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

1

Relação AtRALF1 - Etileno e a identificação de um promotor mínimo em CML38, um gene induzido por AtRALF1 e componente da via de resposta ao AtRALF1 independente de FERONIA

Akemi Lueli Niitsu

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

Piracicaba 2020 Akemi Lueli Niitsu Bióloga

## Relação AtRALF1 - Etileno e a identificação de um promotor mínimo em CML38, um gene induzido por AtRALF1 e componente da via de resposta ao AtRALF1 independente de FERONIA

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 2020

#### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Niitsu, Akemi Lueli

Relação AtRALF1 - Etileno e a identificação de um promotor mínimo em CML38, um gene induzido por AtRALF1 e componente da via de resposta ao AtRALF1 independente de FERONIA / Akemi Lueli Niitsu. - - Piracicaba, 2020. 100 p.

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

1. RALF 2. Etileno 3. Crescimento da raiz 4. CML38 5. Elementos regulatórios 6. Fatores transcricionais I. Título

## DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais que, mesmo sem terem terminado os estudos, sempre souberam a importância do conhecimento na minha vida.

#### AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu professor e orientador Daniel Scherer de Moura, que mais uma vez me acolheu em seu laboratório e me guiou nos estudos e conhecimentos na vida científica.

Aos professores Helaine Carrer, responsável pelo laboratório de Biologia Molecular, Márcio de Castro Silva Filho, responsável pelo laboratório de Biologia Molecular de Plantas e aos professores Victor Vitorello e Núbia Eloy, todos pelo fornecimento de materiais e ferramentas para o desenvolvimento desta pesquisa. Agradeço também ao professor Ricardo Ferraz pelas conversas e total apoio, assim como o professor Paulo Teixeira.

Aos meus pais e familiares por todo apoio concedido durante todos esses anos.

À minha irmã Jéssica que mesmo longe esteve sempre ao meu lado.

Aos queridos amigos Helbert Noventa, Pedro Sanner, Thamires Marques e Diego Kühl que me deram apoio mesmo que virtualmente devido à correria do dia a dia. Agradeço a todos por muitos anos de amizade e sei que posso contar com todos vocês!

Agradeço em especial meus amigos, Aldeir Ronaldo e Marina Queiroz, que sempre estiveram dispostos a me ajudar com muito carinho.

À minha querida amiga Arlete Ramalho, mesmo estando em outro estado. Uma pessoa que de maneira inesperada entrou na minha vida e sou imensamente grata.

Aos técnicos de laboratório Amaral, Fátima e Rodinei por toda ajuda e amizade.

Aos amigos de laboratório, Tábata, que sempre sinto saudades. Ao Juan que me auxiliava por videoconferências. À Aparecida, parceira de bancada. À Maressa e Camila pela ajuda e conversas. À Giovana, Ana Luísa e Aline estagiários que me acompanharam na reta final.

Às médicas Vivian Beatriz Orlandin Coelho e Faridi que me ajudaram nos momentos difíceis.

Agradeço à CAPES pela bolsa concedida, à FAPESP, CNPq e ESALQ-USP pelo auxílio financeiro e toda estrutura disponibilizada.

Agradeço todos que não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram imensamente para a realização deste trabalho.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001".

# EPÍGRAFE

"Toda decisão acertada é proveniente de experiência. E toda experiência é proveniente de uma decisão não acertada."

**Albert Einstein** 

# SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	. 10
1 INTRODUÇÃO	.11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	. 13
2.1 Peptídeos Hormonais	. 13
2.1.1 Peptídeos de defesa vegetal	. 13
2.1.1.1 Sistemina	. 13
2.1.2 Peptídeos de desenvolvimento vegetal	.16
2.2 Peptídeos RALFs	. 18
2.2.1 Descoberta	. 18
2.2.2 Receptor de RALF	. 20
2.2.3 Atividades biológicas	. 22
2.2.4 Peptídeos RALFs e a relação com outros hormônios vegetais	. 24
2.2.4.1 Via de sinalização de etileno	. 26
2.3 Ca <sup>2+</sup> e Proteínas semelhantes a calmodulinas (CMLs)	. 27
2.4 Promotores e seus Fatores Transcricionais	. 31
3 MATERIAL E MÉTODOS	. 37
3.1 Material vegetal e condições de crescimento	. 37
3.2 Assepsia superficial das sementes	. 37
3.3 Expressão Heteróloga do peptídeo AtRALF1 recombinante	. 37
3.3.1 Crescimento de células e indução à produção de proteínas	. 37
3.3.2 Purificação e extração de proteínas por cromatografia de afinidade	. 38
3.3.3 Diálise e liofilização	. 38
3.3.4 Quantificação da proteína e determinação da pureza por cromatografia líquida alta eficiência (HPLC)	de . 38
3.4 Tratamento com peptídeo AtRALF1 recombinante	. 39
3.5 Extração de DNA genômico de arabidopsis	. 39
3.6 Avaliação da produção de etileno	. 39
3.7 Avaliação da deposição de calose nas plantas	. 40
3.8 Análise de expressão por PCR em tempo real	. 40
3.8.1 Extração de RNA	. 40

3.8.2 Tratamento com DNAse (Promega)
3.8.3 Síntese de cDNA
3.8.4 Análise de expressão gênica41
3.9 Clonagem dos fragmentos do promotor do <i>CML38</i>
3. 10 Purificação de fragmentos de DNA amplificados
3.11 Clonagem no vetor pENTR/D-TOPO
3.12 Transformação de <i>Escherichia coli</i>
3.12.1 Preparação de células eletrocompetentes de <i>E.coli</i>
3.12.2 Eletroporação de <i>E.coli</i>
3.13 Isolamento e purificação de DNA plasmidial de <i>E.coli</i>
3.14 Clonagem no vetor de destino pKGWFS7
3.14.1 Obtenção do vetor de destino pKGWFS745
3.14.2 Clonagem no vetor de destino pKGWFS7
3.15 Transformação de Agrobacterium tumefaciens
3.15.1 Preparação de células eletrocompetentes de A. tumefaciens
3.15.2 Eletroporação de A. tumefaciens
3.16 Isolamento e purificação de DNA plasmidial de A. tumefaciens
3.17 Transformação estável de arabidopsis
3.18 Seleção de sementes
3.19 Sítio de ligação para fatores transcricionais (TFBS)
3.20 Análise estatística
4 RESULTADOS
4.1 Produção de etileno é induzida em plantas tratadas com AtRALF1
4.2 Genes da via de sinalização de etileno são induzidos por AtRALF1 e dependem da via
mediada por FER
4.3 Indução de calose em plantas mutantes para CML38 é similar a observada em plantas
selvagens
4.4 Identificação de um promotor mínimo na região regulatória de CML38
4.5 Sítio de ligação para fatores transcricionais (TFBS)
5 DISCUSSÃO
6 CONCLUSÕES
REFERÊNCIAS
ANEXOS

#### RESUMO

## Relação AtRALF1 - Etileno e a identificação de um promotor mínimo em CML38, um gene induzido por AtRALF1 e componente da via de resposta ao AtRALF1 independente de FERONIA

As plantas precisam de uma rede de sinalização química coordenada para regular o seu desenvolvimento, uma vez que não conseguem se esquivar das frequentes alterações do meio ambiente. Dentre estes sinais estão os peptídeos hormonais, pequenas proteínas que regulam processos como defesa, crescimento e reprodução. O qual também é regulado por hormônios vegetais como o etileno. A relação entre hormônios e peptídeos vem sendo elucidada nos últimos anos. Assim, o objetivo deste trabalho foi desvendar os componentes da via de sinalização de AtRALF1. O hormônio etileno foi induzido em raízes de plantas selvagens e tratadas com AtRALF1 e não foi induzido em plantas com perda de função para o receptor do peptídeo. Genes da via de sinalização de etileno são expressos no tratamento exógeno de plantas selvagens com AtRALF1. Da mesma maneira, genes da via de sinalização de etileno e calose são expressos e induzidos em plantas mutantes de cml38 mostrando a importância das ligações de Ca<sup>2+</sup> a elementos essenciais da parede celular durante a inibição do crescimento da raiz. Para entender a resposta de CML38 à AtRALF1, buscou-se os elementos regulatórios presentes na região promotora de CML38. Várias fragmentações do promotor de CML38 foram feitas até encontrar a região mínima responsível ao peptídeo. Através desta informação será possível a utilização destas regiões como ferramentas para isolamento de fatores transcricionais envolvidos na resposta ao RALF.

Palavras-chave: RALF, Etileno, Crescimento da raiz, CML38, Elementos regulatórios, Fatores transcricionais

#### ABSTRACT

## AtRALF1 - Ethylene crosstalk and the identification of a minimal promoter in CML38, a gene induced by AtRALF1 and component of the FERONIA-independent response pathway to AtRALF1

Plants need a coordinated chemical signaling network to regulate their development, as they cannot avoid frequent changes in the environment. Among these signs are hormonal peptides, small proteins that regulate processes such as defense, growth and reproduction. Which is also regulated by plant hormones like ethylene. The relationship between hormones and peptides has been elucidated in the last years. Thus, the objective of this work was to unveil the components of the AtRALF1 signaling pathway. The ethylene hormone was induced in roots of wild plants and treated with AtRALF1 and was not induced in plants with loss of function for the peptide receptor. Genes of the ethylene signaling pathway are expressed in the exogenous treatment of wild plants with AtRALF1. Likewise, genes from the ethylene and callose signaling pathway are expressed and induced in *cml38* mutant plants showing the importance of Ca<sup>2+</sup> bonds to essential elements of the cell wall during the inhibition of root growth. To understand CML38 responses to AtRALF1, the regulatory elements present in the CML38 promoting region were sought. Several fragmentations of the CML38 promoter were made until finding the minimal region responsible for the peptide. Through this information it will be possible to use these regions as tools to isolate transcription factors involved in the response to the RALF.

Keywords: RALF, Ethylene, Root growth, CML38, Regulatory elements, Transcription factors

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Os peptídeos e suas sequências conservadas14
Figura 2 - Precursor do peptídeo RALF originalmente isolado de folhas de tabaco (NtRALF). 
Figura 3 - Produção do gás etileno nas raízes de plantas tratadas exogenamente com AtRALF1
Figura 4 - Expressão relativa de genes da via de biossíntese de etileno
Figura 5 - Expressão relativa de genes da via de biossíntese de etileno
Figura 6 - Expressão relativa de genes da via de biossíntese de etileno
Figura 7 - Deposição de placas de calose nas raízes de plantas selvagens e mutantes fer4 e cml38
Figura 8 - Construções dos quatros primeiros fragmentos do promotor de CML38 fusionados a proteína repórter GFP
Figura 9 - Análise das plantas transformadas em microscopia confocal
Figura 10 - Construções dos fragmentos gerados a partir do fragmento 4 do promotor de <i>CML38</i> fusionados a proteína repórter GFP
Figura 11 - Análise das plantas transformadas em microscopia confocal
Figura 12 - Localização das sequências reconhecidas por fatores transcricionais encontradas na análise in silico do promotor mínimo de CML3860
Figura 13 - Modelo da via de sinalização de AtRALF164

## 1 INTRODUÇÃO

O estudo da fisiologia e bioquímica de plantas busca entender os mecanismos responsáveis pela manifestação da vida onde, o sistema como um todo, é estruturado com células capazes de se regularem e regenerarem. As células são unidades microscópicas que, bioquimicamente, interagem entre si mantendo organização no nível molecular.

As plantas recebem estímulos endógenos e exógenos que regulam o seu crescimento e desenvolvimento. Algumas proteínas, como os peptídeos hormonais, funcionam como moléculas de sinalização celular em vários processos fisiológicos (MOURA; SILVA-FILHO, 2006; MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 2006; FUKUDA; HIGASHIYAMA, 2011; KATSIR et al., 2011; ALBERT, 2013). Uma família de peptídeos hormonais denominados por RALF (*Rapid Alkalinization Factor*) afetam o crescimento da planta, resposta a patógenos e a geração do tubo polínico (PEARCE et al., 2001; GE et al., 2017; GE; STEGMANN et al., 2017; GONNEAU et al., 2018 CHEUNG; QU, 2019). O RALF originalmente isolado de tabaco possui 49 aminoácidos e é derivado de um precursor maior, uma pré-pro-proteína de 115 aminoácidos. Há duas características essenciais para a atividade de AtRALF1, o motivo - YISY- e quatro cisteínas que formam duas pontes dissulfetos. Outra característica da estrutura primária do precursor é a presença de um sítio dibásico, dupla arginina (Arg63, Arg64), necessário para o reconhecimento da enzima responsável pelo processamento do precursor (PEARCE et al., 2001; SRISVASTAVA et al., 2009).

Sabe-se que AtRALF1 se liga à proteína de membrana FERONIA. Esta interação RALF1-FERONIA, leva a uma fosforilação da serina899 (Ser899) que resulta na regulação negativa da ATPase AHA2, alcalinizando assim o apoplasto (HARUTA et al., 2014). A via completa de sinalização do peptídeo ainda é pouco conhecida, entretanto é proposto que tenha mais do que um receptor para RALF (SCHEER; PEARCE; RYAN, 2005; DRESSANO et al., 2017). Recentemente, foi descoberto uma proteína que atua como co-receptor de AtRALF1, BAK1 (*BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-associated receptor kinase 1*). BAK1 está relacionada com o controle da expansão celular, mas não envolve a alcalinização e a mobilização de Ca<sup>2+</sup> que são algumas das funções do peptídeo (DRESSANO et al., 2017). A alcalinização do meio extracelular iniciada por AtRALF1 permite a dissociação do complexo proteico responsável pela resposta ao brassinolide (BL). Este complexo é formado pelo receptor dos brassinoesteróides, a proteína BRI1 (*BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1*), BL e BAK1 e sua formação é dependente de um pH ácido (SUN et al., 2013). O envolvimento da proteína BAK1 na percepção de AtRALF1 sugere a existência de duas vias independentes

para a ativação dos genes que levam a inibição da expansão celular (DRESSANO et al., 2017). Uma proteína que detecta oscilações de Ca<sup>2+</sup>, a CML38 (*Calmodulin-like 38*), no apoplasto, se liga à AtRALF1 e assim se ligam à BAK1, formando então, um novo complexo para a via de respostas à AtRALF1 (CAMPOS et al., 2017). Mutantes de *cml38* não inibem suas raízes através de AtRALF1, entretanto essas plantas exibem alcalinização normal em resposta ao peptídeo. Sugerindo também, a dissociação das respostas à AtRALF1 (CAMPOS et al., 2017).

Grandes avanços na interação de AtRALF1 e hormônios vegetais vêm sendo alcançados nos últimos anos. AtRALF1 altera os genes envolvidos na via desses hormônios, como o hormônio etileno, ajudando na compreensão do funcionamento da via de sinalização do peptídeo (AALEN et al., 2013; LIU et al., 2013; HARUTA et al., 2014). NIITSU (2016), analisou a interação entre o peptídeo AtRALF1 e o hormônio vegetal etileno. Onde foi observado a dependência do hormônio pelo peptídeo.

O objetivo desta pesquisa foi aprofundar o conhecimento da relação entre AtRALF1 e etileno assim como identificar um promotor mínimo no gene *CML38* capaz de responder a AtRALF1. Os resultados aqui descritos compõem um esforço maior para desvendar os componentes da via de sinalização envolvida na resposta ao AtRALF1 e suas funções na regulação da inibição da expansão celular.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1 Peptídeos Hormonais

Peptídeos hormonais são pequenas proteínas que coordenam diversas respostas fisiológicas nas plantas (ALBERT, 2013), são encontrados em baixas concentrações e possuem desde 5 até 50 aminoácidos, sendo derivados de precursores maiores (MURPHY et al., 2012). O primeiro peptídeo hormonal em plantas, foi descoberto no início dos anos 90, desde então outros inúmeros peptídeos já foram identificados e isolados. E há evidências de que os peptídeos interagem com hormônios vegetais (PEARCE et al., 1991; Chilley et al., 2006; GHORBANI et al., 2014; WHITFORD et al., 2012). Os peptídeos têm grande importância na comunicação intercelular e estão divididos em famílias que atuam em processos como defesa vegetal, proliferação celular e controle do desenvolvimento e crescimento vegetal (MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 2006; MOURA; SILVA-FILHO, 2006; KATSIR et al., 2011).

#### 2.1.1 Peptídeos de defesa vegetal

#### 2.1.1.1 Sistemina

A sistemina é um peptídeo que foi descoberto e isolado de folhas de tomate, possui 18 aminoácidos, e induz a síntese e o acúmulo de inibidores de proteases. (PEARCE et al., 1991; RYAN 1998). Este peptídeo foi isolado através de frações cromatográficas em HPLC (High performance liquid chromatography) e foi encontrado apenas na família Solanaceae, sendo dividido em dois subgrupos. (PEARCE et al., 1991; CONSTABEL et al., 1998; PEARCE et al. 2001a, PEARCE, RYAN 2003). Derivada de uma prosistemina de 200 aminoácidos (Figura 1), a sistemina originalmente isolada de tomateiro é uma pequena proteína presente na extremidade C-terminal do precursor e está diretamente relacionada com a indução de proteínas de defesa na planta (McGURL et al., 1992; DOMBROWSKI et al.; 1999). Essas proteínas induzidas, normalmente são inibidores de proteases. Elas atuam como agentes antinutritivos uma vez presentes na dieta dos insetos. As proteases catalisam reações de hidrólise de diferentes ligações peptídicas presentes em processos fisiológicos importantes para a sobrevivência dos insetos como, por exemplo, a digestão (RYAN 1990; NEURATH, 1989). Ou seja, na medida em que o inseto se alimenta da planta, os inibidores de proteases são induzidos e ingeridos, fazendo com que as proteases digestivas sejam inibidas, prejudicando a digestão e assim, o desenvolvimento desses insetos (RYAN, 1990).

Os inibidores de proteases se acumulam nas folhas onde ocorreu o ferimento, mas também nas folhas não feridas que estão mais distantes, o qual indica a mobilidade da sistemina dentro da planta (YANG et al., 1999).

Peptídeo	Sequência de aminoácidos
Sistemina	AVQSKPPSKRDPPKMQTD
AtPEP1	ATKVKAKQRGKEKVSSGRPGQHN
PSK	YIYTQ
CLV3	RTVPSGPDPLHHH
RALF	ATKKYISYGALQKNSVPCSRRGASYYNCKPGAQANPYSRGCSAITRCRS

Figura 1 - Os peptídeos e suas sequências conservadas.

A sistemina é produzida via células do parênquima de vários órgãos da planta como as partes florais, sépalas, pétalas e anteras onde a prosistemina foi encontrada compartimentalizada no citosol e no núcleo (RYAN; NARVÁEZ-VÁSQUEZ, 2004). O seu transporte ocorre pelos feixes vasculares até se ligar ao seu respectivo receptor.

SR160, um receptor da família LRR (do inglês *Leucine-rich-repeat*, repetições ricas em Leucina) de 160-kD foi isolado e essa proteína foi nomeada por ser um receptor de sistemina (JACINTO et al.; 1997; SCHEER; RYAN, 2002). SR160 é um homólogo do Brassinosteroid Insensitive 1 (BR11) de tomate, que leva a regulação do crescimento e desenvolvimento em resposta ao hormônio brassinolide (KINOSHITA et al., 2005; HOTHORN et al., 2011). Estudos subsequentes a estes, não demonstraram o papel de SR160 como receptor e ativador das vias de sinalização, no entanto, confirmam apenas que o SR160 é uma proteína de ligação à sistemina (HOLTON et al., 2007; MALINOWSKI et al., 2009). Recentemente foi mostrado que SR160/BRI1 em *Nicotiana benthamiana* e arabidopsis não respondiam à sistemina em concentrações de micromolar. Diferentemente de duas outras proteínas LRR-RKs, *Systemin receptor* 1 e 2 (SYR1 e SYR2), que se sugere que façam parte da percepção da sistemina (WANG et al., 2018).

A via da sistemina é ativada em concentrações subnanomolares, induzindo em poucos minutos a modulação do fluxo iônico, causando a alcalinização do meio extracelular e um aumento na síntese de 1-aminociclopropano-l-carboxilato (ACC), a principal enzima da biossíntese de etileno (FELIX; BOLLER, 1995; MOYEN; JOHANNES, 1996). A sistemina induz também as células vizinhas a sintetizarem o ácido jasmônico (JA), que por sua vez ativa

sistematicamente a expressão dos genes inibidores da proteinase (NARVÁEZ-VÁSQUEZ; RYAN, 2004; LI et al., 2002).

Este peptídeo inicia uma série de eventos de transdução de sinal que incluem a fosforilação de proteínas (STRATMANN; RYAN, 1997), a mobilização de cálcio (MOYEN et al. 1998), a produção de espécies reativas de oxigênio (OROZCO-CARDENAS; RYAN, 1999) além da ativação de genes específicos como o gene da calmodulina (CaM) e expressão de genes de defesa (BERGEY; RYAN, 1999; RYAN, 2000; MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 2006).

## 2.1.1.2 AtPEPs

Com a descoberta de peptídeos de defesa em 1991, novos peptídeos foram encontrados e que envolvem não apenas a defesa contra a herbivoria, mas também o desenvolvimento, crescimento e a reprodução de plantas (RYAN et al., 2002; MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 2006). A resposta imune em plantas se inicia através do reconhecimento de uma variedade de moléculas associadas a patógenos que são chamados elicitores. Alguns desses elicitores derivados de patógenos vegetais foram identificados como peptídeos. Os elicitores, são nomeados Padrões Moleculares Associados a Micróbios (MAMPs) ou Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), quando isolados de agentes infecciosos (BOLLER; FELIX, 2009; KUMAR et al., 2012). Algumas moléculas endógenas ativam o sistema imunológico inato quando são liberadas no espaço extracelular devido à danos correspondentes às respostas de hospedeiros endógenos, essas moléculas são chamadas de DAMPs (Padrões Moleculares Associados a Danos) (TANG et al., 2012; BIANCHI, 2007). Através de uma busca por outros tipos de sisteminas, foi descoberta uma família de DAMPs em arabidopsis, os peptídeos elicitores de plantas (Peps) (HUFFAKER et al., 2006).

AtPep1 (*ARABIDOPSIS THALIANA PEPTIDE* 1) é um peptídeo de 23 aminoácidos derivado de uma proteína precursora de 92 aminoácidos, que foi isolada de folhas de arabidopsis e ativa a transcrição de gene de defesa e a síntese de espécies reativas de oxigênio (EROS ou ROS) (HUFFAKER et al., 2006). Seu receptor, AtPEPR1, é uma proteína LRR-RLK (do inglês *Receptor-Like-Kinase*), de 170 kDa, que foi identificada na superfície de células de arabidopsis cultivadas em suspensão usando um peptídeo radiomarcado (YAMAGUCHI et al., 2006). Há também um homólogo ao AtPEPR1, o AtPEPR2, que também auxilia na percepção de AtPEP1 (KROL et al., 2010). Os receptores contêm um

domínio extracelular com 26 regiões LRR, uma região transmembranar e um domínio quinase intracelular (YAMAGUCHI et al., 2006). Aproximadamente 200 LRR-RLKs estão presentes no genoma de arabidopsis e são divididos em 13 subfamílias (SHIU; BLEECKER, 2001). AtPEPR1 e AtPEPR2 pertencem à subfamília LRR-RLK XI, que possui 28 membros. Dentro da subfamília XI, há um subgrupo composto de receptores associados ao desenvolvimento e outro subgrupo composto apenas por AtPEPR1 e AtPEPR2 (RYAN et al., 2007).

A ligação do AtPep1 ao seu receptor AtPEPR1 na superfície celular também é seguida pela alcalinização extracelular (PEARCE et al., 2008). Deleções feitas no N-terminal do peptídeo não afetaram a atividade biológica (até 14 aminoácidos), porém quando os últimos 9 aminoácidos da porção C-terminal foram retirados, a atividade biológica foi completamente eliminada (PEARCE et al., 2008). É nesta porção C-terminal que o peptídeo AtPEP1 se liga ao receptor, AtPEPR1 (TANG et al.; 2015). A via de sinalização de AtPEP ativa canais de entrada de cálcio no citoplasma, aumentando a concentração de Ca<sup>2+</sup> nas células do mesófilo (QI et al.; 2010). Essa via de sinalização leva à expressão de genes de defesa à patógenos, PLANT DEFENSIN 1.2 (PDF1.2), MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 3 (MPK3) e WRKY33 (QI et al.; 2010).

## 2.1.2 Peptídeos de desenvolvimento vegetal

#### 2.1.2.1 Peptídeos fitosulfoquinas

Estudos foram feitos para encontrar fatores de controle da proliferação celular em calos de explantes vegetais. Através de um teste sensível para fator mitogênico, foi descoberto que o meio de cultura celular condicionado (CM- *Conditioned medium*) de células do mesófilo de aspargos, aumentava a capacidade de crescimento de calos (MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 1996). Assim, dois pentapeptídeos sulfatados foram purificados e denominados fitosulfoquina PSK- $\alpha$  e PSK- $\beta$  (PSK-phytosulfokine) (MATSUBAYASHI; SAKAGAMI, 1996). Proteínas precursoras de PSK possuindo entre 120 e 160 kDa foram identificadas como proteínas de membrana glicosiladas em células de arroz (MATSHUBAYASHI et al., 2001). Todos os homólogos de PSK identificados contêm a sequência peptídica YIYTQ altamente conservada (Figura 1) com exceção de um homólogo de arabidopsis que contém a sequência YIYTH (LORBIECKE; SAUTER, 2002). O pentapeptídeo ativo está localizado na porção C-terminal da proteína precursora e o precursor de PSK possui 22 aminoácidos de direcionamento para a via secretória na porção N-terminal (YANG et al., 1999). Na busca

pelo receptor da PSK, uma proteína de membrana que se liga ao PSK foi solubilizada na presença de detergente e posteriormente purificada por cromatografia de afinidade (MATSUBAYASHI et al., 2002). Proteínas de 120kD e 150kD foram identificadas como LRR-RLKs. A diferença nos pesos moleculares é devido a diferenças de glicosilação.

