H.; UEGUCHI-TANAKA, M.; SUZUKI, H.; KATOH, E.; IUCHI, S.; KOBAYASHI, M.; MAEDA, T.; MATSUOKA, M.; YAMAGUCHI, I. Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors. **The Plant Journal**, Oxford, v. 46, p. 880-889, 2006.

NAM, K.H.; LI, J. BRI1/BAK1, a Receptor Kinase Pair Mediating Brassinosteroid. **Cell**, Maryland Heights, v. 110, p. 203-212, 2002.

NONGPIUR, R.; SONI, P.; KARAN, R.; SINGLA-PAREEK, S.L.; PAREEK, A. Histidine kinases in plants: cross talk between hormone and stress responses. **Plant Signaling and Behavior**, Georgetown, v. 7, p. 1230-1237, 2012.

NTOUKAKIS, V.; SCHWESSINGER, B.; SEGONZAC, C.; ZIPFEL, C. Cautionary Notes on the Use of C-Terminal BAK1 Fusion Proteins for Functional Studies. **The Plant Cell**, Rockville, v. 23, p. 3871-3878, 2011.

OHYAMA, K.; OGAWA, M.; MATSUBAYASHI, Y. Identification of a biologically active, small, secreted peptide in *Arabidopsis* by in silico gene screening, followed by LC-MS-based structure analysis. **The Plant Journal**, Oxford, v. 55, p. 152-160, 2008.

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

PARK, S.Y.; FUNG, P.; NISHIMURA, N.; JENSEN, D.R.; FUJII, H.; ZHAO, Y.; LUMBA, S.; SANTIAGO, J.; RODRIGUES, A.; CHOW, T.F.; ALFRED, S.E.; BONETTA, D.; FINKELSTEIN, R.; PROVART, N.J.; DESVEAUX, D.; RODRIGUEZ, P.L.; MCCOURT, P.; ZHU, J.K.; SCHROEDER, J.I.; VOLKMAN, B.F.; CUTLER, S.R. Absciscic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. **Science**, New York, v. 324, p. 1068-1071, 2009.

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 Proteinase Inhibitor Proteins. **Science**, Washington, v. 253, p. 895-897, 1991.

PENG, P.; YAN, Z.; ZHU, Y.; LI, J. Regulation of the Arabidopsis GSK3-like kinase BRASSINOSTEROIDINSENSITIVE 2 through proteasome-mediated protein degradation. **Molecular Plant**, Oxford, v. 1, p. 338-346, 2008.

POSTEL, S.; KÜFNER, I.; BEUTER, C.; MAZZOTTA, S.; SCHWEDT, A.; BORLOTTI, A.; HALTER, T.; KEMMERLING, B.; NÜRNBERGER, T. The multifunctional leucine-rich repeat receptor kinase BAK1 is implicated in *Arabidopsis* development and immunity. **European Journal of Cell Biology**, Stuttgart, v. 89, p. 169-174, 2010.

QU, C.; HALL, B.P.; GAO, Z.; SCHALLER, G.E. A strong constitutive ethylene-response phenotype conferred on Arabidopsis plants containing null mutations in the ethylene receptors ETR1 and ERS1. **BMC Plant Biology**, London v.7, p.3, 2007.

RIEFLER, M.; NOVAK, O.; STRNAD, M.; SCHUMMÜLING, T. *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. **The Plant Cell**, Rockville, v. 18, p. 40-54, 2006.

ROJO, E.; SHARMA, V.K.; KOVALEVA, V.; RAIKHEL, N.V.; FLETCHER, J.C. CLV3 is localized to the extracellular space, where it activates the *Arabidopsis* CLAVATA stem cell signaling pathway. **The Plant Cell**, Rockville, v.14, p. 969-977, 2002.

RUEGGER, M; DEWEY, E.; GRAY, W.M.; HOBBIE, L.; TURNER, J.; ESTELLE, M. The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast grr1p. **Genes and Development**, New York, v. 12, p. 198-207, 1998.

