

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

Filogenia da família de peptídeos RALFs em tomateiro e caracterização do  
mutante do gene *SIRALF1* (*sralf1*)

**Mariana Antunes Leão**

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

Piracicaba  
2024

Mariana Antunes Leão  
Engenheira Agrônoma

**Filogenia da família de peptídeos RALFs em tomateiro e caracterização do mutante do gene *SIRALF1* (*slralf1*)**

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

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

Piracicaba  
2024

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

Leão, Mariana Antunes

Filogenia da família de peptídeos RALFs em tomateiro e caracterização do mutante do gene *SIRALF1 (slralf1)* / Mariana Antunes Leão. - - Piracicaba, 2024.

84 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. RALF 2. Peptídeos 3. Tomateiro 4. SIRALF 5. Filogenia  
I. Título

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Daniel Scherer de Moura, pela paciência, pelos ensinamentos, pelo apoio e pelos aconselhamentos.

Agradeço ao Antônio Francisco de Campos Amaral por todo apoio e aconselhamento.

Agradeço a todos os meus colegas do Laboratório de Bioquímica de Proteínas, em especial ao André Guilherme Daubermann dos Reis, por sempre me ajudar e estar disponível, ao Halisson Marques Silva por seu bom humor e disponibilidade, ao Felipe Georgete Scola por sua amizade e companheirismo, a Patrícia Mara de Oliveira, a Ruth Molinas e ao André Arruda Lima.

Agradeço aos professores Helaine Carrer, Nubia Barbosa Eloy e Paulo José Pereira Lima Teixeira por disponibilizarem seus laboratórios.

Agradeço à todos os membros do Centro de biotecnologia agrícola (CEBTEC) pela parceria e momentos agradáveis, em especial à Valentina de Fátima De Martin e a Aline Borges por se mostrarem sempre disponíveis a ajudar

Agradeço aos meus pais, Raquel Aparecida Antunes Leão e Saulo Roberto Lage Leão por acreditarem em mim.

Agradeço à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

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

## SUMÁRIO

RESUMO .....	6
ABSTRACT .....	7
INTRODUÇÃO.....	9
ESTADO DA ARTE .....	11
Tomateiro .....	11
Os peptídeos RALF e sua história evolutiva .....	11
Atividades biológicas dos peptídeos RALF .....	14
Formação de folhas.....	17
1. FILOGENIA DA FAMÍLIA DE PEPTÍDEOS RALFS EM TOMATEIRO .....	19
1.1. Resultados.....	19
1.1.1. Os RALFs de <i>Solanum</i> são conservados .....	19
1.1.2. Motivos identificados nos precursores de <i>SIRALFs</i> .....	25
1.1.3. Relação entre os <i>SIRALFs</i> e os <i>AtRALFs</i> .....	28
1.1.4. <i>SIRALF1</i> é ubíquo nos tecidos vegetais.....	31
1.2. Discussão.....	32
1.3. Materiais e Métodos .....	35
1.3.1. Identificação dos peptídeos e análise filogenética.....	35
1.3.2. Motivos de RALF.....	36
1.3.3. Expressão gênica dos <i>SIRALFs</i> em <i>Solanum pimpinellifolium</i> .....	36
2. CARACTERIZAÇÃO DO MUTANTE DO GENE <i>SIRALF1</i> ( <i>sralf1</i> ) .....	39
2.1. Resultados.....	39
2.1.1. O gene <i>SIRALF1</i> tem papel na germinação .....	39
2.1.2. O gene <i>SIRALF1</i> interfere no crescimento da raiz .....	41
2.1.3. Os mutantes <i>sralf1</i> tem folhas menos complexas.....	43
2.1.4. O gene <i>SIRALF1</i> atua no desenvolvimento da flor.....	50
2.1.5. O gene <i>SIRALF1</i> tem papel na formação das sementes.....	55
2.2. Discussão.....	58
2.3. Material e Métodos .....	61
2.3.1. Ensaio de crescimento radicular .....	61
2.3.2. Desinfestação das sementes.....	61
2.3.3. Ensaio de germinação.....	61
2.3.4. Caracterização fenológica das plantas <i>sralf1</i> .....	62

2.3.5. Ensaio de germinação do pólen e crescimento do tubo polínico.....	63
2.3.6. Quantificação dos sólidos solúveis.....	63
2.3.7. Acidez titulável.....	63
REFERÊNCIAS .....	65
ANEXOS .....	73

## RESUMO

**Filogenia da família de peptídeos RALFs em tomateiro e caracterização do mutante do gene *SIRALF1* (*slralf1*)**

Os *Rapid Alkalinization Factors* (RALFs) são pequenos peptídeos sinais que são ubíquos nas plantas e estão presentes em fungos, nematoides e bactérias. Os RALFs têm um papel regulatório no crescimento e desenvolvimento, interferem na expansão celular, modelam as respostas ao estresse biótico, abiótico e desempenham um papel importante na imunidade da planta. Até o momento, a maior parte das informações que se tem sobre o peptídeo derivam de estudos com *arabidopsis*. Como há um grande volume de informações sobre os peptídeos RALF em *arabidopsis*, entende-se que o momento é apropriado para traduzir esses conhecimentos para outras espécies. Essa dissertação é dividida em dois capítulos, no primeiro capítulo serão investigadas as relações evolutivas de 11 RALFs de *Solanum*. No qual foram, em média, identificados 11 homólogos. Também será apresentada a filogenia de RALFs de *Solanum lycopersicum* com RALFs de *Arabidopsis thaliana* para compreender as relações evolutivas entre eles. No segundo capítulo, será realizada a caracterização do mutante *slralf1*, e será demonstrado que o gene *SIRALF1* interfere no desenvolvimento da planta. A ausência de *SIRALF1* alterou o padrão da germinação, o crescimento da raiz, o número de flores, a porcentagem de abortos, a área foliar, a formação de folíolos, o número de frutos e o número de sementes.

Palavras-chave: RALF, *Solanum lycopersicum*, *Solanum*, Peptídeo, Filogenia

## ABSTRACT

**Phylogeny of the ralfs peptide family in tomato and characterization of the SIRALF1 gene mutant (slralf1)**

Rapid Alkalinization Factors (RALFs) are small signal peptides that are ubiquitous in plants and are present in fungi, nematodes, and bacteria. RALFs have a regulatory role in growth and development, interfering with cell expansion, model biotic and abiotic stress responses, play an important role in plant immunity. To date, most of the information we have so far on the peptide is derived from studies with *Arabidopsis*. As there is a large volume of information about RALF peptides in *Arabidopsis*, it is understood that the time is appropriate to translate this knowledge to other species. This dissertation is divided into two chapters, in the first chapter the evolutionary relationships of 11 *Solanum* RALFs will be investigated. In which, on average, 11 homologues were identified. The phylogeny of *Solanum lycopersicum* RALFs with *Arabidopsis thaliana* RALFs will also be analyzed to understand the evolutionary relationships between them. In the second chapter, the phenological characterization of the *slralf1* mutant will be carried out, and it will be demonstrated that the *SIRALF1* gene interferes in the development of the plant. *SIRALF1* absence altered the germination pattern, root growth, the number of flowers, the percentage of abortions, the leaf area and leaflet formation, and the number of fruits and number of seeds.

Keywords: RALF, *Solanum lycopersicum*, *Solanum*, Peptide, Phylogeny





## INTRODUÇÃO

Os hormônios vegetais são substâncias produzidas pela planta que, em concentrações muito pequenas, influenciam os processos fisiológicos (Davies 2010). Um único hormônio pode regular muitos processos celulares e de desenvolvimento, da mesma forma que muitos hormônios podem regular um único processo (Dilworth, Riley, e Stennett 2017). Em 1937, Went e Thimann descreveram o papel das auxinas em modular o desenvolvimento vegetal, era descoberto e descrito o primeiro hormônio vegetal. Nas décadas subsequentes, citocinina, giberelina, ácido abscísico e etileno se juntaram às auxinas e formam os denominados cinco hormônios vegetais clássicos (Kende e Zeevaart 1997). Mais tarde, novos hormônios foram acrescentados, os brassinosteroids, o ácido salicílico, os jasmonatos, as stringolactonas e os peptídeos hormonais (Fujioka e Yokota 2003; Kaniganti et al. 2022; Hewedy et al. 2023; Rossi et al. 2023)

A mais de 100 anos, os peptídeos hormonais são reconhecidos em animais (Song, Ren, e Liu 2017), mas foi só em 1991 que o primeiro peptídeo hormonal de plantas, a sistemina, foi descrito (G. Pearce et al. 1991). Apesar do ceticismo inicial da comunidade científica, as evidências experimentais se acumularam e comprovaram a existência de peptídeos biologicamente ativos como moléculas sinalizadoras em diversos processos da planta, como por exemplo respostas de defesa, crescimento de calos, organização do meristema, autoincompatibilidade, crescimento de raízes, regulação da forma foliar, desenvolvimento de nódulos, e abscisão de órgãos (Lindsey 2001; Matsubayashi e Sakagami 2006).

O *Rapid Alkalinization Factor* (RALF) foi descoberto durante a busca por sisteminas em tabaco, usando o ensaio de alcalinização do meio de células em suspensão (Gregory Pearce et al. 2001). Os primeiros experimentos com os peptídeos RALF foram realizados em tomateiro e arabidopsis, contudo a maior parte das informações que se tem até o momento sobre o peptídeo derivam de estudos com arabidopsis. Como há um grande volume de informações sobre os peptídeos RALF em arabidopsis, entende-se que o momento é apropriado para traduzir esses conhecimentos para outras espécies, principalmente aquelas de importância agrícola direta.

O tomateiro é uma das hortaliças mais produzidas no mundo (FAO Agricultural Production Indices - knoema.com), além de se tratar de uma planta modelo para frutos carnosos, foi de folhas de tomateiro que se extraiu o primeiro RALF. Em tomateiro encontramos 11 isoformas de RALF, destas, apenas 2 são descritas pela literatura o

SIRALF2 (Solyc01g099520) e o SIRALF6 (Solyc07g063030). Esta dissertação está organizada em dois capítulos. No primeiro, será apresentada uma análise filogenética dos RALFs de tomateiro, utilizando-se 11 genomas do gênero *Solanum*. Neste gênero será demonstrado como os peptídeos são conservados dentro dos tomateiros selvagens e comerciais, também serão apresentadas e discutidas as semelhanças do SIRALFs com os AtRALFs. No segundo capítulo, será caracterizado o mutante de SIRALF1 (Solyc01g067900). Este mutante foi obtido da coleção do projeto “Usando CRISPR/Cas9 para entender e melhorar o sistema imunológico da planta” (NSF-IOS 1546625) com plantas de *background* Rio Grande (N. Zhang et al. 2020). Nesse segundo capítulo, poderá ser observado que o gene *SIRALF1* interfere no desenvolvimento da planta e sua ausência altera o padrão da germinação, o crescimento da raiz, o número de flores, a porcentagem de abortos, a área e forma foliar, o número de frutos e o número de sementes.

## ESTADO DA ARTE

### Tomateiro

A região andina da América do Sul é o centro de origem de uma das mais importantes hortaliças, o tomateiro. *Solanum lycopersicum*, previamente chamado de *Lycopersicon esculentum*, é membro das Solanaceae, a mesma família da berinjela, da batata, e do pimentão, e pertence ao gênero *Solanum* na seção *Lycopersicon*, juntamente com outros tomateiros selvagens (Kimura e Sinha 2008; N. Li et al. 2023).

Os tomateiros selvagens presentes na seção *Lycopersicon* ou *Lycopersicoides*, assim como o tomateiro comercial, possuem 12 cromossomos, são diploides e podem ser alógamos autoincompatíveis, alógamos facultativos autocompatíveis e autógamos autocompatíveis. Com diferentes taxas de sucesso, todos os tomateiros podem ser cruzados com o tomateiro cultivado, apresentam em algum grau, o aumento da diversidade genômica e adaptabilidade ao ambiente o que é um importante fator de domesticação, aquisição de características desejadas e estudo da história evolucionária (Taylor 1986; Kimura e Sinha 2008; N. Li et al. 2023).

Ao comparar, filogeneticamente, genomas de espécies de tomateiro selvagem e cultivado, os resultados evidenciam a diversidade genômica e estrutural existente. As análises revelaram que apenas 54% das famílias de genes são conservadas entre os 13 tomateiros estudados. Demonstrando a diversidade e seu potencial para melhoramento (N. Li et al. 2023).

O tomateiro possui crescimento simpodial, folhas compostas e frutos climatéricos carnosos, características únicas se comparadas as outras plantas modelos. Além disso seu genoma é pequeno, diploide, o seu ciclo é relativamente curto, possui tecnologia de transformação de rotina e disponibilidade de recursos genéticos e genômicos, incluindo mapeamento de populações, marcadores de DNA mapeados (extensas coleções de EST) e microarranjos para análise de expressão gênica; tudo isso torna o tomateiro um excelente modelo (Kimura e Sinha 2008; Giovannoni 2004).

### Os peptídeos RALF e sua história evolutiva

Os peptídeos RALFs estão presentes em uma infinidade de espécies com um número diverso de integrantes. A espécie com uma das maiores famílias de peptídeos

RALFs é *Arabidopsis thaliana*, que possui 37 RALFs (Morato do Canto et al. 2014). As eudicotiledoneas possuem uma média de 20 RALFs, mais do que as monocotiledôneas que possuem uma média de 14. Existem algumas exceções, a videira (*Vitis vinifera*) possui apenas quatro RALFs e *Nicotiana attenuata* foi descrita como tendo somente um RALF (Wu et al. 2007; Campbell e Turner 2017). As diferenças de número de genes que codificam RALFs sugerem que a expansão dos genes RALFs nas angiospermas não ocorreu de forma igual entre as espécies (Cao e Shi 2012). Contudo, nas espécies que apresentam um vasto número de peptídeos RALFs, presume-se que haja uma grande redundância entre eles. Os RALFs, em diferentes espécies, podem ter sido derivados por uma série de eventos de duplicação gênica que ocorreram após a separação de diferentes linhagens. Muitos dos genes que codificam RALFs em arroz e arábida foram gerados por duplicação em tandem, um percentual menor dos genes de milho e álamo foram por duplicação em tandem, sendo a maior parte dos genes de RALFs emergidos de outra forma que não duplicação em tandem (Cao e Shi 2012).

Os RALFs são derivados de preproteínas, com um peptídeo sinal na região N-terminal do peptídeo ativo (Gregory Pearce et al. 2001). A preproteína passa por um processamento pós-traducional, no qual ocorre a sua clivagem para produzir o peptídeo maduro (Matos et al. 2008). Os peptídeos possuem 3 motivos principais, característicos: o primeiro é o motivo dibásico RRXL que está presente na preproteína, sítio de reconhecimento da AtS1P (SITE-1-PROTEASE), que é responsável pelo processamento da preproteína (Matos et al. 2008; Srivastava et al. 2009). O motivo YISY, presente no peptídeo maduro, mostrou ser essencial para a atividade de alcalinização e percepção pelos receptores (Gregory Pearce et al. 2010; Xiao et al. 2019a). E por fim, as quatro cisteínas que formam as duas pontes dissulfeto que são essenciais para a bioatividade dos RALFs (Gregory Pearce et al. 2001; Haruta et al. 2008).

Com conhecimento dos motivos, pode-se dividir os peptídeos RALFs em dois grandes grupos, um formado pelos clados I, II e III, e outro formado pelo clado IV (Campbell e Turner 2017). Os clados I, II e III são bem representados pelos três motivos de um típico RALF, já o clado IV possui modificações. O motivo YISY é alterado, em grande parte dos membros do clado IV, neste grupo o motivo YISY mantém somente a isoleucina e a segunda tirosina (XIXY). O clado IV em sua grande parte não apresenta o sítio da AtS1P, e a segunda cisteína pode estar deslocada. Os peptídeos desse clado são compostos por um número menor de aminoácidos, por volta de 88, sendo que os outros clados apresentam cerca de 123 aminoácidos (Campbell e Turner 2017).

*Physcomitrium patens* possui três peptídeos RALF (Ginanjar, Teh, e Fujita 2022). Em um estudo que os analisou com plantas próximas filogeneticamente como briófitas primitivas e com *arabidopsis*, obteve-se que PpRALFs compartilham uma linhagem ancestral com RALFs de algumas pteridófitas e angiospermas (*arabidopsis*). RALFs não foram identificados em clorófitas e carófitas, sugerindo que os RALFs são parte de um evento genético que ocorreu após a mudança das plantas para o ambiente terrestre (Ginanjar, Teh, e Fujita 2022). Em *Gossypium*, foi descoberto que as espécies possuem mais RALFs que as demais (Lin et al. 2022). Foram identificados nos diploides *G. arboreum* e *G. raimondii*, 42 e 38 RALFs respectivamente. Já nos triploides em *G. hirsutum* e *G. barbadense*, foram identificados 104 e 120 RALFs respectivamente. O maior número de RALFs pode ser devido à duplicação em tandem e a eventos de duplicações de todo o genoma/duplicação segmentar. Também em *Gossypium*, é encontrado um grupo de RALFs que não possui as quatro cisteínas e um outro que possui apenas duas cisteínas conservadas (Lin et al. 2022). Em leguminosas, foram identificados 24, 17 e 12 RALFs, esses, ao passarem por uma análise filogenética, organizaram-se de maneira espécie dependente. Se comparado a *arabidopsis* os RALFs de leguminosas apresentaram motivos mais conservados. A análise sugere que os RALFs presentes em Leguminosas também foram alvo de duplicações segmentares para expansão da família e não em tandem como ocorreu em *arabidopsis* (Jia e Li 2023).

Os peptídeos RALF também são encontrados em nematoides (X. Zhang et al. 2020). Em análises filogenéticas entre nematoides e plantas, foi observado que o agrupamento não foi espécie específico, os RALFs de nematoides agrupam com RALFs das plantas que os nematoides parasitam (X. Zhang et al. 2020). Essa semelhança maior com os RALFs de plantas e não com os de nematoides pode ser explicada ou por transferências horizontais, do hospedeiro para o parasita, ou por evolução convergente de RALFs de plantas e nematoides (X. Zhang et al. 2020). Assim como em nematoides, análises filogenéticas com RALFs de fungo fitopatogênicos mostram que a semelhança entre RALFs encontrados em fungos é maior com os de plantas do que entre os de fungos (Thynne et al. 2017).

### Atividades biológicas dos peptídeos RALF

Os RALFs são pequenos peptídeos sinais, ubíquos nas plantas e que estão presentes em fungos fitopatogênicos, nematoides e bactérias; os RALFs tem um papel regulatório no crescimento e desenvolvimento (Gregory Pearce et al. 2001; Thynne et al. 2017; X. Zhang et al. 2020; Blackburn, Haruta, e Moura 2020). Os peptídeos RALFs causam uma rápida elevação do pH do meio de cultura de células em suspensão e inibem o crescimento da raiz (Gregory Pearce et al. 2001; Morato do Canto et al. 2014). Estudos com um RALF de pólen em *Solanum lycopersicum* (SIPRALF) sugeriram que o SIPRALF atua na inibição do alongamento do tubo polínico (Covey et al. 2010). Em arábido, resultados similares foram observados para os AtRALFs 4, 19 e 34 onde foi constatada a inibição de cerca de 80% da germinação do pólen (Morato do Canto et al. 2014). RALF atua através da via de sinalização do  $Ca^{2+}$ , mobilizando  $Ca^{2+}$  dos meios intra e extracelulares (Haruta et al. 2008; Gjetting et al. 2020).

Os peptídeos RALFs interferem na expansão das células, afetando o tamanho dos órgãos da planta (Bergonci et al. 2014). Em plantas que superexpressam *AtRALF1*, *AtRALF8* e *AtRALF23*, foi observado um menor tamanho da raiz primária, da roseta, da folha, e menor número de sementes (Srivastava et al. 2009; Atkinson, Lilley, e Urwin 2013; Bergonci et al. 2014). Ao silenciar *AtRALF1*, as plantas apresentam maior crescimento radicular, maiores hipocótilos e maior número de raízes laterais (Bergonci et al. 2014). Ao testar 34 dos peptídeos RALFs em arábido, a inibição do crescimento da raiz foi observada em 22 RALFs e 19 apresentaram inibição do crescimento da planta (Abarca, Franck, e Zipfel 2021). Em *Physcomitrium patens*, ao realizar *knockout* de *PpRALF1* e *PpRALF2*, obteve-se plantas com células dos cloronemas, estrutura filamentosa rica em cloroplastos, menores e em menor número. Foi demonstrado que *PpRALF1* e *PpRALF2* tem papel na promoção do crescimento da ponta apical do protonema, estrutura filamentosa derivada dos esporos (Ginanjar, Teh, e Fujita 2022).

Nas angiospermas, os RALFs demonstraram modular respostas ao estresse biótico e abiótico (Zhao et al. 2018). A superexpressão de *AtRALF22* e *AtRALF23* demonstrou aumentar a sensibilidade ao sal (Zhao et al. 2018). Em *Physcomitrium patens*, plantas *knockout* para *PpRALF3* são tolerantes ao estresse abiótico (Mamaeva et al. 2023).

Os peptídeos RALFs desempenham um papel importante na imunidade. Os peptídeos *AtRALF23*, *AtRALF33* e *AtRALF34* inibem a produção de espécies reativas

de oxigênio (ROS), e os AtRALF17, AtRALF24 e AtRALF32 são capazes de induzir a produção de ROS (Abarca, Franck, e Zipfel 2021). ROS são produzidas nas primeiras respostas celulares após o reconhecimento bem-sucedido do patógeno (Torres, Jones, e Dangl 2006). A superexpressão de *AtRALF23* aumentou a susceptibilidade a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 e ao fungo *Plectospharella cumerina*. Em um estudo com *Physcomitrium patens* foi demonstrado o crescimento mais lento de *Pectobacterium carotovorum* e *Fusarium solani* em mutantes *knockout* para *PpRALF2* e *PsRALF3*, demonstrando que esses peptídeos possuem um papel na regulação negativa da resposta imune (Mamaeva et al. 2023).

