

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

**Interação do peptídeo hormonal AtRALF1 com a proteína de membrana  
MSBP1, uma proteína que regula negativamente a via de brassinosteróides**

**Aparecida Leonir da Silva**

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

**Piracicaba  
2019**

Aparecida Leonir da Silva  
Licenciada em Ciências Biológicas

Interação do peptídeo hormonal AtRALF1 com a proteína de membrana MSBP1, uma  
proteína que regula negativamente a via de brassinosteróides

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

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

Piracicaba  
2019



## RESUMO

### **Interação do peptídeo hormonal AtRALF1 com a proteína de membrana MSBP1, uma proteína que regula negativamente a via de brassinosteróides**

Após a descoberta do primeiro peptídeo hormonal em 1991, uma nova família de moléculas de origem proteica, com características hormonais e que atuam na comunicação intracelular regulando crescimento, desenvolvimento, defesa e reprodução, vem sendo estudada em plantas. Após a descoberta das sisteminas em tabaco, foi isolada uma proteína com 5kDa que induz uma rápida alcalinização no meio de cultivo de células em suspensão. Este peptídeo, denominado RALF (*Rapid ALkalinization Factor*), é ubíquo no reino vegetal e na planta modelo *Arabidopsis* forma uma família de 37 isoformas (AtRALFs). O peptídeo AtRALF1 regula, negativamente, a expansão celular, atuando de forma antagônica aos brassinosteróides (BRs). Durante a busca por proteínas que interagissem com o AtRALF1, foi identificada a proteína de ligação a esteróide de membrana MSBP1 (*MEMBRANE STEROID BINDING PROTEIN-1*). A MSBP1 também atua como reguladora negativa da expansão celular e da sinalização de BRs. Este trabalho teve como objetivo a elucidação do papel da MSBP1 nas respostas mediadas por AtRALF1. Para tanto, buscou-se através de ferramentas genéticas e bioquímicas, um melhor entendimento da relação entre estas proteínas. No sistema de duplo híbrido de levedura, MSBP1 interage com AtRALF1, BAK1 e CML38, enquanto que BAK1 interage com AtRALF1, mas não interage com CML38. No mesmo sistema o peptídeo AtRALF1 interage com todas as proteínas, podendo então ser um ligante chave dessas interações, sugerindo a formação de um complexo. Plantas com baixa expressão de *MSBP1* (*irmsbp1*) são, parcialmente, insensíveis ao peptídeo AtRALF1 e exibem raízes mais longas e células da endoderme maiores que as de plantas selvagens (Wt). Plantas com alta expressão de *MSBP1* (35S:MSBP1) exibem raízes curtas e células da endoderme menores que as de plantas Wt. Resultados de expressão gênica em mutantes mostram que *MSBP1* é essencial para a indução de genes responsivos ao peptídeo, que AtRALF1 induz a expressão do gene *MSBP1* e que *BAK1* é essencial para a indução de *MSBP1* por AtRALF1. Os mutantes *irmsbp1* mostraram uma alcalinização do meio quando tratados com AtRALF1, sugerindo que MSBP1 não é necessária para esta atividade. Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a proteína MSBP1 interage com o peptídeo AtRALF1, está envolvida na percepção do peptídeo, é essencial para a inibição do crescimento da raiz primária causada pelo AtRALF1 e para a indução dos genes responsivos ao AtRALF1.

Palavras-chave: RALF; Inibição primária da raiz; Sinalização; BAK1



## ABSTRACT

### **Interaction of the hormonal peptide AtRALF1 with the membrane protein MSBP1, a protein that negatively regulates the brassinosteroid pathway**