RYAN, C.A.; HUFFAKER, A.; YAMAGUCHI Y. New insights into innate immunity in *Arabidopsis*. *Cell Microbiology*, Washington, v. 9, p.1902-1908, 2007.

RYU, H.; KIM, K.; CHO, H.; PARK, J.; CHOE, S.; HWANG, I. Nucleocytoplasmic shuttling of BZR1 mediated by phosphorylation is essential in *Arabidopsis* brassinosteroid signaling. **The Plant Cell**, Rockville, v. 19, p. 2749-62, 2007.

SANTIAGO, J.; HENZLER, C.; HOTHORN, M. Molecular Mechanism for Plant Steroid Receptor Activation by Somatic Embryogenesis Co-Receptor Kinases. **Science**, New York, v. 341, p. 889-892, 2013.

SAUER, M.; KLEINE-VEHN, J. AUXIN BINDING PROTEIN1: the outsider. **The Plant Cell**, Rockville, v. 23, p. 2033-2043, 2011.

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.

SCHEER, J.M.; RYAN, C.A. The systemin receptor SR160 from *Lycopersicon peruvianum* is a member of the LRR receptor kinase family. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, p. 9585-9590, 2002.

SCHULZE, B.; MENTZEL, T.; JEHLE, A.K.; MUELLER, K.; BEELER, S.; BOLLER, T.; FELIX, G.; CHINCHILLA, D. Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 285, p. 9444-9451, 2010.

SCHWESSINGER, B.; ZIPFEL, C. News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 11, p. 389-395, 2008.

SHI, X.; RASHOTTE, A.M. Advances in upstream players of cytokinin phosphorelay: receptors and histidine phosphor transfer proteins. **The Plant Cell**, Rockville, v. 31, p. 789-799, 2012.

SOLANO, R.; STEPANOVA, A.; CHAO, Q.; ECKER, J.R. Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. **Genes and Development**, New York, v.12, p. 3703-3714, 1998.

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.

STEEL, R.G.; TORRIE, J.H.; DICKEY, D.A. **Principles and procedures of statistics**: a biometrical approach. 3rd ed. New York: McGraw-Hill Companies, 1996. p. 672.

STENVIK, G.E.; TANDSTAD, N.M.; GUO, Y.; SHI, C.L.; KRISTIANSEN, W.; HOLMGREN, A.; CLARK, S.E.; AALEN, R.B.; BUTENKO, M.A. The EPIP peptide of INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION is sufficient to induce abscission in *Arabidopsis* through the receptor-like kinases HAESA and HAESA-LIKE2. **The Plant Cell**, Rockville, v. 20, p.1805-1817, 2008.

STEPANOVA, A. N.; HOYT, J.M.; HAMILTON, A.A.; ALONSO, J.M. A link between ethylene and auxin uncovered by the characterization of two root-specific ethylene-insensitive mutants in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, p. 2230-2242, 2005.

STIRNBERG, P.; VAN DE SANDE, K.; LEYSER, H.M.O. MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in *Arabidopsis*. **Development**, Cambridge v. 129, p. 1131-1141, 2002.

TAN, X.; CALDERON-VILLALOBOS, L.I.; SHARON, M.; ZHENG, C.; ROBINSON, C.V.; ESTELLE, M.; ZHENG, N. Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. **Nature**, London, v. 446, p. 640-645, 2007.

TANG, W.; DENG, Z.; OSES-PRIETO, J.A.; SUZUKI, N.; ZHU, S.; ZHANG, X.; BURLINGAME, A.L.; WANG, Z.Y. Proteomic studies of brassinosteroid signal transduction using prefractionation and two-dimensional DIGE. **Molecular & Cell Proteomics**, Bethesda, v. 7, p. 728-738, 2008.