FERONIA (FER) foi a primeira proteína receptora do RALF que foi identificada. FER pertence à família das proteínas *Catharanthus roseus Receptor Like Kinase 1 Like* (CrRLK1Ls). A FER está localizada na membrana plasmática e consiste em um domínio extracelular com dois domínios semelhantes à malectina, um domínio transmembrana e um domínio quinase intracelular (Liu et al. 2018). A identificação de FER como receptor específico de AtRALF1 se deu quando foi detectado um aumento da abundância de fosfopeptídeos derivados da membrana plasmática de plantas tratadas com AtRALF1. Além da proteína FER, a H<sup>+</sup>-ATPase 2 (AHA2) e a proteína quinase dependente de cálcio 9 (CPK9) também foram identificadas como fosforiladas em função da exposição ao peptídeo. AtRALF1 suprime o crescimento de raiz primária de arabidopsis de uma maneira dependente da presença de FER (Haruta et al. 2014). Foi demonstrado que AtRALF23 interage diretamente com o correceptor LRE-LIKE GPI-AP2 (LLG2) (Xiao et al. 2019b). LLG é um membro da família de proteínas semelhantes a LORELEI, que, por sua vez, fazem parte das proteínas âncoras de glicosilfosfatidilinositol e que orientam o posicionamento de FER do retículo endoplasmático para a membrana plasmática. Uma vez na membrana, o complexo FER/LORELEI e LLG participam da percepção de ligantes extracelulares, entre eles o RALF. Uma vez ligados aos peptídeos RALF, regulam processos como recepção do tubo polínico, ruptura do tubo polínico para liberação da unidade masculina e dupla fertilização (Noble et al. 2022). AtRALFs 4/19 e AtRALF34 interagem com ANXUR1 (ANX1) e *Buddha's Paper Seall* (BUPS1) (Ge et al. 2017). A sinalização autócrina dos AtRALFs 4/19 no complexo BUPS1/2-ANX1/2 promove a integridade do tubo polínico, já a sinalização parácrina de AtRALF34 compete com os AtRALFs 4/19 permitindo a ruptura do tubo polínico (Ge et al. 2017). A ANX1 é um receptor do tipo quinase que contém um domínio semelhante a malectina, participa de papéis essenciais na coordenação da



fertilização das plantas. ANX1 e seu homólogo ANX2 são fatores masculinos que controlam o tubo polínico através de sua ruptura no tempo apropriado. Estão envolvidos na comunicação entre os órgãos femininos e masculinos, o que é essencial para o encontro dos gametas feminino e masculino (Miyazaki et al. 2009; C. Li, Wu, e Cheung 2016). BUPS1 é um receptor tipo quinase expresso no pólen pertencente à família das CrRLK1L, tem um papel crucial no crescimento do tubo polínico dentro do pistilo e está envolvido na manutenção da integridade celular durante o crescimento do tubo polínico (Zhu et al. 2018). AtRALF1 também se liga a BRI1-ASSOCIATED KINASE1 (BAK1), sendo este essencial para a inibição do crescimento da raiz e expansão celular (Dressano et al. 2017). BAK1 é um receptor do tipo quinase que tem um papel essencial no desenvolvimento da planta e em sua imunidade, BAK1 é um componente chave na via de sinalização dos BR, na qual BAK1 interage com BR INSENSITIVE 1 (BRI1) e BIR3 para regular a percepção de BR e sua sinalização (Großholz et al. 2020; Nam e Li 2002). AtRALF1 induz indiretamente a sinalização canônica de auxina TIR1/AFB e essa sinalização de auxina TIR1/AFB, por sua vez, inibe o crescimento radicular e atua na inibição sustentada do crescimento radicular induzida por RALF1-FER (L. Li et al. 2022). As proteínas TIR1/AFB (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN-SIGNALING F-BOX) são componentes chave da via de sinalização de auxinas em plantas. Eles atuam como receptores de auxina e fazem parte do complexo da ubiquitina ligase E3 do SCF (Skp1-Cullin1-F-box), que atua na degradação de repressores transcricionais de AUX/IAA (AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID) em resposta à auxina (Salehin, Bagchi, e Estelle 2015).

Alguns RALFs apresentam ações antagônicas, como os AtRALFs 4/19 com o AtRALF34 que competem por BUPS1 e ANX1/2. Sendo os AtRALFs 4/19 necessários para a manutenção da integridade do tubo polínico e AtRALF34, para a ruptura do tubo polínico e fertilização (Ge et al. 2017). Também foi observada ação antagônica dos RALFs derivados de pólen AtRALFs 10/11/12/12/24/26/30 (pRALFs), e dos RALFs derivados do estigma AtRALFs 1/22/23/33 (sRALFs). pRALFs e sRALFs competem pelo complexo de percepção formado pelas proteínas FER-CVY1/ANJ/HERK1. Os pRALFs permitem a penetração do tubo polínico e os sRALFs previnem a penetração no estigma (Lan et al. 2023). Outra forma de antagonismo é entre AtRALFs e brassinosteróides (BRs), regulando a expansão celular, provavelmente competindo por fatores transcricionais comuns (Srivastava et al. 2009; Bergonci et al. 2014).

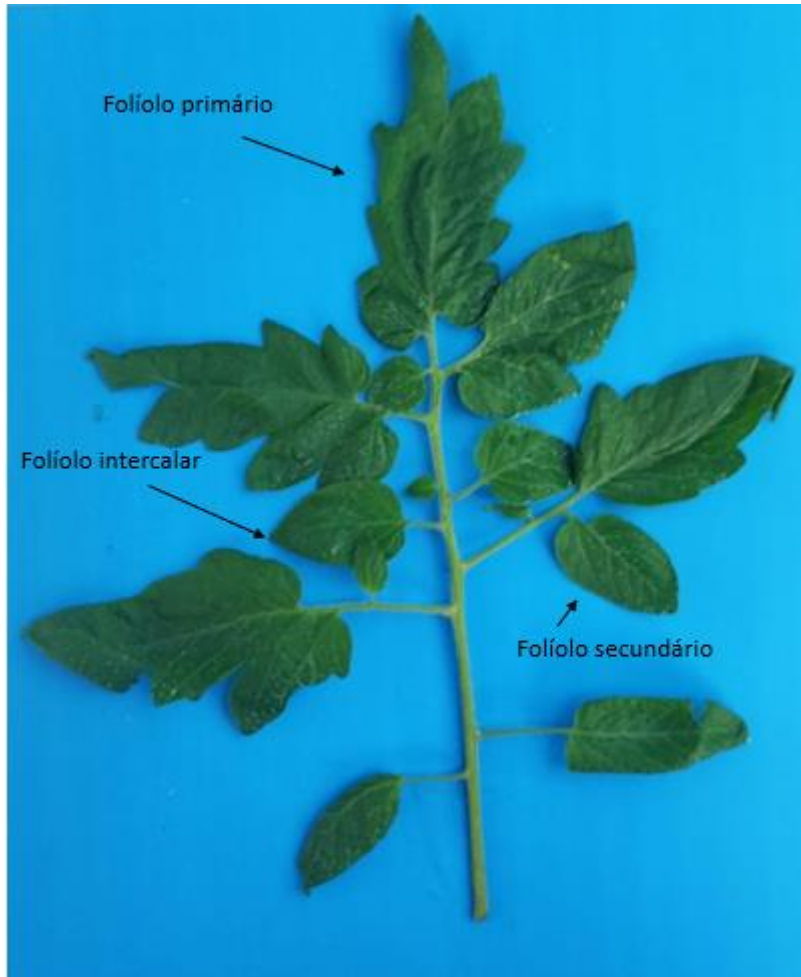
## Formação de folhas

As folhas podem ser classificadas em duas categorias: folhas simples, que são aquelas que tem um único limbo foliar, e folhas compostas que são aquelas que possuem múltiplos folíolos organizados de diversas formas (Champagne e Sinha 2004; Figura 1). O desenvolvimento da folha segue três fases: iniciação, morfogênese primária e morfogênese secundária. Na iniciação, a folha emerge do meristema apical, na morfogênese primária o limbo é iniciado e as estruturas secundárias são formadas como folíolos; na morfogênese secundária, a área foliar aumenta, e os tecidos amadurecem e se diferenciam (Burko e Ori 2013).

A morfologia das folhas é poligênica e com elevada herdabilidade, apesar de também muito dependente do ambiente (Chitwood et al. 2014). Alguns genes relacionados com o desenvolvimento foliar são *CLASS1 KNOTTED-LIKE HOMEODOMAIN PROTEIN 1* (*KNOX1*), que é essencial para a iniciação do meristema e manutenção da diferenciação. Se esse gene é continuamente expresso, as folhas do tomateiro serão mais complexas (Bharathan e Sinha 2001). Também contribuem para a complexidade da folha e desenvolvimento dos folíolos, os genes *BIPINNATA* (*BIP*) e *WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN PROTEIN 1* (*WOX1*) (Nakayama et al. 2021). *PHANTASTICA* (*SIPHAN*) regula a formação dos folíolos e é importante para a desenvolvimento do formato penado das folhas de tomate, sendo que em excesso, causa diversidade na morfologia das folhas (Kim et al. 2003). O fator de transcrição *CLAUSA* (*CLUA*) e o microRNA miR164, quando expressos ectopicamente em tomateiro, resultam em folhas compostas elaboradas e com ausência do folíolo secundário respectivamente (Berger et al. 2009; Bar e Ori 2015).

Os hormônios envolvidos no desenvolvimento foliar incluem giberelinas (GAs), BRs, citocininas, auxina, etileno, ácido abscísico (ABA) e peptídeos hormonais (Ali, Khan, e Xie 2020; Huang, Li, e Guo 2022). Esses hormônios desempenham papéis cruciais na regulação de vários aspectos do crescimento e desenvolvimento foliar, tais como divisão celular, diferenciação, expansão, iniciação foliar, senescência foliar e modulação da morfologia foliar. Hormônios como GAs e BRs são proeminentes na regulação do tamanho foliar e do crescimento intercalar. As GAs aumentam a proliferação celular por meio da repressão aos inibidores do ciclo celular, enquanto os BRs promovem o crescimento foliar pela proliferação e expansão celular (Ali, Khan, e Xie 2020). O pequeno peptídeo secretado *CLE14* (*CLAVATA3/ESR-RELATED 14*) adia a

senescência foliar por ativação transcricional de genes sequestradores de ROS (Huang, Li, e Guo 2022).



**Figura 1.** Folha de tomateiro e suas estruturas.

## 1. FILOGENIA DA FAMÍLIA DE PEPTÍDEOS RALFS EM TOMATEIRO

### 1.1. Resultados

#### 1.1.1. Os RALFs de *Solanum* são conservados

Os RALFs de *Solanum* associados a cada uma das espécies, com seus respectivos *locus* e nomes atribuídos estão listados (Tabela 1). A maioria das famílias de RALFs encontrada dentro de *Solanum* possui 11 membros. Aqui, a numeração atribuída a cada RALF seguiu o padrão de *Solanum lycopersicum*, ou seja, todos aqueles RALFs homólogos ao *SIRALF1* receberam a numeração 1, todos os homólogos ao *SIRALF2*, receberam a numeração 2, etc. Pode-se observar que dentre os RALFs de *Solanum*, homólogos ao *SIRALF8* estão presentes somente em *S. galapagense*, *S. pennellii*, *S. ckmielewskii* e *S. chilense*. Em três espécies, *S. habrochaites*, *S. pennellii* e *S. chilense*, homólogos ao *SIRALF4* foram encontrados em dois *loci* distintos. Em *S. lycopersicoides* não há homólogo ao *SIRALF4*. Somente os homólogos aos *SIRALFs* 3, 5 e 9 estão presentes nas 11 espécies de tomateiro avaliadas.

A análise filogenética de *Solanum* foi feita com a finalidade de reconstruir as relações evolutivas entre as diferentes espécies avaliadas (Figura 2). A árvore filogenética dos RALFs de *Solanum* é organizada em 5 clados. O primeiro clado contém os RALFs homólogos aos *SIRALFs* 1/2/3/7, sendo que dentro desse clado os RALFs 2/7 de *Solanum* são mais próximos formando um subclado, os RALFs 1 de *Solanum* formam um subclado com os RALFs 2/7 de *Solanum*, os RALFs 3 de *Solanum* são os membros mais diferentes do clado. O segundo clado conta com os RALFs 6/9/10 de *Solanum*, dentro desse clado há um subclado formado por RALFs 6/10 de *Solanum*. O terceiro clado é formado pelos RALFs 8/11 de *Solanum*. O quarto clado é formado pelos RALFs 4 de *Solanum*, sendo que há um subclado formado pelos RALFs 4.2 de *Solanum*. O clado 5 é formado pelos RALFs 5 de *Solanum*. Dentro de cada clado de RALFs homólogos de *Solanum*, a ordem com que as espécies são colocadas não se mantém, os homólogos contêm cadeias peptídicas similares, muitas vezes idênticas como no caso dos RALFs 5 de *Solanum* (Tabela 2), dificultando o programa de gerar uma relação de ancestralidade.

Ao realizar a estimativa das divergências evolutivas apenas com o peptídeo ativo, observa-se que os homólogos ao *SIRALF1* possuem divergência de aminoácidos somente em *S. peruvianum*. Nos RALFs 2 de *Solanum* só há diferenças de aminoácidos no peptídeo ativo de *S. lycopersicoides*. Nos RALFs 3 de *Solanum*, há alterações quando

comparado com o *S. lycopersicum* em diversas espécies. Os RALFs 4 de *S. pennellii* e *S. neorickii*, possuem pouca ou nenhuma sequência para alinhar no peptídeo ativo, segundo o alinhamento com SIRALF1, sendo considerada ativa a parte que alinha a partir do motivo YISY. Os peptídeos maduros RALFs 5 de *Solanum* são idênticos em todas as espécies. Os RALFs 6 de *Solanum*, com exceção de *S. pimpinellifolium*, possuem pequenas divergências nos aminoácidos, sendo *S. habrochaites* o de maior divergência. Naqueles que possuem RALF8, três das quatro espécies, há a manutenção do peptídeo ativo com exceção do *S. pennellii* onde há divergências. Os RALFs 9 apresentam divergências em *S. lycopersicoides* e *S. habrochaites*, sendo os demais peptídeos ativos idênticos. Os RALFs 10 de *Solanum* apresentam diferenças de aminoácidos em *S. lycopersicoides*, *S. pennellii* e *S. habrochaites*. RALF11 de *Solanum* possui divergência nas espécies, *S. galapagense*, *S. peruvianum*, *S. chmielewskii* e *S. corneliomulleri*.

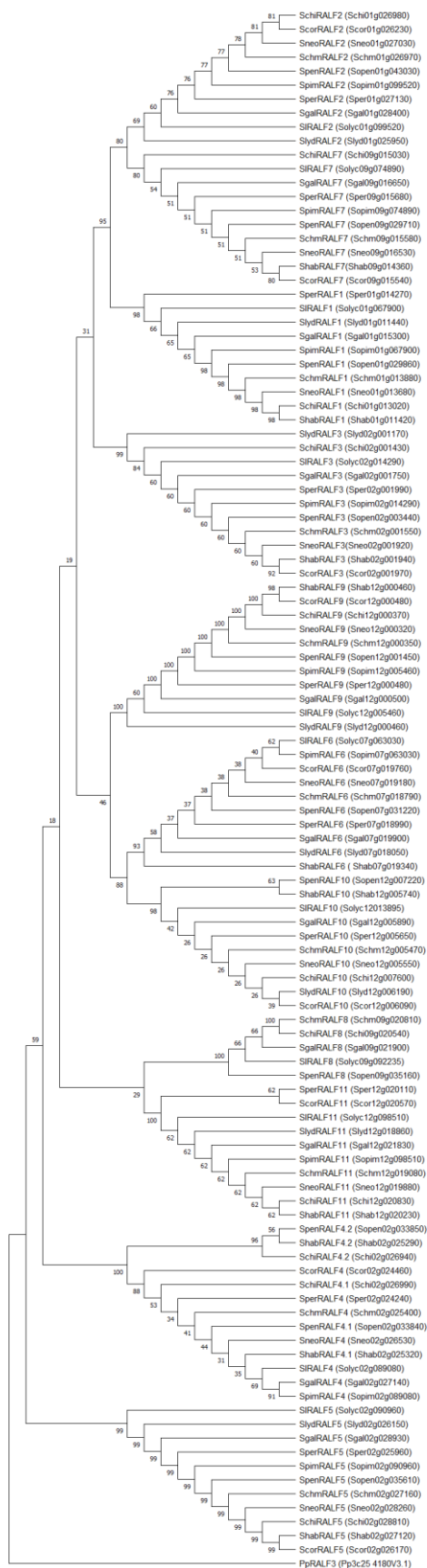
**Tabela 1.** RALFs para cada uma das espécies de tomateiro. A denominação dos genes que codificam RALFs foi feita a partir da similaridade com os RALFs de *Solanum lycopersicum*, que foram nomeados de acordo com a ordem nos cromossomos.

Espécie	ID	Nome
<i>Solanum lycopersicum</i> (11 peptídeos)	Solyc01g067900	SIRALF1
	Solyc01g099520	SIRALF2
	Solyc02g014290	SIRALF3
	Solyc02g089080	SIRALF4
	Solyc02g090960	SIRALF5
	Solyc07g063030	SIRALF6
	Solyc09g074890	SIRALF7
	Solyc09g092235	SIRALF8
	Solyc12g005460	SIRALF9
	Solyc12g013895	SIRALF10
	Solyc12g098510	SIRALF11
<i>Solanum galapagense</i> (11 peptídeos)	Sgal01g015300	SgalRALF1
	Sgal01g028400	SgalRALF2
	Sgal02g001750)	SgalRALF3
	Sgal02g027140	SgalRALF4
	Sgal02g028930	SgalRALF5
	Sgal07g019900	SgalRALF6
	Sgal09g016650	SgalRALF7
	Sgal09g021900	SgalRALF8
	Sgal12g000500	SgalRALF9
	Sgal12g005890	SgalRALF10
	Sgal12g021830	SgalRALF11
<i>Solanum pimpinellifolium</i> (9 peptídeos)	Sopim01g067900	SpimRALF1
	Sopim01g099520	SpimRALF2
	Sopim02g014290	SpimRALF3
	Sopim02g089080	SpimRALF4
	Sopim02g090960	SpimRALF5
	Sopim07g063030	SpimRALF6
	Sopim09g074890	SpimRALF7
	Sopim12g005460	SpimRALF9
	Sopim12g098510	SpimRALF11
	<i>Solanum chmielewskii</i> (11 peptídeos)	Schm01g013880
Schm01g026970		SchmRALF2
Schm02g001550		SchmRALF3
Schm02g025400		SchmRALF4
Schm02g027160		SchmRALF5
Schm07g018790		SchmRALF6
Schm09g015580		SchmRALF7
Schm09g020810		SchmRALF8
Schm12g000350		SchmRALF9
Schm12g005470		SchmRALF10

	Schm12g019080	SchmRALF11
<i>Solanum neorickii</i> (10 peptides)	Sneo01g013680	SneoRALF1
	Sneo01g027030	SneoRALF2
	Sneo02g001920	SneoRALF3
	Sneo02g026530	SneoRALF4
	Sneo02g028260	SneoRALF5
	Sneo07g019180	SneoRALF6
	Sneo09g016530	SneoRALF7
	Sneo12g000320	SneoRALF9
	Sneo12g005550	SneoRALF10
	Sneo12g019880	SneoRALF11
<i>Solanum corneliomulleri</i> (11 peptides)	Scor01g026230	ScorRALF1
	Scor01g026230	ScorRALF2
	Scor02g001970)	ScorRALF3
	Scor02g024460	ScorRALF4
	Scor02g026170	ScorRALF5
	Scor07g019760	ScorRALF6
	Scor09g015540	ScorRALF7
	Scor12g000480	ScorRALF9
	Scor12g006090	ScorRALF10
	Scor12g020570	ScorRALF11
<i>Solanum peruvianum</i> (10 peptides)	Sper01g014270	SperRALF1
	Sper01g027130	SperRALF2
	Sper02g001990	SperRALF3
	Sper02g024240	SperRALF4
	Sper02g025960	SperRALF5
	Sper07g018990	SperRALF6
	Sper09g015680	SperRALF7
	Sper12g000480	SperRALF9
	Sper12g005650	SperRALF10
	Sper12g020110	SperRALF11
<i>Solanum chilense</i> (11 peptides)	Schi01g013020	SchiRALF1
	Schi01g026980	SchiRALF2
	Schi02g001430	SchiRALF3
	Schi02g026990	SchiRALF4.1
	Schi02g026940	SchiRALF4.2
	Schi02g028810	SchiRALF5
	Schi09g015030	SchiRALF7
	Schi09g020540	SchiRALF8
	Schi12g000370	SchiRALF9
	Schi12g007600	SchiRALF10
	Schi12g020830	SchiRALF11
<i>Solanum pennellii</i> (11 peptides)	Sopen01g029860	SpenRALF1
	Sopen01g043030	SpenRALF2
	Sopen02g003440	SpenRALF3

	Sopen02g033840	SpenRALF4.1
	Sopen02g033850	SpenRALF4.2
	Sopen02g035610	SpenRALF5
	Sopen07g031220	SpenRALF6
	Sopen09g029710	SpenRALF7
	Sopen09g035160	SpenRALF8
	Sopen12g001450)	SpenRALF9
	Sopen12g007220	SpenRALF10
<i>Solanum habrochaites</i> (11 peptides)	Shab01g011420	ShabRALF1
	Shab02g001940	ShabRALF3
	Shab02g025320	ShabRALF4.1
	Shab02g025290	ShabRALF4.2
	Shab02g027120	ShabRALF5
	Shab07g019340	ShabRALF6
	Shab09g014360	ShabRALF7
	Shab12g000460	ShabRALF9
	Shab12g005740	ShabRALF10
	Shab12g020230	ShabRALF11
<i>Solanum lycopersicoides</i> (8 peptides)	Slyd01g011440	SlydRALF1
	Slyd01g025950	SlydRALF2
	Slyd02g001170	SlydRALF3
	Slyd02g026150	SlydRALF5
	Slyd07g018050	SlydRALF6
	Slyd12g000460	SlydRALF9
	Slyd12g006190	SlydRALF10
	Slyd12g018860	SlydRALF11





**Figura 2.** Árvore filogenética dos RALFs de espécies de tomateiro. A árvore foi construída pelo método *Neighbor Joining*, com 1000 *bootstraps*, usando como grupo externo o RALF de *Physcomitrium patens* (PpRALF). A árvore filogenética foi construída no MEGA 11.