São proteínas receptoras próximas à BR11, PHYTOSULFOKINE RECEPTOR-1 e -2 (SAUTER, 2015; MATSUBAYASHI et al., 2006), que na via de PSK e brassinoesteróide BR, para fatores de crescimento da planta, compartilham um coreceptor semelhante SERK (*SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE*) (WANG et al., 2015; LADWING et al., 2015). Assim, a via de sinalização de PSK interage com vias hormonais, como a sinalização de BR. As bombas de H<sup>+</sup>-ATPases AHA1, AHA2, localizadas na membrana plasmática de BAK1 (*BRI1-associated receptor kinase 1*) e o canal dependente de nucleotídeos cíclicos 17 (CNGC17), estão envolvidos na via mediada por PSK para regular o crescimento das plantas (LADWIG et al. 2015), sendo outra característica desta interação na via de BR. Assim como também, a medida de sinalização de PSK é quantitativamente controlada por RLP44 (*RECEPTOR-LIKE PROTEIN 44*), que depende da presença de BRI1. RLP44 controla a identidade das células pro-cambiais e conecta as vias de sinalização PSK e BR por meio de interações com o receptor PSKR1 (*Phytosulfokine Receptor 1 Precursor*) e o receptor de BR (WOLF et al., 2014; HOLZWART et al., 2018).

PSK promove o desenvolvimento nas plantas em diversos estágios de crescimento como na germinação de pólen, formação adventícia de brotos, embriogênese somática, e também nas raízes (YAKAMADA et al., 1998; KOBAYASHI et al., 1999; HANAI et al., 2000; CHEN et al., 2000; IGASAKI et al., 2003). Foi demonstrado que a sinalização de PSK promove o crescimento de plantas através do PSKR1 regulando o alongamento da raiz e do hipocótilo em plantas de arabidopsis, enquanto a sinalização via PSKR2 contribui com o alongamento da raiz, mas não do hipocótilo (MATSUBAYASHI et al., 2006; KUTSCHMAR et al. 2009; STÜHRWOHLDT et al. 2011). Em arabidopsis, a sinalização de PSK ativada via PSKR1 contribui com a resistência ao fungo patogênico *Alternaria brassicicola,* porém diminui a resistência a bactéria *Pseudomonas syringae* (IGARASHI et al. 2012; MOSHER et al. 2013; RODIUC et al. 2016). Em tomate, essa via de sinalização, resulta na liberação intracelular de Ca<sup>2+</sup> e leva a ativação de cascatas de sinalização dependentes de auxina. Assim, há respostas imunológicas contra *Botrytis cinerea* (ZHANG et al. 2018). Evidenciando uma importante participação na resposta imunológica e de defesa nas plantas através deste peptídeo.

## 2.2 Peptídeos RALFs

#### 2.2.1 Descoberta

O RALF (do inglês *Rapid Alkalinization Factor*) é um peptídeo de 5 kDa que foi isolado pela primeira vez a partir de extratos de folhas de tabaco em um ensaio de atividade para detectar peptídeos semelhantes a sistemina (PEARCE et al., 2001). Este peptídeo, NtRALF, causa uma rápida e forte alcalinização do meio extracelular de suspensões celulares sem induzir genes de defesa como os inibidores de proteases. Também foi mostrado que houve uma indução da ativação de proteína quinase ativada por mitógeno MAPK (do inglês *MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE*). Em sementes de arabidopsis e tomate, observou-se que houve uma inibição do crescimento radicular na presença do peptídeo (PEARCE et al., 2001).

Os peptídeos RALFs são encontrados em todas as espécies vegetais superiores e inferiores. O número de genes RALF varia largamente entre as espécies, algumas espécies possuem poucas isoformas como em *Solanum chacoense, Medicago truncatula, Nicotiana tabacum*, ou até mesmo apenas uma isoforma como *Nicotiana attenuata* (GERMAIN et al., 2005; HOLMES et al., 2008; PEARCE et al., 2001; WU et al., 2007). Por outro lado, algumas espécies podem ter um número elevado de isoformas como 43 em *Oryza sativa* e *Arabidopsis thaliana* com 39 isoformas (CAO; SHI, 2012; OLSEN et al., 2002; SHARMA et al., 2016; CAMPBELL; TURNER, 2017).

Uma grande porcentagem de proteínas RALF vegetais evoluiu através da duplicação em tandem, sendo responsável por um número variável de proteínas RALF em espécies vegetais. Isso foi demonstrado pela presença de pares de proteínas RALF que são homólogos (CAO, SHI; 2012). Já foram relatados no total 795 RALFs entre 51 espécies de plantas. E apenas 4 de 43 angiospermas analisadas mantêm menos de nove RALFs (CAMPBELL; TURNER, 2017). Também foi encontrado em bactérias e fungos fitopatogênicos atuando em interações planta-patógeno (MASACHIS et al., 2016; THYNNE et al., 2017). A família RALF está separada em 4 clados. O clado III é o maior com 320 membros, seguido pelo clado IV com 264, clado II com 151 e clado I com apenas 49 proteínas. Nos clados I e II estão presentes 90% dos genes de espécies de eudicotiledônea. No clado III, 70% de genes RALF são de monocotiledônea (CAMPBELL; TURNER, 2017).

Os peptídeos RALF são formados por 50 aminoácidos aproximadamente e derivam de precursores maiores. As proteínas RALF são em realidade preproproteínas de normalmente

80 a 120 aminoácidos. Elas podem exibir três regiões distintas, sendo um peptídeo sinal na região N-terminal, uma região intermediária de função ainda desconhecida, e a região C-terminal com o peptídeo maduro (PEARCE et al., 2001). Imediatamente anterior ao peptídeo maduro, há um sítio dibásico de dupla arginina -RR- que está envolvido com o processamento e clivagem do peptídeo e é essencial para o correto processamento do peptídeo maduro (Figura 1) (PEARCE et al., 2001; MATOS et al., 2008). A enzima responsável pelo processamento do AtRALF23 foi identificada e é a subtilase SUBTILISIN-LIKE SERINE PROTEASE1 (AtS1P) (SRISVASTAVA et al., 2009).

A região contendo o motivo -YISY- é uma parte conservada na estrutura primária do peptídeo (Figura 2). Uma vez que há a troca da isoleucina, um aminoácido hidrofóbico, por uma alanina, essa atividade de alcalinização do meio extracelular é prejudicada (PEARCE et al., 2001; PEARCE et al., 2010). Quando a leucina da posição 11 do peptídeo é substituída por uma alanina também há o comprometimento da atividade do peptídeo. Entretanto, recentemente foi relatado que RALF8 e RALF36 exibem algumas das mesmas respostas que outros RALFs, embora não possuam o motivo YISY conservado (GJETTING et al., 2020).

O peptídeo maduro possui quatro cisteínas que formam pontes dissulfetos (Figura 2), sendo que alquilações ou mutações nestas cisteínas tornam o peptídeo inativo (PEARCE et al., 2001, MATOS et al., 2008).



Figura 2 - Precursor do peptídeo RALF originalmente isolado de folhas de tabaco (NtRALF). O sítio dibásico de processamento para liberação do peptídeo RALF maduro está sublinhado e em negrito está o peptídeo maduro contendo 49 aminoácidos. O motivo YISY (duplo sublinhado) e as cisteínas que fazem pontes dissulfeto (linhas conectadas) estão também sinalizados.

Através de análise filogenética, foi demonstrado que a família de RALFs divergiu em quatro clados. Os clados I, II e III possuem as características conservadas no precursor e peptídeo maduro. Já no clado IV há a ausência dessas características, como o sítio dibásico, o motivo YISI e as cisteínas que formam pontes dissulfetos (CAMPBELL; TURNER, 2017).

#### 2.2.2 Receptor de RALF

Os receptores quinases de plantas têm um papel importante na detecção de sinais intrínsecos e extrínsecos para regular as atividades celulares. Em 2005, começaram as buscas por proteínas que poderiam fazer parte da percepção de RALF. Duas proteínas de membranas foram encontradas e se ligavam ao SIRALF e possuíam pesos de 25 e 120kDa, porém não foi possível identificar quais eram essas proteínas (SCHEER, et al., 2005). Quase 10 anos depois, através de uma técnica de fosfoproteômica, cinco proteínas de membrana foram identificadas, dentre estas proteínas, FERONIA (FER) um membro da família CrRLK1L de RLK, foi destacada pelo alto nível de fosforilação quando exposta ao peptídeo (HARUTA et al., 2014). A família CrRLK1L compreende 17 membros em arabidopsis e foi relatado que regulam o alongamento celular em diferentes tipos de células (LINDNER et al. 2012; LI et al. 2016). FER é o CrRLK1L mais estudado neste grupo. Possui um domínio de malectina extracelular e está envolvido em diversas vias da fisiologia das plantas, como no controle de gametas femininos na ruptura do tubo polínico, respostas imunes e respostas ao estresse abiótico (ROTMAN et al., 2003; HUCK et al., 2003; CHEN et al., 2016; STEGMANN et al., 2017; XU et al., 2019; ESCOBAR-RESTREPO et al. 2007). Além disso, atua como regulador na resposta hormonal e na regulação do alongamento celular (LINDNER et al. 2012, LI et al. 2016). Diversos artigos citam FER e alguns RLKs, relacionados na fertilidade da planta como também na integridade da parede celular (HÖFTE 2015; LI et al. 2016; NISSEN et al. 2016)

Haruta et al. (2014) mostraram que AtRALF1 se liga ao receptor FERONIA e desencadeia uma cascata de fosforilação levando assim à inibição da bomba de próton-ATPase AHA2. Essa atividade aumenta o pH do apoplasto e reduz a expansão celular. Mutantes com perda de função para FERONIA (*fer4*) em baixas concentrações, inferior a 1µM, são insensíveis ao peptídeo AtRALF1 e sensíveis a doses maiores (HARUTA et al., 2014). Duas proteínas, LORELEI (LRE) e GPI-AP1 do tipo LRE (LLG1), são ancoradas a glicosilfosfatidilinositol (GPI), que é um fosfoglicerídeo que pode ser ligado ao C-terminal de uma proteína durante a modificação pós-traducional. Essas duas proteínas são encontradas em óvulos e tecidos vegetativos e que interagem fisicamente com FER (LI et al., 2015). Outra proteína, RIPK (RPM1-induced protein kinase), foi identificada como uma proteína que interage com FER e é recrutada após a ligação de AtRALF1 à FER (DU et al., 2016). Possivelmente as proteínas identificadas por Scheer et al. (2005) podem ser proteínas homólogas de tomate das proteínas LLG e CrRLK1Ls de arabidopsis, que atuam como coreceptor e receptor de RALF. Assim, AtRALF1 se liga ao complexo FER-LLG1/LRE, recrutando RIPK e essa interação causa a fosforilação na serina899 (Ser899) da bomba de prótons ATPase-AHA2, inativando AHA2 e leva a inibição de transporte de prótons H<sup>+</sup> através da membrana celular, alcalinizando o meio extracelular (HARUTA et al., 2014). FER não é a única pelo reconhecimento de AtRALF1, na medida em que mutantes *fer4* apresentam 40% de ligação ao peptídeo marcado em relação às plantas selvagens de arabidopsis. Além do mais, mutantes *fer* são sensíveis ao peptídeo quando tratados com doses acima de 1µM em ensaios de inibição de raiz (HARUTA et al., 2014).

Recentemente, foi publicado que a proteína BAK1 atua como coreceptor de AtRALF1 (DRESSANO et al., 2017). AtRALF1 se liga à FER e alcaliniza o meio extracelular (HARUTA et al., 2014). Durante a alcalinização do meio extracelular há a dissociação e liberação da proteína BAK1 do complexo BRI1-BL-BAK1 (SUN et al., 2013). Assim, a percepção de AtRALF1 também ocorre por um outro receptor, ainda desconhecido, juntamente com o coreceptor BAK1 formando um novo complexo. Este complexo leva à indução da expressão de genes relacionados à inibição do crescimento da raiz como PRP3, HRGP2, DWF4, CML38 (BERGONCI et al. 2014a-b, DRESSANO et al., 2017).

Ensaios de localização celular com o promotor de *AtRALF1* fusionado ao gene repórter GUS, mostraram o acúmulo da proteína  $\beta$ -glucuronidase na zona de diferenciação de raízes e hipocótilo (HARUTA et al., 2008). O RALF de tabaco quando foi fusionado a GFP (*Green Fluorescent Protein*) resultou também na localização do peptídeo, inicialmente, no retículo endoplasmático, e após alguns dias, foi localizado na parede celular. (ESCOBAR et al, 2003). Dressano et al. (2017) investigaram a interação física entre AtRALF1 e BAK1, confirmando que ambas as proteínas estavam presentes no mesmo tipo de célula da raiz. Além do mais, AtRALF1 foi também encontrado na endoderme da zona de diferenciação das raízes.

AtRALF4 e AtRALF19 estão ligados à BUPS1 e BUPS2, no gametófito masculino, fazendo com que o tubo polínico não venha se romper antes de chegar até o ovário. Assim, ao chegar no ovário, no gametófito feminino, AtRALF34 entra em cena como um antagonista dos peptídeos AtRALF4 e 19 competindo pelos receptores para que possa ocorrer o rompimento do tubo polínico e a liberação do núcleo espermático para ocorrer a fecundação (GE et al., 2017). O receptor quinase THE1 (THESEUS1) é necessário para monitorar a integridade da parede celular das células vegetais em crescimento. GONNEAU et al. (2018) mostram que THE1 é um receptor para o peptídeo AtRALF34 e que a sinalização AtRALF34-THE1 é necessária para o regular o início do crescimento da raiz lateral o qual é dependente de pH para a ligação no ectodomínio do receptor THE1.

Entretanto, ainda não se sabe sobre todas as vias de ligações ao RALF. Recentemente, Gjetting et al. (2020) verificaram atividades padrões de RALF diferentes relacionados a RALFs fora do clado III, cujo grupo possui a maior semelhança entre o RALF originalmente descoberto de tabaco.

#### 2.2.3 Atividades biológicas

Estudos diversificados identificaram uma ampla variedade de papéis para os membros da família RALF, incluindo expansão celular (MINGOSSI et al., 2010; HARUTA et al., 2014), desenvolvimento radicular lateral (MURPHY et al., 2016) e estresse (ATKINSON et al., 2013). A diversidade dos papéis indica que os peptídeos RALF têm fundamental importância para o desenvolvimento da planta. Das atividades biológicas que o peptídeo RALF possui, a alcalinização rápida do meio extracelular de células em suspensão foi a primeira a ser observada e a qual ocasionou sua descoberta. Também pode ser observada, concomitantemente, a ativação de uma proteína quinase intracelular ativada por mitógeno (MAPK) (PEARCE et al., 2001). Todos os peptídeos RALFs isolados bioquimicamente, e usados em ensaios de tratamento exógeno em culturas de suspensões celularares, exibem atividade de alcalinização (PEARCE et al., 2001; HARUTA, CONSTABEL, 2003; HARUTA et al., 2008; MINGOSSI et al., 2010; PEARCE et al., 2010; MORATO DO CANTO et al., 2014). Em *Fusarium oxysporum*, foi encontrado um homólogo de RALF e este peptídeo induz a alcalinização no meio extracelular o qual promove um aumento da infecção por fungos em plantas (MASACHIS et al., 2016).

Além de induzir a alcalinização, inicialmente foi observado uma inibição do crescimento da raiz primária e do hipocótilo em plantas tratadas com AtRALF1 (PEARCE et al., 2001). Das nove isoformas pertencentes ao grupo com maior similaridade com NtRALF (AtRALF1, 4, 19, 22, 23, 24, 31, 33, 34), todas apresentaram inibição da raiz exceto a isoforma AtRALF4 que é expressa em pólen (MORATO DO CANTO et al., 2014).

Plantas que superexpressam *AtRALF1* exibem um fenótipo semi-anão com severa redução tanto das raízes como a parte aérea quando comparadas a plantas selvagens (MATOS et al., 2008). A superexpressão de outras duas isoformas do RALF de arabidopsis, AtRALF8 e AtRALF23 também levou a um fenótipo semi-anão nessas plantas (SRIVASTAVA et al., 2009; ATKINSON et al., 2013). WU et al. (2007) ao silenciar a única isoforma do peptídeo existente em *Nicotiana attenuata*, irNaRALF, observou um aumento do crescimento das raízes. Em arabidopsis, ao silenciar o gene AtRALF1 (irAtRALF1), notou-se um aumento do

comprimento das raízes e da planta inteira, essas plantas eram maiores em comparação às plantas selvagens. Assim, foi relatado que essa inibição do tamanho da raiz se dava devido ao controle da expansão celular nestas plantas através do peptídeo (MATOS ET AL., 2008; BERGONCI et al., 2014).

Em *Nicotiana attenuata* foi relatado que NaRALF é essencial para o desenvolvimento dos pelos radiculares (WU et al., 2007). Além de atuar na regulação negativa da expansão celular, também foi observado que plantas 35S:AtRALF1 e 35S:AtRALF8, que superexpressam o peptídeo, possuem menor densidade de raízes laterais, enquanto plantas irAtRALF1, com o silenciamento gênico de RALF, possuem maior densidade de raízes laterais. Por outra via, plantas 35S:AtRALF8 apresentam maior densidade de pelos radiculares e são maiores comparando com plantas de arabidopsis selvagens (ATKINSON et al., 2014; BERGONCI et al., 2014). Em cana-de-açúcar, dois peptídeos que apresentam similaridade com AtRALF1 foram purificados de folhas e a adição de um deles, SacRALF1, em meio de crescimento de microcalos inibiu o alongamento celular (MINGOSSI et al., 2010). Foi observado no mesmo trabalho que AtRALF1 recombinante inibe o alongamento do hipocótilo de plantas de arabidopsis estioladas, ou seja, no crescimento da planta sob ausência de luz.

Alguns genes são induzidos por AtRALF1 quando plantas selvagens são tratadas exógenamente com o peptídeo. Esses genes, *AtPRP1* e *AtPRP3* que traduzem proteínas ricas em prolina, *AtHRGP2*, uma glicoproteína rica em hidroxiprolina, e *TCH4*, proteína xiloglucana endotransglucosilase, estão envolvidos com rearranjo da parede celular e também tem expressão elevada em plantas que superexpressam AtRALF1 (BERGONCI et al., 2014a). O que propõem que a inibição do crescimento da raiz causada pelo peptídeo pode ser pela regulação do rearranjo da parede celular através do enrijecimento celular. As hemiceluloses da parede celular estão acopladas às microfibrilas de celulose, formando uma forte rede de suporte de carga. A expansina, é uma proteína presente na parede celular, que ajuda a célula a se expandir pelo afrouxamento da parede. Essa proteína interrompe as ligações de hidrogênio e rompe a associação celulose-hemicelulose, permitindo o movimento dos polímeros da parede celular (MCQUEEN-MASON; COSGROVE, 1995; YENNAWAR et al., 2006). Bergonci et al. (2014a) observaram que, em plantas selvagens, EXPANSINA A5 (AtEXPA5), é regulado positivamente por BL e regulam positivamente o alongamento das células-raiz. Enquanto AtRALF1 regula negativamente AtEXPA5 nessas células.

A função de RALF nos grãos de pólen também foi observada na regulação do alongamento do tubo polínico e na regulação do desenvolvimento do gametófito feminino

seguido do tamanho do fruto (ZHANG et al., 2010; COVEY et al., 2010; CHEVALIER et al., 2013; MORATO DO CANTO et al., 2014).

Para induzir a remodelação da parede celular, as plantas podem produzir peptídeos de sinalização em resposta a múltiplos estresses, como as modificações da parede celular para fornecer uma barreira física contra patógenos, melhorando a tolerância à seca e ao estresse oxidativo, mantendo assim o turgor durante o estresse osmótico (PIRO et al., 2003; PELLOUX et al., 2007; AN et al., 2008; LEUCCI et al., 2008). Uma dessas sinalizações é a partir de AtRALF8 que tem papel fundamental na abertura estomática e nas respostas ao estresse. Que foi identificado como um dos genes induzidos em plantas de arabidopsis expostas ao déficit hídrico e estresse por nematoides (ATKINSON et al., 2013).

Além de todas essas funções já descritas, o peptídeo AtRALF1 causa uma rápida mobilização de Ca<sup>2+</sup> intracelular (PEARCE et al., 2001; HARUTA et al., 2008). Esse rápido influxo de Ca<sup>2+</sup> demonstra o envolvimento desse íon na via de sinalização do peptídeo. Para o crescimento e desenvolvimento vegetal o macronutriente Ca<sup>2+</sup> desempenha um papel fundamental, assim como em várias vias de sinalização celular atuando como mensageiro secundário (WHITE; BROADLEY, 2003; SANDERS et al., 1999; KUDLA et al., 2010; BOUDSOCQ et al., 2010).

## 2.2.4 Peptídeos RALFs e a relação com outros hormônios vegetais

Peptídeos hormonais interagem com hormônios vegetais e a partir disso desempenham diversas funções (AALEN et al., 2013; LIU et al., 2013). Células em suspensão de álamo (*Populus trichocarpa x Populus deltoides*) têm os genes *PtdRALF1* e *PtdRALF2* inibidos por metil jasmonato e essas plantas tratadas com os hormônios benziladenina e ácido naftaleno acético não causaram efeito na expressão de *PtdRALF1* e *PtdRALF2* (HARUTA; CONSTABEL, 2013).

Em *Solanum chacoense* as cinco isoformas ScRALF1-5, não mostraram alteração na expressão gênica ao tratamento com metil jasmonato, ácido salicílico e ácido abscísico (ABA) (GERMAIN et al., 2005). AtRALF1 aumenta a toxicidade salina através do aumento do acúmulo de Na<sup>+</sup> e da diminuição do acúmulo de K<sup>+</sup>. Duas proteínas, AGB1 e FER, que interagem fisicamente estão envolvidas nas respostas ao estresse salino mediado por ABA, regulando a abertura e fechamento dos estômatos. AtRALF1 regula a abertura estomática durante as respostas imunes e de seca, o qual inibe a abertura estomática e induz seu

fechamento através de FER e requer AGB1, que é um gene regulado por ABA (KARTHIK et al., 2000; YU, ASSMANN, 2018).

Plantas de arabidopsis tratadas com Brassinolide regulam negativamente a expressão do gene *AtRALF23* e plantas que superexpressam o *AtRALF23* adquirem insensibilidade ao tratamento com o mesmo hormônio. Através de mutantes *bes1-D*, plantas que apresentam alto nível de brassinoesteróides, observou-se a baixa expressão de *AtRALF23* comparado com plantas selvagens (SRIVASTAVA et al., 2009).

O gene *AtRALF1* não é reprimido pelo tratamento com BL, porém plantas que superexpressam *AtRALF1* são insensíveis a BL, não apresentando alongamento das raízes e aumento do número de raízes laterais (BERGONCI et al., 2014). Genes da via de brassinosteróide que são reprimidos por BL foram induzidos por AtRALF1 (BERGONCI et al., 2014a e b; HATURA et al., 2014) evidenciando um efeito antagonista entre eles. Além do mais, plantas mutantes de *bri1*, que não percebem brassinoesteróides, são plantas mais sensíveis ao tratamento exógeno de AtRALF1 (BERGONCI et al., 2014a).

Em arabidopsis, AtRALF1 altera os genes envolvidos na via de auxina, giberelina e etileno. AtRALF1 induz os genes ACS6, ACS11 (ACC-SYNTHASE), ERF6, ERF13 (ETHYLENE RESPONSE FACTOR) que codificam para fatores de transcrição na via de transdução de sinal do etileno (HARUTA et al. 2014). Os genes AtRALF23, 31 e 33 são induzidos por etileno (SUN et al., 2015; SHARMA et al., 2016). Além disso, mutantes *ein3-1* (ETHYLENE-INSENSITIVE3) apresentam maior nível de expressão do gene AtRALF8, sendo totalmente insensíveis ao etileno, enquanto AtRALF8 é menos expresso no mutante de resposta constitutiva ao etileno *ctr1* (CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE) (ATKINSON et al., 2013).

Etileno e AtRALF1 compartilham componentes da transdução de sinais, sendo que a inibição do crescimento da raiz primária induzida por AtRALF1 é dependente de etileno (NIITSU, 2016). AtRALF1 não é capaz de inibir o tamanho das raízes de plantas mutantes com perda de função para os receptores de etileno. Além do mais, em plantas selvagens quando são tratadas com os inibidores de etileno concomitantemente com AtRALF1, não ocorre a inibição o tamanho das raízes dessas plantas. As plantas selvagens exibem placas de calose nas pontas das raízes quando tratadas com AtRALF1, da mesma maneira plantas que superexpressam AtRALF1 também exibem calose. Entretanto, plantas com o peptídeo parcialmente silenciado, não há a indução de placas de calose. Através da indução de calose pelo peptídeo AtRALF1, há o envolvimento de HRGPS nessa inibição da expansão celular causada por etileno (NIITSU, 2016). Sabe-se que HRGPs é dirigido por ROS, no apoplasto,

por intermédio da atividade da NADPH oxidase. O qual possivelmente ocorre um bloqueio no transporte celular pela deposição de calose (LE et al., 2001, CNODDER et al., 2005).

#### 2.2.4.1 Via de sinalização de etileno

O etileno é uma molécula gasosa que foi descoberta como hormônio vegetal (BAKSHI et al., 2015). Este fitormônio desempenha diversas funções na regulação do metabolismo em todo tecido vegetal (PIERIK et al., 2006; LIN et al., 2009; SCHALLER, 2012).