THINES, B.; KATSIR, L.; MELOTTO, M.; NIU, Y.; MANDAOKAR, A.; LIU, G.; NOMURA, K.; HE, S.Y.; HOWE, G.A.; BROWSE, J. JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. **Nature**, London, v. 448, p. 661-665, 2007.

TROTOCHAUD, A.E.; HAO, T.; WU, G.; YANG, Z.; CLARK, S.E. The CLAVATA1 receptor-like kinase requires CLAVATA3 for its assembly into a signaling complex that includes KAPP and a Rho-related protein. **The Plant Cell**, Rockville, v.11, p. 393-405, 1999.

UEGUCHI-TANAKA, M.; ASHIKARI, M.; NAKAJIMA, M.; ITOH, H.; KATOH, E.; KOBAYASHI, M.; CHOW, T.Y.; HSING, Y.I.; KITANO, H.; YAMAGUCHI, I.; MATSUOKA, M. GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. **Nature**, London, v. 437, p. 693-698, 2005.

UMEHARA, M.; HANADA, A.; YOSHIDA, S.; AKIYAMA, K.; ARITE, T.; TAKEDA-KAMIYA, N.; MAGOME, H.; KAMIYA, Y.; SHIRASU, K.; YONEYAMA, K.; KYOZUKA, J.; YAMAGUCHI, S. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. **Nature**, London, v. 455, p. 195-200, 2008.

VERONESE, P.; NAKAGAMI, H.; BLUHM, B.; ABUQAMAR, S.; CHEN, X.; SALMERON, J.; DIETRICH, R.A.; HIRT, H.; MENGISTE, T. The membrane-anchored BOTRYTIS INDUCED KINASE1 plays distinct roles in *Arabidopsis* resistance to necrotrophic and biotrophic pathogens. **The Plant Cell**, Rockville, v. 18, p. 257-273, 2006.

VERT, G.; CHORY, J. 2006. Downstream nuclear events in brassinosteroid signaling. **Nature**, London, v. 441, p.96-100, 2006.

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.

WANG, W.; ESCH, J.J.; SHIU, S.; AGULA, H.; BINDER, B.M.; CHANG, C.; PATTERSON, S.E.; BLEECKER, A.B. Identification of important regions for ethylene binding and signaling in the transmembrane domain of the ETR1 ethylene receptor of *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 18, p. 3429-3442, 2006.

WANG, X.; CHORY, J. Brassinosteroids regulate dissociation of BKI1, a negative regulator of BRI1 signaling, from the plasma membrane. **Science**, New York, v. 313, p.1118-1122, 2006.

WANG, Z.Y.; NAKANO, T.; GENDRON, J.; HE, J.; CHEN, M.; VAFEADOS, D.; YANG, Y.; FUJIOKA, S.; YOSHIDA, S.; ASAMI, T.; CHORY, J. Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 2, p. 505-513, 2002.

WANG, Z.Y.; SETO, H.; FUJIOKA, S.; YOSHIDA, S.; CHORY, J. BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. **Nature**, London, v. 410, p. 380-383, 2001.

WASTERNAK, C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. **Annals of Botany**, London, v. 100, p. 681-697, 2007.

WEEKS, I.; BEHESHTI, I.; MCCAPRA, F.; CAMPBELL, A.K.; WOODHEAD, J.S. Acridinium esters as high-specific-activity labels in immunoassay. **Clinical Chemistry**, Winston-Salem, v. 29, p. 1474-1479, 1983.

WEEKS, I.; STURGESS, M.; BROWN, R.C.; WOODHEAD, J.S. Immunoassays using acridinium esters. **Methods in Enzymology**, New York, v. 133, p. 366-387, 1986.

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

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.

WU, Y.; ZHANG, D.; CHU, J.Y.; BOYLE, P.; WANG, Y.; BRINDLE, I.D.; DE LUCA, V.; DESPRÉS, C. The *Arabidopsis* NPR1 Protein Is a Receptor for the Plant Defense Hormone Salicylic Acid. **Cell Reports**, Cambridge, v. 1, p. 639-647, 2012.