**Tabela 2.** Heatmap da estimativa das divergências evolucionárias entre os RALFs de *Solanum* em mesmo grupo. É mostrado o número de diferenças em aminoácidos por sítio. Para o grupo dos RALFs 4 de *Solanum* foi selecionada a primeira sequência, quando havia duas. A análise foi com apenas o peptídeo ativo. Análises evolutivas foram conduzidas no MEGA11.

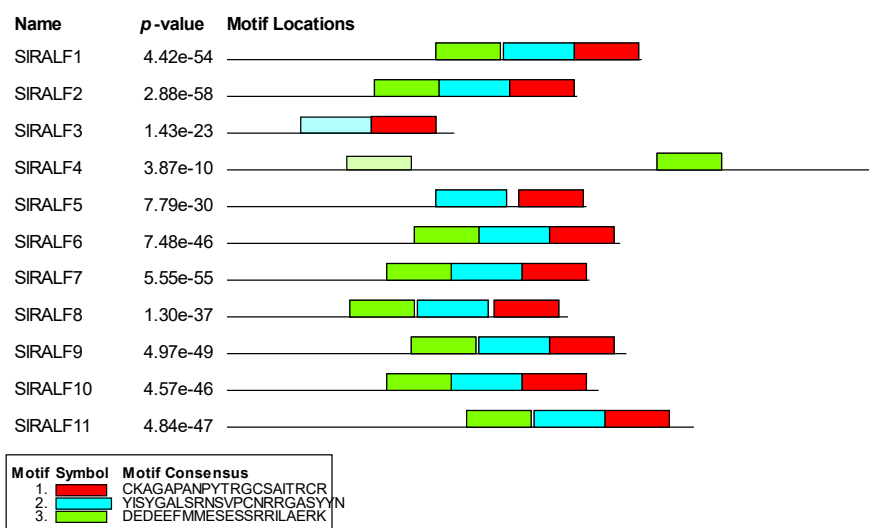
RALFs de Solanum	RALF1	RALF2	RALF3	RALF4	RALF5	RALF6	RALF7	RALF8	RALF9	RALF10	RALF11
<i>S. lycopersicoides</i>	0,0000	0,0225	0,2231	-	0,0000	0,0220	-	-	0,0211	0,0260	0,0000
<i>S. galapagense</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0220	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1201
<i>S. peruvianum</i>	0,0225	0,0000	0,0202	0,1503	0,0000	0,0220	0,0000	-	0,0000	0,0000	0,0190
<i>S. pimpinellifolium</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0225	0,0000	0,0000	0,0000	-	0,0000	-	0,0000
<i>S. pennellii</i>	0,0000	0,0000	0,0202	1,6094	0,0000	0,0220	0,0000	0,0206	0,0000	0,0211	-
<i>S. chmielewskii</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0455	0,0000	0,0220	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1201
<i>S. neorickii</i>	0,0000	0,0000	0,0000	-	0,0000	0,0220	0,0000	-	0,0000	0,0000	0,0000
<i>S. chilense</i>	0,0000	0,0000	0,0408	0,0225	0,0000	-	0,0225	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>S. habrochaites</i>	0,0000	-	0,0202	0,1466	0,0000	0,1911	0,0000	-	0,0211	0,0211	0,0000
<i>S. corneliomulleri</i>	-	0,0000	0,0202	0,1431	0,0000	0,0220	0,0000	-	0,0000	0,0000	0,0190

Os resultados demonstram que os RALFs de *Solanum* são conservados dentro dos subclado de homólogos. As espécies que se apresentaram mais similares a *S. lycopersicum* são, na ordem de similaridade, *S. galapagense*, *S. pimpinellifolium*, *S. neorickii* e *S. chmielewskii*. As espécies menos similares são, também na ordem de similaridade, *S. lycopersicoides* e *S. habrochaites*.

### 1.1.2. Motivos identificados nos precursores de SIRALFs

A fim de conhecer mais a fundo os *SIRALFs*, foram identificados motivos conservados nos peptídeos. De acordo com o programa MEME (Bailey et al. 2015), foram identificados 3 motivos nas preproteínas ou nos precursores de RALFs, o motivo que contém a RRXL, sítio da S1P, que é importante para o processamento da preproteína (Matos et al. 2008), o motivo que contém YISY que é essencial para a atividade de alcalinização e percepção pelos receptores (Gregory Pearce et al. 2010; Xiao et al. 2019a), e o motivo que detém 3 das 4 cisteínas comumente encontradas em um RALF que formam as duas pontes dissulfeto que são essenciais para a bioatividade dos RALFs (Gregory Pearce et al. 2001; Haruta et al. 2008). Observando a Figura 3, percebe-se que a maior parte das sequências possuem todos os motivos, mas algumas sequências chamam a atenção por não possuírem todos os motivos, que são os peptídeos SIRALF3, SIRALF4 e SIRALF5. SIRALF3 e SIRALF5 não apresentam o motivo da RRXL e SIRALF4 só apresenta o motivo da RRXL. Ao observar o alinhamento (Figura 4), percebe-se que as cisteínas, parte mais importante do motivo identificado pela cor vermelha, estão presentes em SIRALF4 e elas estão posicionadas com as distâncias iguais aos outros SIRALFs.

Observa-se que dentre os motivos identificados, no primeiro, que deveria conter o RRXL, as argininas não estão presentes e sim lisinas e no segundo motivo que também é do sítio da SIP, há somente uma arginina (Figura 5). O alinhamento mostra que de fato SIRALF3 e SIRALF5 não apresentam o motivo RRXL, além disso SIRALF3 não possui o motivo YISY completamente conservado, mantendo somente XIXY. SIRALF5 e SIRALF4 geram espaços vazios no alinhamento, apresentando *indels* em sua sequência. Dentre os demais SIRALFs, a maioria possui o motivo RRXL completamente conservado com exceção do SIRALF8, que possui o motivo com apenas uma arginina. Os SIRALFs 6/8/9/10 não possuem o motivo YISY completamente conservado. E os SIRALFs 5/8 tem a segunda cisteína deslocada.



**Figura 3.** Motivos conservados dos SIRALFs. Análise conduzida no MEME (meme-suite.org).



>SIRALF4 (Solyc02g089080)  
 MERKCYKKMLLIVLVVTIIKVQQVIGALECNGTKSNIAP **DDVDEFMESHTSTMLAGNAKKE**RLSLN  
 AAGDRGEICKENIYGNCIDDENVHKTRCVPGVRCRDRMRMTMMMLLVLLVTVIKVESVSECNGTS  
 SSIDACL **RDDDELLMESETSSRILLAAG**GNARSGRLNYKATGKPEICNEQIVGNCINNKNVKATHCNF  
 GTRCKRDVISS

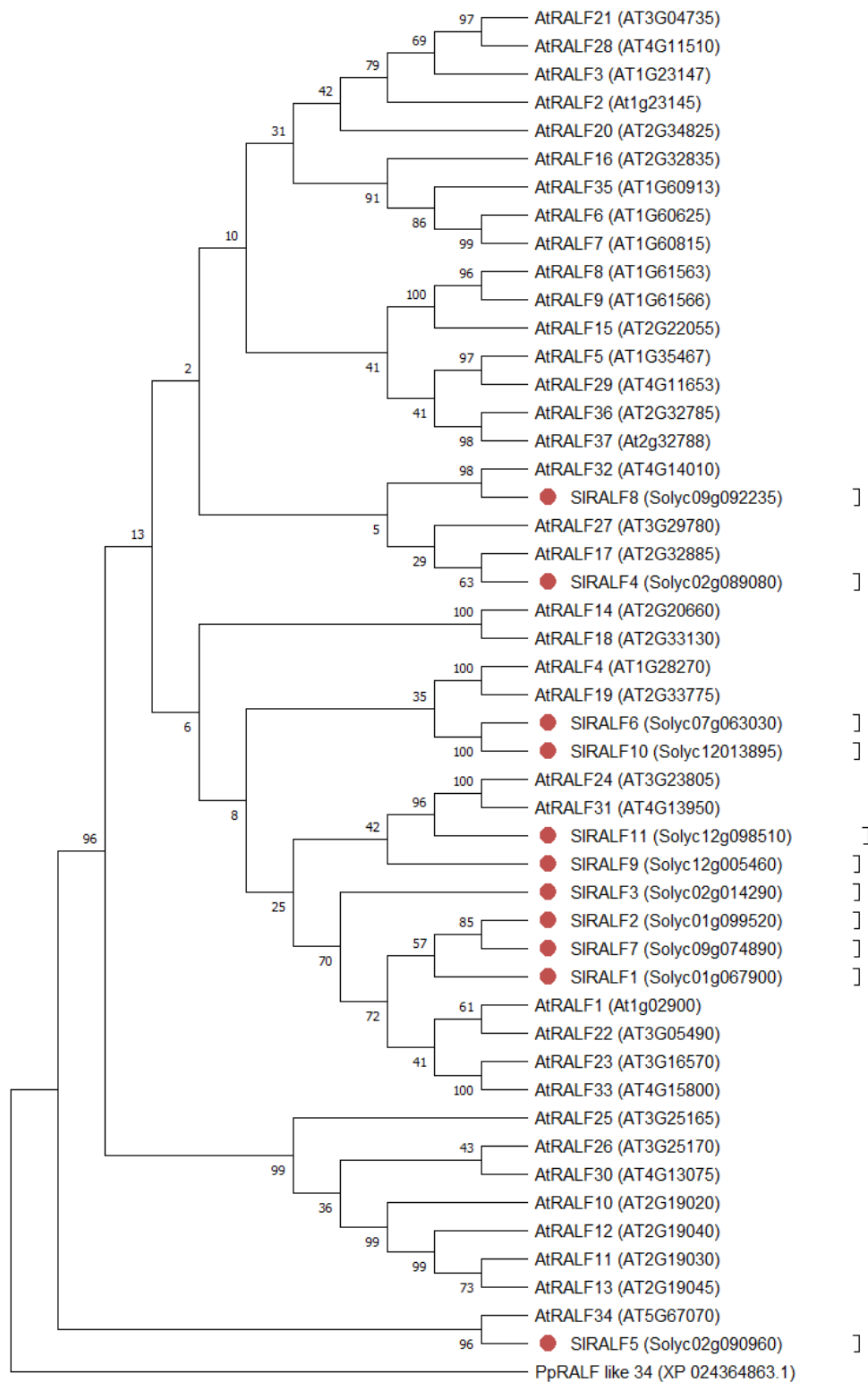
**Figura 5.** Sequência do SIRALF4 com os motivos gerados pelo MEME marcados.

Os resultados mostram que os SIRALFs, de forma geral, apresentam estruturas muito conservadas, sendo exceção o SIRALF4. A conservação, conforme pode ser visto na Figura 4, é percebida na porção C-terminal dos peptídeos. O SIRALF4, de acordo com o programa de predição de sequências de direcionamento para a via secretória (Teufel et al. 2022), apresenta um peptídeo sinal de 27 aminoácidos com um peptídeo ativo atípico que não possui o motivo YISY e baixa conservação na porção C-terminal quando comparado com os demais.

### 1.1.3. Relação entre os *SIRALFs* e os *AtRALFs*

Para explorar as diferenças e semelhanças entre os RALFs de *Solanum* e os AtRALFs, foi feita a comparação destas sequências através da análise filogenética (Figura 6). A árvore filogenética de RALFs de arábido e tomateiro comercial possui 5 clados. O primeiro e o quarto clados possuem apenas AtRALFs. O segundo clado possui o SIRALF4 que está em um subclado com AtRALFs 17/27, estes estão próximos, provavelmente, por se tratar de sequências muito divergentes das demais, como é possível ver na Tabela 3, pela estimativa de divergência evolucionária o SIRALF4 se aproxima mais do AtRALF6, pertencente ao primeiro clado. O SIRALF8 também pertence ao segundo clado e divide um nó com AtRALF32, pela divergência de estimativas evolucionárias, SIRALF8 realmente se assemelha mais com AtRALF32 se comparado aos demais, se comparadas as divergências evolucionárias dentro de tomateiro, SIRALF8 permanece mais semelhante com AtRALF32 (Tabela 04). O terceiro clado é onde está a maior parte dos SIRALFs, nesse clado há a formação de vários subclados. O primeiro subclado não possui SIRALFs, o segundo subclado contém os SIRALFs 6/10 e os AtRALFs 4/19, o terceiro subclado contém os SIRALFs 9/11 e os AtRALFs 31/24 e, por fim, há um quarto subclado com os SIRALFs 1/2/3/7 e os AtRALFs 1/22/23/33, contudo o SIRALF3 é um membro mais deslocado deste subclado. O quinto e último clado é

pequeno e contém os SIRALF5 e AtRALF34, esse clado possivelmente foi formado pela semelhança com o PpRALF que foi usado como membro externo.



**Figura 6.** Árvore filogenética dos RALFs de tomateiro e arabidopsis. A árvore foi construída pelo método Neighbor Joining e com 1000 bootstraps. O RALF de *Physcomitrium patens* (PpRALF) foi utilizado como membro externo. A árvore filogenética foi realizada no MEGA 11.

**Tabela 3.** *Heatmap* da estimativa das divergências evolucionárias entre as sequências de SIRALF e AtRALF. É mostrado o número de diferenças em aminoácidos por sítio. Esta análise envolveu 49 sequências de aminoácidos. Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequências (opção de exclusão pareada). Houve um total de 259 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas no MEGA11.

	SIRALF1_	SIRALF10_	SIRALF11_	SIRALF2_	SIRALF3_	SIRALF4_	SIRALF5_	SIRALF6_	SIRALF7_	SIRALF8_	SIRALF9_
AtRALF1_(At1g02900)	0,5630	0,7212	0,5966	0,4352	0,5362	0,8448	0,7453	0,7321	0,4602	0,6796	0,6415
AtRALF10_(AT2G19020)	0,7571	0,7826	0,7042	0,7015	0,7385	0,8630	0,6901	0,7246	0,7353	0,7286	0,7887
AtRALF11_(AT2G19030)	0,7246	0,7794	0,7143	0,6818	0,7344	0,8194	0,6857	0,7206	0,7015	0,6812	0,7714
AtRALF12_(AT2G19040)	0,7246	0,7794	0,7143	0,6970	0,7188	0,8056	0,6857	0,7206	0,7164	0,6812	0,7714
AtRALF13_(AT2G19045)	0,7246	0,7941	0,7143	0,6970	0,7188	0,8056	0,6857	0,7353	0,7164	0,6812	0,7714
AtRALF14_(AT2G20660)	0,7320	0,7634	0,7822	0,7556	0,6780	0,9010	0,7742	0,7653	0,7692	0,7500	0,7113
AtRALF15_(AT2G22055)	0,6857	0,6812	0,7013	0,6567	0,6912	0,8816	0,6716	0,6269	0,6471	0,7681	0,7042
AtRALF16_(AT2G32835)	0,7714	0,8116	0,7595	0,7761	0,6765	0,8696	0,7463	0,7463	0,7794	0,7391	0,7606
AtRALF17_(AT2G32885)	0,8611	0,9155	0,8243	0,8235	0,8923	0,8961	0,8889	0,9143	0,8116	0,8732	0,8857
AtRALF18_(AT2G33130)	0,7374	0,7708	0,7843	0,7444	0,6875	0,8447	0,7660	0,7778	0,7582	0,7778	0,7857
AtRALF19_(AT2G33775)	0,6078	0,6330	0,6852	0,6042	0,6866	0,8641	0,6408	0,6574	0,5625	0,7368	0,6633
AtRALF2_(At1g23145)	0,7353	0,7692	0,7333	0,6984	0,7031	0,8854	0,6825	0,7302	0,7273	0,7313	0,7077
AtRALF20_(AT2G34825)	0,7714	0,7656	0,7606	0,6923	0,7258	0,8873	0,7231	0,7656	0,7059	0,7206	0,7538
AtRALF21_(AT3G04735)	0,7183	0,7536	0,7375	0,6667	0,7463	0,8725	0,7164	0,7164	0,7536	0,7000	0,7571
AtRALF22_(AT3G05490)	0,5169	0,7019	0,6271	0,4444	0,5735	0,8696	0,6857	0,6667	0,4779	0,6990	0,5810
AtRALF23_(AT3G16570)	0,5203	0,6726	0,6587	0,4414	0,5429	0,9068	0,6727	0,6885	0,4348	0,7009	0,6389
AtRALF24_(AT3G23805)	0,6486	0,6667	0,5254	0,6408	0,7222	0,8644	0,7264	0,7091	0,6538	0,6768	0,6339
AtRALF25_(AT3G25165)	0,7794	0,8116	0,7500	0,7692	0,7576	0,8514	0,7246	0,8209	0,7879	0,7681	0,7887
AtRALF26_(AT3G25170)	0,7361	0,8056	0,7297	0,7391	0,7576	0,8289	0,6438	0,8028	0,7714	0,7123	0,7973
AtRALF27_(AT3G29780)	0,7739	0,7800	0,7500	0,7282	0,7879	0,9224	0,8713	0,7944	0,7315	0,7900	0,7944
AtRALF28_(AT4G11510)	0,7246	0,8060	0,7532	0,7188	0,7077	0,9268	0,7385	0,7846	0,7612	0,7353	0,7353
AtRALF29_(AT4G11653)	0,6667	0,7647	0,7432	0,6970	0,6923	0,9222	0,7164	0,7576	0,7313	0,7353	0,7647
AtRALF3_(AT1G23147)	0,7183	0,7059	0,7333	0,6818	0,7188	0,8590	0,7015	0,7164	0,7536	0,7857	0,7391
AtRALF30_(AT4G13075)	0,7917	0,8472	0,7568	0,7391	0,7727	0,8816	0,7534	0,8169	0,7857	0,7945	0,8378
AtRALF31_(AT4G13950)	0,6321	0,7100	0,5664	0,6566	0,6812	0,8761	0,7353	0,7714	0,6500	0,6809	0,6759
AtRALF32_(AT4G14010)	0,6944	0,7404	0,7522	0,7677	0,7286	0,8750	0,7500	0,7524	0,7500	0,5455	0,7525
AtRALF33_(AT4G15800)	0,4779	0,7019	0,6161	0,3750	0,5507	0,8532	0,6634	0,6909	0,4074	0,6667	0,6311
AtRALF34_(AT5G67070)	0,7034	0,7179	0,7025	0,6545	0,6866	0,8707	0,4609	0,7280	0,7000	0,7624	0,6881
AtRALF35_(AT1G60913)	0,7101	0,7538	0,7361	0,7273	0,7097	0,8289	0,7576	0,7846	0,7313	0,8030	0,7910
AtRALF36_(AT2G32785)	0,7761	0,8308	0,8261	0,7500	0,7833	0,8841	0,7846	0,8000	0,7692	0,8594	0,8615
AtRALF37_(At2g32788)	0,7667	0,8519	0,8065	0,7593	0,8200	0,9194	0,7455	0,8148	0,7414	0,8421	0,8727
AtRALF4_(AT1G28270)	0,6373	0,6606	0,7222	0,6354	0,6866	0,8738	0,6505	0,6944	0,6042	0,7684	0,7041
AtRALF5_(AT1G35467)	0,6176	0,7463	0,7333	0,6000	0,6667	0,8427	0,6818	0,7231	0,6515	0,6567	0,6866
AtRALF6_(AT1G60625)	0,7183	0,8030	0,6986	0,7164	0,7302	0,7949	0,7761	0,7727	0,7059	0,7612	0,7941
AtRALF7_(AT1G60815)	0,7324	0,7879	0,6986	0,7164	0,6667	0,8205	0,7612	0,7879	0,7353	0,7612	0,8088
AtRALF8_(AT1G61563)	0,6901	0,6957	0,7215	0,6716	0,7206	0,8987	0,7313	0,7164	0,6765	0,7826	0,7042
AtRALF9_(AT1G61566)	0,6377	0,7164	0,6849	0,6364	0,6094	0,8889	0,6970	0,6923	0,6119	0,7313	0,7246

**Tabela 4.** *Heatmap* da estimativa das divergências evolucionárias entre as sequências de SIRALF. É mostrado o número de diferenças em aminoácidos por sítio. Esta análise envolveu 49 sequências de aminoácidos. Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequências (opção de exclusão pareada). Houve um total de 259 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas no MEGA11.

	SIRALF1_	SIRALF10_	SIRALF11_	SIRALF2_	SIRALF3_	SIRALF4_	SIRALF5_	SIRALF6_	SIRALF7_	SIRALF8_	SIRALF9_
SIRALF1_(Solyc01g067900)											
SIRALF10_(Solyc12013895)	0,7000										
SIRALF11_(Solyc12g098510)	0,6560	0,7328									
SIRALF2_(Solyc01g099520)	0,4123	0,6923	0,5982								
SIRALF3_(Solyc02g014290)	0,5362	0,6957	0,6892	0,5522							
SIRALF4_(Solyc02g089080)	0,8906	0,8909	0,9055	0,8519	0,8243						
SIRALF5_(Solyc02g090960)	0,7091	0,7453	0,7434	0,6765	0,5882	0,8571					
SIRALF6_(Solyc07g063030)	0,7119	0,4202	0,7541	0,6606	0,7164	0,8870	0,7168				
SIRALF7_(Solyc09g074890)	0,4237	0,6827	0,6552	0,3363	0,5224	0,8850	0,6893	0,6881			
SIRALF8_(Solyc09g092235)	0,6731	0,8200	0,6972	0,6947	0,7101	0,8716	0,7423	0,7600	0,6700		
SIRALF9_(Solyc12g005460)	0,6273	0,6667	0,6385	0,6505	0,6479	0,9115	0,7619	0,7000	0,6538	0,7245	

Os resultados demonstram que o SIRALF4 diverge consideravelmente dos demais RALFs, assim como o AtRALF17 (Tabela 3), porém, ao considerar todas as

divergências de *SIRALF4*, coloca-se em questão sua posição como participante da família dos *RALFs*.