O etileno é derivado do aminoácido metionina, que é convertido em Sadenosilmetionina (AdoMet) pela S-adenosilmetionina sintetase (SAM). AdoMet é convertido em ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) е 5'-desoxi-5'metiltioadenosina (MTA) pela enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilase sintase (ACS) (ADAMS, YANG 1979). Através do Ciclo de Yang (Anexo A), a metiltioadenosina é reciclada em metionina assim mantém altas taxas de produção de etileno (MIYAZAKI, YANG 1987). O gene ACS1 codifica uma enzima cataliticamente inativa, e existem mais oito genes que codificam ACSs ativos (LIANG et al., 1992;1995; YAMAGAMI et al., 2003). A etapa final do hormônio, ocorre quando a ACC oxidase (ACO) converte ACC em etileno, e também em CO<sub>2</sub> e cianeto através de modificações dos carbonos C-2 e C-3 de ACC. O C-1 do ACC é convertido em cianeto, e o seu grupo carboxila é convertido em dióxido de carbono (Anexo A) (PEISER et al., 1984).

A primeira etapa na percepção do etileno é a ligação do hormônio aos seus receptores que estão presentes nas membranas do retículo endoplasmático das plantas onde formam homodímeros (EVANS et al., 1982a, b). Os receptores são divididos em duas subfamílias relacionados à presença ou ausência de elementos conservados no domínio da histidina quinase. Em arabidopsis há 5 receptores, ETR1 e ERS1 formam a subfamília 1 e contêm três regiões abrangendo o domínio transmembranar. ETR2, ERS2 e EIN4 são os receptores da subfamília 2 e possuem quatro regiões transmembranar (HUA et al., 1995, 1998; SAKAI et al., 1998; GAMBLE et al., 1998). Diferente dos outros hormônios conhecidos, o etileno possui uma resposta ativa na sua via de sinalização. Na ausência do hormônio, os receptores ativam constantemente uma proteína (CTR1) para fosforilar EIN2, que regula negativamente a sinalização depois do etileno (KIEBER et al., 1993; CLARK et al., 1998). Quando presente, o etileno se liga ao cobre no domínio N-terminal transmembranar, resultando na inativação de CTR1 (HALL et al., 1999), possivelmente por mudanças conformacionais. O bloqueio da fosforilação de EIN2 leva à liberação proteolítica do domínio C-terminal, que migra para o

núcleo para ativar uma cascata de transcrição envolvendo fatores de transcrição EIN3/EIL e proteínas F-Box EBF1/EBF2 (*EIN3-BINDING F BOX PROTEIN 1/2*). Assim, obtendo fatores de resposta ao etileno ERF (*ETHYLENE RESPONSE FACTOR*) (JU et al., 2012; QIAO et al., 2012; WEN et al., 2012). Como o gene ERF1, o qual induz a transcrição de genes responsivos ao etileno (SOLANO et al., 1998).

# 2.3 Ca<sup>2+</sup> e Proteínas semelhantes a calmodulinas (CMLs)

Mensageiros secundários são substâncias químicas celulares que agem como "códigos de linguagem", permitindo que as células passem informações externas para o interior da célula. O cálcio é um mensageiro secundário que desempenha importante papel nas plantas, o qual faz com que as células respondam devidamente às mudanças ocasionais (JAFFE, 1980). É reportado também que uma comunicação sistêmica rápida nas plantas é sustentada por uma onda de aumento de Ca<sup>2+</sup>. A propagação espaço-temporal de sinais de Ca<sup>2+</sup> e a frequência da onda são as informações que são transmitidas nesses sinais e que são fundamentais para uma resposta adequada aos estímulos recebidos (BOUCHÉ et al., 2005; CHOI et al., 2017). As bombas de Ca<sup>2+</sup> ou transportadores antiporte, são utilizados nas células eucarióticas para retirar Ca<sup>2+</sup> do citosol, visto que altos níveis de cálcio intracelular podem afetar a célula, sendo assim necessário manter em baixos níveis (CHIN; MEANS, 2000).

Nas plantas, diversos estímulos ambientais induzem elevações no  $Ca^{2+}$  citosólico pelo seu fluxo do espaço extracelular e do interior das organelas, como o vacúolo e o cloroplasto, para o citosol após serem percebidos por proteínas de ligação ao  $Ca^{2+}$ . (MCAINSH; PITTMAN, 2009; DODD et al., 2010). Essas proteínas são representadas por calmodulinas (CaMs), CaM-like (CML), quinases dependentes de  $Ca^{2+}$  (CDPKs) e calcineurina B-like (CBL) que possuem motivos *EF-hand* de ligação ao  $Ca^{2+}$  (BENN et al., 2014). A ativação dessas proteínas pela interação com  $Ca^{2+}$  leva a mudanças da expressão gênica e respostas imunes (LI et al., 2009; KUDLA et al., 2018).

Calmodulinas e proteínas semelhantes a calmodulinas são proteínas de ligação ao  $Ca^{2+}$ que na sua maioria, são caracterizadas como citosólicas ou possivelmente nucleares (MCCORMACK; BRAAM, 2003; YANG; POOVAIAH, 2003). As proteínas sensoras mais bem caracterizadas são as Calmodulinas (CHIN, MEANS, 2000), é o membro mais amplamente distribuído da família de proteínas sensoras e acredita-se ser um receptor intracelular primário em todos os eucariotos. Como consequência da ligação de  $Ca^{2+}$  à CaM, ocorre uma mudança estrutural nessa proteína, que revela sua superfície hidrofóbica para interagir e alterar atividades de proteínas marcadas que são dependentes de cálcio (BABU et al., 1985; WRIGGERS et al., 1998; ROBERTS & HARMON, 1992; OHYA; BOTSTEIN, 1994; VOGEL, 1994; SNEDDEN; FROMM, 2001).

As CaMs são altamente conservadas e suas estruturas primárias são ricas em metionina (YANG; POOVAIAH, 2003, CLAPHAM, 2007; ZIELINSKI, 1998; REDDY, et al., 2002). Essas proteínas possuem dois pares de estruturas globulares, com dois sítios de ligações ao Ca<sup>2+</sup>, esses sítios compõem duas alfa-hélices, chamadas de E e F que fazem uma volta pelo Ca<sup>2+</sup>. Esta estrutura aparenta os dedos polegar e indicador, devido a isso, recebeu o nome *EF-hand*, do inglês mão-EF (CHIN; MEANS, 2000; McCORMACK et al., 2005; CLAPHAM, 2007).

Em arabidopsis, estão presentes sete genes que codificam quatro isoformas de CaM e entre 50 genes que codificam proteínas CML (SISTRUNK et al., 1994; YANG et al., 1996; McCORMACK et al., 2003; McCORMACK et al., 2005). Enquanto isso, *Oryza sativa* possui 33, *Sorghum bicolor 22, Zea mays 21, Eucalyptus grandis 25, Solanum tuberosum 27* e *Vitis vinifera* contém 13, mostrando uma grande variabilidade na quantidade de genes entre as espécies (MOHANTA et al., 2017).

As CMLs são exclusivas no reino vegetal e suas funções tem sido relatadas no desenvolvimento e resposta a estímulos bióticos e abióticos desempenhando papéis específicos na coordenação dessas respostas ambientais em arabidopsis para interpretar os sinais de Ca<sup>2+</sup> durante o desenvolvimento e a resposta a estresse (CHIASSON et al. 2005; YAMAGUCHI et al. 2005; MOLINIER et al. 2004; BOUCHÉ et al., 2005; PEROCHON et al., 2011; ZENG et al., 2015; ALDON et al., 2018). Possuindo entre, aproximadamente 80 e 300 aminoácidos, as CMLs são compostas de um a seis *EF-hands* sendo que a maioria contém quatro (MCCORMACK; BRAAM, 2003).

Tanto CaMs como CMLs, podem regular vários alvos específicos que incluem fatores transcricionais, canais e bombas de íons, proteínas quinases e proteínas de transporte (VOGEL, 1994; BOUCHÉ et al., 2005; PEROCHON et al., 2010; OH et al., 2012; CHO et al., 2016;). Entretanto, não atuam com atividades enzimáticas, apenas funcionam ativando proteínas, como as proteínas de ligação à CaM (CaMBPs) (BOUCHÉ, et al., 2005; REDDY, et al., 2002).

Uma das primeiras CMLs identificados, TCH2 (ou CML24), tem papel importante na homeostase de íons, na resposta ao fotoperíodo, na inibição mediada por ABA e na germinação e crescimento de plântulas (DELK et al. 2005).

*CML37*, *CML38*, e *CML39* são membros de uma subfamília que foi descrita por ter padrão de expressão responsivo ao estresse como a seca, a salinidade e o ferimento (VANDERBELD; SNEDDEN, 2007). CML37, CML38 e CML39 recombinantes são proteínas de ligação ao Ca<sup>2+</sup>. Estes compartilham 34,2%, 28,8% e 26,1% da identidade de aminoácidos, respectivamente, com a proteína CaM conservada (McCORMACK; BRAAM, 2003). Entre eles, CML37 compartilha 51,4% e 52,2% da identidade de aminoácidos com CML38 e CML39 respectivamente, enquanto CML38 e CML39 compartilham 76,1% de identidade (MCCORMACK; BRAAM, 2003).

*CML37* e *CML38* foram encontrados em folha jovem, raiz e tecido floral, além do mais, *CML38* também foi expresso em células-guarda. A CML38 liga-se a quatro íons Ca<sup>2+</sup>, de acordo com dados *in sílico (eFP Browser)*, e a nível molecular, essa proteína foi localizada em complexos ribonucleoproteicos induzidos por hipóxia (LOKDARSHI et al., 2016; VANDERBELD; SNEDDEN, 2007).

Através de buscas por peptídeos que interagiam com AtRALF1, foi identificado uma proteína semelhante a calmodulina, CML38, locus At1g76650, e é essencial para a inibição da raiz (CAMPOS et al., 2017). Em uma caracterização por genes que são induzidos por AtRALF1, CML38 foi um gene fortemente induzido (HARUTA et al., 2014), de maneira dose dependente (CAMPOS et al., 2017). Esta proteína também está localizada no apoplasto, funcionando como uma proteína que interage com AtRALF1 sendo dependente de Ca<sup>2+</sup> e pH. Apenas o peptídeo ativo já é suficiente para ocorrer essa interação entre CML38 e AtRALF1. E essa interação, AtRALF1-CML38, é específica, pois foi visto que CML37 e CML39, não interagem com AtRALF1. Da mesma forma, AtRALF34, que é uma das nove isoformas RALFs de arabidopsis similar ao RALF original isolado do tabaco, não interagiu com CML38 (CAMPOS et al., 2017). Mutantes com perda de função para cml38-1 e cml38-2 foram testados quanto a sensibilidade à AtRALF1 nas raízes. Onde o tratamento não foi eficaz na inibição do crescimento dessas raízes e que também demonstrou não ser dependente da dose administrada tanto em baixa ou em alta concentrações do peptídeo (CAMPOS et al., 2017). Diferente do mutante fer4 que apenas inibe a raiz em altas concentrações do peptídeo (HARUTA et al., 2014).

Quando as plantas mutantes com perda de função para *cml38-1* e *cml38-2* são tratadas concomitantemente com AtRALF1 e a proteína CML38, ocorre a inibição do tamanho das raízes. Recuperando assim, a sensibilidade à AtRALF1 nesses mutantes, mostrando que o peptídeo AtRALF1 é dependente da proteína CML38. O mesmo foi feito com a proteína CML39, entretanto não ocorreu a inibição do tamanho das raízes nessas plantas (CAMPOS et

al., 2017). A recuperação da sensibilidade à AtRALF1 foi observada também em duplos mutantes de cruzamento com plantas mutantes de perda de função para *cml38-1* juntamente com o promotor de CML38 fusionado à CML38 e GFP (PROCML38:CML38-GFP) de maneira a reintroduzir o gene de CML38 nesses mutantes. Assim, essas plantas restauraram o fenótipo de sensibilidade à AtRALF1 inibindo as suas raízes (CAMPOS et al., 2017).

Plantas que superexpressam AtRALF1 possuem fenótipo semianão (MATOS et al., 2008), porém ao cruzar plantas mutantes de *cml38* com plantas que superexpressam AtRALF1, foi possível observar que o peptídeo não é capaz de inibir as raízes dessas plantas. Confirmando que essa proteína é necessária para o RALF atuar na inibição do crescimento da raiz. Todos esses dados sugerem então que a proteína CML38 é necessária para a inibição do crescimento radicular causada por AtRALF1.

Como já se sabe, RALF atua alcalinizando o meio extracelular (PEARCE et al., 1990). De maneira dissociada, CML38 mostrou atuar em outra via de sinalização do peptídeo. Células em suspensão de arabidopsis quando tratadas com a proteína CML38 não exibiram alcalinização no pH extracelular. Essas células quando tratadas simultaneamente com AtRALF1 e CML38, em diversas doses, também não exibiram alteração na resposta de alcalinização. Ficando semelhantes ao tratamento apenas com o peptídeo AtRALF1 (CAMPOS et al., 2017).

Essa resposta a alcalinização também foi testada na rizosfera de plantas intactas em um meio contendo um indicador de pH. A alcalinização foi observada nas plantas selvagens e nos mutantes *cml38* tratados com AtRALF1, indicando a alcalinização normal da rizosfera. Para mostrar que esta resposta é específica de AtRALF1, foi usado um peptídeo inativo RALF1(9-49), que os primeiros 8 aminoácidos do peptídeo ativo foram eliminados, e sendo inativo esse peptídeo não causou alcalinização da rizosfera dessas plantas (CAMPOS et al., 2017). Campos et al., (2017) propõem que CML38 se liga à AtRALF1 através de um outro complexo receptor que não é por FERONIA. Após sua ligação, o complexo CML38-AtRALF1 regula a expressão de genes induzidos por AtRALF1, assim levando à inibição das raízes. Esta via não interfere na bomba de prótons ATPase que controla a alcalinização por AtRALF1 (CAMPOS et al., 2017).

Recentemente, foi observado que a sinalização de cálcio citoplasmático precede o fluxo de H<sup>+</sup>, quando há o bloqueio de canais de cálcio da membrana plasmática, o qual evita a alcalinização do apoplasto em resposta a RALF33 e RALFL36 (GJETTING et al., 2020). Foi observado também que plantas mutantes *fer* responderam de maneira diferente ao tratamento com RALF33 e RALFL36. A via de sinalização de RALF33 envolve FERONIA, uma vez que

durante o tratamento com RALF33, mutantes *fer* não exibem respostas de  $Ca^{2+}$  ou H<sup>+</sup> normais como as plantas selvagens. Entretanto, mutantes *fer* mostraram fluxos de  $Ca^{2+}$  ou H<sup>+</sup> que foram menos afetados pelo tratamento com RALFL36, indicando um mecanismo de percepção diferente para este peptídeo (GJETTING et al., 2020).

### 2.4 Promotores e seus Fatores Transcricionais

A expressão gênica de tecidos e órgãos, durante vários estágios de crescimento e desenvolvimento, ou através de estímulos externos, é regulada a nível transcricional, póstranscricional e pós-traducional. A regulação transcricional desempenha o maior papel na ativação e supressão da expressão gênica e é amplamente controlada por fatores dentro dos promotores de genes, como os elementos regulatórios, conhecidos também por elementos regulatórios em cis (*cis-regulatory elements* - CREs) (ZOU et al., 2011). Uma das maneiras mais comuns de estudar os genes é através dessa análise de promotores (DAS; DAI, 2007). Promotores são as regiões no genoma que contém sequências regulatórias para variados genes. Assim, estudos de promotores que regulam a expressão gênica ao nível transcricional são cruciais para melhorar a compreensão da regulação dos genes.

Os promotores possuem regiões próximas e distantes do local de iniciação da transcrição (LEE; YOUNG, 2000). Na região distal, aproximadamente mais que 300 pb, estão elementos adicionais de regulação, com geralmente pequenas influências na regulação. Na região proximal, até 300 pb está a região denominada *core promoter*, ou promotor principal, região de aproximadamente 35pb acima ou abaixo do início da transcrição. Além do *core promoter*, nesta região encontram-se os elementos mínimos necessários para iniciar corretamente a transcrição dos genes (SMALE; KADONAGA, 2003; MOLINA; GROTEWOLD, 2005). Antes do início da transcrição, um complexo proteico, incluindo fatores de transcrição, TFIID e TFIIB, é formado com RNA polimerase II (LEE; YOUNG, 2000). O TATA-box é o local de ligação da subunidade TFIID TBP (*TATA-box-Binding Protein*) do fator de iniciação da transcrição, ou seja, precedendo o início da transcrição, o TFIID liga-se à TATA-box na região promotora do gene. Esta região também contém elementos regulatórios que são locais de ligação para o início da transcrição, incluindo a enzima RNA polimerase II e suas subunidades (BURLEY; ROEDER, 1996).

As sequências de elementos regulatórios são parte do DNA não codificante que contém locais de ligação para fatores de transcrição ou outras moléculas reguladoras que afetam a transcrição genética. Estudos demonstraram que mutações nesses elementos

regulatórios ocasionam níveis alterados de expressão gênica e contribuiu com o processo evolutivo de domesticação de culturas (HUFFORD et al., 2012; KOENING et al., 2013). Meyer e Purugganan (2013) relatam que durante uma análise das mutações associadas à domesticação de culturas, 26 de 60 mutações eram nos elementos regulatórios. No entanto, para a maioria dos elementos que sofreram mutações durante a domesticação, os FTs ou micro-RNAs, que interagem com estes, permanecem desconhecidos.

Mutações de ganho ou perda de função frequentemente exibem efeitos pleiotrópicos, ou seja, quando um único gene controla diversas características que muitas vezes não estão relacionadas umas com as outras. Por outro lado, as mutações nos elementos regulatórios possibilitam alterações na expressão gênica sem esses efeitos pleiotrópicos (MEYER; PURUGGANAN, 2013).

Para o estudo dos elementos regulatórios, são feitas diversas séries de deleções do promotor. Isto permite aos pesquisadores restringirem a área do promotor que é responsável pela expressão de determinado gene. Estas construções podem ser expressas em plantas através de uma proteína repórter. Os promotores geralmente são fusionados a uma proteína repórter como a *Green Florescent Protein* (GFP), *Firefly Luciferase* (LUC) e  $\beta$ -glucuronidase (GUS) (GHIM et al., 2010). Após serem transformadas e selecionadas, as plantas são visualizadas em microscopia para confirmação da região genômica responsiva adquirida neste procedimento (SUSSMAN, 2001).

Além deste método, há também outras formas para analisar elementos regulatórios. CRISPR/Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas*) é eficaz para a identificação e análise de elementos regulatórios (THAKORE et al., 2015; HILTON et al., 2015). Uma ferramenta de edição de genoma que permite a indução simples, rápida e eficiente de clivagem de fita dupla de DNA em posições precisas e determinadas do genoma (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014). E que através dessa técnica, pode-se manipular a expressão de qualquer gene, em sítios específicos, aumentando ou silenciando a expressão gênica (THAKORE et al., 2015; HILTON et al., 2015).

*Chromatin immunoprecipitation* (ChIP) é um método usado para localizar locais de ligação ao DNA, elementos regulatórios, de uma proteína de ligação ao DNA de interesse. Sendo assim, utilizado para estudar interações entre fatores transcricionais e DNA *in vivo*. (KUO; ALLIS, 1999). ChIP-Seq envolve imunoprecipitação de cromatina (ChIP) seguido de sequenciamento de alto rendimento (Seq) ou hibridação com microarranjos (ChIP-CHIP) (KIM; REN, 2006).

Muitos avanços foram obtidos para auxiliar a identificação desses elementos por métodos computacionais com a disponibilidade de diversas sequências genômicas (LI, YUAN; LI, 2014; HERATH, 2016; BHURIA et al., 2016). A análise *in sílico* auxilia sobre a localização de sequências regulatórias, porém para chegar até esses dados de caracterização de promotor específico é necessário a busca por esses elementos *in vivo*.

Em análises *in sílico* utilizando o programa PlantCare revelaram elementos regulatórios nos promotores de genes *RALF* que são responsivos desde hormônios, seca à estresse por frio ou calor (SHARMA et al., 2016).

Buscas para identificar genes *RALFs* de sete espécies de Rosaceae foram realizadas através de análise de elementos de regulatórios, ontologia genética (GO), dados EST, análise de RNA-seq e RT-qPCR para ter um conhecimento desses genes em diversos estágios de desenvolvimento, tecidos e sob diversos estresses (ZHANG et al., 2020). Foram descobertos 21 elementos regulatórios envolvidos com ácido abscísico, auxina, giberelina, metil jasmonato, ácido salicílico, ciclo celular, controle circadiano, defesa e estresse, seca, expressão específica do endosperma, luz, baixa temperatura, ferimento, entre outros, que estão relacionados durante o estresse e na expressão específica de tecidos (ZHANG et al., 2020). Com esse conjunto de ferramentas utilizados nesta pesquisa juntamente com os dados analisados, foi possível obter informações abrangentes sobre genes *RALFs* de sete espécies de Rosaceae.

Uma análise *in sílico* foi efetuada no promotor de *FanRALF3-1*, (*Fragaria ananassa*), para identificar possíveis elementos responsivos a patógenos. Posteriormente analisou-se *in vivo* se fragmentos do promotor *FanRALF3-1* poderiam induzir a expressão de genes repórteres em frutos de morango infectados com *Colletotrichum acutatum* (NEGRINI et al., 2020). Assim, foi observado um envolvimento de um FT, MYB, como regulador da indução de infecção por *FanRALF3-1* com base na análise *in sílico* do promotor. Fator este encontrado no elemento regulatório que está presente nos 400pb anteriormente ao códon inicial da sequência do gene *FanRALF3-1* (NEGRINI et al., 2020).

A maioria dos FTs são proteínas que consistem em um domínio de ligação ao DNA, que interagem com elementos regulatórios de seus genes alvos, levando a interação proteínaproteína e assim facilitando a oligomerização entre FTs ou outros reguladores (WRAY et al., 2003). Essas interações influenciam ou controlam os processos biológicos em uma célula ou organismo, ativando e reprimindo a transcrição, de processos como progressão no ciclo celular, equilíbrio metabólico e fisiológico (SCOTT, 2000). Entretanto, muitos genes diferentes e tipos diferentes de células podem compartilhar os mesmos fatores de transcrição. A transcrição de genes em eucariotos é realizada com a ajuda da RNA-polimerase II, com o envolvimento de fatores de transcrição. Essas proteínas são responsáveis pelo posicionamento correto da enzima RNA-polimerase no promotor e ajudam então na separação das fitas de DNA para permitir o início da transcrição, assim liberando a RNA polimerase no início da transcrição.

Os FTs são agrupados em famílias de acordo com seu domínio de ligação ao DNA (LUSCOMBE et al., 2000). O genoma de arabidopsis contém várias famílias de FTs que incluem mais de 100 membros, sendo ao todo mais de 1500 membros conhecidos, como MYB, MADS, hélice-alça-hélice básica (bHLH), APETALA2 (AP2)/proteína de ligação do elemento de resposta ao etileno (EREBP) entre outros (LEE et al., 1999; RIECHMANN et al., 2000; BAILEY et al., 2003; RIECHMANN; RATCLIFFE, 2003; KIRIK et al., 2005).

A família MYB é a maior família de FTs conhecida em plantas. É dividida em três grupos, as famílias relacionadas com R2R3, R1R2R3 e MYB. Vários estudos dão números variados da quantidade de membros desta família, mas está em torno de 200 membros e é conhecida por ter uma vasta resposta aos estímulos ambientais (SINGH et al., 2002; GONG et al., 2004; XIONG et al., 2005; QU; ZHU, 2006), como respostas à luz ultravioleta (UV), ferimentos, estresse anaeróbico e patógenos (RUSHTON; SOMSSICH, 1998; JIN; MARTIN, 1999; HEMM et al., 2001.)

Aproximadamente 160 genes AtbHLH foram identificados, sendo essa a segunda maior família de FTs do genoma de arabidopsis (BAILEY et al., 2003). Essas proteínas estão envolvidas no controle da proliferação celular e no desenvolvimento de algumas células específicas (HEIM et al., 2003). E se ligam especificamente na sequência de DNA GCACGTG (TOLEDO-ORTIZ et al., 2003).

Uma família de fatores transcricionais denominada WRKY, possui mais de 70 membros em arabidopsis, se liga a um elemento no promotor conhecido como W-box e são encontrados nos promotores de genes relacionados à defesa como a sinalização de ácido salicílico e em respostas a patógenos. Os genes WRKYs foram detectados preferencialmente em folhas (EULGEM et al., 2000; SCHMID et al., 2005), onde algumas dessas proteínas são induzidas durante a senescência foliar (HINDERHOFER; XENTGRAF, 2001; ROBATZEK; SOMSSICH, 2001).

AP2/EREBP é uma família de aproximadamente 150 membros em arabidopsis. Foi sugerido que este grupo se originou das endonucleases de bactérias ou vírus. Essa família de genes está envolvida principalmente em respostas a diferentes estresses: seca, congelamento e invasão de patógenos. Há as proteínas ERF que são uma subfamília de fatores de transcrição

AP2/EREBP que é exclusiva das plantas, e em arabidopsis possui 124 proteínas ERF (JIN; MARTIN, 1999; GUTTERSON; REUBER, 2004; FENG et al., 2005; SHIGYO; MITSUYASU 2006). Essas ERF podem se ligar a dois elementos regulatórios, um que envolve respostas ao etileno, e outro elemento relacionado à expressão de genes responsivos à desidratação e a baixas temperaturas.

Os membros das proteínas AHL, do inglês *AT-Hook Motif Nuclear Localized*, contêm duas unidades estruturais conservadas, o motivo AT-Hook e o domínio PPC, do inglês *Plant and Prokaryote Conserved* (FUJIMOTO et al., 2004). O motivo AT-Hook permite a ligação ao DNA na parte rica em AT e foi identificado em várias famílias de genes em procariontes e eucariotos (AVAVIND; LANDSMAN; 1998). O domínio PPC é responsável pela localização nuclear das proteínas AHL, bem como pelas interações proteína-proteína entre as proteínas AHL e fatores de transcrição (FUJIMOTO et al., 2004).