XIE, D.X.; FEYS, B.F.; JAMES, S.; NIETO-ROSTRO, M.; TURNER, J.G. COI1: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. **Science**, New York, v. 280, p. 1091-1094, 1998.

XU, W.; HUANG, J.; LI, B.; LI, J.; WANG, Y. Is kinase activity essential for biological functions of BRI1? **Cell Research**, Beijing, v. 18, p. 472-478, 2008.

YAMAGUCHI, S. Gibberellin metabolism and its regulation. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 225-251, 2008.

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.

YAMAGUCHI, Y.; PEARCE, G.; RYAN, C.A. The cell surface leucine-rich repeat receptor for AtPep1, an endogenous peptide elicitor in *Arabidopsis*, is functional in transgenic tobacco cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, p. 10104-10109, 2006.

YAN, Y.; STOLZ, S.; CHÉTELAT, A.; REYMOND, P.; PAGNI, M.; DUBUGNON, L.; FARMER, E.E. A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. **The Plant Cell**, Rockville, v. 19, p. 2470-2483, 2007.

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

YIN, Y.; WANG, Z.Y.; MORA-GARCIA, S.; LI, J.; YOSHIDA, S.; ASAMI, T.; CHORY, J. BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. **Cell**, Cambridge, v. 109, p. 181-191, 2002.

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.

ZHAO, Y. Auxin biosynthesis and its role in plant development. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 61, p. 49-64, 2010.

ZHAO, Y.; QI, Z.; BERKOWITZ, G.A. Teaching An Old Hormone New Tricks: Cytosolic Ca²⁺ Elevation Involvement in Plant Brassinosteroid Signal Transduction Cascades. **Plant Physiology**, Lancaster v. 163, p. 555-565, 2013.

ZIPFEL, C.; KUNZE, G.; CHINCHILLA, D.; CANIARD, A.; JONES, J.D.; BOLLER, T.; FELIX, G. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. **Cell**, Cambridge, v.125, p. 749-760, 2006.

ZIPFEL, C.; ROBATZEK, S.; NAVARRO, L.; OAKELEY, E.J.; JONES, J.D.G.; FELIX, G.; BOLLER, T. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. **Nature**, London, v. 428, p. 764-767, 2004.

ANEXOS

ANEXO A - Lista dos vetores usados e seus respectivos antibióticos para seleção em *E. coli*.

Nome do vetor usado	Antibiótico para seleção - concentração utilizada
pET28b	Canamicina - 50 µg/mL
pGADT7	Ampicilina - 100 µg/mL
pGBKT7	Canamicina - 50 µg/mL
pENTR D-TOPO	Canamicina - 50 µg/mL
pDEST17	Ampicilina - 100 µg/mL
pK7FWG2	Espectinomicina - 50 µg/mL
	Estreptinomicina - 15 µg/mL

ANEXO B - Lista com sequência dos iniciadores usados, se acordo com o objetivo do experimento. As sequências correspondentes aos sítios enzimáticos estão em **negrito**