#### 1.1.4. *SIRALF1* é ubíquo nos tecidos vegetais

Para conhecer a expressão dos genes *SIRALFs*, foram consultados os dados existentes no *Tomato Genomics Database* (Fei et al. 2011). Em *Solanum pimpinellifolium*, acesso LA1589, *SIRALF1* é expresso em toda planta, sendo mais expresso em flores em antese, frutos 10 dias pós antese (dpa), no hipocótilo, meristema vegetativo e nas folhas maduras; em frutos 4 dpa, *SIRALF1* está presente nos funículos e no septo. A média de expressão de *SIRALF1* é 60,52% superior que a expressão média dentre os *SIRALFs*. O também ubíquo *SIRALF2* apresenta elevada expressão gênica no hipocótilo e em toda a raiz; sendo, dentre os *SIRALFs*, o mais expresso nos órgãos femininos a 0 dpa e a 4 dpa, sua expressão é 76,35% maior que a média. A expressão do *SIRALF3* é 77% maior que a média das expressões gênicas dos *SIRALFs* em antese e 90% maior que a média geral de expressão de *SIRALF* na planta, contudo essa expressão não é derivada de órgãos femininos. *SIRALF4* tem sua expressão destacada nas folhas maduras, na qual a expressão é 64,81% superior à média de expressão em folhas maduras e no fruto 10 dpa, no qual a expressão é 26,75% superior à média de expressões no fruto 10 dpa. *SIRALF5* se expressa mais 61,72% em folhas jovens e 36,85% a mais em frutos 10 dpa que a média. *SIRALF6* só se expressa em flores em antese, sendo essa expressão 83,32% maior que a expressão média total dos *RALFs* em *S. pimpinellifolium*, *SIRALF6* possui uma expressão baixa, que é 86,7% menor que a média das expressões nos órgãos femininos. *SIRALF7* é o que mais se expressa em raiz, sendo sua expressão 73,61% maior que a média de expressões em raiz. *SIRALFs 8/10* não estão presentes em *S. pimpinellifolium*. *SIRALF9* possui uma baixa expressão e ela ocorre prioritariamente em flores em antese, de forma que sua expressão em flores é igual a média de expressão geral e 70% menor que a média de expressão em flores em antese. *SIRALF11* é ubíquo e mais expresso 44,59% em frutos 10 dpa e 60,53% em frutos 20 dpa.



**Tabela 5.** Heatmap da expressão normalizada em RPKM (leituras por quilo base por milhão de leituras mapeadas) dos *SIRALFs* em diferentes partes da planta de *Solanum pimpinellifolium* acesso LA1589. Dpa, dias pós antese. Os dados foram obtidos em *Tomato Functional Genomics Database* (TFGD cornell.edu).

LA1589	flores em antese	10dpa fruto	10 dpa fruto 2	frutos 20 dpa	frutos mafutod	cotiledone	hipocotilo	meristem an vegetativos	folhas maduras	toda raiz	ovens botões florais	Folhas jovens
SIRALF1	122,81	117,91	150,88	61,04	40,08	61,42	106,64	94,79	96,36	20,11	71,35	59,6
SIRALF2	59,77	71,33	78,85	92,02	53,09	65,92	132,16	53,1	31,29	128,29	23,48	26,21
SIRALF3	426,24	1,78	0,12	0	0	0,06	0	0,06	0,94	0,38	0	0
SIRALF4	11,74	76,75	102,11	26,41	2,49	29,09	76,96	42,97	84,59	9,51	44	66,48
SIRALF5	3,89	85,72	121,74	16,43	0,26	14,93	11,98	30,25	1,38	0,06	68,13	95,03
SIRALF6	193,81	0,87	0,12	0	0	0,03	0	0	0,52	0,06	0,01	0
SIRALF7	5,8	2,77	0,55	13,9	5,37	3,61	7	0,31	1,14	151,84	0,23	0,75
SIRALF8												
SIRALF9	32,16	0,22	0	0	0	0,02	0	0	0,1	0	0	0
SIRALF10												
SIRALF11	21,5	125,26	111,18	97,25	9,99	24,44	41,16	36,04	21,81	10,73	37,12	42,92

**Tabela 6.** Heatmap da expressão normalizada em RPKM (leituras por quilo base por milhão de leituras mapeadas) dos *SIRALFs* em diferentes partes do ovário e do fruto de *Solanum pimpinellifolium* acesso LA1589. Dpa, dias pós antese. Os dados foram obtidos em *Tomato Functional Genomics Database* (TFGD cornell.edu)

LA1589	Ovulo 0dpa	Placenta 0 dpa	Septo 0 dpa	Pericarpio 0 dpa	Embrião 4 dpa	Endosperma 4 dpa	tégumento da semente 4 dpa)	Funiculos 4 dpa	Placenta 4 dpa	Septo 4 dpa	Pericarpio 4 dpa
SIRALF1	49,54	67,29	91,07	59,24	37,3	39,15	86,97	94,6	72,85	148,84	51,67
SIRALF2	227,54	133,67	317,23	50,06	68,87	146,71	102,65	84,78	46,31	114,21	140,85
SIRALF3	0,38	1,12	7,58	12,62	1,99	0,1	0,25	0,07	0,07	0,28	0,52
SIRALF4	14,82	7,79	16,7	25,73	6,12	6,78	7,24	22,77	33,46	19,29	8,34
SIRALF5	2,61	1,22	11,77	9,89	1,7	4,01	16,05	22,99	22,53	52,14	11,16
SIRALF6	0,67	4,97	18,54	14,83	4,25	0,14	0,05	0,18	0,06	0,18	1,28
SIRALF7	2,34	2,28	3,86	1,54	3,92	2,2	1,38	1,39	1,05	0,61	1,52
SIRALF8											
SIRALF9	0,51	1,28	1,23	5,07	1,82	1,39	0,79	0,38	0,07	0,21	0,62
SIRALF10											
SIRALF11	6,49	3,75	2,93	4,32	2,12	2,36	11,18	4,65	3,91	3,99	6,09

Através dos resultados, percebe-se que alguns *SIRALFs* são órgão ou tecido específicos, a exemplo do *SIRALF7* que se expressa mais em raízes e do *SIRALF3* que se expressa em flores em antese.

## 1.2. Discussão

A Filogenética estuda a história evolutiva e as relações entre grupos de sequências de proteínas ou de ácidos nucleicos. O estudo da filogenia busca encontrar uma relação evolucionária entre organismos diferentes e as mudanças que ocorreram entre eles; encontrar uma conexão entre ancestral e descendente; e estimar a divergência entre indivíduos com um ancestral em comum (Sharma et al. 2023). No primeiro capítulo da minha dissertação foi apresentada uma análise filogenética da família de peptídeos RALFs em *Solanum*.

Li et al., (2023) fizeram a filogenia de 13 genomas de tomateiro, desses genomas, do mais próximo ao mais distante de *S. lycopersicum*, estão: *S. galapagense*, *S. pimpinellifolium*, *S. chmielewskii*, *S. neorickii*, *S. corneliomulleri*, *S. peruvianum*, *S. chilense*, *S. pennellii*, *S. habrochaites*, *S. lycopersicoides* e *S. tuberosum*. Neste estudo, foi observado que apenas 54% dos genes de tomateiro são constantes em todas as espécies e que há muitas variantes estruturais em todos os genomas de tomateiro, que são uma boa fonte de diversidade genômica.

Ao realizar a filogenia dos peptídeos RALF em *Solanum*, a ordem demonstrada no estudo de Li et al. (2023) não é observada. *S. lycopersicum* não é colocado como o mais recente das espécies, na maior parte das aberturas de nós, os SIRALFs estão como segunda ou terceira posição em um grupo, possivelmente esse é um resultado da alta similaridade e identidade entre as cadeias de aminoácidos (Anexo A e B). Os valores de *bootstraps* se alteram a depender do homólogo, e mesmo em situações que os *bootstraps* são altos, como nos RALFs 5 de *Solanum*, a ordem não é igual a Li et al (2023), contudo as sequências são idênticas, possuindo 100% de similaridade e identidade, sendo improvável que o programa forneça uma ordem evolutiva acurada. No entanto, ao analisar as divergências evolucionárias para com *S. lycopersicum*, observa-se que aquelas espécies que possuem mais peptídeos iguais a *S. lycopersicum*, são aquelas que são mais próximas filogeneticamente, e as espécies com menos peptídeos ativos iguais, são as mais distantes filogeneticamente pela árvore de Li et al (2023).

Campbell e Turner (2017) fizeram uma distribuição dos RALFs em grupos. Este trabalho é o mais compreensivo até o momento, envolvendo 795 RALFs de 51 espécies. Por esse motivo seria interessante alocar os SIRALF dentro dos dois grupos criados por Campbell e Turner (2017). O primeiro grupo, nomeado grupo dos clados I, II, III, tem a característica dos motivos YISY, RRXL e as cisteínas serem conservados; no outro grupo, nomeado grupo do clado IV, estão os RALFs diferentes, que não possuem o motivo da convertase S1P, o motivo YISY não é conservado, e a segunda cisteína está deslocada. SIRALFs 1/2/7/11 possuem motivos sem alterações (Figura 4), dessa forma esses RALFs estariam agrupados com os clados I, II e III. O SIRALF3, por não possuir o sítio da S1P e o motivo YISY conservado, agruparia com os genes do clado IV. O SIRALF5 seria um membro do clado IV, pois não possui o sítio da S1P, e tem a segunda cisteína deslocada, contudo, seu motivo YISY está conservado. O SIRALF6 provavelmente é participante do grupo dos clados I, II e III, apesar do motivo YISY não ser totalmente conservado, se vê essa modificação nas descrições de Campbell e Turner (2017), o mesmo pode ser dito

sobre SIRALF9. O SIRALF8 possui o sítio da S1P, apesar de não conservado, assim como o motivo YISY, e tem a segunda cisteína deslocada, mas considerando que a ausência do RRXL é importante para participar do clado IV, SIRALF8 pertence ao grupo do clado I, II e III. SIRALF10 possui o S1P, as cisteínas conservadas, e possui o motivo YISY modificado, considerando a presença de dois motivos de forma conservada ele pertence ao grupo dos cladros I, II e III. O mais difícil de definir é o SIRALF4, pois ele possui um sítio não conservado da S1P, contudo, não possui o motivo YISY, tem um peptídeo sinal muito maior que os demais, apesar das cisteínas serem conservadas os aminoácidos que estão entre elas não são conservados; por ser diferente dos demais ele não se encaixa muito bem em nenhum clado, porém como os peptídeos do clado IV são divergentes, SIRALF4 é mais representado por ele.

O SIRALF4 o mais divergente dos SIRALFs, possui uma preproteína de 217 aminoácidos enquanto os demais variam de 74 a 152, não possui o motivo YISY e os aminoácidos entre as cisteínas não são conservados. A falta de conservação sugere inclusive que a classificação desta proteína como um RALF possa estar equivocada, testes funcionais como o de alcalinização, inibição de raiz primária e mobilização de cálcio são necessários para esclarecer este ponto. Interessante observar que o grau de divergência do SIRALF4 para o RALF originalmente isolado de tabaco, 17% de identidade e 26% de similaridade, não é inferior àquele observado entre o AtRALF17 e o NtRALF1, 13% de identidade e 26% de similaridade,

Através da árvore filogenética entre os SIRALFs e os AtRALFs, é possível sugerir o envolvimento dos SIRALFs com as funções pré-definidas dos AtRALFs. Os SIRALFs 6 e 10 estão agrupados com os AtRALFs 4 e 19, estes AtRALFs provavelmente estão ligados a manutenção da integridade do tubo polínico (Mecchia et al. 2017; Morato do Canto et al. 2014). Nesse caso podemos inferir que esses peptídeos, ou ao menos o SIRALF6, tem papel no crescimento do tubo polínico, pois SIRALF6 também denominado SIPRALF, está envolvido no crescimento do tubo polínico (Covey et al. 2010). Os SIRALFs 1/2/7 estão agrupados com os AtRALFs 1/22/23/33, estes RALFs possuem múltiplas funções, participando da expansão celular, modulação da resposta ao estresse e participação na imunidade da planta (Bergonci et al. 2014; Zhao et al. 2018; Abarca, Franck, e Zipfel 2021). Pode-se estipular através dos dados de expressão que SIRALF7 está envolvido no controle do crescimento radicular, já que se expressa prioritariamente na raiz. Já sobre SIRALFs 1/2 é incerto prever suas funções, pois estes estão presentes em todos os tecidos. O SIRALF2 já foi caracterizado, sabe-se que a

aplicação exógena causa inibição do crescimento radicular e que ele alcaliniza meio de células em suspensão (Gregory Pearce et al. 2001). Sobre o SIRALF3, devido à falta de conservação de estrutura primária com os demais RALFs, seu posicionamento na árvore é isolado ainda que mais próximo do clado contendo os AtRALFs 1/22/23/33 e os SIRALFs 1/2/7, não permitindo inferências sobre seu papel biológico. A expressão de *SIRALF3* é majoritariamente em flores em antese, contudo não está presente nas partes femininas, sugerindo um papel no crescimento ou manutenção da integridade do tubo polínico. O SIRALF4 se une ao AtRALF17 na árvore filogenética, mas esse resultado não deve indicar uma verdadeira semelhança, possivelmente foram unidos por serem diferentes dos demais. O *SIRALF4* está expresso em toda planta com valores menores na raiz e em flores em antese, como não é similar a nenhum AtRALF é difícil prever uma função. O SIRALF5 se assemelha ao AtRALF34 que é antagonista dos AtRALFs 4/19, sendo importante para a ruptura do tubo polínico (Ge et al. 2017). Contudo a expressão de *SIRALF5* em órgãos femininos em antese é muito baixa, colocando em dúvida essa possível função. AtRALF34 também demonstrou ser importante na iniciação de raízes laterais (Murphy et al. 2016), mas a expressão de *SIRALF5* em raízes é quase inexistente. O SIRALF8 está em um clado junto com o AtRALF32, não há muito sobre o AtRALF32 além de que ele é capaz de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Abarca, Franck, e Zipfel 2021), que talvez seja uma possibilidade para o SIRALF8. O SIRALF9 forma um clado com o SIRALF11 e os AtRALFs 24/31. O AtRALF24 mostrou ser capaz de induzir a produção de ROS, e os AtRALFs 24/31 alcalinizaram o meio de células em suspensão, inibiram crescimento radicular e do hipocótilo e influenciaram na germinação do pólen (Morato do Canto et al. 2014; Abarca, Franck, e Zipfel 2021). Baseado na expressão gênica, o *SIRALF9* terá seu papel na reprodução, provavelmente na regulação do crescimento do tubo polínico ou germinação do pólen, em vista que sua expressão é detectada apenas em flores em antese, e tem expressão ínfima nas partes femininas. Já o SIRALF11 talvez tenha algum papel na formação do fruto pois sua maior expressão é em frutos 10 dpa, contudo está presente em toda planta.

### **1.3. Materiais e Métodos**

#### **1.3.1. Obtenção das sequências que codificam os peptídeos RALFs e análise filogenética**

Utilizando as sequências dos AtRALFs que foram adquiridas através do TAIR (Poole 2007), buscou-se por sequências similares de tomateiro em *Sol Genomics Network* através do BLAST. Para identificar os RALFs dos tomateiros selvagens utilizou-se o BLAST no TOMATO (biocloud.net) (N. Li et al. 2023).

Os RALFs de *Solanum lycopersicum* foram denominados de acordo com a posição dos genes nos cromossomos (Figura 7), as demais espécies de *Solanum* foram denominadas de acordo com a similaridade com os SIRALFs.

As sequências obtidas da prepreproteína de RALF de tomateiro e arábida foram alinhadas por ClustalW, aparadas para que restasse apenas o peptídeo ativo, a sequência de aminoácidos a partir do motivo -YISY. O programa MEGA versão 11 (State College, PA, EUA) foi utilizado para construir uma árvore filogenética de Neighbor-Joining com 1000 réplicas bootstrap, uma deleção pareada e um modelo de Poisson. Em seguida o MEGA foi utilizado para construir as estimativas de divergência evolucionária. Foi utilizado o modelo Poisson, com *Uniform Rates* e *Pairwise deletion*.



**Figura 7.** Posição dos SIRALFs nos cromossomos de *Solanum lycopersicum*

### 1.3.2. Motivos de RALF

Para encontrar os motivos de RALF em *S. lycopersicum* foi utilizado o servidor MEME (Bailey et al. 2015) on-line. A análise foi realizada com requisição de 10, 7, 5 e 3 motivos. Ao final foi escolhido manter apenas 3 motivos, pois esses eram os que se mantinham constantes entre os RALFs.

### 1.3.3. Expressão gênica dos SIRALFs em *Solanum pimpinellifolium*

Os dados de RNA-seq foram obtidos através do servidor *Tomato Functional Genomics Database* (Fei et al. 2011). Os dados foram extraídos de dois experimentos o D006 - Análise do transcriptoma de vários tecidos na espécie selvagem, *S. pimpinellifolium*, LA1589 e o experimento D009- Perfil transcriptômico tecido-específico dos ovários e frutos usando LCM-acoplado ao RNA-seq. de *S. pimpinellifolium*.



## 2. CARACTERIZAÇÃO DO MUTANTE DO GENE *SIRALF1* (*slralf1*)

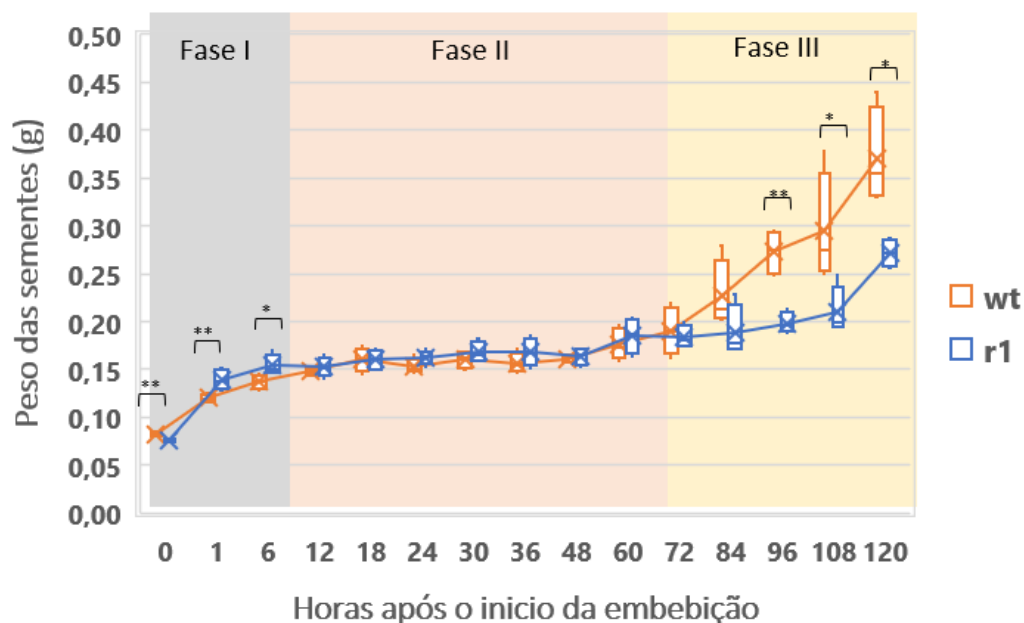
### 2.1. Resultados

#### 2.1.1. O gene *SIRALF1* está envolvido na germinação

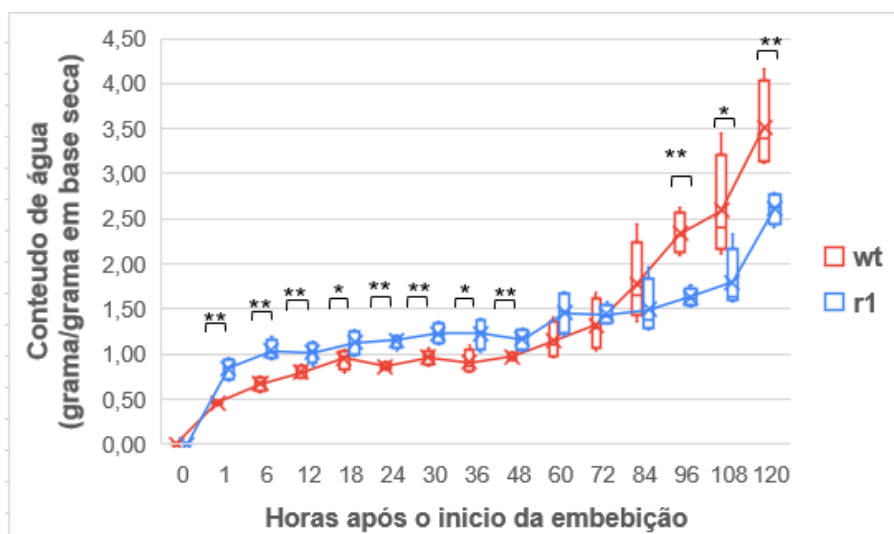
Com a finalidade de detectar possíveis alterações na germinação de sementes do mutante *slralf1*, a germinação foi monitorada através de medidas recorrentes do peso de 25 sementes. A germinação ocorre em três fases, na fase I, chamada fase de embebição, observa-se o aumento do peso das sementes conforme as sementes absorvem a água; a fase II, fase lag, é uma fase estacionária no aumento do peso das sementes, na qual as atividades metabólicas retornam a acontecer; e, por fim, a fase III, ou fase log, onde ocorre a retomada do aumento do peso da semente com a divisão celular iniciada, é no início da fase log que ocorre a protrusão da radícula (Bewley et al. 2012). Na primeira fase da curva, o genótipo selvagem começa com um maior peso, porém após 1 e 6 h de embebição, observa-se um aumento do peso das sementes mutantes, gerando uma diferença de 7,45% nos pesos das sementes. Já na fase lag, não há diferença significativa nos pesos. No início da fase log, não há diferença entre *slralf1* e wt, contudo conforme a radícula se desenvolve, as plantas wt passam a ser 28,8% mais pesadas que as *slralf1* (Figura 8).