After the discovery of the first hormonal peptide in 1991, a new family of peptide with hormonal characteristics and that act in the intracellular communication regulating growth, development, defense and reproduction, has been studied in plants. After the discovery of the sistemins in tobacco, a protein with 5kDa was isolated that induces a quick alkalinization in the culture medium of cells in suspension. This peptide, called RALF (Rapid AL kalinization Factor), is ubiquitous in the plant kingdom and in the model plant arabidopsis forms a family of 37 isoforms (AtRALFs). The AtRALF1 peptide negatively regulates cell expansion, acting in an antagonistic way to the brassinosteroids (BRs). During the search for proteins that interacted with AtRALF1, the membrane steroid binding protein MSBP1 (MEMBRANE STEROID BINDING PROTEIN-1) was identified. MSBP1 also acts as a negative regulator of cellular expansion and BRs signaling. This work aimed to elucidate the role of MSBP1 in the responses mediated by AtRALF1. In order to do so, a better understanding of the relationship between these proteins was sought through genetic and biochemical tools. In two-hybrid system, MSBP1 interacts with AtRALF1, BAK1 and CML38, whereas BAK1 interacts with AtRALF1, but does not interact with CML38. In the same system the AtRALF1 peptide interacts with all the proteins, being able to be a key ligand of these interactions, suggesting the formation of a complex. Plants with low expression of MSBP1 (*irmsbp1*) are partially insensitive to the AtRALF1 peptide and exhibit longer roots and endodermal cells larger than those of wild-type plants. Plants with high expression of MSBP1 (35S:MSBP1) exhibit short roots and endodermal cells smaller than those of Wt plants. Results of gene expression in mutants show that MSBP1 is essential for the induction of peptide responsive genes, that AtRALF1 induces MSBP1 gene expression and that BAK1 is essential for the induction of MSBP1 by AtRALF1. The *irmsbp1* mutants did show an alkalinization of the medium when treated with AtRALF1, suggesting that MSBP1 is not required for this activity. Based on the results obtained, it is concluded that the MSBP1 protein interacts with the peptide AtRALF1, is involved in the perception of the peptide, is essential for the inhibition of primary root growth caused by AtRALF1 and for the induction of genes responsive to AtRALF1.

Keywords: RALF; Primary root inhibition; Signaling; BAK1



## 1. INTRODUÇÃO

Os hormônios são produzidos pelas plantas e estão presentes em todas as fases da vida como no controle do desenvolvimento, crescimento e defesa das plantas. Em 1991 surge uma nova classe de hormônios vegetais os peptídeos hormonais, e a sistemina foi o primeiro a ser descoberto (Pearce et al., 1991; Ryan et al., 2002). Eles apresentam funções similares aos hormônios (comunicação intracelular e atividade em baixas concentrações nos processos de crescimento, desenvolvimento, defesa e reprodução), no entanto são pequenas proteínas (Whitford et al., 2012). Desde a descoberta da sistemina, vem sendo descoberto uma variedade de peptídeos que se diferenciam em tamanho, modificações pós-traducionais e funções.

Em 2001 foi descoberto um novo peptídeo de 5kDa que induz uma rápida alcalinização em células cultivadas em suspensão, *Rapid Alkalinization Factor* (RALF), que foi isolado de folhas de tabaco (Pearce et al., 2001). Desde sua descoberta, foi proposto que o peptídeo RALF poderia ter um papel básico na regulação do crescimento e no desenvolvimento das plantas (Pearce et al., 2001).

Posterior a descoberta de RALF em tabaco, o peptídeo foi encontrado em outras espécies vegetais e é tido como ubíquo no reino vegetal (Moura; Silva-Filho, 2006). Na espécie modelo *Arabidopsis thaliana*, foram encontradas 37 isoformas de AtRALFs (Morato do Canto et al., 2014; Lamesch et al., 2012), dentre as 37, há um subgrupo de 9 isoformas que possui maior identidade de estrutura primária com o RALF previamente isolado de tabaco. A isoforma pólen-específica AtRALF4, não foi capaz de induzir a alcalinização ou inibir o crescimento da raiz primária (Morato do Canto et al., 2014). A isoforma de RALF mais estudada é a AtRALF1, que além de inibir o crescimento de raízes e expansão de hipocótilos, promove um rápido aumento da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular (Haruta et al., 2008; Morato do Canto et al., 2014).

Plantas que superexpressam AtRALF1 apresentaram menor sensibilidade à BL, não aumentando, significativamente, o comprimento da raiz quando expostas ao BL (Bergonci et al., 2014a). AtRALF1 induz os genes reprimidos por BL, *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHISM AND DWARFISM* (*CPD*) e *DWARF4* (*DWF4*), e reprime o gene induzido por BR, *EXPANSINA A5* (Bergonci et al., 2014b). O tratamento simultâneo com AtRALF1 e BL causa uma redução na



expressão dos genes responsivos a AtRALF1, o que sugere que ambas as vias podem estar competindo por componentes em comum (Bergonci et al., 2014a).