Proteínas do tipo "*basic region/leucine zipper motif*" (bZIP), são proteínas com hélicealça-hélice e proteínas com zíper de leucina, que possuem uma região básica que liga o DNA e um motivo de dimerização do zíper de leucina. Os FTs bZIP são considerados únicos devido ao seu papel de suporte durante o ciclo de vida das plantas, como resposta a hormônios (LI et al., 2013) e crescimento e desenvolvimento de plantas (LUO, DEAN, 1999; KUBO et al., 2005).

*DNA binding with one finger* (Dof) é uma família de FTs específica de plantas (MA et al. 2015). O domínio Dof possui uma estrutura de Cys2/Cys2 que coordena so  $Zn^{2+}$  e liga-se especificamente ao elemento AAAG no promotor de seus genes (YANAGISAWA, 2002; 2004). Essas proteínas estão envolvidas com uma variedade de processos biológicos em toda a planta. Elas desempenham papéis importantes no desenvolvimento de sementes, regulação do metabolismo, sinalização de hormônio e resposta ao estresse (NOGUERO et al., 2013). O primeiro Dof isolado foi descoberto em milho. Desde então, muitos estudos documentaram os Dofs em outras plantas, como arabidopsis, tomate, banana (YANAGISAWA; IZUI, 1993; PAPI et al., 2000; CAI et al., 2013; FENG et al., 2016).
# **3 MATERIAL E MÉTODOS**

# 3.1 Material vegetal e condições de crescimento

Plantas ecótipo columbia-0 de *Arabidopsis thaliana* foram utilizadas e suas sementes foram colocadas em vasos contendo substrato e vermiculita (2:1) sendo umidificadas com uma solução de 3,25mL/L de fertilizante de raiz e folha. As plantas cresceram em câmaras monitoradas, modelo conviron ATC26, durante 16h de luz (200µmol/m<sup>2</sup>s) e 8h de escuro a 22°C e 18°C respectivamente por aproximadamente 45 dias até a obtenção das sementes na síliqua seca.

#### 3.2 Assepsia superficial das sementes

As sementes obtidas de *A. thaliana* selvagem (wild-type), em tubo Eppendorf, foram superficialmente esterilizadas com 1mL de hipoclorito de sódio 50% (v/v) invertendo-se o tubo por 10min. Em seguida foram lavadas 5 vezes com 1mL de água Milli-Q autoclavada e na sexta lavagem foram deixadas em 1mL de agarose 0,1% para tratamento com frio (4°C) durante 4d.

#### 3.3 Expressão Heteróloga do peptídeo AtRALF1 recombinante

#### 3.3.1 Crescimento de células e indução à produção de proteínas

Um pré-inóculo da Cepa BL21 de AtRALF1 foi crescida em meio de cultura LB (Luria-Bertani, triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 10g/L e pH 7,5, estéril) sob 200rpm overnight a 37°C na presença do antibiótico canamicina ( $50\mu$ g/mL, LB<sub>can50</sub>). A 500mL do meio de cultura LB<sub>can50</sub> foram adicionados 10mL do inóculo inicial. A cultura foi deixada sob agitação em frasco Erlenmeyer de 1L até atingir a OD<sub>600</sub> entre 0,6-0,9. Posteriormente, foi adicionado ou o indutor da expressão proteica IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) ou a lactose (2,5g). Após a adição dos indutores, os frascos ficaram sob agitação por mais 4h (IPTG) ou 6h (lactose). Após este período, as células foram separadas do meio de cultura por centrifugação (temperatura ambiente a 5000rpm por 5min) e armazenadas (-20°C).

## 3.3.2 Purificação e extração de proteínas por cromatografia de afinidade (Ni-NTA)

Como consequência do vetor utilizado (pET-28b), o peptídeo AtRALF1 é produzido fusionado a uma sequência de histidinas no N-terminal para facilitar e maximizar a purificação em cromatografia de afinidade utilizando resina de níquel. As células congeladas são ressuspendidas em 250mL de tampão desnaturante (100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20mM Tris HCl, 8M ureia, pH 8,0) e submetidas a processo de lise celular por descompressão (N<sub>2</sub>) com a bomba Parr. O lisado foi centrifugado por 40min a 24°C em 5000rpm para separação da proteína (sobrenadante) do material mais pesado. O sobrenadante foi então carregado em uma coluna de resina de níquel (Ni-NTA). A coluna foi lavada (100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20mM Tris HCl, 8M ureia, pH 6,3) e a proteína de interesse eluida (100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Tris HCl, 8M ureia, pH 3.3).

## 3.3.3 Diálise e liofilização

Para a retirada de sais e ureia da proteína eluida, o conteúdo da cromatografia foi dialisado contra uma solução 0,2% de ácido fórmico durante 4d à 4°C. Foram feitas 3 trocas da solução de diálise totalizando 12L ao longo dos 4d. Após esse período de diálise as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido para serem liofilizadas e quantificadas em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

3.3.4 Quantificação da proteína e determinação da pureza por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A proteína liofilizada foi diluída em 1mL de água Milli-Q autoclavada. Após a eluição, foram diluídos 100µL do eluido em 900µl de ácido fórmico 0,1% para serem injetados e analisados na HPLC. A presença de um único pico atestou a pureza e o tempo de retenção da proteína foi utilizado na comparação com uma amostra de AtRALF1 previamente identificada por espectrometria de massa (do CANTO et al., 2014). A quantificação se deu através da integração da área do pico gerado no cromatograma.

## 3.4 Tratamento com peptídeo AtRALF1 recombinante

Plantas transgênicas contendo as deleções do promotor e que germinaram e cresceram em meio seletivo (0,5x meio MS, sais MS sem sacarose e vitaminas da PhytoTechnology Laboratories, pH 5.8 ajustado com KOH com 6g/L de Phytagel e 100 mg/L Canamicina), foram expostas ao tratamento exógeno com o peptídeo AtRALF1. As plantas selecionadas foram colocadas em uma placa de 24 poços, com meio 0,5x MS líquido contendo 1µM do peptídeo. Após 4h sob leve agitação, as plantas foram observadas usando Microscópio Confocal (Olympus FV1000). Plantas controle foram mantidas em meio livre do peptídeo. O sinal fluorescente da proteína GFP foi observado excitando o material com 488nm e observando a 540nm. As imagens foram processadas utilizando o programa FluoView da Olympus.

#### 3.5 Extração de DNA genômico de arabidopsis

Para a extração e purificação do material genético de plantas selvagens usou-se aproximadamente 100mg de tecido foliar de arabidopsis. Em tubo Eppendorf de 1,5mL as folhas foram congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente foram maceradas com ajuda de um pistilo. No tubo com a planta macerada foram adicionados 500µL de Plant DNAZOL, misturou-se o conteúdo lentamente por inversão e foi deixado incubando a 25°C durante 5min. Após este período, o tubo foi centrifugado a 13000rpm por 10min. Para precipitar o DNA, foram adicionados 250µL de etanol 100%, misturando novamente por inversão e foi deixado incubando a temperatura ambiente durante 5min. Centrifugou-se o Eppendorf a 13000rpm por 5min e o precipitado foi posteriormente lavado usando etanol 75% (v/v). O tubo com o DNA precipitado foi deixado a temperatura ambiente para secar e assim ser ressuspendido em 20µL de água Milli-Q autoclavada.

## 3.6 Avaliação da produção de etileno

Aproximadamente 200 sementes de arabidopsis (wt e *fer4*) foram germinadas e crescidas em meio 0,5x MS (sais MS sem sacarose e vitaminas da PhytoTechnology Laboratories, pH 5.8, ajustado com KOH com 9g/L de Phytagel) durante 10d. As raízes foram cortadas e transferidas imediatamente para um recipiente de vidro (20mL) hermeticamente fechado contendo 2mL de meio 0,5x MS líquido juntamente com 2 ou 5µM de peptídeo

40

AtRALF1. As raízes foram mantidas em luz constante a 120rpm de agitação. A produção de etileno foi analisada com 0,5mL de ar desse recipiente em uma cromatografia gasosa modelo Thermofinigan GC Ultra- ThermoFisher equipado com o detector de ionização (FID) metanador e coluna de aço inox de 1/8" e 1,8m de comprimento. O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste a um fluxo de 25mL min<sup>-1</sup>. A temperatura da coluna, do injetor, do detector, e do metanador foi respectivamente de 100°C, 140°C, 200°C, 350°C. Foram utilizados gases padrões de etileno para elaboração da curva padrão. A produção de etileno foi analisada através dos dados obtidos das determinações cromatográficas em parte por milhão (ppm).

#### 3.7 Avaliação da deposição de calose nas plantas

Plantas de arabidopsis com 5d (wt, mutante *fer4* ou *cml38-2*) foram tratadas em meio 0,5x MS líquido contendo 0,5 ou 1µM do peptídeo AtRALF1 durante 3h sob leve agitação. Um volume igual de água foi usado como controle no tratamento sem peptídeo. Após o tratamento, as plantas foram coradas em corante azul Aniline 0,1% e glicina 1M (2:3) em água Milli-Q durante 5min. Essas plantas foram analisadas no microscópio confocal (Olympus FV1000). O comprimento de onda da excitação foi de 405nm e a emissão foi detectada em 725nm. O processamento da imagem foi concluído usando o programa Olympus FluoView.

#### 3.8 Análise de expressão por PCR em tempo real

#### 3.8.1 Extração de RNA

Raízes de plantas de arabidopsis com 10d foram tratadas com 0,5 e 1µM de AtRALF1 por 30min. Posteriormente as raízes foram cortadas, imediatamente colocadas em tubo Eppendorf e congeladas com nitrogênio líquido. As raízes foram maceradas usando pistilo e colocou-se o reagente Trizol (1mL/Eppendorf) de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen). O tubo foi agitado e incubado por 5min a temperatura ambiente. Decorrido este tempo, adicionou-se 200µL de clorofórmio e o tubo foi agitado por inversão durante 20s e foi mantido por 5min em temperatura ambiente. O tubo foi centrifugado por 15min a 12000 rpm na temperatura de 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 500µL de isopropanol e deixou-se incubar por 10min em temperatura ambiente. O tubo com a

solução foi centrifugado a 12000rpm, novamente a 4°C por 10min. Todo o conteúdo líquido foi retirado do tubo e foi lavado com 1mL de etanol 75%. Centrifugou-se o conteúdo a 7500rpm por 5min a 4°C. O conteúdo líquido foi descartado e deixou-se o tubo secar a temperatura ambiente por 15min, ressuspendendo o precipitado com 20µL de água milli-Q ultra-pura autoclavada.

#### 3.8.2 Tratamento com DNAse (Promega).

O conteúdo no tubo Eppendorf, contendo o RNA extraído, passou por tratamento com DNAse para retirada de quaisquer DNAs da amostra. Foram adicionados 2µL da enzima RQ1 juntamente com o tampão RQ1 DNAse buffer que acompanham no kit, mais 8µL de água livre de RNAse. O RNA foi então incubado em banho maria a 37°C durante 30 min. Logo após, foi adicionado ao tubo 1µL de *Stop Solution*, para parar a reação, e foi mantido novamente em banho-maria por 10min a 65°C. O RNA tratado foi então re-extraído com Trizol conforme descrito anteriormente.

## 3.8.3 Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado seguindo as instruções do Sistema de Transcrição Reversa ImProm-II (Promega) usando 1µg de RNA. As amostras de RNA em tubo Eppendorf foram incubadas por 5min a 70°C no termociclador, juntamente com 2µL de oligodT e em seguida foram colocadas no gelo por 5min. Assim, a reação foi preparada com tampão ImpromII, MgCl, dNTPs, e a enzima ImpromII Reverse Transcriptase seguindo as orientações do fabricante. Essa solução juntamente com a reação anterior ficou incubando por 5min a 25°C seguido de 60min a 42°C e finalizando com 15min a 70°C.

# 3.8.4 Análise de expressão gênica

A análise da expressão gênica quantitativa foi feita usando PCR em tempo real (qRT-PCR). A reação foi realizada usando cDNA diluído 10 vezes e SyBR Green Rox ou Eva Green Rox, qPCR Master Mix (Thermo Scientific) no sistema de PCR em tempo real StepOne<sup>™</sup> (Applied Biosystems). Três réplicas técnicas foram analisadas para cada amostra biológica e 2 amostras biológicas foram usadas. O ciclo do limiar (CT) foi determinado pelo instrumento e a expressão gênica relativa foi calculada usando a equação  $2-\Delta\Delta CT$  (LIVAK, SCHMITTGEN, 2001).

#### 3.9 Clonagem dos fragmentos do promotor do CML38

Fragmentos de DNA foram feitos a partir da região promotora do gene *CML38* (locus At1g76650). Para a amplificação das deleções do promotor do gene *CML38* foram usados iniciadores específicos desenhados com o auxílio do programa GeneRunner e a adição da sequência 5'CACC3' para a ligação direcional dos mesmos ao vetor específico (Anexo B).

Nos fragmentos 1, 2, 3, 4 e 5 foram utilizados iniciadores específicos e reação de PCR padrão (Anexo B). Para o fragmento 6 (59pb) foram sintetizados dois iniciadores longos, equivalentes as duas fitas do fragmento, que foram usados diretamente na reação de inserção no vetor pENTR D-TOPO. Todas as clonagens foram confirmadas pela presença dos fragmentos (Anexo F) e sequenciamento.

### 3. 10 Purificação de fragmentos de DNA amplificados

O DNA de arabidopsis extraído na sessão 3.3 e os fragmentos amplificados com os primers específicos foram usados como produtos da reação de PCR para serem analisados em gel de agarose 2% (p/v).

As mostras obtidas foram purificadas usando QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN). Os fragmentos do promotor do gene em gel de agarose foram cortados em blocos e pesados em tubos Eppendorfs de 1,5mL. Três volumes do tampão QXI foram adicionados aos tubos contendo o bloco de gel juntamente com 15µL de resina QIAEX II. A incubação da amostra foi feita a 50°C durante 10min e a cada 2min as amostras foram agitadas em um vórtex. O tubo foi centrifugado a 10000rpm por 30s e o sobrenadante foi descartado. A amostra no tubo foi lavada 2 vezes com 500µL de QXI e centrifugada por 30s a 10000rpm. Em seguida, a amostra foi lavada 3 vezes com 500µL de tampão PE e centrifugada por 30s a 10000rpm. Após esta etapa, os tubos foram deixados a 37°C por 20min para secar. O precipitado no fundo do tubo foi assim ressuspendido em 20µL de água Milli-Q autoclavada e ficou a 50°C durante 5min. Para finalizar, o tubo foi centrifugado e o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um novo tubo, sendo esse procedimento repetido por 3 vezes.

## 3.11 Clonagem no vetor pENTR/D-TOPO

As clonagens dos fragmentos dos promotores do gene *CML38* foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante (pENTR/D-TOPO ThermoFisher/Scientific, Anexo C). Entre 0,5 - 4 $\mu$ L dos produtos de PCR purificados foram adicionados juntamente com 1 $\mu$ L de solução de sal diluído (1:4), 1 $\mu$ L do vetor pENTR/D-TOPO e água Milli-Q autoclavada para completar para o volume final de 6 $\mu$ L. A reação foi incubada entre 16 a 18h à 23°C.

## 3.12 Transformação de Escherichia coli

3.12.1 Preparação de células eletrocompetentes de E.coli

Bactérias *E.coli* cepa TOP10 foram estriadas em placa contento meio de cultura LB semi-sólido (adição de 14g/L ágar bacteriológico) e colocadas a 37°C overnight. Um préinóculo com uma colônia isolada da placa estriada foi feito em meio de cultura líquido (sem ágar bacteriológico) para multiplicação da bactéria. Em meio LB líquido sem antibióticos, a bactéria foi incubada a 37°C por 16h sob agitação de 200rpm. Assim, esta cultura foi incubada em um novo inóculo de 250mL de meio LB líquido novamente a 37°C durante 16h, 200rpm. Quando atingida a densidade óptica (OD<sub>600</sub>) 0,6-0,8 as culturas foram utilizadas em ambiente estéril permanecendo no gelo a todo momento.

As células foram distribuídas em tubos Falcon de 50mL e centrifugadas a 5000rpm, a 4°C durante 10min. O sobrenadante resultante de cada tubo foi removido e as células precipitadas foram ressuspendidas em de água Milli-Q gelada e autoclavada. As células foram novamente sedimentadas a 5000rpm e 4°C por 10min descartando o sobrenadante e lavadas mais duas vezes em água Milli-Q gelada e autoclavada. Novamente os tubos foram centrifugados a 5000rpm, a 4°C por 10min. Finalmente, o sobrenadante é descartado e em seguida foi efetuada mais uma lavagem com glicerol 10% (v/v) filtro-esterilizado, a 4°C. As células foram ressuspendidas em 1000µL de glicerol 10% (v/v) filtro-esterilizado a 4°C. As células foram distribuídas em 70µL em cada tubo Eppendorf de 1,5mL sendo imediatamente colocados em nitrogênio líquido para posterior armazenagem em freezer -80°C.

#### 3.12.2 Eletroporação de E.coli

Vetores pENTR/D-TOPO carregando os fragmentos oriundos das deleções do promotor do *CML38* foram introduzidos em células de *E.coli* adicionando  $2\mu$ L do produto da reação vetor-fragmento a 70 $\mu$ L de células eletrocompetentes. A mistura de células e vetores foi agitada suavemente e colocada no gelo por 5min. Após este tempo, a mistura foi colocada em uma cubeta de eletroporação (largura da ranhura 2mm, BioRad) que fora mantida no gelo. A eletroporação foi efetuada em capacitância 25 $\mu$ F, resistência 200 $\Omega$ , voltagem 2,5kV e o eletroporador utilizado foi o Gene Pulse II (BioRad). Após a eletroporação, imediatamente foi adicionado 1mL de meio 2XYT líquido (16g/L triptona, 10g/L extrato de levedura, 5g/L NaCl, pH 7,5) ao tubo. Em seguida as células foram incubadas a 37°C por 1h a 200rpm e espalhadas em meio LB semi-sólido contendo antibiótico canamicina 100 $\mu$ g/mL e incubadas a 37°C por 16h.

# 3.13 Isolamento e purificação de DNA plasmidial de E.coli

Uma colônia isolada de E. coli transformada foi colocada em 10mL de meio LB líquido com o antibiótico canaminica 100µg/mL e deixado sob agitação (200rpm), durante 16-18h a 37°C. Após esse período, 1,5mL do conteúdo foi transferido para tubos Eppendorf e centrifugado por 3min a 13000rpm. O sobrenadante foi descartado para uso apenas das bactérias. O precipitado das células foi ressuspendido em 100µL da solução I (Tris-HCl 1M, EDTA 0,5M, glicose 0,90g), e após adicionou-se 200µL da solução II (NaOH 10N, SDS 10%) para a lise da membrana celular. Misturou-se levemente por inversão e o tubo foi deixado no gelo por 5min, nesta etapa, as proteínas parcialmente sofrem desnaturação e o DNA da bactéria não se desliga destas proteínas o qual pode ser precipitado com a solução III (acetato de potássio 5M, ácido acético glacial 11,5%, água Milli-Q), misturando-se 150µL à amostra por inversão e incubando por 5min. O plasmídio é assim liberado e o conteúdo é centrifugado por 25min a 13000rpm, para uso do sobrenadante que foi transferido para um tubo novo Eppendorf. RNAse (10µg/µL) foram adicionados (2µL) à reação e deixados incubando a 37°C em banho-maria por 15min para catalisar a degradação de RNA da amostra. Logo após, foi feito a lavagem da amostra com 1mL de etanol 100% misturando por inversão e centrifugando por 35min a 13000rpm. O sobrenadante foi descartado e, em seguida, o precipitado foi lavado e concentrado com 500µL de etanol 70% (v/v). O tubo foi centrifugado por 20min a 13000rpm e o sobrenadante descartado. Esperou-se o etanol

evaporar e o precipitado foi ressuspendido e solubilizado em 20µL de água Milli-Q autoclavada.

## 3.14 Clonagem no vetor de destino pKGWFS7

3.14.1 Obtenção do vetor de destino pKGWFS7

Células com o vetor pKGWFS7 (Anexo E) foram estriadas em placa contendo meio LB semi-sólido com o antibiótico espectinomicina 50µg/mL e deixadas a 37°C durante 16h. Foi feito um pré-inóculo com uma colônia isolada em 10mL de meio LB líquido com o antibiótico, incubando-se a 37°C durante 8h em 200rpm.

#### 3.14.2 Clonagem no vetor de destino pKGWFS7

As clonagens dos fragmentos foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen®). A reação de recombinação foi feita com o vetor de entrada pENTR/D-TOPO (50-150ng), o vetor de destino pKGWFS7 (Anexo D) (150ng/µL), a enzima LR Clonase II Enzyme Mix (2µL, ThermoFisher Scientific) e tampão TE completando o volume para 10µL. Por fim, reação foi incubada por aproximadamente 16h a 24°C. Após este período, para interromper a reação, foi adicionado 1µL de Proteinase K, incubando a 37°C por 10min. O vetor de destino possui os genes repórteres *eGFP* da proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein* - GFP), *uidA* da enzima β-glucuronidase (GUS) e o gene de seleção em plantas *nptll* conferindo resistência ao antibiótico Canamicina (KARIMI et al., 2007).

# 3.15 Transformação de Agrobacterium tumefaciens

### 3.15.1 Preparação de células eletrocompetentes de A. tumefaciens

Células de *A. tumefaciens* cepa GV3101 foram estriadas em placa contendo meio LB semi-sólido com o antibiótico gentamicina (50  $\mu$ g/mL) e foram mantidas a 28°C por 48h. Com uma colônia isolada dessa placa foi feito um pré-inóculo em 10mL de meio LB líquido com o antibiótico e incubou-se a 28°C por 24h a 200rpm. Esta cultura foi incubada em inóculo de 200mL de meio LB líquido a 28°C sob agitação em 180rpm até atingir OD<sub>600</sub> entre 0,5-0,8. Após essa etapa as células eletrocompetentes de *Agrobacterium* foram preparadas

como descrito anteriormente para as células de *E. coli* - seção 3.7.1. Os fragmentos no vetor pKGWFS7 foram sequenciados pelo laboratório de Biologia Molecular CEBTEC-ESALQ/USP, analisados através do programa BIOEDIT e BLAST e assim validados.

## 3.15.2 Eletroporação de A. tumefaciens

A eletroporação foi feita adicionando-se  $2\mu$ L do produto da reação a  $70\mu$ L de célula eletrocompetente, a mistura foi agitada levemente e permaneceu no gelo por 5min. Essa mistura foi colocada em uma cubeta de eletroporação (largura da ranhura 2mm, BioRad) previamente resfriada no gelo. A eletroporação foi realizada sob voltagem de 2,5kV, capacitância  $25\mu$ F e resistência  $200\Omega$ . O eletroporador utilizado foi o Gene Pulse II (BioRad) igualmente usado para *E. coli*. Imediatamente foi adicionado 1mL de meio 2XYT líquido após esta reação. As células permaneceram sob agitação de 200rpm por 4h a 28°C. O produto final ( $70\mu$ L) foi espalhado em meio LB semi-sólido contendo antibiótico espectinomicina e gentamicina ( $50\mu$ g/mL), permanecendo a 28°C por 48h.

# 3.16 Isolamento e purificação de DNA plasmidial de A. tumefaciens

Uma colônia isolada de *A. tumefaciens* foi adicionada em 10mL de meio LB líquido com os antibióticos espectinomicina e gentamicina 50µg/mL para se multiplicarem sob agitação de 200rpm durante 48h a 28°C. Após esse período as células foram preparadas como descrito anteriormente para as células de *E. coli* - seção 3.8 com a adição de lisozima que é usada para digerir a cadeia de açucares da parede celular de bactérias e assim facilitar o rompimento.

#### 3.17 Transformação estável de arabidopsis

As construções introduzidas em *A. tumefaciens* por eletroporação foram utilizadas para transformação de plantas de arabidopsis pelo método de imersão de flores (*Floral dip* – CLOUGH; BENT, 1998). Assim, uma colônia isolada foi inoculada para um pré-inóculo de 10mL de meio LB líquido contendo antibiótico gentamicina 100µg/mL e sob agitação de 200rpm permaneceu por 24h a 28°C. Desse pré-inóculo 5mL foram adicionados em 500mL de meio LB líquido com o antibiótico gentamicina e foi mantido por aproximadamente 48h a

28°C sob agitação de 200rpm até a OD atingir 0,8. No inóculo foi adicionado 125g de sacarose juntamente com 75µL de Silwet L-77.

Nas plantas, os botões florais abertos foram removidos, mantendo-se apenas os botões fechados para maximizar o número de sementes transformadas. As plantas foram "mergulhadas" na solução com *Agrobacterium* transformadas. As bandejas das plantas foram cobertas com plástico filme PVC e deixadas no escuro por 24h em temperatura ambiente. Assim, as plantas voltaram paras as câmaras monitoradas, modelo conviron ATC26. Após 7 dias a transformação por botão floral pôde ser realizada novamente.

## 3.18 Seleção de sementes

Após 6 semanas, foram obtidas sementes das plantas transformadas. As sementes da geração T1 foram esterilizadas e tratadas com frio (conforme seção 3.2). Após permanecerem a 4°C as sementes foram dispostas uma a uma em placas contendo meio MS 0,5X (sais MS PhytoTechnology sem sacarose e sem vitaminas (2,215g/L), pH 5,7, contendo Phytagel (2,3g/L) e canamicina 100 $\mu$ g/mL para crescer horizontalmente. Após 2 semanas em meio seletivo, as plantas transformadas, que possuíam o segundo par de folhas verdadeiras, foram retiradas do meio com Canamicina, tratadas e observadas no microscópio.