O conteúdo de água ao longo da germinação também foi mensurado (Figura 9). Observa-se que o conteúdo de água aumentou 1,73 vezes mais em sementes *slralf1* do que em sementes wt na primeira hora de experimento. O gráfico mostra que durante a fase lag, *slralf1* apresenta um maior conteúdo de água, o que é alterado ao atingir 60 h, quando ocorre a protrusão da radícula de wt. Conforme as raízes se desenvolvem, o *slralf1* passa a ter menor conteúdo de água, aproximadamente 1,5 vezes menor.





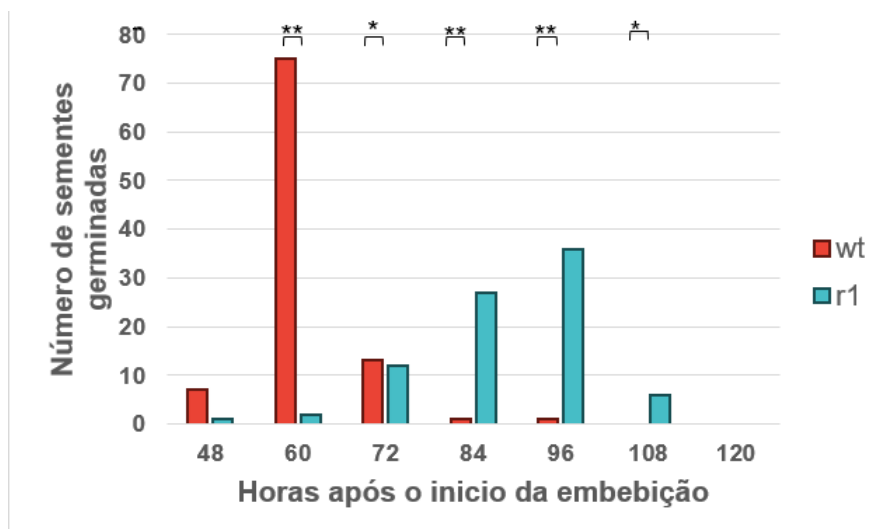
**Figura 8.** Peso fresco de 25 sementes após o início da embebição até 120 h. O experimento foi realizado com  $n = 4$  e foi repetido 2 vezes. No gráfico, a mediana é representada por uma reta no interior das caixas e a média é representada pelo x. wt, wild type; r1, mutante *slralfl*. \*\*, significância pelo teste  $t$   $p=0,01$ . \*, significância pelo teste  $t$   $p=0,05$ .



**Figura 9.** Conteúdo de água de 25 sementes usando como base o peso da semente seca respeitando a equação conteúdo de água = peso fresco \* peso seco / peso seco (Pereira et al, 2022). O experimento foi realizado com  $n = 4$  e foi repetido 2 vezes. No gráfico a mediana é representada por uma reta no interior das caixas e a média é representada pelo x. wt, wild type; r1, mutante *slralfl*. \*\*, significância pelo teste  $t$   $p=0,01$ . \*, significância pelo teste  $t$   $p=0,05$ .

As sementes de wt emitem a radícula 24 h antes que as sementes de *slralfl*, sendo que *slralfl* também tem uma maior distribuição da germinação ao longo do tempo, de 72 a 108 h após o início da embebição (Figura 10). O início da germinação coincide com o

aumento conteúdo de água presente nas sementes, entrada na fase log. As sementes de *slralf1* obtiveram uma germinação de 84% já a taxa de germinação de wt foi de 97%.



**Figura 10.** Germinação ao longo do tempo. O experimento foi realizado com  $n = 4$  e foi repetido 2 vezes. No gráfico, a mediana é representada por uma reta no interior das caixas e a média é representada pelo  $\bar{x}$ . wt, wild type; r1, mutante *slralf1*. \*\*, significância pelo teste t  $p=0,01$ . \*, significância pelo teste t  $p=0,05$ .

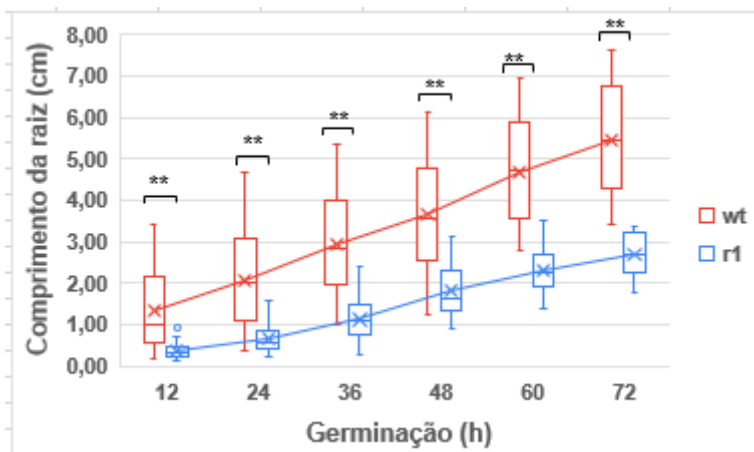
Esses resultados demonstram que a mutação no gene *SIRALF1* fez com que as sementes fossem capazes de absorver 21% mais água do que os controles, contudo isso não resultou em uma germinação mais rápida, pelo contrário, as sementes *slralf1* demoram 24 h a mais para iniciar sua germinação. Também foi observada uma germinação menos uniforme, ou seja, as sementes deixam de germinar no mesmo tempo e passam a germinar em uma janela de tempo maior.

### 2.1.2. O gene *SIRALF1* interfere no crescimento da raiz

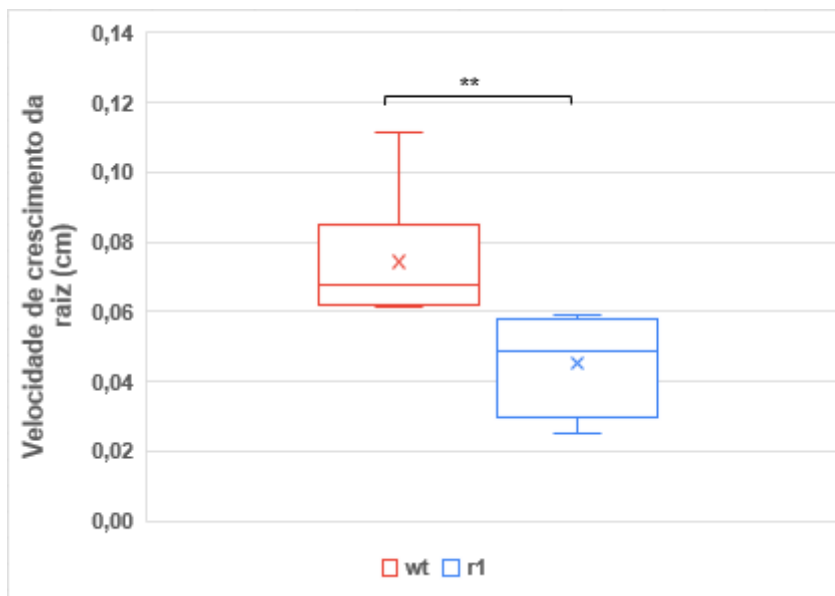
Para caracterização do crescimento radicular do mutante *slralf1*, foram realizados ensaios de crescimento da raiz primária em placas de Petri. Após 72 h da germinação, as raízes alcançaram um comprimento médio de 5,5 cm para wt (controle) e 2,75 cm para *slralf1* (Figura 11). Após 12 h da emissão da radícula, o mutante *slralf1* mostrou uma raiz primária 2 vezes menor que o wt, com uma velocidade de crescimento 1,5 vezes inferior ao controle wt (Figuras 12 e 13).



**Figura 11.** Plantas 5 d após semeadas em papel filtro e água. Wt, wild type controle. *slralf1*, mutantes para o gene *SIRALF1*.



**Figura 12.** Comprimento da raiz primária de wild type (wt) e de *slralf1* de 12 a 72 h após a germinação. O comprimento das raízes foi aferido pelo ImageJ. O experimento foi realizado com  $n=50$  e foi repetido 3 vezes. No gráfico a mediana é representada por uma reta no interior das caixas e a média é representada pelo x. \*\*, significância pelo teste  $t p=0,01$ .



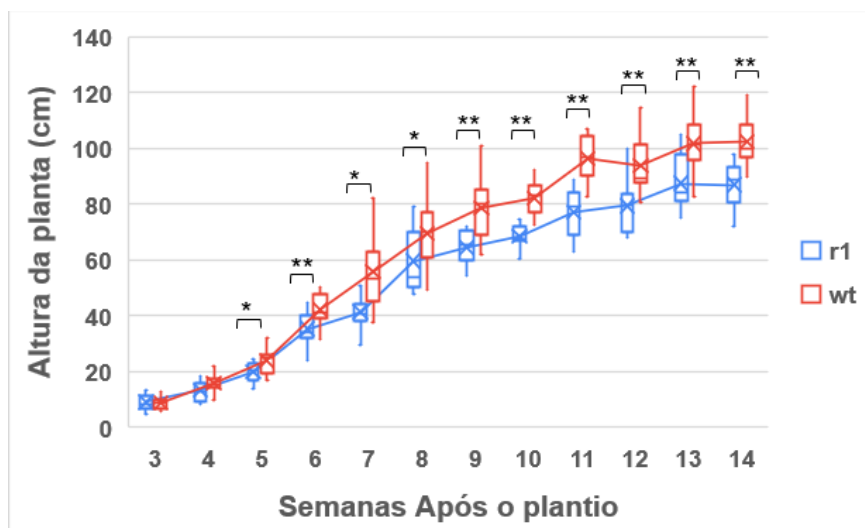
**Figura 13.** Índice de crescimento radicular em 1 h. O experimento foi realizado com  $n=50$  e foi repetido 3 vezes. No gráfico, a mediana é representada por uma reta no interior das caixas e a média é representada pelo x. wt, wild type controle. r1, mutante *slralf1*. \*\*, significância pelo teste t  $p=0,01$ .

Pelos resultados pode-se inferir que a ausência do gene *SIRALF1* compromete o crescimento da raiz primária de tomateiro, levando a um crescimento lento se comparado com o controle.

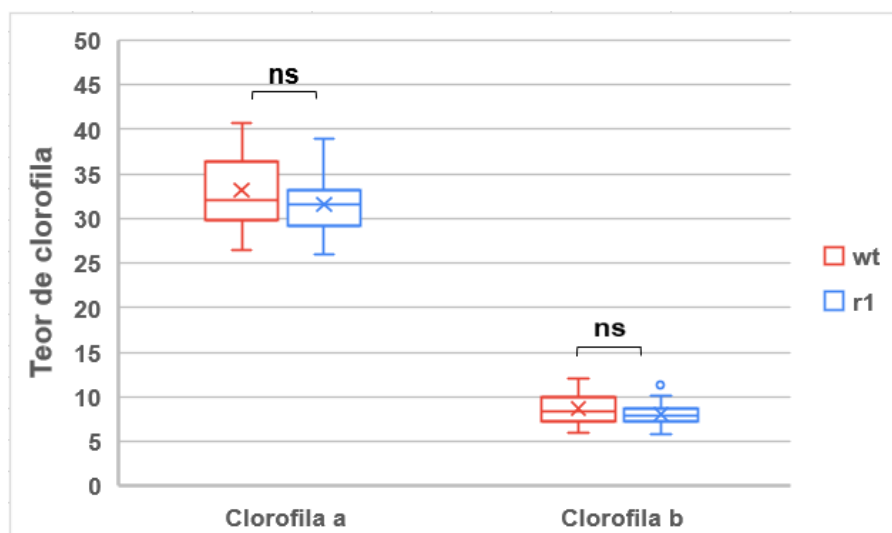
### 2.1.3. Os mutantes *slralf1* tem folhas menos complexas

Para averiguar se o mutante *slralf1* tem o crescimento da planta alterado, a altura da planta foi aferida entre a 3<sup>a</sup> e a 14<sup>a</sup> semana. É possível observar que, a partir da 5<sup>a</sup> semana, a altura das plantas de *slralf1* foi 19,8 % menor que o controle, a diferença entre as alturas foi reduzindo com o passar das semanas, sendo que na 14<sup>a</sup> semana a altura de *slralf1* estava 10,7% menor que de wt (Figura 14).

A fim de observar se a ausência do peptídeo SIRALF1 tem efeito na clorofila, as clorofilas a e b foram mensurados com um SPAD. Observou-se que não houve diferença no teor de clorofila a e b entre plantas controle e mutante (Figura 15).



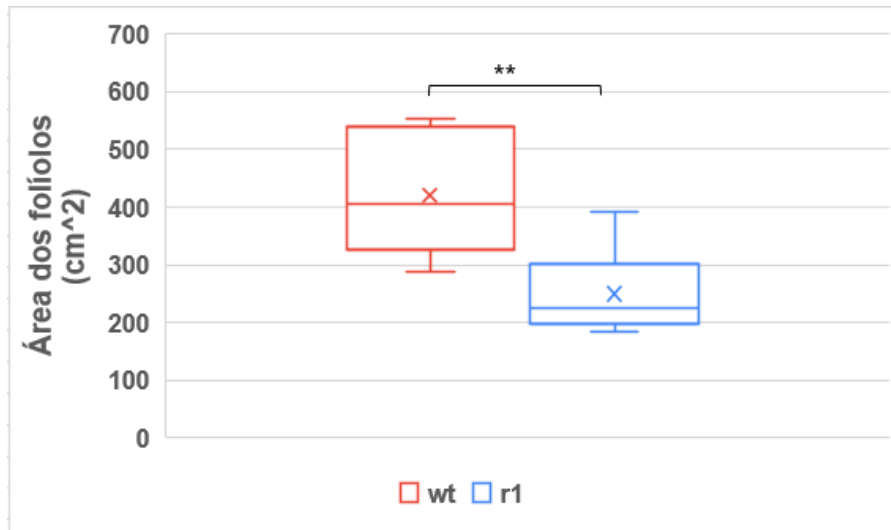
**Figura 14.** Altura da planta ao longo do tempo. O experimento foi realizado com  $n=10$ . No gráfico a mediana é representada por uma reta no interior das caixas e a média é representada pelo x. Na legenda. wt, wild type controle. r1, mutante *slralf1*. \*\*, significância pelo teste t  $p=0,01$ . \*, significância pelo teste t  $p=0,05$ . ns, não significativo



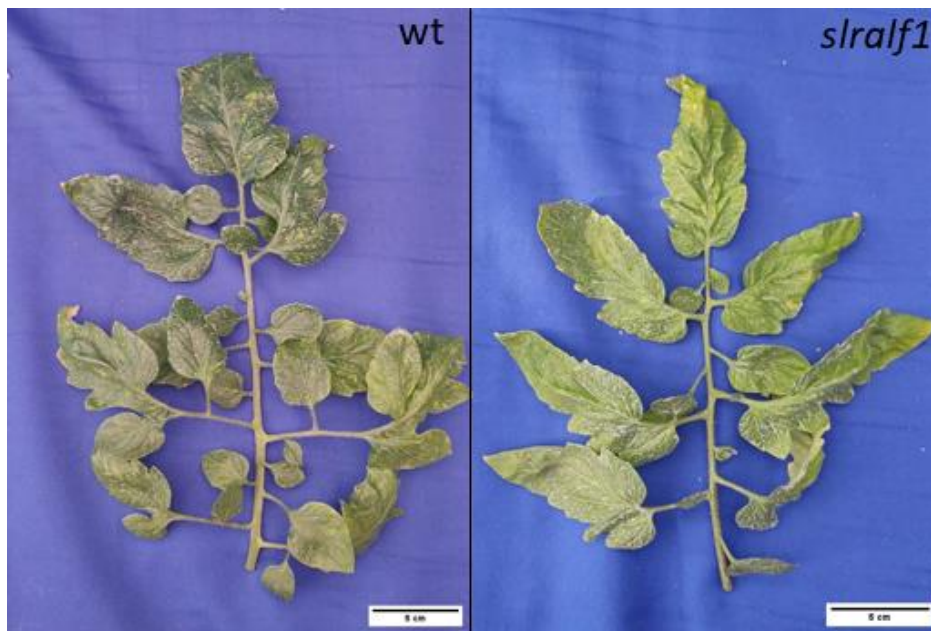
**Figura 15.** Teor de clorofila coletado com o SPAD. O experimento foi realizado com  $n=30$ . No gráfico a mediana é representada por uma reta no interior das caixas e a média é representada pelo x. wt, wild type controle. r1, mutante *slralf1* ns, teste t não significativo

Com a finalidade de caracterizar as folhas do mutante *slralf1*, folhas totalmente expandidas foram selecionadas do 4º e 5º nós a partir da base da planta. As folhas de *slralf1* têm uma área foliar menor que as wt, com uma diferença média superior a 150  $\text{cm}^2$  (Figura 16). A folha de *slralf1* é menos complexa que a de wt (Figura 17) e possui menos folíolos secundários e intercalares (Figura 18). A separação dos folíolos das folhas mostra que o número de folíolos em *slralf1* é significativamente inferior (Figura 19). Para averiguar se a diferença de área é devido ao menor número de folíolos secundários e intercalares foi quantificada a área dos folíolos primários. Não houve diferença

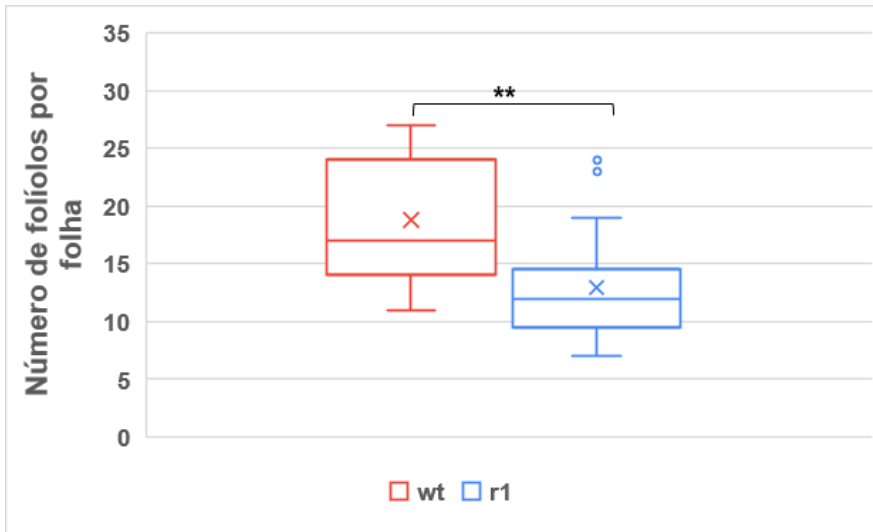
significativa entre *slralf1* e wt, indicando uma mesma área de folíolos primários (Figura 20).



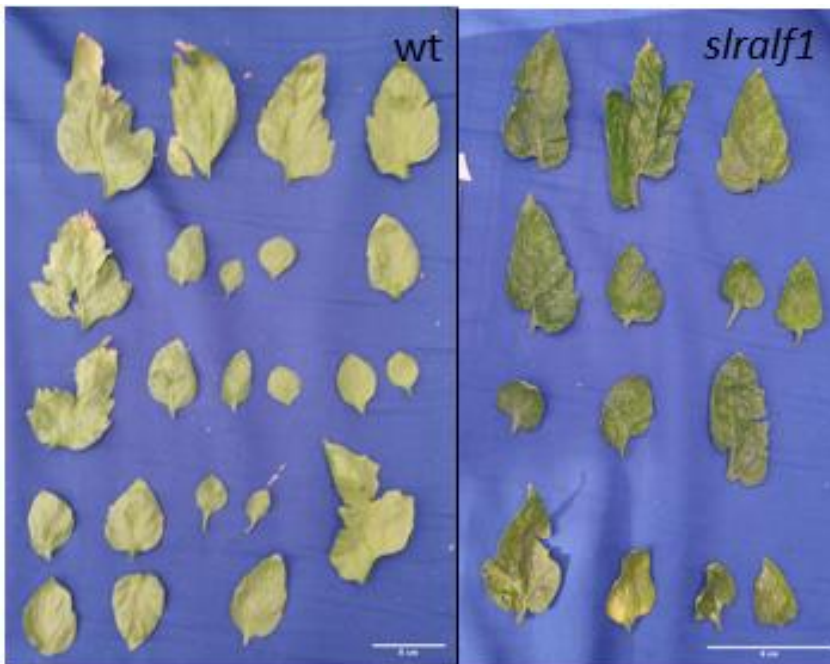
**Figura 16.** Área foliar, somatório da área de todos os folíolos, das folhas dos nós 4o e 5o a partir da base. Área dos folíolos de folhas completamente expandidas de plantas de tomateiro wild type e *slralf1*. A área foi aferida através do ImageJ. O experimento foi realizado com n=6. No gráfico a mediana é representada por uma reta no interior das caixas e a média é representada pelo x. wt, wild type controle. r1, mutante *slralf1*\*\*, significância pelo teste t p=0,01.