Em *Arabidopsis*, a proteína BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE1 (BAK1) interage com o receptor BRI1 de BL e modula a sinalização de BR (Li et al., 2002). Mutantes de *Arabidopsis* com perda de função da proteína BAK1 mostraram insensibilidade a aplicação exógena de AtRALF1, sem inibição do crescimento de raízes, mostrando assim que BAK1 está envolvida na percepção do peptídeo e é essencial para a inibição do crescimento da raiz primária causada pelo AtRALF1 (Dressano et al., 2017).

A MEMBRANE STEROID BINDING PROTEIN-1 (MSBP1) é uma proteína que atua como regulador negativo do alongamento celular em *Arabidopsis thaliana*, de forma semelhante ao descrito para o peptídeo AtRALF1 (Yang et al., 2005, Bergonci et al., 2014a). Em outro estudo, foi demonstrado ainda que MSBP1 interage com o domínio extracelular de BAK1, regulando, negativamente, a sinalização de BRs, aumentando a endocitose de BAK1 (Song et al., 2009).

Considerando que a literatura reporta ações semelhantes de MSBP1 e AtRALF1, ou seja, como reguladores negativos do alongamento celular, o objetivo deste trabalho foi elucidar o papel da MSBP1 nas respostas mediadas por AtRALF1, posicionando a proteína MSBP1 na via de sinalização do AtRALF1.

#### 4 CONCLUSÕES

A proteína MSBP1 interage, fisicamente, de forma específica com o peptídeo AtRALF1 e é essencial para as atividades biológicas de inibição de crescimento radicular em arabidopsis. A proteína MSBP1 também interage com o domínio extracelular da proteína BAK1 e CML38, ambas proteínas fazem parte da via de sinalização do peptídeo AtRALF1. AtRALF1 parece ser um ligante chave dessas interações, sugerindo a formação de um complexo com estas proteínas.

Os resultados que sustentam essas conclusões:

Interação específica de AtRALF1 com MSBP1, BAK1 e CML38 (duplo híbrido em células de levedura);

Mutantes silenciados para *MSBP1* apresentam raízes maiores que o tipo selvagem e mutantes de superexpressão para *MSBP1* apresentam raízes menores (ensaio de crescimento de raízes);

Células da endoderme de mutantes silenciados para *MSBP1* são maiores que o tipo selvagem;

Insensibilidade parcial e específica de mutantes *msbp1* a diferentes concentrações de AtRALF1;

Insensibilidade parcial de mutantes *msbp1* a diferentes concentrações do hormônio BL;

*MSBP1* é essencial para a indução de genes responsivos ao AtRALF1;

AtRALF1 induz a expressão do gene *MSBP1* e para que isso aconteça BAK1 é essencial.



## REFERÊNCIAS

- ABELES, F.B.; MORGAN, P.W.; SALTVEIT, M.E.Jr. **Ethylene in Plant Biology**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2004. p. 296.
- 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**, v. 65, p. 2219-2230, 2014a.
- BERGONCI, T.; SILVA-FILHO, M.C.; MOURA, D.S. Antagonistic relationship between AtRALF1 and brassinosteroid regulates cell expansion-related genes. **Plant Signaling & Behavior**, v. 10, p. e976146, 2014b.
- CAO, J.; SHI, F. Evolution of the *RALF* Gene Family in Plants: Gene Duplication and Selection Patterns. **Evolutionary Bioinformatics**. v.8, p.271-292, 2012.
- CAMPOS, W.F; DRESSANO, K.; CECILIATO, P.H.; GUERRERO-ABAD, J.C.; SILVA, A.L.; FIORI, C.S.; CANTO, A.M.; BERGONCI, T.; CLAUS, L.A.; FILHO, M.C.S.; MOURA, D.S. *Arabidopsis thaliana* rapid alkalization factor 1-mediated root growth inhibition is dependent on calmodulin-like protein 38. **JBC**, v. 293, p. 2159-2171, 2018.
- CAÑO-DELGADO, A.; YIN, Y.; YU, C.; VAFEADOS, D.; MORA-GARCIA, S.; CHENG, J.C.; NAM, K.H.; LI, J.; CHORY, J. BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in *Arabidopsis*. **Development**, v. 131, p. 5341–5351. 2004.
- 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**, v. 107, p. 1075-1082, 1995.
- CHEN, J.; YU, F.; LIU, Y.; DU, C.; LI, X.; ZHU, S.; WANG, X.; LAN, W.; RODRIGUEZ, P. L.; LIU, X.; LI, D.; CHEN, L.; LUAN, S. FERONIA interacts with ABI2-type phosphatases to facilitate signaling cross-talk between abscisic acid and RALF peptide in *Arabidopsis*. **PNAS**, 2016.
- 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**, v. 73, p. 1019–1033, 2013.
- CHINCHILLA, D.; SHAN, L.; HE, P.; DE VRIES, S.; KEMMERLING, B. One for all: the receptor-associated kinase BAK1. **Trends in Plant Science**, v. 14, p. 535–541, 2009.
- CLOUGH, S.J.; BENT, A.F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 16, p. 735-743, 1998.