#### 3.19 Sítio de ligação para fatores transcricionais (TFBS)

A análise de fatores transcricionais foi realizada pelo programa PlantPAN 3.0 (<u>http://plantpan.itps.ncku.edu.tw/</u>), através dos menores fragmentos do promotor de *cml38*.

# 3.20 Análise estatística

Para as análises estatísticas, foi utilizado o pacote de software Infostat Statistics Base (versão 2012e; Córdoba, Argentina).

#### **4 RESULTADOS**

# 4.1 Produção de etileno é induzida em plantas selvagens tratadas com AtRALF1, mas não em plantas mutantes para FERONIA

A inibição da expansão celular em plantas tratadas com o hormônio etileno está associada a proteínas que formam a parede celular das plantas, produção de ROS e deposição de calose (CNODDER et al. 2005). A inibição do crescimento da raiz mediada por AtRALF1 também envolve a regulação da expansão celular (BERGONCI et al., 2014a-b), e a indução da produção de etileno foi relatada em suspensões celulares de arabidopsis tratadas com AtRALF1 (NIITSU; 2016). Com o objetivo de ampliar nosso conhecimento sobre a relação entre AtRALF1 e o hormônio etileno, raízes de plantas selvagens e do mutante para FERONIA (FER), foram tratadas com o peptídeo AtRALF1 (Figura 3). Raízes dos mutantes do receptor de AtRALF1, *fer4*, possuem um nível basal de etileno acima de plantas não tratadas pois FER regula negativamente a síntese de S-adenosilmetionina (SAM), um precursor do etileno (MAO et al., 2015). Entretanto, em resposta ao tratamento com AtRALF1 não foi observado um aumento da produção do etileno como ocorre em plantas wt, sugerindo que a indução da produção de etileno por AtRALF1 é dependente de FER (Figura 3).



Figura 3 - Produção do gás etileno nas raízes de plantas tratadas exogenamente com AtRALF1. Aproximadamente 200 raízes de plantas foram tratadas em meio líquido por 24hrs. Após este período, a produção de etileno foi medida em cromatógrafo gasoso, usando 0,5mL do ar contido no recipiente devidamente fechado. Os asteriscos representam P<0,5 (teste *t*,); ns não significativo. Valores em partes por milhão (ppm). O experimento foi repetido três vezes e mostraram dados semelhantes.

# 4.2 Genes da via de sinalização de etileno são induzidos por AtRALF1 e dependem da via mediada por FER

Para obter maiores informações a respeito da indução da produção de etileno por AtRALF1, foram feitas análises quantitativas da expressão de genes da via de sinalização do etileno (*ACS6*, *ACO5*, *EBF2*, *ERF6* e *ERF13*) em plantas tipo selvagem e nos mutantes *fer4* e *cml38* (Figuras 4, 5, 6).

O etileno é gerado a partir do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), que é sintetizado pela ACC sintase (ACS) (DONG et al., 1992; KENDE ZEEVART, 1997). ACS6 foi induzido por AtRALF1 (0,5µM), apresentando um aumento de expressão de 2 vezes os níveis encontrados em plantas wt não tratadas e 4 vezes quando tratadas com 1,0µM (Figura 4A). ACO5, é um gene que codifica a enzima ACC oxidase, responsável pela etapa final da biossíntese de etileno, convertendo ACC em etileno (DONG et al., 1992). A expressão do ACO5 aumentou aproximadamente 2 vezes no tratamento com 1,0µM de AtRALF1, não apresentando aumento significativo na menor dose (Figura 4B). EBF2 (EIN3-BINDING F-BOX PROTEIN 2) atua na via de etileno, na degradação de EIN3 após as respostas ao etileno terem sido ativadas. EBF2 se acumula durante a sinalização de etileno para evitar o acúmulo excessivo de EIN3/EIL1 e para remover EIN3/EIL1 depois que os níveis de etileno se dissipam (BINDER et al. 2007). Plantas tratadas com 0,5µM de AtRALF1 mostraram um aumento da expressão de EBF2 de aproximadamente 20 vezes, já plantas tratadas com 1,0µM, mostraram um aumento da ordem de 69 vezes quando comparado com os níveis encontradas em plantas controles (Figura 4C). ERFs (ETHYLENE RESPONSE FACTORS), conhecidos por serem os últimos componentes da via de transdução do etileno, são fatores transcricionais pertencentes a família APETALA2/ERF (BENAVENTE; ALONSO, 2006; CHANG et al., 2013). ERFs podem atuar como ativadores ou repressores de genes relacionados ao estresse (THIRUGNANASAMBANTHAM et al., 2015). Os genes que codificam os fatores ERF6 e ERF13 foram induzidos pelo tratamento com o peptídeo nas raízes das plantas selvagens. ERF6 aumentou sua expressão em resposta ao tratamento com AtRALF1 em aproximadamente 10 vezes para ambas concentrações, sugerindo que se pode ter atingido a saturação com a concentração mais baixa, 0,5µM de AtRALF1 (Figura 4 D). ERF13 aumentou sua expressão em aproximadamente 6 vezes e 19 vezes no tratamento com 0,5µM e 1,0µM de AtRALF1 respectivamente.



Figura 4 - Expressão relativa de genes da via de biossíntese de etileno. Plantas col-0 de arabidopsis cresceram em meio de cultura MS 0,5X e após 10d foram transferidas para um meio de cultura MS 0,5X líquido contendo 0,0, 0,5 ou 1µM de AtRALF1. As plantas permaneceram neste meio por 30min. Após este tempo, as raízes foram cortadas e o cDNA foi utilizado em PCR em tempo real. O experimento foi repetido três vezes e mostraram dados semelhantes. ACS6 (ACC SYNTASE), ACO5 (ACC OXYDASE), EBF2 (EIN3-BINDING F-BOX PROTEIN 2), ERF6 (ETHYLENE RESPONSE FACTORS) e ERF13.

O primeiro receptor de AtRALF1 identificado é a proteína de membrana com domínio extracelular malectina, denominada FERONIA (HARUTA et al., 2014). Em plantas mutantes para FERONIA, *fer4*, os genes ACS6, ACO5, EBF2, ERF6 e ERF13 não foram induzidos de forma significativa após o tratamento com AtRALF1 (Figura 5). Os níveis de expressão dos genes ficaram estatisticamente iguais aos valores das plantas controle tratadas apenas com  $H_2O$ , com exceção do gene *EBF2*, que apresentou uma redução da expressão no tratamento com 1,0µM de AtRALF1.



Figura 5 - Expressão relativa de genes da via de biossíntese de etileno. Mutantes *fer4* cresceram em meio de cultura MS 0,5X e após 10d foram transferidas para um meio de cultura MS 0,5X líquido contendo 0, 0,5 ou 1µM de AtRALF1. As plantas permaneceram neste meio por 30min. Após este tempo, as raízes foram cortadas e o cDNA foi utilizado em PCR em tempo real. O experimento foi repetido três vezes e mostraram dados semelhantes. *ACS6 (ACC SYNTASE), ACO5 (ACC OXYDASE), EBF2 (EIN3-BINDING F-BOX PROTEIN 2), ERF6 (ETHYLENE RESPONSE FACTORS)* e *ERF13*.

*CML38* é essencial para a inibição do tamanho da raiz pelo tratamento com AtRALF1 e pertence a uma via de resposta a AtRALF1 independente de alcalinização (CAMPOS et al., 2017). Sabendo que a resposta de alcalinização causada por AtRALF1 é uma via mediada por FERONIA, as análises com mutantes de *CML38*, auxiliaram a definir se etileno faz parte da via dependente ou independente de alcalinização mediada por FERONIA.

Em plantas mutantes *cml38-2*, *ACS6* foi um gene induzido (aproximadamente 12 vezes) pelo tratamento com 0,5 $\mu$ M de AtRALF1 e aproximadamente 14 vezes mais expresso no tratamento com 1,0 $\mu$ M (Figura 6A). ACO5 foi induzido em aproximadamente 34 e 51 vezes em resposta aos tratamentos com 0,5 e 1,0 $\mu$ M de AtRALF1 respectivamente (Figura 6B). EBF2 foi também induzido (aproximadamente 2 e 4 vezes) em ambos tratamentos (Figura 6C). ERF6 mostrou novamente uma saturação no aumento da expressão do gene, aumentando em aproximadamente 4 vezes nos dois tratamentos (Figura 6D). ERF13 apresentou os maiores níveis de indução, aumentou 32 e 71 vezes quando plantas foram tratadas com 0,5 e 1,0 $\mu$ M de AtRALF1 respectivamente (Figura 6E).



Figura 6 - Expressão relativa de genes da via de biossíntese de etileno. Plantas mutantes *cml38* cresceram em meio de cultura MS 0,5X e após 10d foram transferidas para um meio de cultura MS 0,5X líquido contendo 0,0, 0,5 ou 1µM de AtRALF1. As plantas permaneceram neste meio por 30min. Após este tempo, as raízes foram cortadas e o cDNA foi utilizado em PCR em tempo real. O experimento foi repetido três vezes e mostraram dados semelhantes. *ACS6 (ACC SYNTASE), ACO5 (ACC OXYDASE), EBF2 (EIN3-BINDING F-BOX PROTEIN 2), ERF6 (ETHYLENE RESPONSE FACTORS)* e *ERF13*.

Os resultados da análise de expressão dos genes da via do etileno em plantas wt e em mutantes *fer4* e *cml38* sugerem uma relação do etileno e do AtRALF1 potencialmente sinérgica ou aditiva e que o etileno está envolvido com a via dependente da alcalinização mediada por FERONIA.

# 4.3 Indução de calose em plantas mutantes para CML38 é similar a observada em plantas selvagens

Em plantas que superproduzem etileno como os mutantes *eto3*, mutante da enzima ACS9, ocorre deposição anormal de calose nas raízes mediada por etileno (CNODDER et al., 2005; Anexo B). A deposição de calose em plantas de arabidopsis selvagens foi analisada previamente e mostrou ser induzida em plantas tratadas com AtRALF1 e em plantas que superexpressam AtRALF1 (NIITSU 2016). Com a finalidade de investigar mais o processo de deposição de calose em resposta a AtRALF1, mutantes *fer4* e *cml38-2* foram tratados com 0,5

ou 1,0μM de AtRALF1 e a deposição de calose na ponta de suas raízes foi avaliada (Figura 7). Apesar dos níveis basais de etileno existentes em plantas *fer4*, os resultados demostram que nesses mutantes não foi observado um aumento significativo na deposição de calose após o tratamento com AtRALF1. Já no mutante *cml38-2*, foi observada indução de deposição de calose nos tratamentos com 0,5 ou 1,0μM de AtRALF1 (Figura 7).

Estes resultados confirmam que a resposta de AtRALF1 mediada por etileno é dependente de FERONIA, uma vez que as respostas em *fer4* foram alteradas, e corroboram os dados que sugerem que *CML38* é parte da via independente de FERONIA, visto que a deposição de calose em *cml38* foi semelhante a wt.



Figura 7 - Deposição de placas de calose nas raízes de plantas selvagens e mutantes fer4 e cml38. As sementes foram germinadas em meio de cultura MS 0,5X semi-sólido. No 5º dia as plantas foram transferidas para um meio de cultura MS 0,5X líquido e tratadas com o peptídeo por 3hr. Após este período, as plantas foram coradas com azul de anilina 0,1% juntamente com 1M de glicina durante 5min. Placas de calose em plantas tratadas com 0,0, 0,5 ou 1,0 $\mu$ M de AtRALF1 em plantas selvagens, *fer4, e cml38-2* respectivamente. Laser de excitação 405nm e filtro de emissão de 725nm (DAPI).

## 4.4 Identificação de um promotor mínimo na região regulatória de CML38

Resultados prévios sugerem a existência de duas vias simultâneas que coordenam as respostas ao peptídeo AtRALF1: uma dependente do receptor FERONIA (FER) e outra independente de FER (DRESSANO et al., 2017; CAMPOS et al., 2017). A via independente de FER é dependente do co-receptor BAK1 e da proteína semelhante a calmodulina CML38 (DRESSANO et al., 2017; CAMPOS et al., 2017). Na tentativa de identificar elementos regulatórios responsivos ao AtRALF1 na via independente de FER, isolou-se a região promotora do gene *CML38* e uma série de deleções na região promotora foram utilizadas em construções gênicas de fusão a proteína verde fluorescente (GFP, Figura 8A; Anexo E). Iniciadores específicos, dentro da região promotora próxima ao início da transcrição do gene CML38 foram desenhados, delimitando cada deleção a fragmentos de 359pb, foram sintetizados para as clonagens em vetor específico (ver materiais e métodos) (Figura 8B; Anexo B). Primeiramente, 4 deleções foram realizadas contendo 1436pb (fragmento#1), 1077pb (fragmento#2), 718pb (fragmento#3) e 359pb (fragmento#4) do promotor de *CML38* (Figura 8A; Anexo F).



Figura 8 - Construções dos quatros primeiros fragmentos do promotor de CML38 fusionados a proteína repórter GFP. Seta preta mostrando o início da transcrição na 5'UTR.

Plantas transgênicas resistentes ao antibiótico (Anexo G), foram tratadas com 1µM do peptídeo AtRALF1 para indução da proteína GFP e levadas para observação no microscópio confocal. Por se tratar de exposição exógena ao peptídeo, o sinal da GFP se fez mais intenso na zona de alongamento e diferenciação celular (Figura 9). Plantas transgênicas contendo o fragmento#1, conforme já relatado (CAMPOS et al., 2017), apresentaram indução por AtRALF1 e fluorescência nas regiões esperadas, alongamento e diferenciação (Figura 9A).

Na construção contendo o fragmento#2, onde foram excluídos 359pb da região 5' do promotor, observou-se plantas expressando GFP em resposta ao peptídeo (Figura 9B). Nas construções contendo o fragmento#3, onde foi novamente deletada uma região de 359pb da região 5' do promotor, as plantas também mostraram fluorescência induzida em resposta ao peptídeo (Figura 9C). A última construção gênica desta série, fragmento#4, que consiste nos 359pb restantes do promotor, as plantas responderam de modo semelhante ao tratamento com AtRALF1 (Figura 9D).



Figura 9 - Análise das plantas transformadas em microscopia confocal. As sementes transformadas foram selecionadas em meio de cultura MS 0,5X semi-sólido contendo antibiótico Canamicina. As plantas verdes e resistentes foram usadas no experimento, em meio de cultura MS 0,5X líquido tratadas com 1uM de AtRALF1. As plantas que emitiam fluorescência possuíam os elementos regulatórios transformados. A. Fragmento 1. B. Fragmento 2. C. Fragmento 3. D. Fragmento 4

Como todas as construções apresentaram fluorescência induzida pelo tratamento com o AtRALF1, foram feitas mais duas construções gênicas com base no menor fragmento, fragmento#4 (Figura 10). A primeira contendo os 300pb da região 5' (fragmento#5) e a segunda, as 59 bases restantes do promotor (fragmento#6). Plantas transgênicas foram novamente obtidas, selecionadas para resistência ao antibiótico e levadas ao microscópio confocal para análise da indução da GFP por AtRALF1. No fragmento#5 não foi observada a fluorescência da GFP após o tratamento com o peptídeo (Figura 11A). Já o fragmento#6, de apenas 59pb, apresentou fluorescência, sugerindo que os elementos regulatórios estão presentes na menor construção efetuada (Figura 11B; Anexo H).



Figura 10 - Construções dos fragmentos gerados a partir do fragmento 4 do promotor de *CML38* fusionados a proteína repórter GFP. Seta preta mostrando o início da transcrição na 5'UTR.

Através das análises do promotor de *CML38*, os dados sugerem que o promotor mínimo que responde à AtRALF1 está localizado nos 59pb acima do início da tradução gênica (Figura 11B).



Figura 11 - Análise das plantas transformadas em microscopia confocal. As sementes transformadas foram selecionadas em meio de cultura MS 0,5X semi-sólido contendo antibiótico Canamicina. As plantas verdes e resistentes foram usadas no experimento, em meio de cultura MS 0,5X líquido tratadas com 1uM de AtRALF1. As plantas que emitiam fluorescência possuíam os elementos regulatórios transformados, as plantas que não emitiam a fluorescência não possuíam os elementos regulatórios. A. Fragmento 5. B. Fragmento 6.

Em arabidopsis há 3 isoformas de *CML38*, segundo o banco de dados do TAIR (*The Arabidopsis Information Resource* - https://www.arabidopsis.org/). A isoforma#1, possui o início da transcrição (base +1) mais distante do ATG inicial da tradução, com uma região 5'UTR de 270pb. A isoforma#2 possui uma região 5'UTR de 75pb, enquanto a isoforma#3 possui a menor região 5'UTR, de apenas 30pb. Os resultados anteriores com deleções sugerem um promotor mínimo de *CML38* com apenas 59pb, portanto compatível com a isoforma de menor região 5'UTR.

## 4.5 Sítios de ligação para fatores transcricionais (TFBS)

Uma vez determinada uma região mínima capaz de responder ao tratamento exógeno com o peptídeo AtRALF1, procedeu-se a análise *in silico* da região através do programa PlantPAN 3.0. Foram encontrados sítios de ligações que recrutam 131 Fatores transcricionais diferentes (Anexo I). Como o gene que codifica o peptídeo AtRALF1 é mais expresso em raízes, optou-se por restringir a análise utilizando somente os fatores transcricionais que são encontrados nas raízes (Tabela 1). De todas as regiões localizadas, 6 sítios de ligações recrutam 13 Fatores transcricionais diferentes que são atuantes nas raízes de arabidopsis (Figura 12). Essas regiões podem recrutar fatores transcricionais da família Dof, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, MADF e AT-Hook (Tabela 1). Esses podem ser famílias de fatores transcricionais possivelmente induzidos através deste segmento do promotor mínimo de *CML38* ao tratamento com AtRALF1.

O sítio de ligação dos fatores transcricionais encontrados *in silico* no promotor mínimo de *CML38*, foram observados na região 5' entre as posições 9-21pb e também 35-47pb (Figura 12). Correspondendo também ao início da transcrição gênica, nesta segunda porção (35-47pb), da isoforma#3.

Tabela 1 – Sequências reconhecidas por Fatores transcricionais encontradas no promotor mínimo de CML38 que estão presentes nas raízes de arabidopsis.

FRAGMENTO#6	(Promotor Mi	ínimo)		
Posição	Strand	Sequência	Gene	Família
8	-	AAAAG	COG1, COGWHEEL1	Dof
9	+	AAAGT	COG1, COGWHEEL1	Dof
9	+	AAAGT	OBP3	Dof
9	+	AAAGT	DAG1	Dof
9	+	AAAGT	PEAR2, PHLOEM EARLY DOF 2	Dof
21	-	GACAA	IDD3, MGP	C2H2
21	-	GACAA	ATIDD8, IDD8, NUC	C2H2
35	+	ACACT	AT3G49930	C2H2
35	+	ACACT	AZF3; ZF3	C2H2
35	+	ACACT	AT2G28710	C2H2
40	-	TAACC	GT-1	MADF; Trihelix
47	+	TTATT	AHL25; AGF1	AT-Hook
47	-	TTATT	AT5G62260	AT-Hook



Figura 12 - Localização das sequências reconhecidas por fatores transcricionais encontradas na análise in silico do promotor mínimo de CML38. Posição 8 e 9, família Dof; posição 21 e 35 família C2H2; posição 40 família MADF; posição 47, família At-Hook. Seta indica início da transcrição.

# **5 DISCUSSÃO**

Na zona de alongamento das raízes, onde ocorre a maior taxa de crescimento celular nas plantas, vários mecanismos são responsáveis pela expansão celular (BENFEY et al., 1993; HAUSER et al., 1995; VERBELEN et al., 2001; BERGONCI et al., 2014a,b; COSGROVE 2016). Normalmente, o controle da expansão celular está associado a mudanças do material da parede celular, redução nos processos de afrouxamento da parede e aumento nos eventos de conexão na parede celular (COSGROVE, 1997). Calose ( $\beta$ -1,3-glucan), é um polissacarídeo que desempenha um papel fundamental em vários processos biológicos, incluindo a formação da placa celular (CHEN et al., 2009; THIELE et al., 2009). É comum em plantas, sendo componente e estrutura associada à parede celular em estágios de crescimento e diferenciação (STONE; CLARKE, 1992). A relação de proteínas estruturais na parede também foi observada como um mecanismo para restringir o crescimento celular (BRISSON et al., 1994; IIYAMA et al., 1994; KNOX, 1995). O hormônio etileno é sintetizado pelas plantas e também restringe o alongamento celular (ABELES et al., 2002). Em arabidopsis, a inibição do tamanho da raiz controlada pelo peptídeo AtRALF1 é dependente de etileno, atuando em uma parte da via acima do hormônio, uma vez que mutantes da via de sinalização de etileno são insensíveis ao peptídeo AtRALF1 (NIITSU, 2016). Na presença de AtRALF1, FER regula negativamente a produção de etileno através da inibição da síntese de SAM que é um precursor direto de etileno, usado na conversão de metionina à ACC através da SAM-sintase (ADAMS E YANG, 1977; ADAMS E YANG, 1979). Entretanto, os dados aqui apresentados revelam que a via de sinalização de AtRALF1 que compreende também o hormônio etileno, é dependente de FER, sendo necessária para induzir genes da via deste hormônio (Figura 3-5 e 7). Em plantas que super produzem etileno, ocorre a deposição de placas de calose nas células do meristema e da zona de expansão celular (CNODDER et al., 2005) (Anexo B). Poucos minutos de exposição ao etileno são necessários para ocorrer uma inibição da expansão celular nas raízes de arabidopsis, o que causa um bloqueio do crescimento da raíz (LE et al., 2001). Uma variedade de processos biológicos regulados por etileno está associada à regulação da homeostase de espécies reativas de oxigênio (ROS) (HE et al. 2011; JIANG et al. 2013; PENG et al. 2014). ROS atuam como moléculas de sinalização importantes que regulam processos biológicos, como

crescimento, desenvolvimento e respostas a estresses bióticos e abióticos (FOREMAN et al. 2003; MILLER et al. 2008). Wu et al. (2007) observaram que RALF afeta o nível de produção de ROS em *N. attenuata*, e em plantas com RALF silenciado, irRALF, há níveis

reduzidos de acúmulo de ROS. Monshausen et al. (2007) relataram que o pH apoplástico e ROS contribuem para estabilizar a parede celular de pelos radiculares durante o crescimento. Além do mais, a produção de ROS no apoplasto pode levar a ligações cruzadas de componentes de parede celular como as HRGPs que já foram relatadas por serem induzidas por AtRALF1 (BERGONCI et al., 2014). Através do acúmulo de ROS no apoplasto, pode ocorrer o aumento de NADPH oxidases e peroxidases (BOLLWELL et al., 2002; FOREMAN et al., 2003) o qual também limita o alongamento celular induzido pelo aumento da produção de etileno (CNODDER et al., 2005). Uma possível explicação para não ocorrer a inibição das raízes das plantas mutantes cml38-2 mesmo na presença de calose (Figura 6 e 7), seria a dependência de uma rede de sinalização envolvida na via diretamente relacionada a ativação de genes relacionados a expansão celular e que são induzidos de forma independente da alcalinização (CAMPOS et al., 2017) e que precisa ser mais estudada. A independência da alcalinização também foi demonstrada na supressão da resposta imune dos peptídeos RALF (STEGMANN et al., 2017). As determinações de constantes de ligação para acriAtRALF1, BAK1 e FER demonstraram a existência de um fator apoplástico e possivelmente outra(s) proteína(s)s receptoras de membrana para AtRALF1. Atualmente, sabe-se que RALFs ligamse a proteína ancorada em glicosilfosfatidilinositol LORELEI (GPI-anchored protein LORELEI - LRE) e as proteínas semelhantes a LORELEI, LLG1/2 (LRE-LIKE GPI-ANCHORED PROTEINs -LLG1/2) formando complexos heteroméricos (GE et al., 2019, XIAO et al., 2019). Em estudos com bases estruturais que fazem o reconhecimento de peptídeos RALFs por proteínas LRX durante o crescimento do tubo polínico, foi possível observar dois mecanismos distintos de direcionamento para peptídeos RALFs (MOUSSU et al., 2020). Os peptídeos específicos da parte reprodutiva, RALF4/19 podem sinalizar através da via CrRLK1Ls-LLGs para controlar os processos dentro do tubo polínico e de maneira distinta esses peptídeos também podem sinalizar o controle dos processos da célula através da interação com proteínas LRXs na parede celular (MECCHIA et al., 2017 FRANK et al., 2018). Além disso, sugere-se que proteínas LRXs são sensores de alta afinidade para RALFs no pH ácido, enquanto LLGs tem preferência de ligação em condições neutras ou alcalinas (MOUSSU et al., 2020).

Os resultados aqui apresentados fornecem mais evidências para a existência de uma divisão na percepção de AtRALF1, agora agregando a via do etileno à do receptor FER, independente da proteína apoplástica CML38 e provavelmente da proteína co-receptora BAK1 (Figura 13). Primeiramente, AtRALF1 se liga ao complexo das proteínas LORELEI LLG1/2 e FER (GE et al., 2019, XIAO et al., 2019). Há o aumento do cálcio intracelular,

aumento da expressão dos genes *CML38*, *DWF4*, *HRGP2*, *PRP3* (BERGONCI et al., 2014ab) e aumento da expressão dos genes da via de etileno, *ACS6*, *ACO5*, *EBF2*, *ERF6*, *ERF13* (Figura 4) induzindo a produção de etileno e a formação de placas de calose na raíz (Figura 3 e 7). Ocorre também a inativação da bomba de prótons ATPase AHA2, o qual leva a alcalinização do meio extracelular (HARUTA et al., 2014). Ao mesmo tempo, uma proteína receptora desconhecida se liga ao co-receptor BAK1 que anteriormente se dissociou de BR11. Assim, AtRALF1 se liga a proteína CML38, juntando-se com o complexo que envolve BAK1, inibindo o crescimento da raiz (DRESSANO et al., 2017; CAMPOS et al., 2017). Sugere-se que CML38 é uma proteína imprescindível para ocorrer a inibição do crescimento da raiz por AtRALF1 e que envolva uma rede de sinalização que ainda é desconhecida (Figura 13), mas que pode relacionar ao aumento de enzimas produtoras de ROS, tais como as peroxidases e também NADPH oxidases e ocorrendo as ligações cruzadas entre HRGPs na parede celular (BOLLWELL et al., 2002; FOREMAN et al., 2003; NIITSU, 2016).