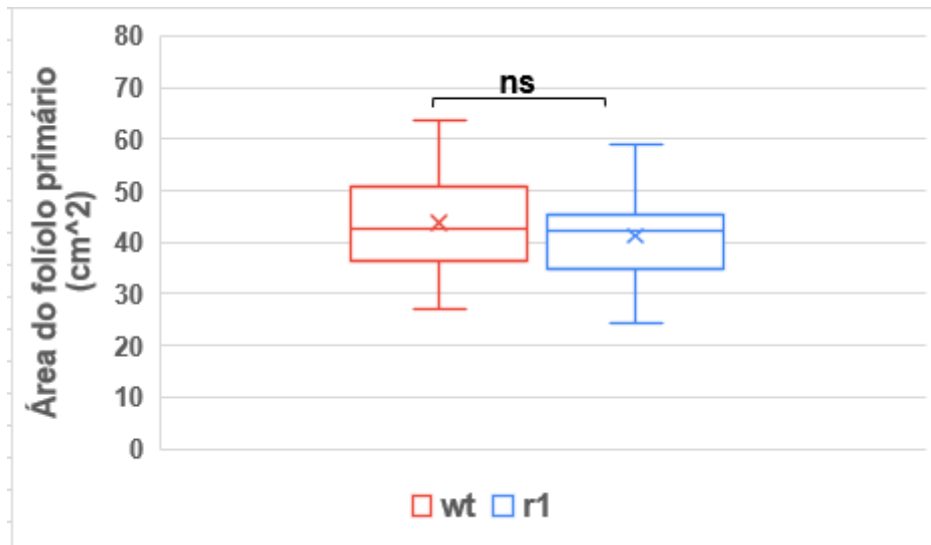
**Figura 17.** Folhas número 5, completamente expandidas. wt, wild type; *slralf1*, mutante para o gene *SIRALF1*.



**Figura 18.** Número de folíolos totais por folha. O experimento foi realizado com  $n=20$ . No gráfico a mediana é representada por uma reta no interior das caixas e a média é representada pelo x. wt, wild type controle. r1, mutante *slralf1* \*\*, significância pelo teste t  $p=0,01$ .

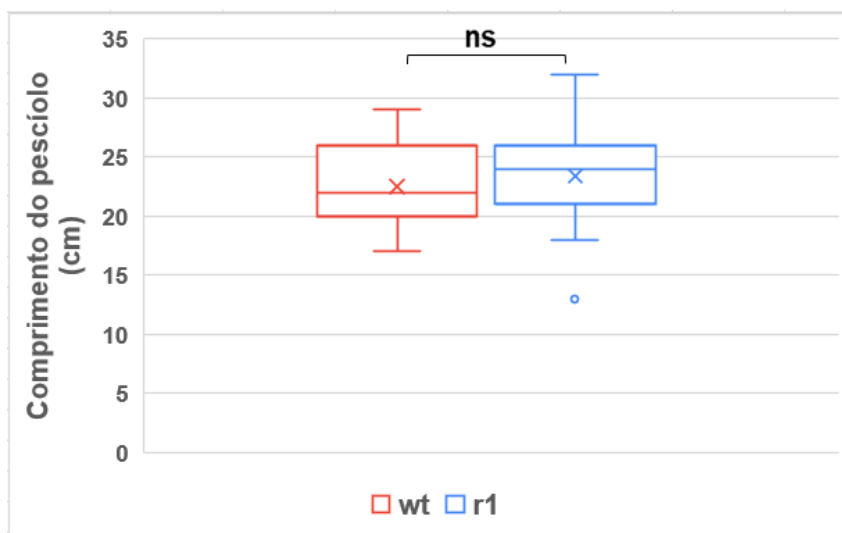


**Figura 19.** Imagem representativa dos folíolos de tomateiro, retiradas do nó número 5. wt, wild type; *slralf1*, mutante para o gene *SIRALF1*.



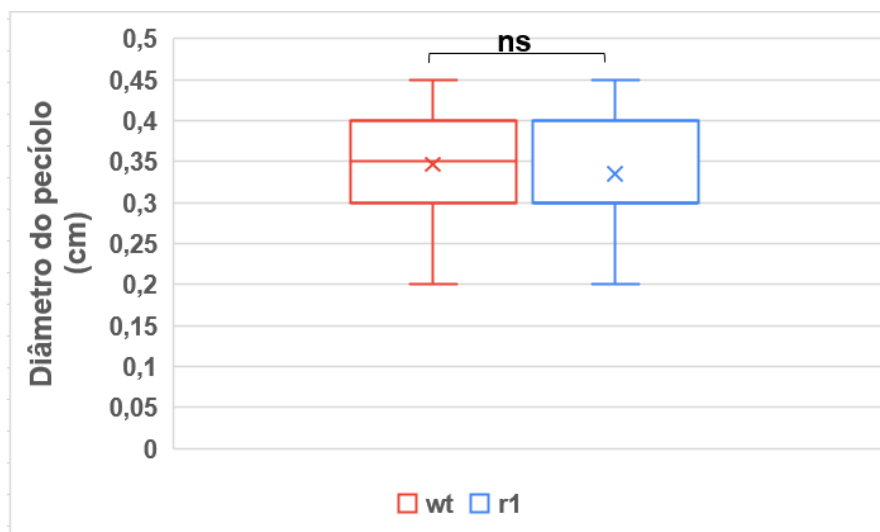
**Figura 20.** Área individual dos folíolos primários das folhas. Área dos folíolos de folhas do 4º e 5º nó a contar da base de plantas de tomate wild type e *slralf1*. A área foi aferida através do ImageJ. O experimento foi realizado com n=10. No gráfico a mediana é representada por uma reta no interior das caixas e a média é representada pelo x. wt, wild type controle. r1, mutante *slralf1*. ns, não significativo

Com a finalidade de caracterizar melhor a folha, o comprimento do pecíolo e o diâmetro do pecíolo foram aferidos. O comprimento da folha e o diâmetro dos pecíolos de *slralf1* não se diferenciam das folhas das plantas wt (Figuras 21 e 22).



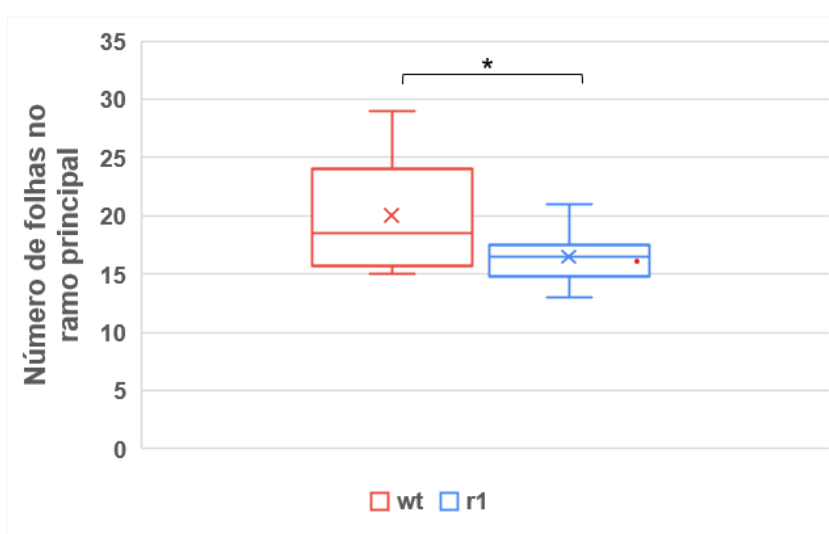
**Figura 21.** Comprimento do pecíolo das folhas de tomateiro. O experimento foi realizado com n=10. No gráfico a mediana é representada por uma reta no interior das caixas e a média é representada pelo x. wt, wild type controle. r1, mutante *slralf1*. ns, não significativo



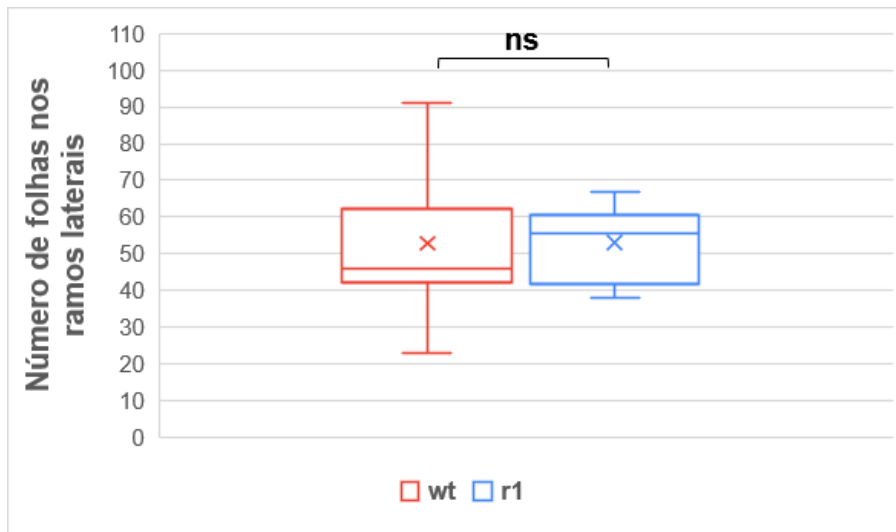


**Figura 22.** Diâmetro do pecíolo das folhas de tomate. O experimento foi realizado com  $n=30$ . No gráfico a mediana é representada por uma reta no interior das caixas e a média é representada pelo x. wt, wild type controle. r1, mutante *sralf1*. ns, não significativo

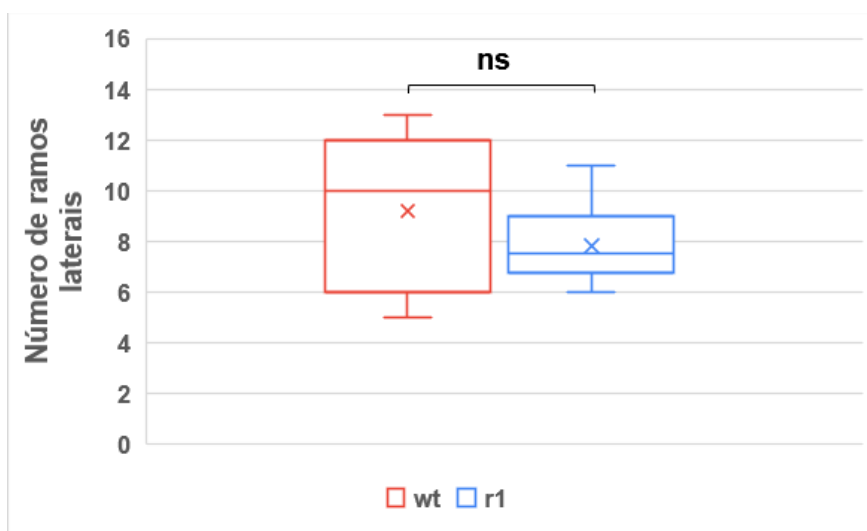
Para melhor entender como a planta de *sralf1* teve seu desenvolvimento foliar modificado, ao completar 20 semanas, o número de folhas, número de ramos, e o peso seco foram quantificados. As plantas de *sralf1* apresentaram maior número de folhas no ramo principal (Figura 23), em contrapartida o número de ramos laterais e de folhas nestes ramos laterais foi equivalente ao encontrado no wt (Figuras 24 e 25). Em plantas de 20 semanas, o peso de folhas no ramo principal foi o único fator que diferiu entre *sralf1* (Figura 26 A) e as plantas selvagens, mostrando similaridade no peso seco das demais partes vegetativas e da raiz (Figuras 26 B-E).



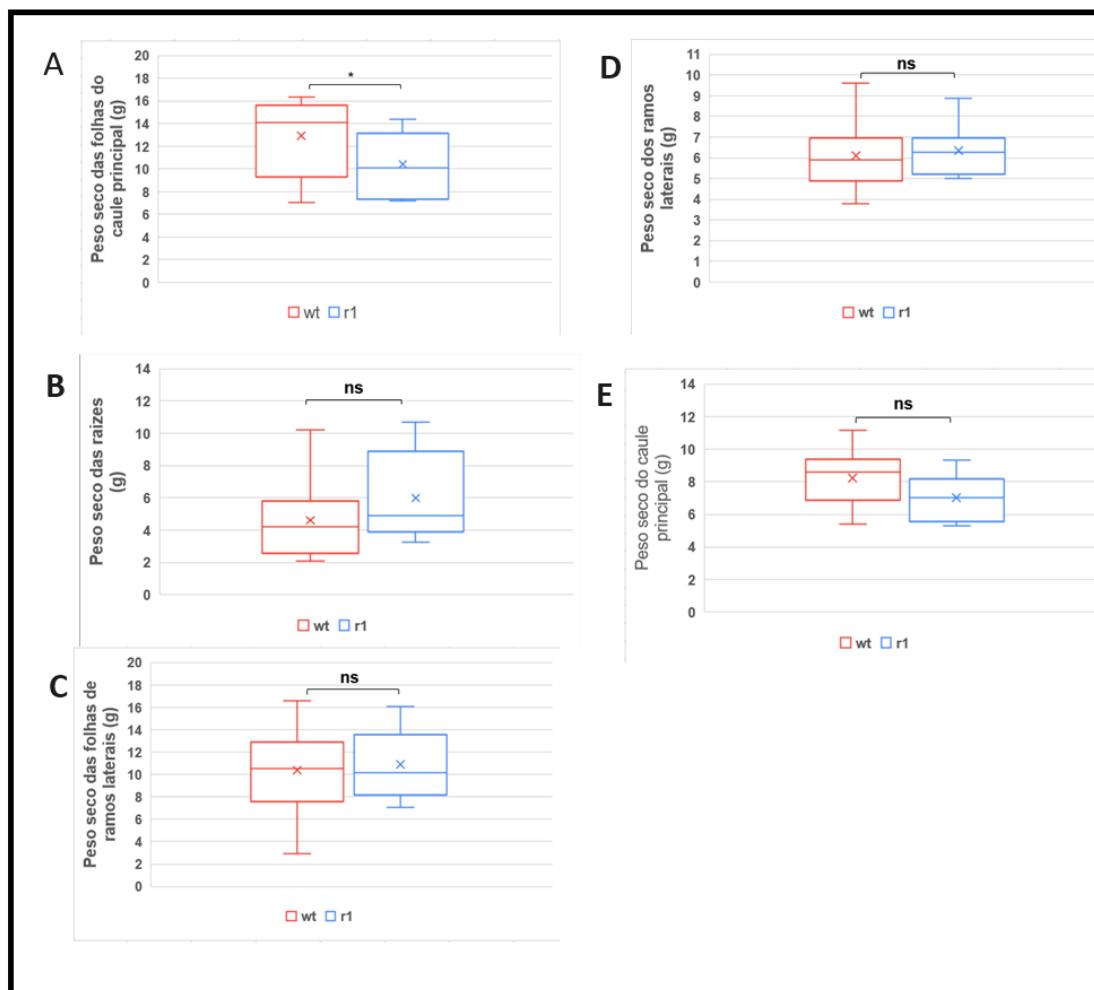
**Figura 23.** Número de folhas no ramo principal com 20 semanas. O experimento foi realizado com  $n=10$ . No gráfico a mediana é representada por uma reta no interior das caixas e a média é representada pelo x. wt, wild type controle. r1, mutante *sralf1*\*, significância pelo teste t  $p=0,05$ .



**Figura 24.** Número de folhas nos ramos laterais com 20 semanas. O experimento foi realizado com n=10. No gráfico a mediana é representada por uma reta no interior das caixas e a média é representada pelo x. wt, wild type controle. r1, mutante *sralf1*. ns, não significativo



**Figura 25.** Número de ramos laterais por planta com 20 semanas. O experimento foi realizado com n=10. No gráfico a mediana é representada por uma reta no interior das caixas e a média é representada pelo x. wt, wild type controle. r1, mutante *sralf1*. ns, não significativo



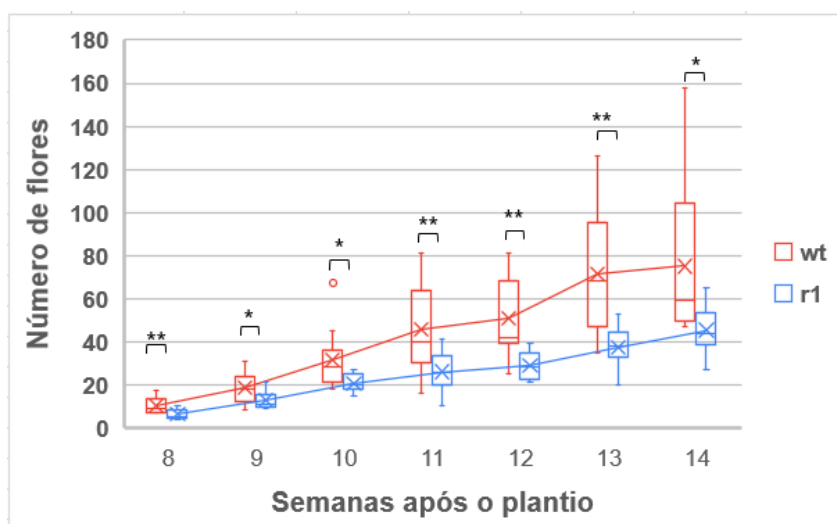
**Figura 26.** Peso seco das folhas de tomateiro selvagem e mutante para o gene *SIRALF1* **A-** Peso seco das folhas do caule principal de *slralf1* e wild type com 20 semanas. **B-** Peso seco das raízes de *slralf1* e wild type com 20 semanas. **C-** Peso seco das folhas dos ramos laterais de *slralf1* e wild type com 20 semanas. **D-** Peso seco dos ramos laterais de *slralf1* e wild type com 20 semanas. **E-** Peso seco do caule principal de *slralf1* e wild type com 20 semanas. O experimento foi realizado com n=10. No gráfico a mediana é representada por uma reta no interior das caixas e a média é representada pelo x. wt, wild type controle. r1, mutante *slralf1* \*, significância pelo teste t p=0,05. ns, não significativo

Os resultados demonstram que o gene *SIRALF1* está relacionado ao desenvolvimento da folha, mais especificamente ao desenvolvimento de folíolos secundários e intercalares nas folhas compostas de tomateiro.

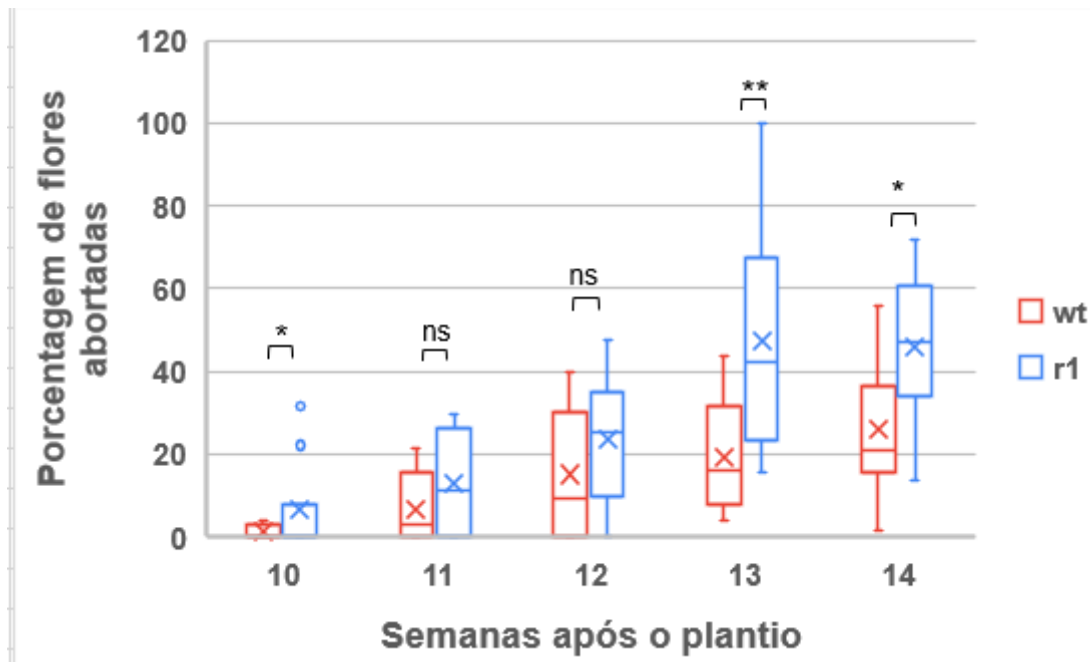
#### 2.1.4. O gene *SIRALF1* atua no desenvolvimento da flor

A fim de caracterizar o desenvolvimento reprodutivo dos mutantes *slralf1* o número de flores e o número de abortos foram quantificados, semanalmente, até a 14<sup>a</sup> semana. O número de flores de *slralf1* foi menor por todo o período que ela foi observada (Figura 27), e, desse menor número de flores que chegou a ser 55,18 % menor que wt,

uma porcentagem maior de flores foi abortada, chegando a quase 50% do total de flores (Figura 28).