CLOUSE, S.D.; LANGFORD, M.; McMORRIS, T.C. A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. **Plant Physiology**, v. 111, p. 671–678, 1996.

CLOUSE, S.D.; SASSE, J.M. Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. **Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 427–451, 1998.

CLOUSE, S.D. Brassinosteroid signal transduction and action. In: Davies PJ, ed. **Plant hormones, biosynthesis, signal transduction, action**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2004. p. 204–220.

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

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

DRESSANO, K.; CECILIATO, P.H.O.; SILVA, A.L.; GUERRERO-ABAD, J.C.; BERGONCI, T.; ORTIZ-MOREA, F.A.; BU RGER, M.; SILVA-FILHO, M.C.; MOURA, D.S. BAK1 is involved in AtRALF1-induced inhibition of root cell expansion. **PLOS Genetics**. p. 1-33, 2017.

ECKARDT, N.A. Abscisic Acid Biosynthesis Gene Underscores the Complexity of Sugar, Stress, and Hormone Interactions. **The Plant Cell**, v.14, p. 2645-2649, 2002.

FENG, W., KITA, D., PEAUCELLE, A., CARTWRIGHT, H.N., DOAN, V., DUAN, Q., LIU, M. C., MAMAN, J., STEINHORST, L., SCHMITZ-THOM, I., YVON, R., KUDLA, J., WU, H. M., CHEUNG, A. Y., DINNENY, J. R. The FERONIA Receptor Kinase Maintains Cell-Wall Integrity during Salt Stress through Ca<sup>2+</sup> Signaling. **Current Biology**, v. 28, p. 666–675, 2018.

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**, v. 486, p. 228–232, 2012.

FUJII, H.; CHINNUSAMY, V.; RODRIGUES, A.; RUBIO, S.; ANTONI, R.; PARK, S.Y.; CUTLER, S.R.; SHEEN, J.; RODRIGUEZ, P.L.; ZHU, J.K. In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. **Nature**, v. 462, p. 660–664, 2009.

FRIEDRICHSEN, D.M.; JOAZEIRO, C.A.P.; LI, J.M.; HUNTER T., CHORY, J. Brassinosteroid-insensitive-1 is a ubiquitously expressed leucine-rich repeat receptor serine/threonine kinase. **Plant Physiology**, v. 123, p. 1247-1256, 2000.

GE, Z.; BERGONCI, T.; ZHAO, Y.; ZOU, Y.; DU, S.; LIU, M.C.; LUO, X.; RUAN, H.; GARCÍA-VALENCIA, L.E.; ZHONG, S.; HOU, S.; HUANG, Q.; LAI, L.; MOURA, D.S.; GU, H.; DONG, J.; WU,

H.M.; DRESSELHAUS, T.; XIAO, J.; CHEUNG, A.Y.; QU, L.J. *Arabidopsis* pollen tube integrity and sperm release are regulated by RALF-mediated signaling. **Science**, v. 358, n. 6370, p.1596-1600. 2017.

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**, v.13, p.177- 189, 2007.

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

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

GONNEAU, M., DESPREZ, T., MARTIN, M., DOBLAS, V. G., BACETE, L., MIART, F., SORMANI, R., HÉMATY, K., RENOU, J., LANDREIN, B., MURPHY, E., DE COTTE, B. V., VERNHETTES, S., DE SMET, I., HOFTE, H. Receptor Kinase THESEUS1 Is a Rapid Alkalinization Factor 34 Receptor in *Arabidopsis*. **Current Biology**, v 28, p. 2452–2458, 2018.

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**, v. 281, p. 216-217, 1979.

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**, v. 106 p. 7648-7653, 2009.

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

HARUTA, M.; MONSHAUSEN, G.; GILROY, S.; SUSSMAN, M.R. A cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> functional assay for identifying and purifying endogenous cell signaling peptides in *Arabidopsis* seedlings: identification of AtRALF1 peptide. **Biochemistry**, 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**, v. 343, p. 408-411, 2014.