Gene (locus)	Nome do iniciador	Sequência 5' - 3'
OBJETIVO: Clonagem para fusão a uma extensão de Histidinas (His)		
At1g02900	AtRALF1- NdeI -Fw	GGG CATATG GCGACCACAAAATACAT
	AtRALF1- HindIII -Rv	TTGA AAGCTT CTAACTCCTGCAACGAGCAAT
At5g67070	AtRALF34- NdeI -Fw	TTC CATATG TACTGGCGGAGGACGAAGTA
	AtRALF34- HindIII -Rv	T AAGCTT CTAGCGGCGGCAGCGGGTGATCG
At4g33430	BAK1DE-HA- Fw	CACCTACCCATACGACGTACCAGAT
	BAK1DE-HA- Rv	CTACGATTCATCTGCAGCTCGA
OBJETIVO: Clonagem para fusão a GFP		
At4g33430	BAK1-Fw	CACCATGGAACGAAGATTAATGATCCCTT
	BAK1-Rv	TCTTGGACCCGAGGGGTATTTCGTT
OBJETIVO: Clonagem para duplo-híbrido em leveduras		
At1g02900	AtRALF1- PA - NdeI -Fw	GGG CATATG ATATTGGCGACCACAAAATACAT
	AtRALF1-PA- BamHI -Rv	TTGG GATCC GTCTAACTCCTGCAACGAGCAAT
At5g67070	AtRALF34- PA- NdeI -Fw	CG CATATG TATTACATATCGTACGG
	AtRALF34-PA BamHI -Rv	TTAG GATCC CTTCATCTATCTCCGGCA
At2g13790	BAK7DE- NdeI -Fw	GCG CATATG GCTGAAGGTGATGCTTTGACT

Gene (locus)	Nome do iniciador	Sequência 5' - 3'
OBJETIVO: Clonagem para duplo-híbrido em leveduras		
At2g13790	BAK7DE- BamHI -Rv	CGC GGATCCCC ATTTGCCCCCCTGAAGGT
At4g39400	BRI1DE- NdeI -Fw	GCG CATATG GCTTCACCATCTCAGTCTTTA
	BRI1DE BamHI -Rv	CGC GGATCC CTCCCATCGCCACACTACCAGCAA
At5g46330	FLS2DE- NdeI -Fw	GCG CATATG AAACAGAGCTTTGAACCAGAGAT
	FLS2DE BamHI -Rv	CGC GGATCC CAATCAGGATGACTCTGGTT
At4g33430	BAK1DE- NdeI -Fw	GCG CATATG CCGAAGGTGATGCTCTAA
	BAK1DE BamHI -Rv	CGC GGATCC CTCTATTACTCCCTGCAGGTGAT
	BAK1-N- term-L zippers- NdeI -Fw	GCG CATATG GACAATAGTGTTACACGTGT
	BAK1-N- term-L zippers- BamHI -Rv	CGC GGATCC CTCTATTACTCCCTGCAGGTGAT
	BAK1-N- term-LRR1- NdeI -Fw	GCG CATATG CTTCCAACTTGCAGTACTTGGA
	BAK1-N- term-LRR1- BamHI -Rv	CGC GGATCC CTCTATTACTCCCTGCAGGTGAT

Gene (locus)	Nome do iniciador	Sequência 5' - 3'
OBJETIVO: Clonagem para duplo-híbrido em leveduras		
At4g33430	BAK1-N- term-LRR2- Ndel -Fw	GCG CATATG CTGACGGAATTGGTGAGCTT
	BAK1-N- term-LRR2- BamHI -Rv	CGC GGATCC CTCTATTACTCCCTGCAGGTGAT
	BAK1-N- term-LRR3- Ndel -Fw	GCG CATATG CTTAAGAACTCCGTTTCTTGCGT
	BAK1-N- term-LRR3- BamHI -Rv	CGC GGATCC CTCTATTACTCCCTGCAGGTGAT
	BAK1-N- term-LRR4- Ndel -Fw	GCG CATATG GTCCTGACGCTACAAGTTCT
	BAK1-N- term-LRR4- BamHI -Rv	CGC GGATCC CTCTATTACTCCCTGCAGGTGAT
	BAK1-N- term-LRR5- Ndel -Fw	GCG CATATG TCACTTTTCACTCCAATCAGTT
	BAK1-N- term-LRR5- BamHI -Rv	CGC GGATCC CTCTATTACTCCCTGCAGGTGAT
	BAK1-C- term-P rich region- Ndel - Fw	GCG CATATG GCCGAAGGTGATGCTCTAAGT