Figura 13 - Modelo da via de sinalização de AtRALF1. AtRALF1 se liga ao complexo FERONIA- LRE-like GPI-AP1 (LLG1)/LORELEI (LRE), recruta RIPK e inibe a bomba de prótons ATPase AHA2, que alcaliniza o meio extracelular, induz o aumento de cálcio intracelular, aumenta a produção de etileno intracelular o qual induz a atividade de NADPH oxidase e peróxido de hidrogênio. Há o aumento e acúmulo de ROS que ocasiona ligações cruzadas entre HRGPs na parede celular. Assim ocorre a deposição de calose que impede a comunicação intercelular. Também induz genes *DWF4*, *HRGP2*, *CML38*, *PRP3* e genes da via de etileno *ACS6*, *AC05*, *EBF2*, *ERF6*, *ERF13*. Ao mesmo tempo, AtRALF1 se liga à CML38 e se ligam a outro complexo de proteína receptora desconhecida, juntamente com a proteína co-receptora BAK1. Há a regulação de genes responsivos a AtRALF1, que levam a inibição do tamanho da raiz, mas esta via não interfere na alcalinização do meio extracelular.

Elementos regulatórios, são regiões de DNA não codificantes que regulam a transcrição de genes determinados e são componentes vitais de redes de genes regulatórios (BUTLER; KADONAGA, 2002). Esses elementos desempenham um papel fundamental no controle transcricional das vias hormonais (CAARLS et al., 2015; TEALE et al., 2006). São relativamente curtos e geralmente funcionam em conjuntos para aumentar a especificidade, tornando sua identificação ainda mais complexa (KATO et al., 2004; WALEEV et al., 2006). Os elementos regulatórios recrutam proteínas nomeadas de fatores transcricionais, que funcionam como reguladores positivos ou negativos e estão associados a redes reguladoras de

genes e coordenam as respostas das plantas ao meio ambiente (SCOTT, 2000). Alguns elementos regulatórios foram encontrados nos promotores de genes RALFs de diversas espécies e que desempenham variadas funções fisiológicas. Elementos com respostas à luz que foram encontrados nos promotores de todos os genes RALFs analisados. Foram encontrados elementos relacionados à ácido abscísico, auxina, giberelina. Dois motivos importantes de resposta a ácido jasmônico (CGTCA e TGACG) foram encontrados nos promotores de 98% de todos os promotores. Elementos responsivos ao etileno (ERE -ATTTCAAA) foram encontrados em 26,27% dos promotores, os de seca e ABA (ABRE -GCAACGTGTC) foram encontrados em 41,5% dos promotores. Elementos responsivos ao ácido salicílico foram encontrados em 44,9% dos promotores de todos os genes em estudo. Elementos responsivos por estresse térmico (HSE e AAAAAATTTC) foram encontrados em promotores de 56% e também foram encontrados elementos responsivos ao frio. Além de alguns motivos como sítio de ligação para fixação do fator de transcrição MYB induzidos durante a seca (MBS e CAACTG) foram encontrados em 51,6% dos promotores e fatores WRKY também foram relatados (SHARMA et al., 2016). São resultados que mostram uma grande diversidade de respostas, durante o desenvolvimento da planta, encontrados através dos elementos regulatórios presentes nos promotores de genes RALFs. Ressaltando a importância em se estudar os elementos regulatórios e entender a rede de sinalização que ocorre durante o desenvolvimento vegetal. Em análise in sílico da sequência do promotor mínimo de CML38, conforme a Tabela 1, foram encontrados sítios para recrutamento de fatores transcricionais já conhecidos pelas sequências do promotor, que promovem o controle do alongamento do hipocótilo (COG1), por meio do PIF4 e PIF5 (PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 4/5) (WEI et al., 2017). Fatores transcricionais que são regulados por hormônios (OBP3), como o ácido salicílico e auxina (KANG; SINGH, 2000) e que coordenam o crescimento e desenvolvimento das plantas (KANG; SINGH, 2000). Fatores transcricionais que afetam o crescimento do hipocótilo, além da transição floral, inflorescência, desenvolvimento das flores senescência, tecido vascular, defesa e entre outros, mostrando serem fatores fundamentais para diversos processos do desenvolvimento vegetal (LU et al., 2010; XU et al., 2013; ZHAO et al., 2013; JIA et al., 2015; LEE; SEO, 2017). Essas informações poderão ser utilizadas para análises futuras na identificação potencial de fatores transcricionais responsivos à AtRALF1.

# **6 CONCLUSÕES**

-O peptídeo AtRALF1 induz a produção de etileno, da mesma maneira expressa genes da via de sinalização deste hormônio em plantas wt.

- No tratamento com AtRALF1 mutantes *fer4* não produzem etileno, assim não expressam genes da via de etileno e não induzem placas de calose.

-Mutantes de *cml-38*, não inibem o tamanho das raízes através de AtRALF1, entretanto expressam genes da via de etileno e induzem a formação de placas de calose na ponta de suas raízes.

-Embora as duas vias proponham sinalizações para a inibição do crescimento da raiz, há uma via que ocasiona à alcalinização e outra via que ocasiona a inibição da raiz, ambas por AtRALF1.

-A sequência que apresenta os elementos regulatórios, que respondem ao peptídeo AtRALF1 no promotor do gene CML38, está presente próximo ao início do gene, entre 59pb.

-Fatores transcricionais que possivelmente podem ser induzidos pela sequência mínima do promotor de *cml38*, e respondem ao peptídeo, podem estar atuando em diversas áreas do desenvolvimento vegetal.

# REFERÊNCIAS

AALEN, R.B.; WILDHAGEN, M.; STO, I.M.; BUTENKO, M.A. IDA: a peptide ligand regulating cell separation processes in *Arabidopsis*, **Journal of Experimental Botany**, v. 64, p. 5253–5261, 2013.

ABBE, E. C.; PHINNEY, B. O.; BAER, D. F. The growth of the shoot apex in maize: internal features. **American Journal of Botany**, v. 38, p. 744-751, 1951.

ABELES, F.B.; MORGAN, P.W.; SALTVEIT, M.E. Jr. **Ethylene in plant biology**. 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Academic Press, 1992. 414 p.

ADAMS, D.O.; YANG, S.F. Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. **PNAS**, v. 76, p. 170–174, 1979.

ALBERT, M. Peptides as triggers of plant defense. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, p. 5269-5279, 2013.

ALDON, D.; MBENGUE, M.; MAZARS, C.; GALAUD, J.-P. Calcium signalling in plant biotic interactions. International Journal of Molecular Science, v. 19, p. 665; 2018.

AN, S.H.; SOHN, K.H.; CHOI, H.W.; HWANG, I.S.; LEE, S.C.; HWANG, B.K. Pepper pectin methylesterase inhibitor protein CaPMEI1 is required for antifungal activity, basal disease resistance and abiotic stress tolerance. **Planta**, v. 228, p. 61–78, 2008.

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**, v. 162, p. 2028-2041, 2013.

BABU, Y.S.; SACK, J.S.; GREENHOUGH, T.J.; BUGG, C.E.; MEANS, A.R.; COOK, W.J. Three-dimensional structure of calmodulin. **Nature**, v. 315, p. 37–40, 1985.

BAILEY, P.C.; MARTIN, C.; TOLEDO-ORTIZ, G.; QUAIL, P.H.; HUQ, E.; HEIM, MA, JAKOBY M, WERBER M, WEISSHAAR B: Update on the basic helixloop-helix transcription factor gene family in Arabidopsis thaliana. **Plant Cell**, v. 15, p. 2497-2502, 2003.

BAKSHI, A.; SHEMANSKY, J. M.; CHANG, C.; BINDER, B. M. History of research on the plant hormone ethylene. Journal of Plant Growth Regulation, v. 34, p. 809–827, 2015.

BENAVENTE, L.M.; ALONSO, J.M. Molecular mechanisms of ethylene signaling in Arabidopsis, **Molecular Biosystem**, v. 2, p. 165–173, 2006.

BENN, G.; WANG, C-Q.; HICKS, D.R.; STEIN, J.; GUTHRIE, C.; DEHESH, K. A key general stress response motif is regulated non-uniformly by CAMTA transcription factors. **Plant Journal**, v. 80, p. 82–92, 2014.

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

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, 2014a.

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, 2014b.

BHURIA, M., GOEL, P., KUMAR, S., SINGH, A.K. The Promoter of AtUSP Is Coregulated by Phytohormones and Abiotic Stresses in Arabidopsis thaliana. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1-13, 2016.

BIANCHI, ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **Journal** Leukocite Biology, v. 81, p. 1–5, 2007.

BLACKBURN, M. R.; HARUTA, M.; MOURA, D. S. RALF as a growth inhibitory fator. **Plant Physiology**, 2020.

BOLLER, T.; FELIX, G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. **Annuals Review Plant Biology**, v.60, p. 379–406, 2009.

BOLWELL, G.P.; BINDSCHEDLER, L.V.; BLEE, K.A.; BUTT, V.S.; DAVIES, D.R.; GARDNER, S.L.; GERRISH, C.; MINIBAYEVA, F. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. **Jounal Experimental Botany**, v. 53, p. 1367-1376, 2002.

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

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

BOWLER, C.; NEUHAUS, G.; YAMAGATA, H.; CHUA, N.H. Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. **Cell**, v. 77, p. 73–81, 1994.

BURLEY, S.K.; ROEDER, R.G. Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). **Annual Review of Biochemistry**, v. 65, 769–799, 1996.

BUTLER, J.E.; KADONAGA, J.T. "The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression". **Genes & Development,** v. 16, p. 2583–2592, 2002.

CAI, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, C.; ZHANG, T.; HU, T.; YE, J.; ZHANG, J.; WANG, T.; LI, H.; YE, Z. Genome-wide analysis of plant-specific Dof transcription factor family in tomato. **Journal Integregrative Plant Biology**, v. 55, p. 552–566, 2013.

CAMPBELL, L.; TURNER, S. R. A comprehensive analysis of AtRALF proteins in green plants suggests there are two distinct functional groups. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1-14, 2017.

CAMPOS, W. F.; DRESSANO, K.; CECILIATO, P. H.O.; GUERRERO-ABAD, J.C.; SILVA, A. P.; FIORI, C. S.; CANTO, A. M.; BERGONCI, T.; CLAUS, L. A. N.; SILVA-FILHO, M. C.; MOURA, S. D. *Arabidopsis thaliana* rapid alkalinization factor-mediated root growth inhibition is dependent on calmodulin-like protein38. Journal of Biological Chemistry, v. 293, p. 2159-2171, 2017.

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

CHANG, K.N.; S. ZHONG, M.T.; WEIRAUCH, G.; HON, M.; PELIZZOLA, H.; LI, S.-S.C.; HUANG, R.J.; SCHMITZ, M.A.; URICH, D.; KUO, J.R.; NERY, H.; QIAO, A.; YANG, A.; JAMALI, H.; CHEN, T.; IDEKER, B.; REN, Z.; BAR-JOSEPH, T.R.; ECKER, J.R. Temporal transcriptional response to ethylene gas drives growth hormone cross-regulation in Arabidopsis, **ELife**, v. 2, 2013.

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

CHEN, X.Y.; LIU, L.; LEE, E.; HAN, X.; RIM, Y.; CHU, H.; KIM, S.W.; SACK, F.; KIM, J.Y. The Arabidopsis callose synthase gene GSL8 is required for cytokinesis and cell patterning. **Plant Physiology**, v. 150, p. 105–113, 2009.

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**, v. 113, p. 5519-5527, 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.

CHILLEY, P.M.; CASSON, S.A.; TARKOWSKI, P.; HAWKINS, N.; WANG, K.L.; HUSSEY, P.J.; BEALE, M.; ECKER, J. R.; SANDBERG, G.K.; LINDSEY, K. The POLARIS peptide of Arabidopsis regulates auxin transport and root growth via effects on ethylene signaling. **The Plant cell**, v. 18, p. 3058–3072, 2006.

CHO, K.M.; NGUYEN, H.T.; KIM, S.Y.; SHIN, J.S.; CHO, D.H.; HONG, S.B.; OK, S.H. Cml10, a variant of calmodulin, modulates ascorbic acid synthesis. **New Phytologist**, v. 209, p. 664–678. 2016.

CHOI, W-G.; MILLER, G.; WALLACE, I.; HARPER, J.; MITTLER, R.; GILROY, S. Orchestrating rapid long-distance signaling in plants with Ca<sup>2+,</sup> ROS and electrical signals. **Plant Journal**, v. 90, p. 698–707, 2017.
CHN D.; MEANS, A.R. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. Trends in Cell Biology, v. 8, p. 322-328, 2000.

CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R., The zinc finger network of plants, Cellular and Molecular Life Science, v. 65, p. 1150–1160, 2008.

CLAPHAM, D. E. Calcium signaling. Cell, v. 80, p. 1041-1058, 2007.

CLARK, S. E.; WILLIAMS, R. W.; MEYEROWITZ, E. M. The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in Arabidopsis. **Cell**, v. 89, p. 575-585, 1997.

CLARK, K.L.; LARSEN, P.B.; WANG, X.; CHANG, C. Association of the *Arabidopsis* CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors. **PNAS**, v. 95, 5401–5406, 1998.

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

CNODDER, T.; VISSENBERG, K.; VAN DERSTRAETEN, D.; VERBELEN, J.P. Regulation of cell length in the *Arabidopsis thaliana* root by ethylene percursor 1-aminocyclopropane-a-carboxylic acid: a metter of apoplastic reactions. **New Phytologist**, v. 169, p. 541-550, 2005.

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

COSGROVE, D.J. Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. **Plant Cell**, v. 9, p. 1031–1041. 1997.

COSGROVE DJ. Plant cell wall extensibility: connecting plant cell growth with cell wall structure, mechanics, and the action of wall-modifying enzymes. **Journal Experimental Botany**, v. 67, p. 463-476, 2016.

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 pellon tube elongation. **Plant Physiology**, v. 2, p. 703-715, 2010.

DAS, M.K.; DAI, HK. A survey of DNA motif finding algorithms. **BMC Bioinformatics**, v. 8, p. 1-13, 2007.

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

DELK, N.A.; JOHNSON, K.A.; CHOWDHURY, N.I.; BRAAM, J. CML24, regulated in expression by diverse stimuli, encodes a potential Ca2+ sensor that functions in responses to abscisic acid, daylength, and ion stress. **Plant Physiology**, v. 139, p. 240–253, 2005.

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

DOMBROWSKI, J. E.; PEARCE, G.; RYAN, C. A. Proteinase inhibitor-inducing activity of the prohormone prosystemin resides exclusively in the C-terminal systemin domain. **PNAS**, v. 96, p. 12947-12952, 1999.

DONG, J.G.; FERNANDEZ-MACULET, J.C.; YANG, S.F., Purification and characterization of laminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from apple fruit. **PNAS**, v.89, p. 9789- 9793, 1992.

DOUDNA, J.A.; CHARPENTIER, E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science, v. 346, p. 1258096, 2014.

DRESSANO, K.; CECILIATO, P. H. O.; SILVA, A. L.; GUERRERO-ABAD, J. C.; BERGONCI, T.; ORTIZ-MOREA, F. A.; BÜRGER, M.; SILVA-FILHO, M.; MOURA, D. S. BAK1 is involved in AtRALF1-induced inhibition of root cell expansion. **PLOS Genetics** v. 13, p. 1-33, 2017.

DU, C.; LI, X.; CHEN, J.; CHEN, W.; LI, B.; LI, C.; WANG, L.; LI, J.; ZHAO, X.; LIN, J.; LIU, X.; LUAN, S.; YU, F. Receptor kinase complex transmits RALF peptide signal to inhibit root growth in Arabidopsis. **PNAS**, v. 113, p. 8326-8334, 2016.

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 plasmodemata. **The Plant Cell**, v. 15, p. 1507-1523, 2003.

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

EULGEM, T.; RUSHTON, P.J.; ROBATZEK, S.; SOMSSICH, I.E. The WRKY superfamily of plant transcription factors. **Trends Plant Science**, v. 5, p. 199-206, 2000.

EVANS, D. E.; BENGOCHEA, T.; CAIRNS, A. J.; DODDS, J. H.; HALL, M. A. Studies on ethylene binding by cell-free preparations from cotyledons of *Phaseolus vulgaris* L.: subcellular localization. **Plant Cell Environment**, v. 5, p. 101–107, 1982.

EVANS, D. E.; DODDS, J. H; LLOYD, P. C.; APGWYNN, I.; HALL, M. A. A study of the subcellular localization of an ethylene binding site in developing cotyledons of *Phaseolus vulgaris* L. by high resolution autoradiography. **Planta**, v. 154, p. 48–52, 1982.

FENG, J.X.; LIU, D.; PAN, Y.; GONG, W.; MA, L.G.; LUO, J.C.; DENG, X.W.; ZHU, Y.X.; An annotation update via cDNA sequence analysis and comprehensive profiling of developmental, hormonal or environmental responsiveness of the Arabidopsis AP2/EREBP transcription factor gene family. **Plant Molecular Biology**, v. 59, p. 853-868, 2005.

FENG, B.H.; HAN, Y.C.; XIAO, Y.Y.; KUANG, J.F.; FAN, Z.Q.; CHEN, J.Y.; LU, W.J. The banana fruit of transcription factor MaDof23 acts as a repressor and interacts with MaERF9 in regulating ripening-related genes. **Journal of experimental botany**, v, 67, p. 2263–2275, 2016.

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

FOREMAN, J.; DEMIDCHIK, V.; BOTHWELL, J.H.F.; MYLONA, P.; MIEDEMA, H.; TORRES, M.A.; LINSTEAD, P.; COSTA, S.; BROWNLEE, C.; JONES, J.D.G.; DAVIES, J.M. DOLAN, L. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. **Nature**, v. 422, p. 442-446, 2003.

FRANCK, C.M.; WESTERMANN1, J.; BÜRSSNER, S.; LENTZ1, R.; LITUIEV2, D.S.; BOISSON-DERNIER, A. The Protein Phosphatases ATUNIS1 and ATUNIS2 Regulate Cell Wall Integrity in Tip-growing Cells, **Plant Cell**, v. 30, p.1906 – 1923, 2018.

FROMMER, W.B.; LUDEWIG, U.; RENTSCH, D. Taking transgenic plants with a pinch of salt. **Science**, v. 285, p. 1222–1223, 1999.

FUJIMOTO, S.; MATSUNAGA, S.; YONEMURA, M.; UCHIYAMA, S.; AZUMA, T.; FUKUI, K. Identification of a novel plant MAR DNA binding protein localized on chromosomal surfaces. **Plant Molecular Biology**, v. 56, p. 225–239, 2004.

FUKUDA, H.; HIGASHIYAMA, T. Diverse functions of plant peptides: entering a new phase. **Plant cell Physiology**, v. 52, p. 1-4, 2011.

GAMBLE, R.L.; COONFIELD, M.L.; SCHALLER, G.E. Histidine kinase activity of the ETR1 ethylene receptor from *Arabidopsis*. **PNAS**, v, 95, p. 7825–7829, 1998.

GE, Z.; BERGONCI, T.; ZHAO, Y.; ZOU, Y.; DU, S.; LIU, M. C.; LUO, X.; RUAN, H.; GARCIA-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, p. 1596–1600, 2017.

GE, Z.; CHEUNG, A. Y.; QU, L. J. Pollen tube integrity regulation in flowering plants: insights from molecular assemblies on the pollen tube surface. **New Phytologist**, v. 222, p. 6876–693, 2019.

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

GHIM, C.M.; LEE, S.K.; TAKAYAMA, S.; MITCHELL, R.J. The art of reporter proteins in science: past, present and future applications. **BMB Reports**, v. 43, p. 451-60, 2010.

GJETTING, S.K.; MAHMOOD, K.; SHABALA, L.; KRISTENSEN, A.; SHABALA, S.; PALMGREN, M.; FUGLSANG, A.T. Evidence for multiple receptors mediating RALF-triggered Ca<sup>2+</sup> signaling and proton pump inhibition. **Plant Journal**, 2020.

GOMEZ, B.; DAVIERO-GOMEZ, V.; COIFFARD, C.; MARTÍN-CLOSAS, C.; DILCHER, D. L. Montsechia, an ancient aquatic angiosperm **PNAS**, v. 112, p. 10985–10988, 2015.

GONG, W.; SHEN, Y.P.; MA, L.G.; PAN, Y.; DU, Y.L.; WANG, D.H.; YANG, J.Y.; HU, L.D.; LIU, X.F.; DONG, C.X.; MA, L.; CHEN, Y.H.; YANG, X.Y.; GAO, Y.; ZHU, D.; TAN, X.; MU, J.Y.; ZHANG, D.B.; LIU, Y.L.; DINESH-KUMAR, S.P.; LI, Y.; WANG, X.P.; GU, H.Y.; QU, L.J.; BAI, S.N.; LU, Y.T.; LI, J.Y.; ZHAO, J.D.; ZUO, J.; HUANG, H.; DENG, X.W.; ZHU, Y.X. Genome-wide ORFeome cloning and analysis of Arabidopsis transcription factor genes. **Plant Physiology**, v. 135, p. 773-82, 2004.

GONNEAU, M.; DESPREZ, T.; MARTIN, M.; DOBLAS, V. G.; BACETE, L.; MIART, F.; SORMANI, R.; HEMATY, K.; RENOU, J.; LANDREIN, B.; MURPHY, E.; VAN DE COTTE, B.; 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.

GRISAR, T.; LAKAYE, B.; DE NIJS, L.J.; LoTURCO, A.; DAGA, A.V.; DELGADO-ESCUETA. Myoclonin1/EFHC1 in cell division, neuroblast migration, synapse/dendrite formation in juvenile myoclonic epilepsy. In: NOEBELS; J.L.; AVOLI, M.; ROGAWSKI, M.A.; W.; OLSEN, A.V DELGADO-ESCUETA. BETHESDA (MD): National Center for Biotechnolog editors. **Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies.** 4<sup>th</sup> edition. Bethesda (MD) National Center for Biotechnology Information, 2012.

GUTTERSON, N.; REUBER, T.L. Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. **Current Opinion Plant Biology**, v. 7, p. 465-471, 2004.

HALL, A. E.; CHEN, Q. G.; FINDELL, J. L.; SCHALLER, G. E.; BLEECKER, A. B. The relationship between ethylene binding and dominant insensitivity conferred by mutant forms of the ETR1 ethylene receptor. **Plant Physiology**, v. 121, p. 291–300, 1999.

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**, 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 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.

HEIM, M.A.; JAKOBY, M.; WERBER, M.; MARTIN, C.; WEISSHAAR, B.; BAILEY, P.C. The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. **Molecular Biology Evolution**, v. 20, p. 735-747, 2003.

HEMM, M.R.; HERRMANN, K.M.; CHAPPLE, C. AtMYB4: a transcription factor general in the battle against UV. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 135-136, 2001.

HERATH, V. Small family, big impact: In sílico analysis of DREB2 transcription factor family in rice. **Computational Biology and Chemistry**, v. 65, p. 128-139, 2016.

HILTON, I.B.; D'IPPOLITO, A.M.; VOCKLEY, C.M.; THAKORE, P.i.; CRAWFORD, G.E.; REDDY, T.E.; GERSBACH, C.A. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. **Nature biotechnology**, v. 33, p. 510–517, 2015.

HINDERHOFER, K.; ZENTGRAF, U. Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence. **Planta**, v. 52, p. 213:469-473, 2001.

HÖFTE, H. The Yin and Yang of Cell Wall Integrity Control: Brassinosteroid and FERONIA Signaling. **Plant Cell Physiology**, v. 56, p. 224-231, 2015.

HOLMES, P.; GOFFARD, N.; WEILLER, G. F.; ROLFE, B. G.; IMIN, N. Transcriptional profiling *Medicago truncatula* meristematic root cells. **BMC Plant Biology**, v.8, p. 11-22, 2008.

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

HOLZWART, E.; HUERTA, A.I.; GLÖCKNER, N.; GARNELO GÓMEZ, B.; WANKE, F.; AUGUSTIN, S.; ASKANI, J.C.; SCHÜRHOLZ, A-K.; HARTER, K.; WOLF, S. BRI1 controls vascular cell fate in the Arabidopsis root through RLP44 and phytosulfokine signaling. **PNAS**, v. 115, p. 11838–11843, 2018.

HOTHORN, M.;, BELKHADIR, Y.; DREUX, M.; DABI, T.; NOEL, J.P.; WILSON, I.A.; CHORY, J. Structural basis of steroid hormone perception by the receptor kinase BRI1. **Nature**, v. 474, p. 467–471, 2011.

HUA, J.; CHANG, C.; SUN, Q.; MEYEROWITZ, E.M. Ethylene insensitivity conferred by Arabidopsis ERS gene. Science, v,269, p. 1712–1714, 1995.

HUA, J.; SAKAI, H.; NOURIZADEH, S.; CHEN, Q.G.; BLEECKER, A.B.; ECKER, J.R.; MEYEROWITZ, E.M. *EIN4* and *ERS2* are members of the putative ethylene receptor gene family in Arabidopsis. **Plant Cell**, v. 10, p. 1321–1332, 1998.