HE, Z.; WANG, Z.Y.; LI, J.; ZHU, Q.; LAMB, C.; RONALD, P.; CHORY, J. Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1. **Science**, v. 288, p. 2360-2363, 2000.

HOHMANN, U., SANTIAGO, J., NICOLET, J., OLSSON, V., SPIGA, F. M., HOTHORN, L. A., BUTENKO, M. A., HOTHORN, M. Mechanistic basis for the activation of plant membrane receptor kinases by SERK-family coreceptors. **PNAS**, v. 115, p. 3488-3493, 2018.

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**, v. 29, p. 259-266, 2010.

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**, v. 18, p. 626-638, 2006.

KAUSCHMANN, A.; JESSOP, A.; KONCZ, C.; SZEKERES, M.; WILLMITZER, L.; ALTMANN, T. Genetic evidence for an essential role of brassinosteroids in plant development. **The Plant Journal**, v. 9, p. 701–713, 1996.

KESHISHIAN, E. A.; RASHOTTE, A. M. Plant cytokinin signalling. **Portland Press Limited Essays Biochem.** V. 58, p. 13–27, 2015.

KINOSHITA, T.; CANO-DELGADO, A.; SETO, H.; HIRANUMA, S.; FUJIOKA, S.; YOSHIDA, S.; CHORY, J. Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. **Nature**, v. 433, p. 167–171. 2005.

KIR, G., YE, H., NELISSEN, H., NEELAKANDAN, A. K., KUSNANDAR, A. S., LUO, A., INZÉ, D., SYLVESTER, A. W., YIN, Y., BECRAFT, P. W. RNA Interference Knockdown of BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 in Maize Reveals Novel Functions for Brassinosteroid Signaling in Controlling Plant Architecture. **Plant Physiology**, v. 169, p. 826–839, 2015.

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**, v. 40, p. 1202-1210, 2012.

LI, J.; CHORY, J. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signaling transduction. **Cell**, 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**, v. 110, p. 213-222, 2002.

LI, J.M.; JIN, H. Regulation of brassinosteroid signaling. **Trends in Plant Science**, v. 12, p. 37-41, 2007.

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**, 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**, v. 25, p. 402-408, 2001.

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

MASACHIS, S.; SEGORBE, D.; TURRÀ, D.; LEON-RUIZ, M.; FÜRST, U.; EL GHALID, M.; LEONARD, G.; LÓPEZ-BERGES, M.S.; RICHARDS, T.A.; FELIX, G.; Di PIETRO, A. A fungal pathogen secretes plant alkalizing peptides to increase infection. **Nature Microbiology**, v. 1, n. 16043, p. 21-30, 2016.

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.

MAYUMI, K.; SHIBAOKA, H. A possible double role for brassinolide in the reorientation of cortical microtubules in the epidermal cells of Azuki bean epicotyls. **Plant Cell Physiology**, v. 36, p. 173–181, 1995.

MECCHIA, M. A.; SANTOS-FERNANDEZ, G.; DUSS, N. N.; SOMAZA, S. C.; BOISSON-DERNIER, A.; GAGLIARDINI, V.; MARTÍNEZ-BERNARDINI, A.; FABRICE, T. N.; RINGLI, C.; MUSCHIETTI, J. P.; GROSSNIKLAUS, U. RALF4/19 peptides interact with LRX proteins to control pollen tube growth in *Arabidopsis*. **Science**, v. 358, p.1-8, 2017.



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**, v. 73, p. 271-281, 2010.

MITCHELL, J. W., MANDAVA, N. B., WORLEY, J. F., PLIMMER, J.R., SMITH, M. V. Brassins -- a new family of plant hormones from rape pollen. **Nature**, v. 225, p. 1065-1066, 1970.

MÖCKLI, N.; AUERBACH, D. Quantitative beta-galactosidase assay suitable for high-throughput applications in the yeast two-hybrid system. **BioTechniques**, v. 36, p. 872-876, 2004.

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**, 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**, v. 75, p.45-54, 2014.

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.

MURPHY, E., L. VU, D., BROECK, L. V., LIN, Z., RAMAKRISHNA, P., COTTE, B. V., GAUDINIER, A., GOH, T., SLANE, D., BEECKMAN, T., INZÉ, D., BRADY, S. M., FUKAKI, H., DE SMET, I. RALFL34 regulates formative cell divisions in *Arabidopsis* pericycle during lateral root initiation. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, p. 4863–4875, 2016.