Gene (locus)	Nome do iniciador	Sequência 5' - 3'
OBJETIVO: Clonagem para duplo-híbrido em leveduras		
At4g33430	BAK1-C- term-P rich region- BamHI -Rv	CGC GGATCC CAAAGGAACCATTAACAGGA
	BAK1-C- term-LRR1- NdeI -Fw	GCG CATATG CCGAAGGTGATGCTCTAAGT
	BAK1-C- term-LRR1- BamHI -Rv	CGC GGATCC CGCTATTGCAAGTAACATGAA
	BAK1-C- term-LRR2- NdeI -Fw	GCG CATATG CCGAAGGTGATGCTCTAAGT
	BAK1-C- term-LRR2- BamHI -Rv	CGC GGATCC CCTGACCAAGTTGCATTACGAGCT
	BAK1-C- term-LRR3- NdeI -Fw	GCG CATATG CCGAAGGTGATGCTCTAAGT
	BAK1-C- term-LRR3- BamHI -Rv	CGC GGATCC CATTTCCAAGCTGTTCTGGGA
	BAK1-C- term-LRR4- NdeI -Fw	GCG CATATG CCGAAGGTGATGCTCTAAGT
	BAK1-C- term-LRR4- BamHI -Rv	CGC GGATCC CTCGGCCGAGAGTTGATGGAAT

Gene (locus)	Nome do iniciador	Sequência 5' - 3'
OBJETIVO: Clonagem para duplo-híbrido em leveduras		
At4g33430	BAK1-C- term-LRR5- Ndel -Fw	GCGCATATGGCCGAAGGTGATGCTCTAAGT
	BAK1-C- term-LRR5- BamHI -Rv	CGCGGATCCCAGCAGTCAAAGACCTTGGA
OBJETIVO: Genotipagem, RT-PCR e qRT-PCR		
At1g13440	GAPDH-Fw	TTGGTGACAACAGGTCAAGCA
	GAPDH-Rv	AAACTTGTGCTCAATGCAATC
At3g62680	PRP3-Fw	GTTCCGACCCAGCATCATAC
	PRP3-Rv	GCAAGTCTCGACCGGAGATA
At5g19800	HRGP2-Fw	CACAGTTGCTAATGGAAACGA
	HRGP2-Rv	CGGCGGTGAATATCTCTTGT
At5g05690	CPD-Fw	AGCAACTCGGTAACGACAGG
	CPD-Rv	CAGAGAGTGCAACCCTAGCC
At3g50660	DWF4-Fw	GTGGGTGGAAAGTGTTACCG
	DWF4-Rv	CTGTTGCCATCTCCAAGGAT
At4g33430	BAK1-Fw	GTCAGAAAGTAGTGTCGCCA
	BAK1-Rv	ACTTGTAGCGTCAGGACAGC

ANEXO C - Representação esquemática do local de inserção do T-DNA em
mutantes *bak1-1*, *bak1-3* e *bak1-4*

Gene *BAK1* (At4g33430) – mutantes (inserção T-DNA):

ANEXO D - Análise por espectrometria de massa (MALDI) da proteína BAK1DE (domínio extracelular) fusionada com HA digerido com tripsina. A massa de três fragmentos tripticos foi obtida: 1313,7; 2305,3 e 2444,5 (fragmentos em negrito na sequência completa da proteína acima do perfil cromatográfico). Nenhuma alteração na proteína foi detectada

ANEXO E - Os peptídeos RALF1 (9-49) e RALF1 (I6A) não inibem raízes primárias de plantas de arabidopsis selvagens. As medições das raízes foram feitas após 48 h de tratamento com 10 μ M dos peptídeos. Col-0, plantas selvagens. AtRALF1 foi usado como controle positivo. Cada barra representa a média do comprimento de raiz de 20-40 plantas. Valores representam as médias mais o desvio padrão. As médias com a mesma letra não são significativamente diferentes entre si (Teste de Tukey, $P \leq 0.01$)