HUCK, N.; MOORE, J. M.; FEDERER, M.; GROSSNIKLAUS, U. The Arabidopsis mutant feronia disrupts the female gametophytic control of pollen tube reception. **Development**, v. 130, p. 2149–2159, 2003.

HUFFAKER, A.; PEARCE, G.; RYAN, C. A. An endogenous peptide signal in Arabidopsis activates components of the innate immune response. **PNAS**, v. 103, p. 10098–10103, 2006.

HUFFORD, M.B.; XU, X.; VAN-HEERWAARDEN, J.; PYHÄJÄRVI, T.; CHIA, J.M.; CARTWRIGHT, R.A.; ELSHIRE, R.J.; GLAUBITZ, J.C.; GUILL, K.E.; KAEPPLER, S.M.; LAI, J.; MORRELL, P.L.; SHANNON, L.M.; SONG, C.; SPRINGER, N.M.; SWANSON-WAGNER, R.A.; TIFFIN, P.; WANG, J.; ZHANG, G.; DOEBLEY, J.; MCMULLEN, M.D.; WARE, D.; BUCKLER, E.S.; YANG, S. ROSS-IBARRA, J. Comparative population genomics of maize domestication and improvement. **Nature genetics**, v. 44, p. 808–811, 2012.

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

IGARASHI, D.; TSUDA, K.; KATAGIRI, F. The peptide growth factor, phytosulfokine, attenuates pattern-triggered immunity. **Plant Journal**, v. 71, p. 194–204, 2012.

JACINTO, T.; MCGURL, B.; FRANCESCHI, V.; DELANO-FREIER, J.; RYAN, C. A. Tomato prosystemin promoter confers wound-inducible, vascular bundle-specific expression of the  $\beta$ -glucuronidase gene in transgenic tomato plants. **Planta**, v. 203, p. 406–412, 1997.

JAFFE, L.F. Calcium explosions as triggers of development. Annals of the New York Academy of Sciences. v. 339, p. 86–101, 1980.

JIA, Q.S.; ZHU, J.; XU, X.F.; LOU, Y.; ZHANG, Z.L.; ZHANG, Z.P.; YANG, Z.N. Arabidopsis AT-hook protein TEK positively regulates the expression of arabinogalactan proteins for Nexine formation. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, p. 251–260, 2015.

JIN, H.; MARTIN, C. Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. **Plant Molecular Biology**, v. 41, p. 577-585, 1999.

JU, C.; YOON, G.M.; SHEMANSKY, J.M.; LIN, D.Y.; YING, Z.I.; CHANG, J.; GARRETT, W.M.; KESSENBROCK, M.; GROTH, G.; TUCKER, M.L.; COOPER, B.; KIEBER, J.J.; CHANG, C. CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signalling from the ER membrane to the nucleus in *Arabidopsis*. **PNAS**, v. 109, p. 19486–19491, 2012.

JUNG, H.; KIM, J-K.; HÁ, S-H. Use of animal viral internal ribosome entry site sequence makes multiple truncated transcripts without mediating polycistronic expression in rice. Journal of the Korean Society Applied Biological Chemistry, v. 54, p. 678–684, 2011.

JUVEN-GERSHON, T.; KADONAGA, J.T. Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. **Developmental biology**, v. 339, p. 225–229, 2010.

KARIMI, M.; DEPICKER, A.; HILSON, P. Recombinational cloning with plant gateway vectors. **Plant Physiology**, v. 145, p. 1144-1154, 2007.

KANG, H. G.; SINGH, K. B. Characterization of salicylic acid-responsive, arabidopsis Dof domain proteins: overexpression of OBP3 leads to growth defects. **The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology**, v. 21, p. 329–339, 2000.

KATO, M.; HATA, N.; BANERJEE, N.; FUTCHER, B.; ZHANG, M.Q. Identifying combinatorial regulation of transcription factors and binding motifs. **Genome Biology**, v. 5, p. R56, 2004.

KATSIR, L.; DAVIES, K.A.; BERGMANN, D.C.; LAUX, T. Peptide signaling in plant development. **Current Biology**, v. 21, p. 356-364, 2011.

KENDE, H.; ZEEVAART, J.A.D. The five "classical" plant hormones. **The Plant Cell**, v. 9, p. 1197-1210, 1997.

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

KIM, S.H.; HONG, J. K.; LEE, S.C., SOHN, K.H.; JUNG, H.W.; HWANG, B.K. CAZFP1, Cys2/His2-type zinc-finger transcription factor gene functions as a pathogen-induced earlydefense gene in Capsicum annuum. **Plant molecular biology**, v. 55, p. 883–904, 2004.

KIM, T.H.; REN, B. Genome-wide analysis of protein-DNA interactions. Annual Review Genomics Human Genetics. 7, 81–102 (2006).

KINOSHITA, T.; CAÑO-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.

KOENIG, D.; JIMÉNEZ-GÓMEZ, J.M.; KIMURA, S.; FULOP, D.; CHITWOOD, D.H.; HEADLAND, L.R.; KUMAR, R.; COVINGTON, M.F.; DEVISETTY, U.K.; TAT, A.V.; TOHGE, T.; BOLGER, A.; SCHNEEBERGER, K.; OSSOWSKI, S.; LANZ, C.; XIONG, G.; TAYLOR-TEEPLES, M.; BRADY, S.M.; PAULY, M.; WEIGEL, D.; USADEL, B.; FERNIE, A.R.; PENG, J.; SINHA, N.R.; MALOOF, J.N. Comparative transcriptomics reveals patterns of selection in domesticated and wild tomato. **PNAS**, v. 110, p. 2655–2662, 2013.

KROL, E.; MENTZEL, T.; CHINCHILLA, D.; OLLER, T.; FELIX, G.; KEMMERLING, B.; POSTEL, S.; ARENTS, M.; EWORUTZKI, 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. **The Journal Biochemistry**, v. 285, p. 13471–13479, 2010.

KUBO, M.; UDAGAWA, M.; NISHIKUBO, N.; HORIGUCHI, G.; YAMAGUCHI, M.; ITO, J.; MIMURA, T.; FUKUDA, H.; DEMURA, T. Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. **Genes & Development**, v. 15, p. 1855-1860, 2005.

KUDLA, J.; BATISTIC, O.; HASHIMOTO, K. Calcium Signals: The lead currency of plant information Processing. **Plant Cell**, v. 22, p. 541-563, 2010.

KUDLA, J.; BECKER, D.; GRILL, E.; HEDRICH, R.; HIPPLER, M.; KUMMER, U.; PARNISKE, M.; ROMEIS, T.; SCHUMACHER, K. Advances and current challenges in calcium signaling. **New Phytologist**, v. 218, p. 414–431, 2018.

KUMAR H, KAWAI T, AKIRA S. Pathogen recognition by the innate immune system. **International Reviews of Immunology**, v. 30, p. 16–34, 2011.

KUO, M.H.; ALLIS, C.D. In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic protein: DNA associations in a chromatin environment. **Methods**, v. 19, p. 425–433, 1999.

KUTSCHMAR, A.; RZEWUSKI, G.; STÜHRWOHLDT, N.; BEEMSTER, G.T.; INZÉ, D.; SAUTER, M. PSK-α promotes root growth in Arabidopsis. **New Phytologist**, v. 181, p. 820–831, 2009.

LADWIG, F.; DAHLKE, RI.; STÜHRWOHLDT, N.; HARTMANN, J.; HARTER, K.; SAUTER, M. Phytosulfokine Regulates Growth in Arabidopsis through a Response Module at the Plasma Membrane That Includes CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED CHANNEL17, H+-ATPase, and BAK1. **Plant Cell**, v. 27, p. 1718-1729, 2015.

LAITY, J.H.; LEE, B.M.; WRIGHT, P.E. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity, **Current Opinion in Structural Biology**, v. 11, p. 39–46, 2001.

LAMPORT, D.T.A.; ANDVARNAI, P. Periplasmicarabinogalactan glycoproteins act as a calcium capacitor that regulates plant growth and development. **New Phytolist**, v. 197, p. 58–64, 2013.

LE, J.; VANDENBUSSCHE, F.; VAN DER STRAETEN, D.; VERBENEL, J. P. In the early response of Arabidopsis roots to ethylene, cell elongation is up-and down- regulated and uncoupled from differentiation. **Plant Physiology**, v. 125, p. 519-522, 2001.

LEE, K.; SEO, P.J. Coordination of matrix attachment and ATP-dependent chromatin remodeling regulate auxin biosynthesis and Arabidopsis hypocotyl elongation. **PLoS ONE**, v. 12, p. e0181804, 2017.

LEE, T.I.; YOUNG, R.A. Transcription of eukaryotic protein-coding genes, AnnualReview of Genetics, v. 34, p. 77–137, 2000.

LEUCCI, M.R.; LENUCCI, M.S.; PIRO, G.; DALESSANDRO, G. Water stress and cell wall polysaccharides in the apical root zone of wheat cultivars varying in drought tolerance. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 1168–1180, 2008.

LI, L.; LI, C.; LEE, G.I.; HOWE, G.A. Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. **PNAS**, v, 99, p. 6416–6421, 2002.

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

LI, J.; YUAN, J.; LI, M. Characterization of putative cis-regulatory elements in genes preferencially expressed in *Arabidopsis* male meiocytes. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-10, 2014.

LI, X.Z.; ROY, C.K.; DONG, X.; BOLCUN-FILAS, E.; WANG, J.; HAN, B.W.; XU, J.; MOORE, M.J.; SCHIMENTI, J.C.; WENG, Z.; ZAMORE, P.D. An ancient transcription factor initiates the burst of piRNA production during early meiosis in mouse testes. **Molecular Cell**, v.11, p. 67-81, 2013.

LI, W.; HALLING, D.B.; HALL, A.W.; ALDRICH, R.W. EF hands at the N-lobe of calmodulin are required for both SK channel gating and stable SK–calmodulin interaction. **The Journal of general physiology**, v. 134, p. 281–293, 2009.

LI, C.; YEH, F. L.; CHEUNG, A. Y.; DUAN, Q.; KITA, D.; LIU, M. C.; MAMAN, J.; LUU, E.J.; WU, B. W.; GATES, L.; JALAL, M.; KWONG, A.; CARPENTER, H.; WU, H. M. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins as chaperones and co-receptors for FERONIA receptor kinase signaling in Arabidopsis. **eLife**, v. 4, p. 06587, 2015.

LIANG, X.; ABEL, S.; KELLER, J.A.; SHEN, N.F.; THEOLOGIS, A. The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of Arabidopsis thaliana. **PNAS**, v. 89, p. 11046–11050, 1992.

LIANG, X.; OONO, Y.; SHEN, N.F.; KOHLER, C.; LI, K. Characterization of two members (ACS1 and ACS3) of the 1- aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of Arabidopsis thaliana. **Gene**, v. 167, p. 17–24, 1995.

LIN, Z.; ZHONG, S.; GRIERSON, D. Recent advances in ethylene research. Journal **Experimental Botany**, v. 60, p. 3311–3336, 2009.

LINDNER, H.; MÜLLER, L.M.; BOISSON-DERNIER, A.; GROSSNIKLAUS, U. CrRLK1L receptor-like kinases: not just another brick in the wall. **Current opinion plant biology**, v. 15, p. 659-669, 2012.

LIU, J.; MEHDI, S.; TOPPING, J.; FRIML, J.; LINDSEY, K. Interaction of PLS and PIN and hormonal crosstalk in Arabidopsis root development. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 1-8, 2013.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. 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.

LOKDARSHI, A.; CONNER, W. C.; MCCLINTOCK, C.; LI, T.; ROBERTS, D. M. Arabidopsis CML38, a Calcium Sensor That Localizes to Ribonucleoprotein Complexes under Hypoxia Stress. **Plant physiology**, v. 170, p. 1046–1059, 2016.

LORBIECKE, R.; SAUTER, M. Comparative analysis of PSK peptide growth factor precursor homologs. **Plant Science**, v. 163, p. 321-332, 2002.

LU, H.; ZOU, Y.; FENG, N. Overexpression of AHL20 negatively regulates defenses in Arabidopsis. Journal of Integrative Plant Biology, v. 52, p. 801–808, 2010.

LUO, X.; DEAN, D.C. Chromatin remodeling and transcriptional regulation. Journal of the National Cancer Institute, v. 91, p. 1288–1294, 1999.

LUO, X.; BAI, X.; ZHU, D.; LI, Y.; JI, W.; CAI, H.; WU, J.; LIU, B.; ZHU, Y. GsZFP1, a new Cys2/His2-type zinc-finger protein, is a positive regulator of plant tolerance to cold and drought stress. **Planta**, v. 235, p. 1141–1155, 2012.

LUSCOMBE, N.M.; AUSTIN, S.E.; BERMAN, H.M.; Thornton JM. An overview of the structures of protein-DNA complexes. **Genome Biology**, v. 1, 2000.

MA, J.; LI, M.Y.; WANG, F.; TANG, J.; XIONG, A.S. Genome-wide analysis of Dof family transcription factors and their responses to abiotic stresses in Chinese cabbage. **BMC Genomics**, v. 16, 2015.

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**, v. 70, p. 603–616, 2009.

MAO, D.; YU, F.; LI, J.; POEL, B.V.; TAN, D.; LI, J.; LIU, Y.; LI, X.; DONG, M.; CHEN, L.; LI, D.; LUAN, S. FERONIA Receptor Kinase Interacts with *S*-adenosylmethionine Synthetase and Suppresses *S*-adenosylmethionine Production and Ethylene Biosynthesis in *Arabidopsis1*. **Plant Cell Environment**, 10.1111/pce.12570, 2015.

MASACHIS, S.; SEGORBE, D.; TURRÀ, D.; LEON-RUIZ, M.; FÜRST, U.; El GHALID, M.; LEONARD, G.; LÒPEZ-BERGES, M. S.; RICHARDS, T.A; FELIX, G.; DI PIETRO, A. A fungal pathogen secrets plant alkalinizing peptide to increase infection. **Nature Microbiology**, v. 1, p. 21-30, 2016.

MATOS, J.L.; FIORI, C.S.; SLVA-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**, v. 582, p. 3343-3347, 2008.

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

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**, 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. **PNAS**, v. 93, p. 7623-7627, 1996.

MATSUBAYASHI, Y.; SAKAGAMI, Y. Peptide hormones in plants. Annual Review of Plant Biology, v. 57 p. 649-674, 2006.

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

McCORMACK, E.; BRAAM, J. Calmodulins and related potential calcium sensors of Arabidopsis. **New Phytologist**, v. 159, p. 275-294, 2003.

McCORMACK, E.; TSAI, Y. C.; BRAAM, J. Handling calcium signaling Arabidopsis CaMs and CMLs. **Trends Plant Science**, Kidlingdon, v. 10, p. 383-389, 2005.

MCGURL, B.; PEARCE, G.; OROZCO-CARDENAS, M.; RYAN, C. A. Structure, expression, and antisense inhibition of the systemin precursor gene. **Science**, v. 255, p. 1570-1573, 1992.

MCQUEEN-MASON, S.J.; COSGROVE, D.J. "Expansin mode of action on cell walls. Analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding". **Plant Physiology**, v. 107, p. 87–100, 1995.

MECCHIA, M.A.; SANTOS-FERNANDEZ, G.; DUSS, N.N.; SOMOZA, BOISSON-DERNIER, S.C.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. 1600 – 1603, 2017.

MEYER, R.S.; PURUGGANAN, M.D. Evolution of crop species: genetics of domestication and diversification. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, p. 840–852, 2013.

MILLER, G.; SHULAEV, V.; MITTLER, R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. **Plant Physiology**, v. 133, p. 481–489, 2008.

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.

MIYAZAKI, J.H.; YANG, S.F. The methionine salvage pathway in relation to ethylene and polyamine biosynthesis. **Plant Physiology**, v. 69, p. 366–370, 1987.

MOHANTA, T.K.; KUMAR, P.; BAE, H. Genomics and evolutionary aspect of calcium signaling event in calmodulin and calmodulin-like proteins in plants. **BMC Plant Biology**, v. 17, p. 38, 2017.

MONSHAUSEN, G.B.; BIBIKOVA, T.N.; MESSERLI, M.A.; SHI, C.; GILROY, S. Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of Arabidopsis root hairs. **PNAS**, v. 104, p. 20996–21001, 2007.

MONTOYA, T.; NOMURA, T.; FARRAR, K.; KANETA, T.; YOKOTA, T.; BISHOP, G. J. Cloning the tomato curl3 gene highlights the putative dual role of the leucine-rich repeat receptor kinase tBRI1/SR160 in plant steroid hormone and peptide hormone signaling. **Plant Cell**, v. 14, p. 3163–3176, 2002.

MORATO DO CANTO, A. M.; CECILIATO, P. H. O.; RIBEIRO, B.; MOREA, F. A. O.; 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.

MOSHER, S.; KEMMERLING, B. PSKR1 and PSY1R-mediated regulation of plant defense responses. **Plant Signal Behavior**, v. 8, p. e24119, 2013.

MOURA, D.S.; SILVA-FILHO, M.C. Plant peptide hormone, from defense to pollen selfincompatibility, 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 Book, 2006. p. 203-209.

MOUSSU, S.; BROYART, C.; SANTOS-FERNANDEZ, G.; AUGUSTIN, S.; WEHRLE, S.; GROSSNIKLAUS, U.; SANTIAGO, J. Structural basis for recognition of RALF peptides by LRX proteins during pollen tube growth. **PNAS**, v. 117, p. 7494-7503, 2020.

MOYEN, C.; JOHANNES, E. Systemin transiently depolarizes the tomato mesophyll cell membrane and antagonizes fusicoccin-induced extracellular acidification of mesophyll tissue. **Plant, Cell and Environment**, v. 19, p. 464–470, 1996.

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

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

NAGANO, Y., INABA, T., FURUHASHI, H. AND SASAKI, Y. Trihelix DNA-binding protein with specificities for two distinct cis-elements: both important for light downregulated and dark-inducible gene expression in higher plants, **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 22238–22243, 2001.

NARVÁEZ-VÁSQUEZ, J.; RYAN, C.A. The cellular localization of prosystemin: a functional role for phloem parenchyma in systemic wound signaling. **Planta**, v. 218, p. 360–369, 2004.

NEGRINI, F.; O'GRADY, K.; HYVÖNEN, M.; FOLTA, K.M.; BARALDI, E. Genomic structure and transcript analysis of the Rapid Alkalinization Factor (RALF) gene family during host-pathogen crosstalk in Fragaria vesca and Fragaria x ananassa strawberry. **PloS One**, v. 15, p. e0226448, 2020.

NEURATH, H. Proteolytic processing and physiological regulation. Trends Biochemistry. Science, v.14, p. 268-271, 1989.

NI, M.; DEHESH, K.; TEPPERMAN, J.M.; QUAIL, P.H. GT-2: in vivo transcriptional activation activity and definition of novel twin DNA binding domains with reciprocal target sequence selectivity, **Plant Cell**, v. 8, p. 1041–1059, 1996.

NIITSU; A.L. A inibição da expansão celular causada pelo peptídeo AtRALF1 é dependente de etileno. 2016. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – USP, Esalq, Piracicaba, 2016.

NISSEN, K.S.; WILLATS, W.G.T.; MALINOVSKY F.G. Understanding CrRLK1L function: cell walls and growth control. **Trends Plant Science**, v. 21, p. 516-527, 2016.

NOGUERO, M.; ATIF, R.M.; OCHATT, S.; THOMPSON, R.D. The role of the DNAbinding One Zinc Finger (DOF) transcription factor family in plants. **Plant Science**, v. 209, p. 32–45, 2013.

OH, M.H.; KIM, H.S.; WU, X.; CLOUSE, S.D.; ZIELINSKI, R.E.; HUBER, S.C. Calcium/calmodulin inhibition of the arabidopsis brassinosteroid-insensitive 1 receptor kinase provides a possible link between calcium and brassinosteroid signalling. **Biochemistry** Journal, v. 443, p. 515–523, 2012.

OROZCO-CARDENAS, M.; RYAN, C. A. Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. **PNAS**, v, 96, p. 6553-6557, 1999.

OSLEN, A. N.; MUNDY, J.; SKRIVER, K. Peptomics, identification of novel cationic Arabidopsis peptides with conserved sequence motif. **In silico Biology**, 4, p. 441-451, 2002.

PAIK, I.; KATHARE, P.K.; KIM, J.I.; AND HUQ, E. Expanding roles of PIFs in signal integration from multiple processes. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, p. 1035–1046, 2017.

PAPI, M.; SABATINI, S.; BOUCHEZ, D.; CAMILLERI, C.; COSTANTINO, P.; VITTORIOSO, P. Identification and disruption of an Arabidopsis zinc finger gene controlling seed germination. **Genes & development**, v. 14, p. 28–33, 2000.

PEARCE, G.; MOURA, D.S.; STRATMANN, J.; RYAN, C. A. Jr.; RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development. **PNAS**, v. 98, p. 12843–12847, 2001.

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

PEARCE, G.; RYAN, C. A. Systemic signaling in tomato plants for defense against herbivores. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 30044-30050, 2003.

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

PEARCE, G.; YAMAGUCHI, Y.; MUNSKE, G.; RYAN, C. A. Structure-activity studies of RALF, rapid alkalization factor, reveals an essential – YISY – motif. **Peptides**, v. 31, p. 1973-1977, 2010.

PEARCE, G.; YAMAGUCHI, Y.; MUNSKE, G.; RYAN, C. A. Structure-activity studies of AtPep1, a plant peptide signal involved in the innate immune response. **Peptides,** v. 29, p. 2083-2089, 2008.

PEISER, G.D.; WANG, T.T.; HOFFMAN, N.E.; YANG, S.F.; LIU, H.W.; WALSH, CT. Formation of cyanide from carbon 1 of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid during its conversion to ethylene. **PNAS**, v. 81, p. 3059-3063, 1984.

PELLOUX, J.; RUSTÉRUCCI, C.; MELLEROWICZ, E.J. New insights into pectin methylesterase structure and function. **Trends in Plant Science**, v. 12, p. 267–277, 2007.

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

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

PHILLIPS, T.; HOOPES, L. Transcription factors and transcriptional control in eukaryotic cells. **Nature Educational**, v, 1, p.119, 2008.

PIERIK, R.; THOLEN, D.; POORTER, H.; VISSER, E. J.; VOESENEK, L. A. The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. **Trends Plant Science**, v. 11, p. 176–183, 2006.

PIRO, G.; LEUCCI, M.R.; WALDRON, K.; DALESSANDRO, G. Exposure to water stress causes changes in the biosynthesis of cell wall polysaccharides in roots of wheat cultivars varying in drought tolerance. **Plant Science**, v. 165, p. 559–569, 2003.

QI, Z.; VERMA, R.; GEHRING, C.; YAMAGUCHI, Y.; ZHAO, Y.; RYAN, C. A.; BERKOWITZ, G. A. Ca<sup>2+</sup> signaling by plant *Arabidopsis thaliana* Pep peptides depends on AtPepR1, a receptor with guanylyl cyclase activity, and cGMP-activated Ca<sup>2+</sup> channels. **PNAS**, v. 107, p. 21193-21198, 2010.

QIAO, H.; SHEN, Z.S.; HUANG, C.; 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

RAYLE, D.L.; CLELAND, R.E. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. **Plant Physiology**, v. 99, p. 1271–1274, 1992.

REDDY, V.S; ALI, S.G.; REDDY, A.S.N. Genes encoding calmodulin-binding proteins in the *Arabidopsis* genome. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 277, p. 9840-9852, 2002.

RIECHMANN, J. L.; HEARD, J; MARTIN G.; REUBER, L.; JIANG, C.-Z; KEDDIE, J.; ADAM, L.; PINEDA, 0.; RATCLIFFE, 0. J.; SAMAHA, R. R.; CREELMAN, R.; PILGRIM, M.; BROUN, P.; ZHANG, J. Z.; GHANDEHARI, D.; SHERMAN, B. K.; YU, G-L. *Arabidopsis* Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes. **Science**, v. 290, p. 2105-2110, 2000.

ROBATZEK, S.; SOMSSICH, I.E. A new member of the Arabidopsis WRKY transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence- and defence-related processes. **Plant Journal**, v. 28, p. 123-133, 2001.

RODIUC, N.; BARLET, X.; HOK, S.; PERFUS-BARBEOCH, L.; ALLASIA, V.; ENGLER, G.; SÉASSAU, A.; MARTEU, N.; ALMEIDA-ENGLER, J.; PANABIÈRES, F.; ABAD, P.; KEMMERLING, B.; MARCO, Y.; FAVERY, B.; KELLER, H. Evolutionarily distant pathogens require the Arabidopsis phytosulfokine signaling pathway to establish disease. **Plant Cell Environment**, v. 39, p. 1396–1407, 2016.

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. **Plant Cell**, v. 14, p. 969-977, 2002).

ROTMAN, N.; ROZIER, F.; BOAVIDA, L.; DUMAS, C.; BERGER, F.; FAURE, J. E. Female control of male gamete delivery during fertilization in Arabidopsis thaliana. **Current Biology**, v. 13, p. 432–436, 2003.

RUSHTON, P.J.; SOMSSICH, I.E. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. **Current Opinion Plant Biology**, v. 1, p. 311-315, 1998.

RYAN, C. A. Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 28, p. 425-449, 1990.

RYAN, C. A. THE DISCOVERY OF SYSTEMIN. In: KUNG, D.; YANG, S-F. Discoveries in Plant Biology, World Scientific Press, p. 175-188, 1998.

RYAN, C. A. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1477, p. 112-121, 2000.

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

RYAN, C. A.; MOURA, D. S. Systemic wound signaling in plants: A new perception **PNAS**, v, 99, p. 6519-6520, 2002.