MULKEY, T.J.; KUZMANOFFB, 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**, v.1, p. 43-48, 1982.

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

MURASE, K.; HIRANO, Y.; SUN, T.P.; HAKOSHIMA, T. Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. **Nature**, v. 456, p. 459-463, 2008.

MÜSSIG, C.; SHIN, G.H.; ALTMANN, T. Brassinosteroids promote root growth in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 133, p. 1261–1271, 2003.

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

NEMHAUSER, J. L.; MOCKLER, T. C.; CHORY, J. Interdependency of brassinosteroid and auxin signaling in Arabidopsis. **PLOS Biology**, v.2, p.1460-1471, 2004.

NOGUCHI, T.; FUJIOKA, S.; CHOE, S.; TAKATSUTO, S.; YOSHIDA, S.; YUAN, H.; FELDMANN, K. A.; TAX, F. E. Brassinosteroid-insensitive dwarf mutants of Arabidopsis accumulate brassinosteroids. **Plant Physiol**, v. 121, p. 743-752, 1999.

PEARCE, G.; STRYDOM, D.; JOHNSON, S.; RYAN, C.A. A Polypeptide from Tomato Leaves Induces Wound-Inducible Proteinase Inhibitor Proteins. **Science**, v. 253, p. 895-897, 1991.

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**, v. 98, p. 12843-12847, 2001.

PENG, P.; YAN, Z.; ZHU, Y.; LI, J. Regulation of the Arabidopsis GSK3-like kinase BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE2 through proteasome-mediated protein degradation. **Molecular Plant**, v. 1, p. 338-346, 2008.

QIAO, H.; SHEN, Z.; HUANG, S.S.; SCHMITZ, R.J.; URICH, M.A.; BRIGGS, S.P.; ECKER, J.R. Processing and subcellular trafficking of ER-tethered EIN2 control response to ethylene gas. **Science**, v. 338, p. 390–393, 2012.

RYAN, C.A., PEARCE, G., SHEER, J., MOURA, D.S. Polypeptide hormones. **Plant Cell**, v. 14, S251 e S264, 2002.

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

SANTNER, A.; ESTELLE, M. Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. **Nature**, v. 459, p. 1071–1078, 2009.

SCHALLER, G.E., SHIU, S.H., ARMITAGE, J.P. Two-component systems and their co-option for eukaryotic signal transduction. **Curr Biol**, v. 21, p. R320–R330, 2011.

SHEARD, L.B.; TAN, X.; MAO, H.; WITHERS, J.; BEN-NISSAN, G.; HINDS, T.R.; KOBAYASHI, Y.; HSU, F.F.; SHARON, M.; BROWSE, J.; BROWSE, J.; HE, S.Y.; RIZO, J.; HOWE, G.A.; ZHENG, N. Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. **Nature**, v. 468, p. 400-405, 2010.

SILVA, A.L., DRESSANO, K., CECILIATO, P.H.O., GUERRERO-ABAD, J.C., MOURA, D.S. Evaluation of Root pH Change Through Gel Containing pH-sensitive Indicator Bromocresol Purple. **Bio-protocol**, v. 8, 2018.

SONG, L.; SHI, Q.M.; YANG, X.H.; XU, Z.H.; XUE, H.W. Membrane steroid-binding protein 1 (MSBP1) negatively regulates brassinosteroid signaling by enhancing the endocytosis of BAK1. **Cell Research**, v. 19, p. 864-876, 2009.

SONG, W., HAN, Z., WANG, J., LIN, G., CHAI, J. Structural insights into ligand recognition and activation of plant receptor kinases. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 43, p.18-27, 2017.

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**, v. 59, p. 930-939, 2009.

SUN, Y.; HAN, Z.; TANG, J.; HU, Z.; CHAI, C.; ZHOU, B.; CHAI, J. Structure reveals that BAK1 as a co-receptor recognizes the BRI1-bound brassinolide. **Cell Research**, v. 23, p. 1326-1329, 2013.

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.

STEGMANN, M., MONAGHAN, J., SMAKOWSKA-LUZAN, E., ROVENICH, H., LEHNER, A., HOLTON, N., BELKHADIR, Y., AND ZIPFEL, C. The receptor kinase FER is a RALF-regulated scaffold controlling plant immune signaling. **Science**, v. 355, p. 287-289, 2017.