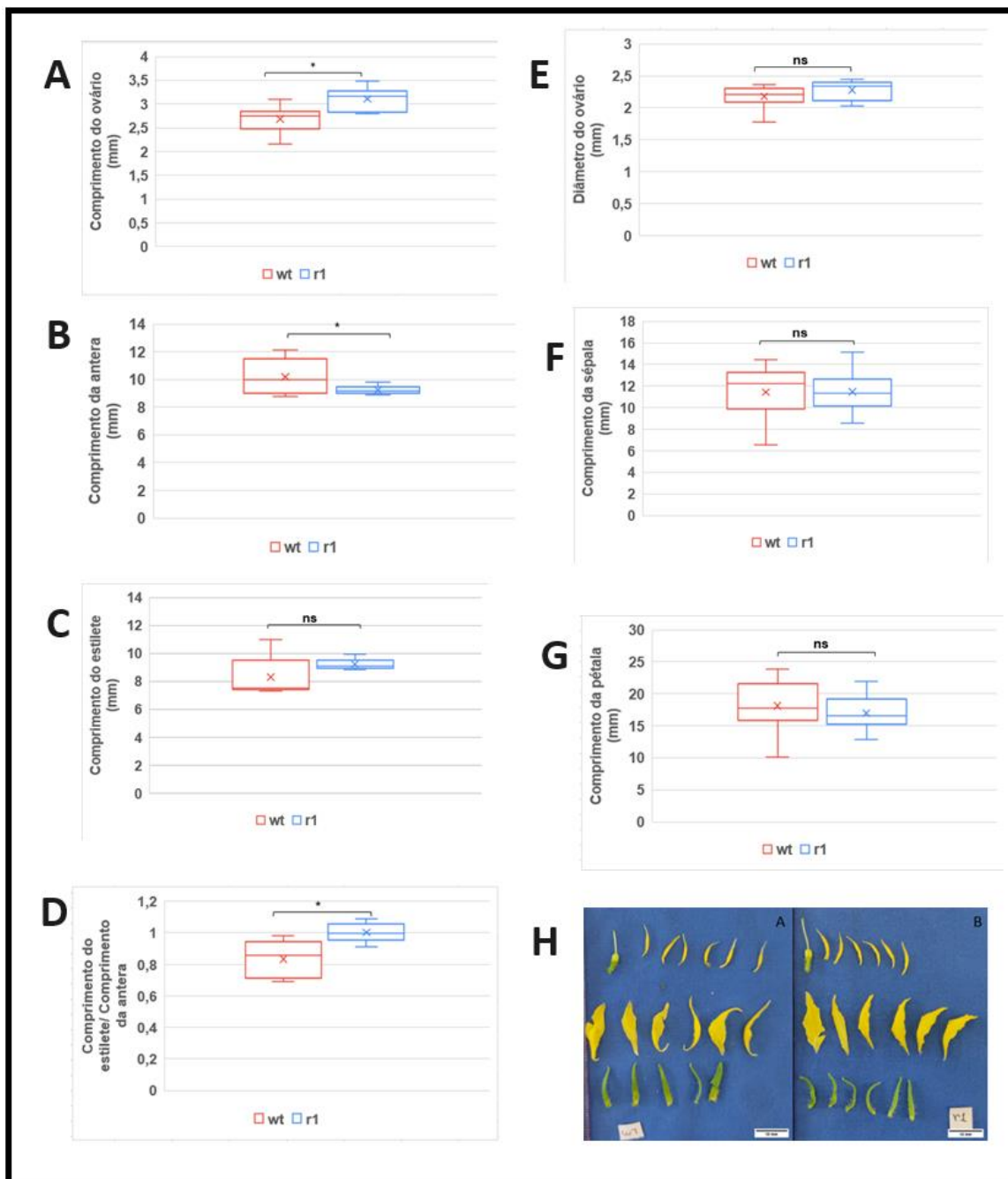
**Figura 27.** Número de flores da 8ª a 14ª semana após o plantio. O experimento foi realizado com n=10. No gráfico a mediana é representada por uma reta no interior das caixas e a média é representada pelo x. wt, wild type controle. r1, mutante *slralfl*. \*\*, significância pelo teste t p=0,01. \*, significância pelo teste t p=0,05.



**Figura 28.** Porcentagem de flores abortadas da 8ª a 14ª semana após o plantio. O experimento foi realizado com n=10. No gráfico a mediana é representada por uma reta no interior das caixas e a média é representada pelo x. wt, wild type controle. r1, mutante *slralfl*. \*\*, significância pelo teste t p=0,01. \*, significância pelo teste t p=0,05. ns, não significativo

A fim de investigar diferenças morfológicas nas flores, as diversas partes das flores foram identificadas e mensuradas. Em flores em antese, o comprimento do ovário

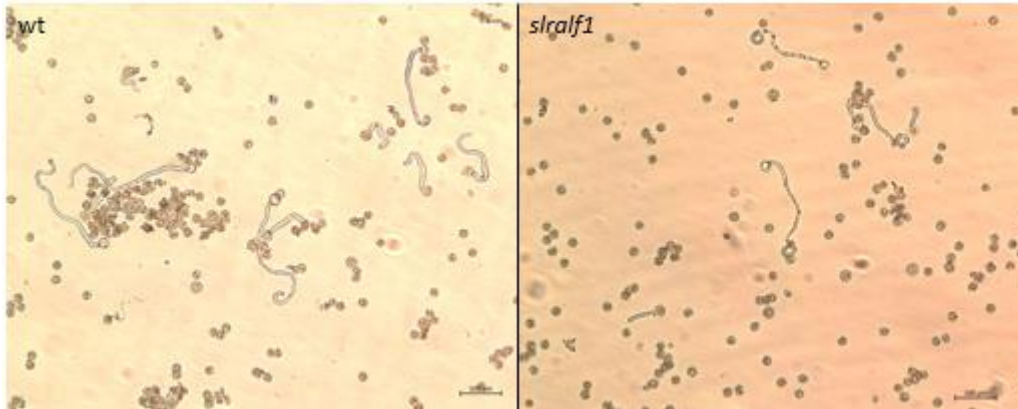
de *sralf1* é superior ao comprimento do ovário de wt (Figuras 29 A) e o comprimento das anteras é inferior (Figura 29 B), apesar de não haver diferença estatística no comprimento dos estiletes (Figura 29 C), a diferença da antera gera uma maior razão entre comprimento de estilete e comprimento da antera (Figura 29 D). Os outros parâmetros da flor, tamanho de pétala, tamanho de sépala e diâmetro do ovário, não apresentaram diferença estatística (Figuras 29 E, F e G)



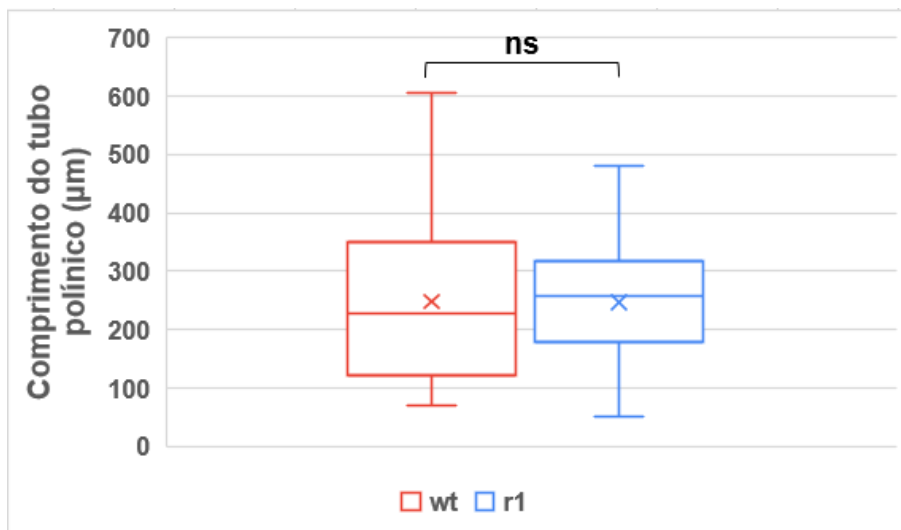
**Figura 29.** Tamanho dos órgãos florais de tomateiro selvagem e mutante para o gene *SIRALF1*. **A-** Comprimento do ovário. **B-** Comprimento da antera. **C-** Comprimento do estilete. **D-** Razão do comprimento do estilete e do comprimento da antera. **E-** Diâmetro do ovário. **F-** Comprimento da sépala. **G-** Comprimento da pétala. **H-** Partes da flor em antese de wild type a esquerda e *stralf1*, a direita. O experimento foi realizado com n=6. No gráfico a mediana é representada por uma reta no interior das caixas e a média é representada pelo x. wt, wild type controle. r1, mutante *stralf1*. \*,0,05 de significância pelo teste t. ns, não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Com a finalidade de verificar a causa dos abortos florais, os polens foram colocados para germinar em meio de germinação de pólen (Figura 30). O comprimento do tubo polínico não possui diferença estatística relevante entre *stralf1* e as plantas wt após 2 h (Figura 31). Contudo há um menor percentual de polens de *stralf1* germinados,

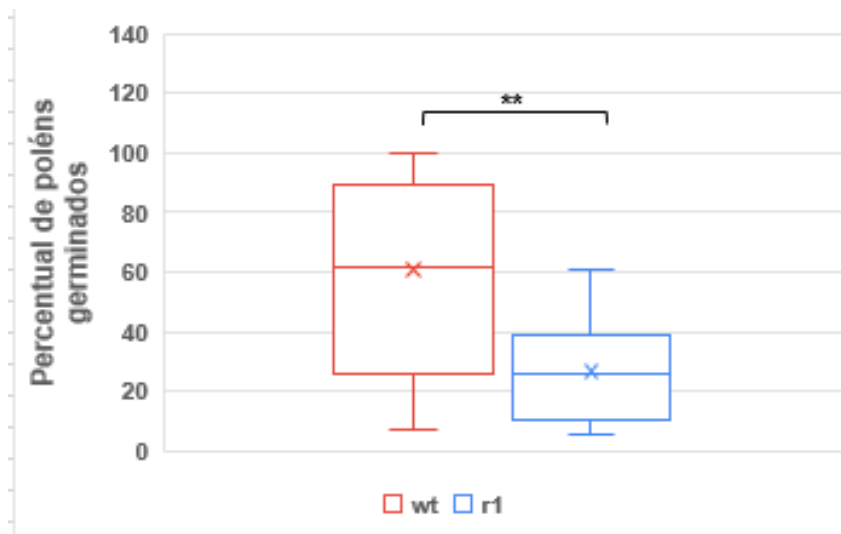
sendo que 60% dos polens wt germinaram e pouco mais de 20% dos polens *slralf1* germinaram (Figura 32).



**Figura 30.** Germinação do tubo polínico em wild type, a esquerda e *slralf1*, a direita. A germinação foi mensurada 2h após inoculação em meio de germinação de pólen, as placas foram mantidas no escuro.



**Figura 31.** Comprimento do tubo polínico 2 h após o início da indução da germinação. O experimento foi realizado com n=60. No gráfico a mediana é representada por uma reta no interior das caixas e a média é representada pelo x. wt, wild type controle. r1, mutante *slralf1*. ns, não significativo



**Figura 32.** Percentual de tubos polínicos germinados 3 h após o início da indução à germinação. O experimento foi realizado com  $n=21$ . No gráfico a mediana é representada por uma reta no interior das caixas e a média é representada pelo x. wt, wild type controle. r1, mutante *slralf1*. \*\*, significância pelo teste t  $p=0,01$

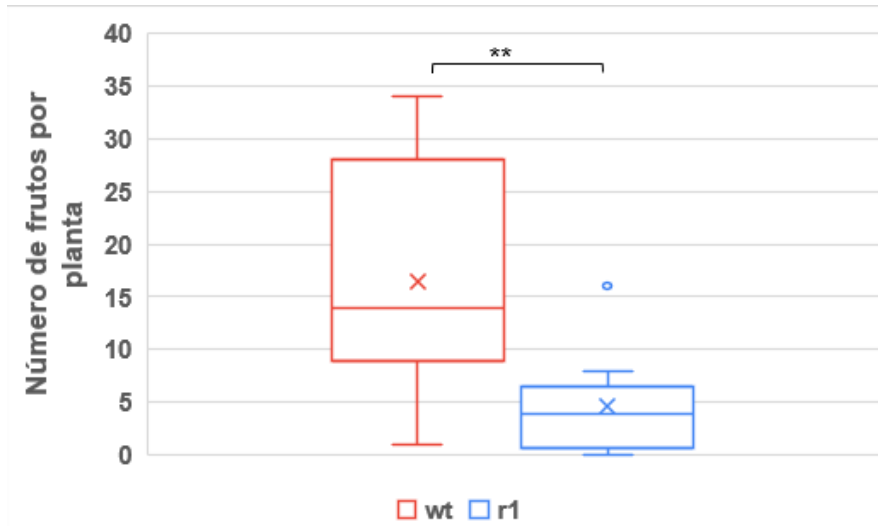
Os resultados aqui apresentados demonstram que o gene *SIRALF1* reduz a germinação do pólen, diminui o número de flores e gera abortos.

### 2.1.5. O gene *SIRALF1* tem papel na formação das sementes.

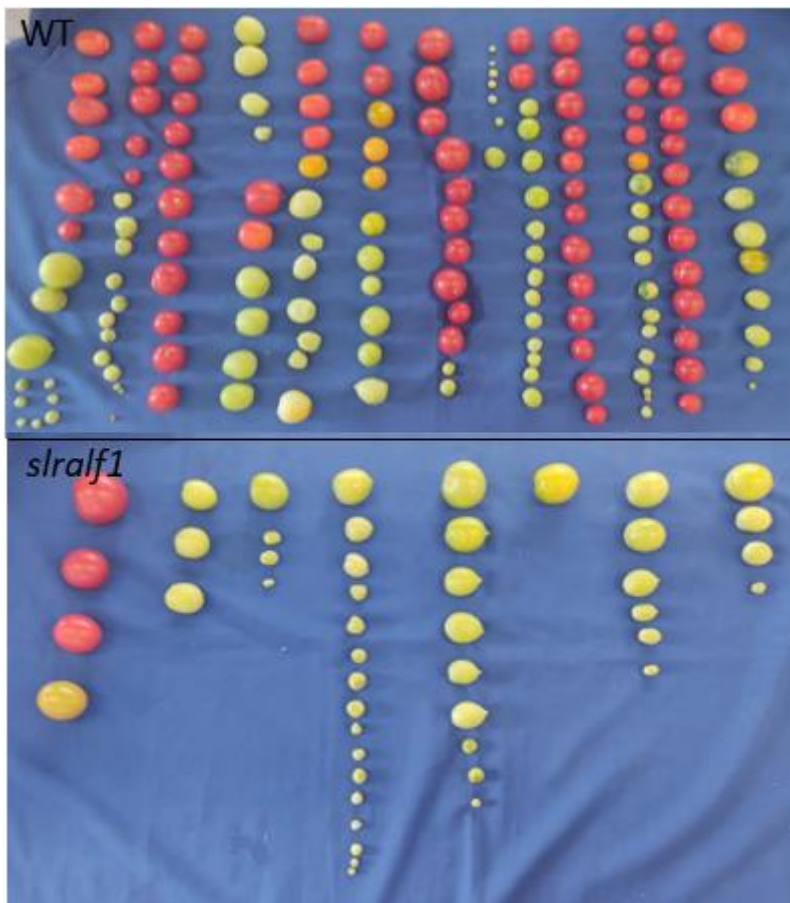
A interferência do *SIRALF1* na reprodução tem reflexos na formação e produção dos frutos. As plantas de *slralf1*, em 20 semanas, apresentaram menos frutos por planta do que as plantas selvagens (Figura 33), esses frutos também não maturaram ao mesmo tempo que os das plantas controle (Figura 34). Conseqüentemente, os frutos por planta apresentaram um peso muito menor, cerca de 100 g a menos (Figura 35). Observou-se também que frutos de *slralf1* apresentaram uma quantidade inferior de sementes por fruto, sendo um valor mais de 5 vezes menor que o número de sementes de wt (Figura 36).

Para caracterizar se o fruto do mutante é semelhante ao fruto wt, quantificou-se dois fatores de qualidade de fruto: os sólidos solúveis e a acidez total. Através da acidez total, estimou-se a porcentagem de ácido cítrico. Não há diferença no teor Brix, contudo a porcentagem de ácido cítrico é 15% menor em *slralf1* (Figura 37 e 38).

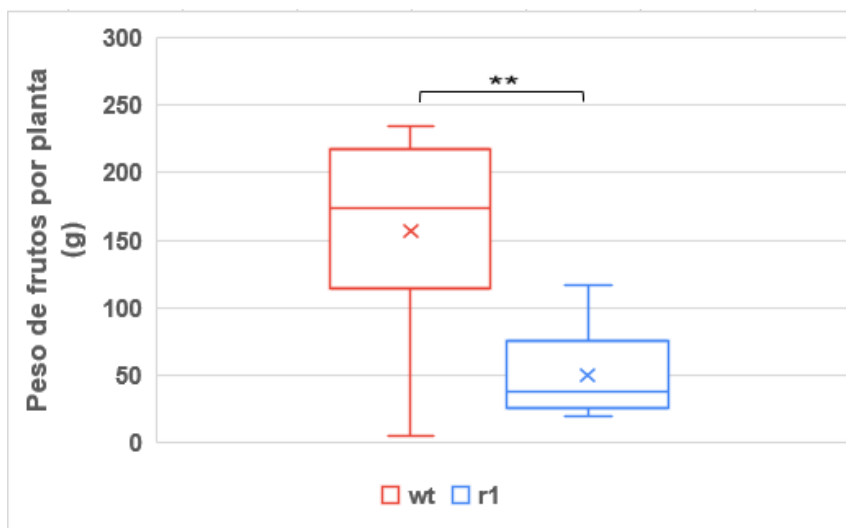




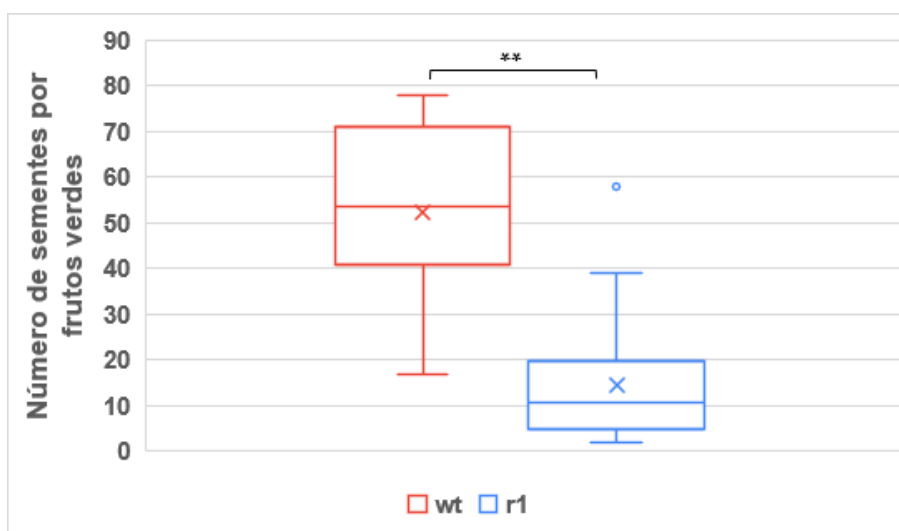
**Figura 33.** Número de frutos por plantas wild type e *slralf1*. O experimento foi realizado com n=10. No gráfico a mediana é representada por uma reta no interior das caixas e a média é representada pelo x. wt, wild type controle. r1, mutante *slralf1*. \*\*, significância pelo teste t p=0,01.



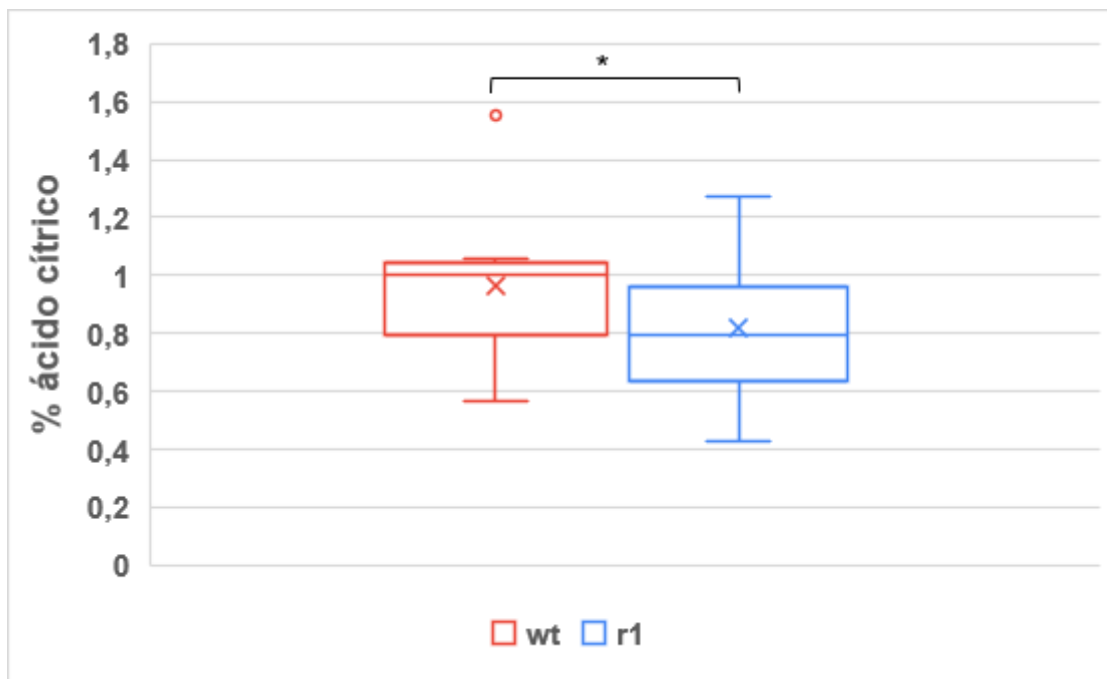
**Figura 34.** Frutos oriundos de plantas com 20 semanas.



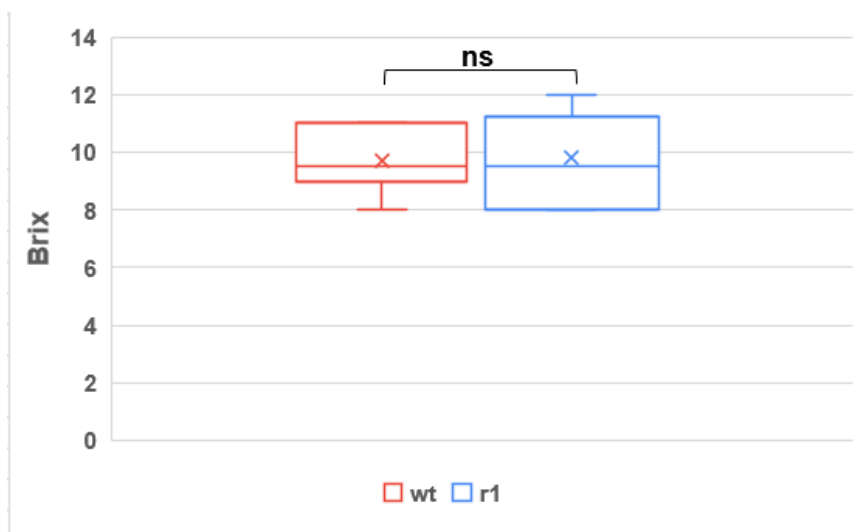
**Figura 35.** Peso de frutos por plantas wild type e *sralf1*. O experimento foi realizado com n=10. No gráfico a mediana é representada por uma reta no interior das caixas e a média é representada pelo x. wt, wild type controle. r1, mutante *sralf1*. \*\*, significância pelo teste t p=0,01.