RYAN, C. A.; NARVÁEZ-VÁSQUEZ, J. The cellular localization of prosystemin: a functional role for phloem parenchyma in systemic wound signaling. **Planta**, v. 218, p. 360–369, 2004

RYAN, C. A.; PEARCE, G.; MOURA, D. S.; SCHEER, J. Polypeptide hormones. Plant Cell, v. 14, p. 251–264, 2002.

SAKAI, H.; HUA, J.; CHEN, Q.G.; CHANG, C.; MEDRANO, L.J.; BLEECKER, A.B.; MEYEROWITZ, E.M. *ETR2* is an *ETR1*-like gene involved in ethylene signaling in *Arabidopsis*. **PNAS**, v. 95, p. 5812–5817, 1998.

SANDERS, D.; BROWNLEE, C.; HARPER, J.F. Communicating with Calcium. **Plant Cell**, v. 11, p. 691-706, 1999.

SAUTER, M. Phytosulfokine peptide signalling. Journal Experimental Botany, v. 66, p. 5161-5169, 2015.

SCHALLER, G. E. Ethylene and the regulation of plant development. **BMC Biology**, v, 10, 2012.

SCHMID, M.; DAVISON, T.S.; HENZ, S.R.; PAPE, U.J.; DEMAR, M.; VINGRON, M.; SCHOLKOPF, B.; WEIGEL, D.; LOHMANN, J.U. A gene expression map of Arabidopsis thaliana development. **Nature Genetics**, v. 37, p. 501-506, 2005.

SCHEER, J.M.; PEARCE. G.; RYAN, C.A. LeRALF, a plant peptide that regulates root grown and development, specifically binds to 25 and 120kDa cells surface membrane proteins of *Lycopersicon peruvianium*. **Planta**, 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. **PNAS**, v. 99, p. 9585–9590, 2002.

SCHILMILLER, A. L.; HOWE, G. A. Systemic signaling in the wound response. Current **Opinion in Plant Biology**, v. 8, p. 369-377, 2005.

SCOTT, M.P. Cell, Development: The Natural History of Genes. Cell Press, V. 100, p. 27–40, 2000.

SHARMA, A.; HUSSAIN, A.; MUN, B-G.; IMRAN, Q.M.; FALAK, N.; LEE, S-U.; KIM, J.Y.; HONG, J.K.; LOAKE, G.J.; ALI, A.; YUN, B-W. Compreensive analysis of plant rapid alkalinization factor (RALF) genes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 106, p. 82-90, 2016.

SHIN, J.; KIM, K.; KANG, H.; ZULFUGAROV, I.S.; BAE, G.; LEE, C.H.; LEE, D.; CHOI, G. Phytochromes promote seedling light responses by inhibiting four negatively-acting phytochrome-interacting factors. **PNAS**, v. 106, p. 7660–7665, 2009.

SHIGYO, M.; MITSUYASU, H.; ITO, M. Molecular evolution of the AP2 subfamily. Gene, v. 366, p. 256-265, 2006.

SHIU, S. H.; BLEECKER, A. B. Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. **PNAS**, v. 98, p. 10763–10768, 2001.

SHIU, S-H.; SHIH, M-C.; LI, W-H. Transcription Factor Families Have Much Higher Expansion Rates in Plants than in Animals. **Plant Physiology**, v. 139, p. 18-26, 2005.

SISTRUNK, M. ANTOSIEWICZ, D.M.; PURUGGANAN, M.M.; BRAAM, J. Arabidopsis TCH3 encodes a novel  $Ca^{2+}$  binding protein and shows environmentally induced and tissue specific regulation. **Plant Cell**, v. 6, p. 1553–1565, 1994.

SMALE, S.T.; KADONAGA, J.T. The RNA polymerase II core promoter. Annual review of biochemistry, v. 72, p. 449–479, 2003.

SNEDDEN, W.A.; FROMM, H. Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. **New Phytologist**, v. 151, p. 35–66, 2001.

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**, v. 12, p. 3703-3714, 1998.

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.

STEFFENSEN, D. M. A reconstruction of cell development in shoot apex of maize. American Journal of Botany, v. 55, p. 354-369, 1968.

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

STONE, B.A.; CLARKE, A.E. Chemistry and Biology of (1-3)- $\beta$ -D-Glucans. Victoria, Australia: La Trobe University Press, 1992.

STRATMANN, J.; RYAN, C. A. Myelin basic protein kinase activity in tomato leaves is induced systemically by wounding and increases in response to systemin and oligosaccharide elicitors. **PNAS**, v. 94, p. 11085-11089, 1997.

STÜHRWOHLDT, N.; DAHLKE, R.I.; STEFENS, B.; JOHNSON, A.; SAUTER, M. Phytosulfokine- $\alpha$  controls hypocotyl length and cell expansion in Arabidopsis thaliana through phytosulfokine receptor 1. **PLoS One**, v. 6, p. 21054, 2011.

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.

SUN, J.; MA, Q.; MAO, T. Ethylene regulates the Arabidopsis microtube-associated protein wave-dampened2-like5 in etiolated hypocotyls elongation. **Plant Physiology**, v. 169, p. 325-337, 2015.

SUSSMAN, H. Choosing the best reporter's assay. The scientist, v. 15, p. 25-32, 2001.

TANG, D.; KANG, R.; COYNE, C.B.; ZEH, H.J.; LOTZE, M.T. PAMPs and DAMPs: signal 0 s that spur autophagy and immunity. **Immunol Review**, v. 249, p. 158–75, 2012.

TANG, D.; KANG, R.; COYNE, C.B.; ZEH, H.J.; LOTZE, M.T. PAMPs and DAMPs: signal 0 s that spur autophagy and immunity. **Immunol Review**, v. 249, p. 158–75, 2012.

TANG, J.; HAN, Z.; SUN, Y.; ZHANG, H.; GONG, X.; CHAI, J. Structural basis for recognition of an endogenous peptide by the plant receptor kinase PEPR1. **Cell Research**, v. 25, p. 110–120, 2015.

THAKORE, P.I.; D'IPPOLITO, A.M.; SONG, L.; SAFI, A.; SHIVAKUMAR, N.K.; KABADI, A.M.; REDDY, T.E.; CRAWFORD, G.E.; GERSBACH, C.A. Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements. **Nature methods**, v. 12, p. 1143–1149, 2015.

THIELE, K.; WANNER, G.; KINDZIERSKI, V.; JÜRGENS, G.; MAYER, U.; PACHL, F.; ASSAAD, F.F. The timely deposition of callose is essential for cytokinesis in Arabidopsis. **The Plant Journal,** v. 58, p. 13–26, 2009.

THIRUGNANASAMBANTHAM, K.; DURAIRAJ, S.; SARAVANAN, S.; KARIKALAN, K.; MURALIDARAN, S.; ISLAM, V.I.H. Role of Ethylene Response Transcription Factor (ERF) and Its Regulation in Response to Stress Encountered by Plants. **Plant Molecular Biology**, v. 33, p. 347–357, 2015.

THYNNE, E., SAUR, I., SIMBAQUEBA, J., OGILVIE, H. A., GONZALEZ-CENDALES, Y., MEAD, O., TARANTO, A., CATANZARITI, A. M., MCDONALD, M. C., SCHWESSINGER, B., JONES, D. A., RATHJEN, J. P., & SOLOMON, P. S. Fungal phytopathogens encode functional homologues of plant rapid alkalinization factor (RALF) peptides. **Molecular Plant Pathology**, v. 18, p. 811–824, 2017.

TOLEDO-ORTIZ, G.; HUQ, E.; QUAIL, P.H. The Arabidopsis basic/helixloop-helix transcription factor family. **Plant Cell**, v. 15, p. 1749-1770, 2003.

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.

VENTER, M.; BOTHA, F.C. Synthetic promoter engineering. In: PUA, E.C.; DAVEY, M.R. Plant developmental biology-biotechnological perspectives. **Springer**, p. 393–414, 2010.

VOGEL, H.J. Calmodulin: A versatile calcium mediator protein. **Biochemistry Cell Biology**, v. 72, p. 357–376, 1994.

WALEEV, T.; SHTOKALO, D.; KONOVALOVA, T.; VOSS, N.; CHEREMUSHKIN, E.; STEGMAIER, P.; KEL-MARGOULIS, O.; WINGENDER, E.; KEL, A. Composite Module Analyst: identification of transcription factor binding site combinations using genetic algorithm. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. W541–W545, 2006.

WANG, J.; LI, H.; HAN, Z.; ZHANG, H.; WANG, T.; LIN, G.; CHANG, J.; YANG, W.; CHAI, J. Allosteric receptor activation by the plant peptide hormone phytosulfokine. **Nature**, v. 525, p. 265-268, 2015.

WANG, L.; EINIG, E.; ALMEIDA-TRAPP, M.; ALBERT, M.; FLIEGMANN, J.; MITHÖFER, A.; KALBACHER, H.; FELIX, G. The systemin receptor SYR1 enhances resistance of tomato against herbivorous insects. **Nature Plants**, v. 4, p. 152-156, 2018.

WEI, Z.; YUAN, T.; TARKOWSKÁ, D.; KIM, J.; NAM, H.G.; NOVÁK, O.; HE, K.; GOU, X.; LI, J. Brassinosteroid biosynthesis is modulated via a transcription factor cascade of COG1, PIF4, and PIF5. **Plant Physiology**, v. 174, p. 1260–1273, 2017.

WEN, X.; ZHANG, C.; JI, Y.; ZHAO, Q.; HE, W.; AN, F.; JIANG, L.; GUO, H. Activation of ethylene signaling is mediated by nuclear translocation of the cleaved EIN2 carboxyl terminus. **Cell Research**, v. 22, p. 1613–1616, 2012.

WRAY, G.A.; HAHN, M.W.; ABOUHEIF, E.; BALHOFF, J.P.; PIZER, M.; ROCKMAN, M.V.; ROMANO, L.A. The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes. **Molecular Biology Evolution**, v. 20, p. 1377–1419, 2003.

WRIGGERS, W.; MEHLER, E.; PITICI, F.; WEINSTEIN, H.; SCHULTEN, K. Structure and dynamics of calmodulin in solution. **Biophysics Journal**, v. 74, p. 1622–1639, 1998.

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

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

WOLF, S.; VAN DER DOES, D.; LADWIG, F.; STICHT, C.; KOLBECK, A.; SCHÜRHOLZ, A.K.; AUGUSTIN, S.; KEINATH, N.; RAUSCH, T.; GREINER, S.; SCHUMACHER, K.; HARTER, K.; ZIPFEL, C.; HÖFTE, H. A receptor-like protein mediates the response to pectin modification by activating brassinosteroid signaling. **PNAS**, v. 111, p. 15261-15266, 2014.

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

WYMER, C.L.; BIBIKOVA, T.N.; GILROY, S. Cytoplasmic free calcium distributions during the development of root hairs of Arabidopsis thaliana. **Plant Journal**, v. 12, p. 427–439, 1997.

XIAO, Y.; STEGMANN, M.; HAN, Z.; DEFALCO, T. A.; PARYS, K.; XU, L.; BELKHADIR, Y.; ZIPFEL, C.; CHAI, J. Mechanisms of AtRALF peptide perception by a heterotypic receptor complex. **Nature**, v. 572, p. 270-274, 2019.

XIONG, Y.; LIU, T.; TIAN, C.; SUN, S.; LI, J.; CHEN, M. Transcription factors in rice: a genome-wide comparative analysis between monocots and eudicots. **Plant Molecular Biology**, v. 59, p. 191-203, 2005.

XU, Y.; GAN, E.S.; ITO, T. The AT-hook/PPC domain protein TEK negatively regulates floral repressors including MAF4 and MAF5. **Plant Signaling and Behavior**, v. 8, p. e25006, 2013.

XU, Z.; MA, J.; QU, C.; YANBO, HU.; HAO, B.; SUN, Y.; LIU, Z.; YANG, H.; YANG, C.; WANG, H.; LI, Y.; GUANJUN, L. Identification and expression analyses of the alanine aminotransferase (AlaAT) gene family in poplar seedlings. **Scientific Reports**, v. 7, p. 45933, 2017.

XU, G.; CHEN, W.; SONG, L.; CHEN, Q.; ZHANG, H.; LIAO, H.; ZHAO, G.; LIN, F.; ZHOU, H.; YU, F. FERONIA phosphorylates E3 ubiquitin ligase ATL6 to modulate the stability of 14-3-3 proteins in plant C/N responses. **Jounal Experimental Botany**, v. 70, p. 6375-6388, 2019.

YAMAGAMI, T.; TSUCHISAKA, A.; YAMADA, K.; HADDON, W.F.; HARDEN, L.A.; Biochemical diversity among the 1-aminocyclopropane- 1-carboxylate synthase isozymes encoded by the Arabidopsis gene family. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 49102–49112, 2003.

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. **PNAS**, v. 103, p. 10104–10109, 2006.

YANAGISAWA, S.; IZUI, K. Molecular cloning of two DNA-binding proteins of maize that are structurally different but interact with the same sequence motif. **Journal of Biological Chemistry**, v.268, p. 16028–16036, 1993.

YANAGISAWA, S. The dof family of plant transcription factors. **Trends plant science**, v. 7, p. 555–560, 2002.

YANAGISAWA, S. Dof domain proteins: plant-specific transcription factors associated with diverse phenomena unique to plants. **Plant cell physiology**, v. 45, p. 386–391, 2004.

YANG, T.; SEGAL, G.; ABBO, S.; FELDMAN, M.; FROMM, H. Characterization of the calmodulin gene family in wheat: structure, chromosomal location, and evolutionary aspects. **Molecular and General Genetics**, v. 252, p. 684–694, 1996.

YANG, H.; MATSUBAYASHI, Y.; NAKAMURA, K.; SAKAGAMI, Y. *Oryza sativa* PSK gene encodes a precursor of phytosulfokine-α, a sulfated peptide growth factor found in plants. **PNAS**, v. 96, p. 13560-13565, 1999.

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

YANG, L.; LIU, Z.; LU, F.; DONG, A.; HUANG, H. SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 47, p. 841–850, 2006.

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

YENNAWAR, N.H.; LI, L.C.; DUDZINSKI, D.M.; TABUCHI, A.; COSGROVE, D.J. "Crystal structure and activities of EXPB1 (Zea m. 1), a  $\beta$ -expansin and group-1 pollen allergen from maize". **PNAS**, v. 103, p. 14664–14671, 2006.

YU, Y.; ASSMANN, S.M. Inter-relationships between the heterotrimeric G $\beta$  subunit AGB1, the receptor-like kinase FERONIA, and AtRALF1 in salinity response. **Plant Cell Environment**, v. 41, p, 2475–2489, 2018.

ZHANG, G.Y.; WU, J.; WANG, X.W. Cloning and expression analysis of a pollen preferential rapid alkalinization factor gene, BoRALF, from broccoli flower. **Molecular Biology Reports**, v. 37, p. 3273-3281, 2010.

ZHANG, H.; HU, Z.; LEI, C.; ZHENG, C.; WANG, J.; SHAO, S.; LI, X.; XIA, X.; CAI, X.; ZHOU, J.; ZHOU, Y.; YU, J.; FOYER, C.H.; SHI, K. A plant phytosulfokine peptide initiates auxin-dependent immunity through cytosolic Ca2+ signaling in tomato. **Plant Cell**, v. 30, p. 652–667, 2018.

ZHANG, H.; JING, X.; CHEN, Y.; LIU, Z.; XIN, Y.; QIAO, Y. The Genome-Wide Analysis of RALF-Like Genes in Strawberry (Wild and Cultivated) and Five Other Plant Species (Rosaceae). **Genes**, v. 11, p. 174, 2020.

ZHAO, J.; FAVERO, D.S.; PENG, H.; NEFF, M.M. Arabidopsis thaliana AHL family modulates hypocotyl growth redundantly by interacting with each other via the PPC/DUF296 domain. **PNAS**, v. 110, p. E4688–E4697, 2013.

ZHOU, J.; WANG, X.; LEE, J.Y.; LEE, J.Y. Cell-to-cell movement of two interacting AT-hook factors in Arabidopsis root vascular tissue patterning. **Plant Cell**, v. 25, p. 187–201, 2013.

ZENG, H.; XU, L.; SINGH, A.; WANG, H.; DU, L.; POOVAIAH, B.W. Involvement of calmodulin and calmodulin-like proteins in plant responses to abiotic stresses. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p.600; 2015.

ZIELINSKI, R.E. Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants. Annuals Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, v. 49, p. 697-725, 1998.

ZOU, C.; SUN, K.; MACKALUSO, J.D.; SEDDON, A.E.; JIN, R.; THOMASHOW, M.F.; SHIU, S.H. Cis-regulatory code of stress-responsive transcription in Arabidopsis thaliana. **PNAS**, v. 108, p. 14992–14997, 2011.

## ANEXOS

## Anexo A - Ciclo de Yang.



Anexo B - Plantas Mutantes eto3 induzem a deposição de calose.



Iniciador	Sequência 5'->3'	Tamanho (pb)	% GC
FW1	CACCTCTTTAGTCTCTTTTTAAT	23	30,4
FW2	CACCTTTCTCGTTCTCTAGAATATT	25	36
FW3	CACCATAATCTTTCTTTCT	19	31,6
FW4	CACCAAGCGCCCACCGTTAAAAAT	24	50
RV0	GAGAGAAAAATAAATGGTTAAGTG	24	29,2
FW5	CACCAAGCGCCCACCGTTAAAAATCT	26	50
RV5	TTCGGGAAAGGGGATAAAGAGTAAGTGAAA	30	40
FW6	CACCTCATTTCAAAAGTAAAAACAAGACAAAAAAAAAAA	63	27
RV6	GAGAGAAAAATAAATGGTTAAGTGTATTTTTTGTTTGACTTGTTTTACTTTTGAAATGA	59	23,7

Anexo C -Iniciadores para amplificação dos fragmentos do promotor do gene CML38.

Anexo D – Vetor de entrada pENTR/D-TOPO. sistema Gateway com resistência a canamicina.



Anexo E – Vetor de destino pKGWFS7 (Invitrogen®). Sistema que possui as proteínas repórteres GFP e GUS.



Anexo F - Confirmação da presença dos fragmentos de CML38 por qPCR.



Anexo G – Seleção de plantas transformadas por *floral dip*. Plantas verdes foram devidamente transformadas e selecionadas em antibiótico Canamicina.



Anexo H – Plantas transformadas com o menor fragmento do promotor juntamente com uma planta controle transformada apenas com o vetor vazio.



Posição	Strand	Sequência	Gene	Família
43	+	TTATT	AHL25; AGF1	AT-Hook
46	-	TTTAT	AT1G19485	AT-Hook
46	-	TTTAT	AHL6	AT-Hook
47	-	TTATT	AT5G62260	AT-Hook
47	-	TTATT	AHL6	AT-Hook
46	-	TTTAT	AT4G21895	AT-Hook
46	-	TTTAT	AHL6	AT-Hook
46	-	TATTT	AT4G21895	AT-Hook
46	-	TATTT	AHL6	AT-Hook
45	-	TATTT	AT4G21895	AT-Hook
45	-	TATTT	AHL6	AT-Hook
28	+	AAAAT	AT4G21895	AT-Hook
28	+	AAAAT	AHL6	AT-Hook
34	+	ACACT	AT3G49930	C2H2
34	+	ACACT	AT3G60580	C2H2
34	+	ACACT	ATZAT6	C2H2
34	+	ACACT	AZF3	C2H2
34	+	ACACT	AZF2	C2H2
34	+	ACACT	AT1G02030	C2H2
34	+	ACACT	AT2G45120	C2H2
34	+	ACACT	AT3G49930	C2H2
34	+	ACACT	AT3G60580	C2H2
34	+	ACACT	ATZAT6	C2H2
34	+	ACACT	AZF3	C2H2
31	+	ACACT	ZAT7	C2H2
31	+	ACACT	AT2G28710	C2H2
31	+	ACACT	ZAT11	C2H2
31	+	ACACT	AT3G46070	C2H2
31	+	ACACT	AT3G46080	C2H2
6	+	AAAAG	DOF1.8	Dof
6	+	AAAAG	ADOF2	Dof
38	-	TAACC	GT-1	MADF ; Trihelix
39	+	TAACC	AT3G25990	MADF ; Trihelix
8	+	AAAGT	COG1	Dof
9	+	AAAGT	ATDOF2.4	Dof
9	+	AAAGT	DOF2	Dof
9	+	AAAGT	DOF6	Dof
9	+	AAAGT	CDF3	Dof
9	+	AAAGT	DOF4.7	Dof
9	+	AAAGT	CDF2	Dof
9	+	AAAGT	TMO6	Dof
9	+	AAAGT	OBP4	Dof

Anexo I - Sequências que são reconhecidas por Fatores transcricionais encontradas no promotor mínimo de CML38 em toda a planta.

9	+	AAAGT	DOF5.6; HCA2	Dof
9	+	AAAGT	DAG2	Dof
9	+	AAAGT	OBP2	Dof
9	+	AAAGT	AT1G21340	Dof
9	+	AAAGT	CDF6	Dof
9	+	AAAGT	AT1G47655	Dof
9	+	AAAGT	ADOF1; DOF1	Dof
9	+	AAAGT	CDF5	Dof
9	+	AAAGT	DOF PROTEIN 2.1	Dof
9	+	AAAGT	AT2G28810	Dof
9	+	AAAGT	CDF4,	Dof
9	+	AAAGT	DOF PROTEIN 3.4	Dof
9	+	AAAGT	OBP3	Dof
9	+	AAAGT	DAG1	Dof
9	+	AAAGT	COG1	Dof
9	+	AAAGT	ATDOF4.4	Dof
9	+	AAAGT	ATDOF4.5	Dof
9	+	AAAGT	AT4G24060	Dof
9	+	AAAGT	PEAR2	Dof
9	+	AAAGT	CDF1	Dof
9	+	AAAGT	SCAP1	Dof
9	+	AAAGT	ATDOF5.8	Dof
	+	АТСТА	RAP2.2 "NUCLEAR FACTOR Y, SUBUNIT B4" NF-	AP2; ERF
43	+	CCAAT	YB4 "NUCLEAR FACTOR Y, SUBUNIT A8", NF-	NF-YB
43	+	CCAAT	YA8	NF-YA
43	+	CCAAT	ATLEC1, EMB 212 "NUCLEAR FACTOR Y, SUBUNIT A7", NF-	NF-YB
43	+	CCAAT	YA7	NF-YA
43	+	CCAAT	FACTOR Y "NUCLEAR FACTOR Y, SUBLINIT C3" NF	NF-YA
43	+	CCAAT	YC3	NF-YC
				"NUCLEAR FACTOR Y, SUBUNIT C2", ATHAP5B, HAP5B,
43	+	CCAAT	HAP5B NUCLEAR	NF-YC2
43	+	CCAAT	FACTOR Y	NF-YA
43	+	CCAAT	FACTOR Y NUCLEAR	NF-YB
43	+	CUAAT	FACTOR Y	NF-YB
43	+	ССААТ	UNE8	NF-YA

12	1	ССААТ	NE VA6	NE VA
43	+	CCAAT	NF-1A0	
43	+	CCAAT	NF-IA9	NF-IA
43	+	CCAAT	NF-IDIU	NF-1D
43	+	CCAAT	NF-YB3	NF-YB
43	+	CCAAT	NF-YAIU	NF-YA
43	+	CCAAT	HAP2A	NF-YA
43	+	ССААТ	NF-YC8	NF-YC
43	+	ССААТ	NF-YC12	NF-YC
43	+	CCAAT	NF-YB2	NF-YB
43	+	CCAAT	NF-YB6; L1L	NF-YB
43	+	CCAAT	NF-YC7	NF-YC
43	+	CCAAT	NF-YC6	NF-YC
12	-	GTAAA	AT5G01380	Trihelix
39	-	TAACC	GT-1	MADF ; Trihelix
6	+	AAAAG	AT5G02460	Dof
C.			4772220010	D. C
6	+	AAAAG	A12G28810	Dof
7	_	AAAAG	OBP1	Dof
,			OBI I	201
2	+	AAAAG	ADOF1; DOF1	Dof
6	-	AAAAG	DOF4.7	Dof
5	-	AAAAG	AT1G47655	Dof
6	-	AAAAG	OBP3	Dof
6	-	AAAAG	AT1G29160	Dof
5	-	AAAGT	AT1G47655	Dof
13	-	GACAA	SGR5; ATIDD15	C2H2
13	+	GACAA	ATIDD4	C2H2
13	-	GACAA	ATIDD5	C2H2
13	-	GACAA	ENHYDROUS	C2H2
13	+	GACAA	ATIDD7, IDD7	C2H2
13	-	GACAA	MGP	C2H2
13	-	GACAA	AtIDD11;IDD11	C2H2
14	+	GACAA	SGR5; ATIDD15	C2H2
13	-	GACAA	JKD	C2H2
13	-	GACAA	AtIDD2;IDD2	C2H2
13	-	GACAA	AT5G66730	C2H2
13	+	GACAA	AT1G14580	C2H2
		0.10.14		
14	-	GACAA	AtIDD11;IDD11	C2H2
13	+	GACAA	MGP	C2H2
21				C0110
21	-	GACAA	AUDD3;IDD3	C2H2
13	-	GACAA	AT1G14580	C2H2
		-		

13	-	GACAA	AtIDD5	C2H2
13	+	GACAA	AtIDD2;IDD2	C2H2
6	+	AAAAG	AT5G63260	C3H Zinc finger
4	-	TTCAA		
7	+	AAAAG		
9	+	GTAAA	AT-GTL1	Trihelix
4	+	GTAAA	AT5G47660	MADF
9	+	GTAAA	AT-GTL1	Trihelix
6	-	GTAAA	GT2; AT-GT2	Trihelix
9	+	GTAAA	GT2; AT-GT2	Trihelix
9	+	GTAAA	AT1G76880	MADF; Trihelix
18	-	GACAA	AT3G45260	C2H2
2	-	TCAAA	SOL1	TCR; CPP
21	-	GACAA	AtIDD8;IDD8	C2H2