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**, v. 7, p. 728-738, 2008.

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

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**, v. 18, p. 257-273, 2006.

VERT, G.; NEMHAUSER, J.L.; GELDNER, N.; HONG, F.; CHORY, J. Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 21, p.177-201, 2005.

- VERT, G.; CHORY, J. 2006. Downstream nuclear events in brassinosteroid signaling. **Nature**, v. 441, p.96-100, 2006.
- 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**, v. 410, p. 380–383, 2001.
- WANG, X.; CHORY, J. Brassinosteroids regulate dissociation of BKI1, a negative regulator of BRI1 signaling, from the plasma membrane. **Science**, v. 313, p.1118-1122, 2006.
- WANG, X.; ZHANG, J.; YUAN, M.; EHRHARDT, D.W.; WANG, Z.; MAO, T. *Arabidopsis* MICROTUBULE DESTABILIZING PROTEIN40 is involved in brassinosteroid regulation of hypocotyl elongation. **Plant Cell**, v. 24, p. 4012–4025, 2012.
- WANG, Z.Y.; BAIMY, O.H.E.; ZHU, J.Y. Brassinosteroid signaling network and regulation of photomorphogenesis. **Annu Rev Genet**, v. 46, p. 701–724, 2012.
- WANG, C., LIU, Y., LI, S-S., HAN, G-Z. Insights into the Origin and Evolution of the Plant Hormone Signaling Machinery. **Plant Physiology**, v. 167, p. 872–886, 2015.
- WASTERNAK, C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. **Annals of Botany**, v. 100, p. 681–697, 2007.
- WEIGEL, D.; GLAZEBROOK, J. **Arabidopsis: a laboratory manual**. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 2002. 354p.
- WHITFORD, R.; FERNANDEZ, A.; TEJOS, R.; PEREZ, A.C.; KLEINE-VEHN, J.; VANNESTE, S.; DROZDZECKI, A.; LEITNES, J.; ABAS, L.; AERTS, M.; HOOGEWIJS, K.; BASTER, P.; DE GROODT, R.; LIN, Y.C.; STORME, V.; VAN DE PEER, Y.; BEECKMAN, T.; MADDER, A.; DEVEESE, B.; LUSCHNIG, C.; FRIML, J.; HILSON, P. GOLVEN secretory peptides regulate auxin carrier turnover during plant gravitropic responses. **Dev. Cell**, v. 22, p. 678-685, 2012.
- 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**, v. 52, p. 877-890, 2007.
- YANG, X.H.; XU, Z.H.; XUE H.W. *Arabidopsis* membrane steroid binding protein 1 is involved in inhibition of cell elongation. **Plant Cell**, v. 17, p.116-131, 2005.
- YAMAGUCHI, S. Gibberellin metabolism and its regulation. **Annu. Rev. Plant Biol.** 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**, v. 22, p. 508-522, 2010.

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**, v. 37 p. 3273-3281, 2010.

ZHAO, Y.; QI, Z.; BERKOWITZ, GA. Teaching An Old Hormone New Tricks: Cytosolic Ca<sup>2+</sup> Elevation Involvement in Plant Brassinosteroid Signal Transduction Cascades. **Plant Physiol.** V. 163, p. 555-565, 2013.

ZHAO, C., ZAYED, O., YU, Z., JIANG, W., ZHU, P., HSU, C.C., ZHANG, L., TAO, W. A., LOZANO-DURÁN, R., ZHU, J. K. Leucine-rich repeat extensin proteins regulate plant salt tolerance in *Arabidopsis*. **PNAS**, v. 115, p. 13123-13128, 2018.

ZHOU, F.; LIN, Q.; ZHU, L.; REN, Y.; ZHOU, K.; SHABEK, N.; WU, F.; MAO, H.; DONG, W.; GAN, L.; MA, W.; GAO, H.; CHEN, J.; YANG, C.; WANG, D.; TAN, J.; ZHANG, X.; GUO, X.; WANG, J.; JIANG, L.; LIU, X.; CHEN, W.; CHU, J.; YAN, C.; UENO, K.; ITO, S.; ASAMI, T.; CHENG, Z.; WANG, J.; LEI, C.; ZHAI, H.; WU, C.; WANG, H.; ZHENG, N.; WAN, J. D14-SCF(D3)-dependent degradation of D53 regulates strigolactone signalling. **Nature**, v. 504, p. 406-410, 2013.