**Figura 36.** Número de sementes em frutos verdes de tomate wild type e *sralf1*. O experimento foi realizado com n=20. No gráfico a mediana é representada por uma reta no interior das caixas e a média é representada pelo x. wt, wild type controle. r1, mutante *sralf1*. \*\*, significância pelo teste t p=0,01



**Figura 37.** Percentagem de ácido cítrico em frutos de tomateiro wild type e *slralf1*. O experimento foi realizado com n=10. No gráfico a mediana é representada por uma reta no interior das caixas e a média é representada pelo x. wt, wild type controle. r1, mutante *slralf1* \*\*, significância pelo teste t p=0,01.



**Figura 38.** Índice de refração de frutos de tomateiro wild type e *ralf1*. O experimento foi realizado com n=10. No gráfico a mediana é representada por uma reta no interior das caixas e a média é representada pelo x. wt, wild type controle. r1, mutante *slralf1*. ns, não significativo

Os resultados da avaliação dos frutos de tomateiro selvagem e mutante *slralf1* sugerem que o gene *SIRALF1* é importante para a manutenção da produtividade da planta, e para o desenvolvimento da semente, esses resultados podem ser reflexos da baixa germinação do pólen e alto índice de abortos que a ausência do gene *SIRALF1* causa.

## 2.2. Discussão

Plantas mutantes desempenham um papel fundamental na caracterização de genes em plantas. Para entender melhor o papel dos peptídeos RALFs em plantas o mutante *slralf1* foi caracterizado quanto a seus aspectos morfológicos. O mutante *slralf1* não apresenta o mesmo comportamento observado nos mutantes *atralf1* (Bergonci et al. 2014). O comportamento esperado seria o de crescimento aumentado do mutante em relação ao de plantas selvagens, como ocorreu com plantas de *arabidopsis* que possuíam o *AtRALF1* silenciado (Bergonci et al. 2014). O resultado observado, ou seja de menor crescimento radicular, é algo presente em plantas que superexpressam RALF (Bergonci et al. 2014; Atkinson, Lilley, e Urwin 2013; Srivastava et al. 2009). Como *slralf1* apresentou comportamento contrário ao esperado, é possível que *SIRALF1* seja um antagonista ou competidor de outro RALF que tenha a função de inibir a expansão celular. A ideia de RALFs com papéis antagônicos já foi descrita em peptídeos RALFs responsáveis pela integridade do tubo polínico e por peptídeos RALFs responsáveis pela resposta do sistema imune (Ge et al. 2017; Abarca, Franck, e Zipfel 2021). Não é a primeira vez que o menor crescimento de um mutante para um gene RALF é reportado (Ginanjar, Teh, e Fujita 2022; Wiegand, Prüfer, e Gronover 2019). Em *Physcomitrium patens*, mutantes *knockout Ppralf1*, *Ppralf2* e *Ppralf1,2* apresentaram um menor número de células e células com menor tamanho (Ginanjar, Teh, e Fujita 2022).

Não há informação sobre a influência dos RALFs na germinação de sementes. No caso dos mutantes *slralf1* a forma que a germinação acontece ao longo do tempo é alterada. A germinação no mutante *slralf1* é distribuída ao longo do tempo, ou seja, as sementes não germinam ao mesmo tempo como ocorre com as sementes controle, wt. A germinação é mais tardia também, ocorrendo um atraso de 24 h com relação a germinação das sementes controle, wt. O que causa a germinação tardia não são problemas relacionados a embebição, pois as sementes de *slralf1* embebem na mesma velocidade que as sementes de wt (Figura 11). Contudo, os dados de conteúdo de água ao longo da germinação mostram que as sementes de *slralf1* absorvem mais água que as sementes controle, wt (Figura 12). Esse fato pode estar relacionado ao controle que os RALFs exercem sobre a expansão celular, possivelmente tornando as paredes celulares mais rígidas, menos permeáveis a água (Mecchia et al. 2017), a ausência de RALF torna a parede da célula mais frouxa, facilitando uma maior embebição. Uma hipótese para a germinação tardia pode ser a maior sensibilidade a ABA que a ausência de RALF causa (Chen et al. 2016). A relação de RALF e ABA foi observada em ensaios de crescimento de raiz primária. A presença de RALF reduziu a sensibilidade ao ABA e mutantes de

*AtRALF1* em arábido são mais sensíveis ao ABA (Chen et al. 2016). As sementes tem uma alta concentração de ABA, importante para a manutenção da dormência (del Carmen Rodríguez-Gacio, Matilla-Vázquez, e Matilla 2009) e a sensibilidade ao ABA que a ausência de RALF causa, pode trazer uma menor sensibilidade a giberelina. Sendo a giberelina um fator essencial na ativação da germinação, a razão ABA/GA regula a transição metabólica necessária para a germinação (Nautiyal, Sivasubramaniam, e Dadlani 2023). Se a sensibilidade está mais voltada para o ABA, possivelmente a sensibilidade para a GA fica prejudicada causando uma germinação mais lenta.

Ao longo do desenvolvimento, as plantas de *slralf1* demonstraram ser menores, mas ao chegar em 20 semanas, apenas o número de folhas no ramo principal demonstrou ter diferença, sendo que *slralf1* apresenta um número menor. Em 20 semanas as plantas já possuíam frutos. O número de frutos das plantas mutantes é pífio comparado com as selvagens. Possivelmente, quando as plantas selvagens entram na fase de frutificação, os esforços de desenvolvimento se voltaram pra seus novos drenos, os frutos; já as plantas *slralf1* continuaram a se desenvolver vegetativamente por mais tempo, equiparando-se em massa vegetal as plantas selvagens.

Possivelmente, *SIRALF1* está ligado ao desenvolvimento da folha. As folhas do mutante possuem menos folíolos intercalares, influenciando na área total da folha, e influenciando a morfologia da folha, e conseqüentemente da planta, gerando plantas com aparência menos densa. Já foi observado que mutantes *knockout* do gene *TxRALF1* de *Taraxacum koksaghyz*, alteram a morfologia da raiz principal (Wieghaus, Prüfer, e Gronover 2019). Sugerindo que *RALF* tem papel na formação de órgãos da planta.

Os frutos de *slralf1* apresentaram menos sementes, o baixo número de sementes já foi observado ao silenciar os genes *AtRALF4/19* (Ge et al. 2017; Mecchia et al. 2017) A baixa quantidade de sementes pode ser devido a menor germinação do pólen que os mutantes apresentam. Contudo, pode ser multifatorial, visto que em *Solanum pimpinellifolium* há expressão de *SIRALF1* no ovário durante a antese, assim como em 4 dias pós antese (ver Capítulo 1).

## **2.3. Material e Métodos**

### **2.3.1. Ensaio de crescimento radicular**

Sementes do mutante para *SIRALF1* (*slralf1*) e do tipo selvagem (wt) foram desinfestadas e colocadas em placas de Petri retangular contendo 30 mL de meio semissólido Murashige e Skoog meia força (Murashige e Skoog 1962). As placas foram deixadas no escuro, na posição vertical, por 48 h antes de iniciarem as medições. A marcação da posição das raízes primárias ocorreu a cada 12 h, ao final de 6 medições as placas foram fotografadas e, com o auxílio do programa ImageJ, aferiu-se o crescimento da raiz primária.

### **2.3.2. Desinfestação das sementes**

Em um tubo tipo Falcon de 50 mL são colocadas as sementes e 35 mL de água destilada, 15 mL de hipoclorito de sódio comercial e duas gotas de detergente comercial. Os tubos são agitados por inversão por 15 min, logo após, em uma câmara de fluxo laminar e em condições assépticas, as sementes são lavadas por pelo menos 5 vezes consecutivas, usando água estéril Milli-Q (35 mL).

### **2.3.3. Ensaio de germinação**

Em 4 placas de Petri contendo duas folhas de papel filtro (gramatura 80 g/m<sup>2</sup>, espessura 0,2 mm, poros de 25 µm), 100 sementes de cada tratamento foram divididas igualmente. As 25 sementes em cada uma das 8 placas tiveram seu peso aferido. Logo em seguida, foi adicionada água deionizada nas placas de Petri, o volume de água adicionado é correspondente a 3 vezes o peso dos papéis filtro. As sementes foram deixadas no escuro em uma temperatura de 22°C.

O peso fresco das sementes foi aferido após 1 h e depois de 6 em 6 h até 36 h. Após as 36 h iniciais, o peso fresco foi aferido de 12 em 12 h, até completar 120 h. Para aferir o peso fresco das sementes, elas foram colocadas em um papel filtro seco, e, delicadamente com outro papel seco, foi retirada a umidade superficial. Posteriormente, as sementes foram pesadas. Conforme as sementes foram geminando foi-se anotando a evolução da germinação.

Para obtenção do conteúdo de água foi utilizada a equação abaixo (Pereira et al. 2022).

$$CA_{BS} = \frac{(PF - PS)}{PS}$$

CA<sub>BS</sub>= Conteúdo de água (grama/grama em base seca)

PF= peso fresco

PS= peso seco

#### 2.3.4. Caracterização fenológica das plantas *slralf1*

As sementes de *slralf1* (mutante foi obtido da coleção do projeto “Usando CRISPR/Cas9 para entender e melhorar o sistema imunológico da planta” (NSF-IOS 1546625) com plantas *background* Rio Grande (N. Zhang et al. 2020) e de wt (Rio Grande-RGLA3342) foram semeadas em vasos de 200 mL com uma proporção 1:1 de substrato para plantas e vermiculita, 1 g/L de 10-10-10 e 4 g/L de calcário. As plantas, quando atingiram 2 semanas, foram transplantadas para vasos de 20 L com uma proporção 1:1 de substrato e vermiculita, 8 g/L de 10-10-10 e 4 g/L de calcário. A partir da quarta semana, as plantas passaram a ser tutoradas com estacas. A cada 15 d as plantas receberam adubação de cobertura de 4 g/L de 10-10-10 e 2 g/L de calcário.

Entre a 3<sup>a</sup> e a 14<sup>a</sup> semana, foi aferida, semanalmente, a altura da planta com uma fita métrica, as aferições foram realizadas do substrato até o meristema apical. As medições terminaram quando a altura da planta ultrapassou a altura da estaca de 1,2 m.

A partir das primeiras inflorescências, que ocorreu na 8<sup>a</sup> semana, as flores foram contabilizadas semanalmente até a 14<sup>a</sup> semana. Os abortos foram contabilizados também semanalmente a partir do momento que foram observados.

Na 20<sup>a</sup> semana, foram aferidos número de folhas no ramo principal, número de folhas nos ramos laterais, número de ramos laterais, número de frutos, peso fresco da parte aérea. Na 20<sup>a</sup> semana a planta foi separada em raiz, folhas do caule principal, folhas dos ramos laterais, caule principal e caule dos ramos laterais. As partes da planta foram levadas em estufa 60°C e deixadas para secar até que seu peso fosse constante.

Para aferir a área foliar selecionou-se a 4<sup>a</sup> e a 5<sup>a</sup> folha, contando a partir da base da planta, para que se selecionasse folhas completamente expandidas. Mediu-se o comprimento do pecíolo assim como o diâmetro, que foi aferido na altura dos folíolos

primários da base da folha. Separou-se os folíolos do pecíolo, os folíolos foram contabilizados e fotografados. A área dos folíolos foi aferida com o ImageJ.

Quando as plantas atingiram 20 semanas, os frutos foram colhidos. Cada planta teve seus frutos contados e pesados. Como as plantas *slralf1* apresentaram majoritariamente frutos verdes, foi contabilizado número total de sementes de cada um dos frutos verdes.

### **2.3.5. Ensaio de germinação do pólen e crescimento do tubo polínico**

Flores em antese tiveram seu pólen coletado e colocado em placas de Petri com 6 mL de meio semissólido de germinação de pólen [Sacarose 0,292 M; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 1,27 mM; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 1,62 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM; agarose 0,6%; pH 5,8]. As placas ficaram no escuro por 2 h. Foram feitos registros fotográficos com o auxílio de um microscópio para que os tubos polínicos pudessem ter seu comprimento aferido pelo ImageJ.

### **2.3.6. Quantificação dos sólidos solúveis**

Para a quantificação dos sólidos solúveis foi utilizado um refratômetro portátil (ATAGO, 2111-W10), e duas gotas do sumo do pericarpo, obtido pela maceração do fruto e filtragem com gaze.

### **2.3.7. Titulação da acidez**

A polpa do tomate maduro foi macerada e coada para coletar 1,5 g de extrato. Ao extrato foi adicionado 12,5 mL de água deionizada e levada ao pHmetro. A titulação da acidez foi feita com NaOH 0,1 M até que o pH atingisse 8,2 (Moretti et al. 1998). Para calcular a porcentagem de ácido cítrico foi usada a seguinte equação:

$$\% \text{ ácido cítrico} = \frac{[mL(NaOH) * N(NaOH) * 0.064]}{1,5} * 100$$





## REFERÊNCIAS

- Abarca, Alicia, Christina M. Franck, e Cyril Zipfel. 2021. “Family-wide evaluation of RAPID ALKALINIZATION FACTOR peptides”. *Plant Physiology* 187 (2): 996–1010. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab308>.
- Ali, Shahid, Naeem Khan, e Linan Xie. 2020. “Molecular and Hormonal Regulation of Leaf Morphogenesis in Arabidopsis”. *International Journal of Molecular Sciences* 21 (14): 5132. <https://doi.org/10.3390/ijms21145132>.
- Atkinson, Nicky J., Catherine J. Lilley, e Peter E. Urwin. 2013. “Identification of Genes Involved in the Response of Arabidopsis to Simultaneous Biotic and Abiotic Stresses”. *Plant Physiology* 162 (4): 2028–41. <https://doi.org/10.1104/pp.113.222372>.
- Bailey, Timothy L., James Johnson, Charles E. Grant, e William S. Noble. 2015. “The MEME Suite”. *Nucleic Acids Research* 43 (W1): W39–49. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv416>.
- Bar, Maya, e Naomi Ori. 2015. “Compound leaf development in model plant species”. *Current Opinion in Plant Biology*, SI: Growth and development, 23 (fevereiro): 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.10.007>.
- Berger, Yael, Smadar Harpaz-Saad, Arnon Brand, Hadas Melnik, Neti Sirding, John Paul Alvarez, Michael Zinder, Alon Samach, Yuval Eshed, e Naomi Ori. 2009. “The NAC-Domain Transcription Factor GOBLET Specifies Leaflet Boundaries in Compound Tomato Leaves”. *Development (Cambridge, England)* 136 (5): 823–32. <https://doi.org/10.1242/dev.031625>.
- Bergonci, Tábata, Bianca Ribeiro, Paulo H.O. Ceciliato, Juan Carlos Guerrero-Abad, Marcio C. Silva-Filho, e Daniel S. Moura. 2014. “Arabidopsis thaliana RALF1 opposes brassinosteroid effects on root cell elongation and lateral root formation”. *Journal of Experimental Botany* 65 (8): 2219–30. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru099>.
- Bewley, J. Derek, Kent Bradford, Henk Hilhorst, e hiroyuki nonogaki. 2012. *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy*. Springer Science & Business Media.
- Bharathan, G., e N. R. Sinha. 2001. “The Regulation of Compound Leaf Development”. *Plant Physiology* 127 (4): 1533–38.
- Blackburn, Matthew R., Miyoshi Haruta, e Daniel S. Moura. 2020. “Twenty Years of Progress in Physiological and Biochemical Investigation of RALF Peptides1 [OPEN]”. *Plant Physiology* 182 (4): 1657–66. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01310>.
- Burko, Yogev, e Naomi Ori. 2013. “The Tomato Leaf as a Model System for Organogenesis”. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 959: 1–19. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-221-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-221-6_1).

- Campbell, Liam, e Simon R. Turner. 2017. “A Comprehensive Analysis of RALF Proteins in Green Plants Suggests There Are Two Distinct Functional Groups”. *Frontiers in Plant Science* 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.00037>.
- Cao, Jun, e Feng Shi. 2012. “Evolution of the RALF Gene Family in Plants: Gene Duplication and Selection Patterns”. *Evolutionary Bioinformatics* 8 (janeiro): EBO.S9652. <https://doi.org/10.4137/EBO.S9652>.
- Carmen Rodríguez-Gacio, María del, Miguel A Matilla-Vázquez, e Angel J Matilla. 2009. “Seed dormancy and ABA signaling”. *Plant Signaling & Behavior* 4 (11): 1035–48.
- Champagne, Connie, e Neelima Sinha. 2004. “Compound leaves: equal to the sum of their parts?” *Development* 131 (18): 4401–12. <https://doi.org/10.1242/dev.01338>.
- Chen, Jia, Feng Yu, Ying Liu, Changqing Du, Xiushan Li, Sirui Zhu, Xianchun Wang, et al. 2016. “FERONIA interacts with ABI2-type phosphatases to facilitate signaling cross-talk between abscisic acid and RALF peptide in Arabidopsis”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (37): E5519–27. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608449113>.
- Chitwood, Daniel H., Aashish Ranjan, Ravi Kumar, Yasunori Ichihashi, Kristina Zumstein, Lauren R. Headland, Enrique Ostría-Gallardo, et al. 2014. “Resolving Distinct Genetic Regulators of Tomato Leaf Shape within a Heteroblastic and Ontogenetic Context”. *The Plant Cell* 26 (9): 3616–29. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.130112>.
- Covey, Paul A., Chalivendra C. Subbaiah, Ronald L. Parsons, Gregory Pearce, Fung T. Lay, Marilyn A. Anderson, Clarence A. Ryan, e Patricia A. Bedinger. 2010. “A Pollen-Specific RALF from Tomato That Regulates Pollen Tube Elongation”. *Plant Physiology* 153 (2): 703–15. <https://doi.org/10.1104/pp.110.155457>.
- Davies, Peter J. 2010. “The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions”. Em *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*, editado por Peter J. Davies, 1–15. Dordrecht: Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7_1).
- Dilworth, L. L., C. K. Riley, e D. K. Stennett. 2017. “Chapter 5 - Plant Constituents: Carbohydrates, Oils, Resins, Balsams, and Plant Hormones”. Em *Pharmacognosy*, editado por Simone Badal e Rupika Delgoda, 61–80. Boston: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00005-6>.

- Dressano, Keini, Paulo H. O. Ceciliato, Aparecida L. Silva, Juan Carlos Guerrero-Abad, Tábata Bergonci, Fausto Andrés Ortiz-Morea, Marco Bürger, Marcio C. Silva-Filho, e Daniel S. Moura. 2017. “BAK1 Is Involved in AtRALF1-Induced Inhibition of Root Cell Expansion”. *PLOS Genetics* 13 (10): e1007053. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007053>.
- Fei, Zhangjun, Je-Gun Joung, Xuemei Tang, Yi Zheng, Mingyun Huang, Je Min Lee, Ryan McQuinn, et al. 2011. “Tomato Functional Genomics Database: a comprehensive resource and analysis package for tomato functional genomics”. *Nucleic Acids Research* 39 (Database issue): D1156–63. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq991>.
- Fujioka, S., e T. Yokota. 2003. “Biosynthesis and Metabolism of Brassinosteroids”. *Annual Review of Plant Biology* 54: 137–64. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134921>.
- Ge, Zengxiang, Tabata Bergonci, Yuling Zhao, Yanjiao Zou, Shuo Du, Ming-Che Liu, Xingju Luo, et al. 2017. “Arabidopsis pollen tube integrity and sperm release are regulated by RALF-mediated signaling”. *Science* 358 (6370): 1596–1600. <https://doi.org/10.1126/science.aao3642>.
- Ginanjar, Eggie Febrianto, Ooi-kock Teh, e Tomomichi Fujita. 2022. “Characterisation of Rapid Alkalinisation Factors in *Physcomitrium Patens* Reveals Functional Conservation in Tip Growth”. *New Phytologist* 233 (6): 2442–57. <https://doi.org/10.1111/nph.17942>.
- Giovannoni, James J. 2004. “Genetic Regulation of Fruit Development and Ripening”. *The Plant Cell* 16 (suppl\_1): S170–80. <https://doi.org/10.1105/tpc.019158>.
- Gjetting, Sisse K., Khalid Mahmood, Lana Shabala, Astrid Kristensen, Sergey Shabala, Michael Palmgren, e Anja T. Fuglsang. 2020. “Evidence for Multiple Receptors Mediating RALF-Triggered Ca<sup>2+</sup> Signaling and Proton Pump Inhibition”. *The Plant Journal* 104 (2): 433–46. <https://doi.org/10.1111/tpj.14935>.
- Großholz, Ruth, Anna Feldman-Salit, Friederike Wanke, Sarina Schulze, Nina Glöckner, Birgit Kemmerling, Klaus Harter, e Ursula Kummer. 2020. “Specifying the Role of BAK1-Interacting Receptor-like Kinase 3 in Brassinosteroid Signaling”. *Journal of Integrative Plant Biology* 62 (4): 456–69. <https://doi.org/10.1111/jipb.12803>.
- Haruta, Miyoshi, Gabriele Monshausen, Simon Gilroy, e Michael R. Sussman. 2008. “A Cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> Functional Assay for Identifying and Purifying Endogenous Cell Signaling Peptides in Arabidopsis Seedlings: Identification of AtRALF1 Peptide”. *Biochemistry* 47 (24): 6311–21. <https://doi.org/10.1021/bi8001488>.
- Haruta, Miyoshi, Grzegorz Sabat, Kelly Stecker, Benjamin B. Minkoff, e Michael R. Sussman. 2014. “A Peptide Hormone and Its Receptor Protein Kinase Regulate Plant Cell Expansion”. *Science* 343 (6169): 408–11. <https://doi.org/10.1126/science.1244454>.

- Hewedy, Omar A., Nabil I. Elsheery, Ali M. Karkour, Neveen Elhamouly, Ramadan A. Arafa, Ghada Abd-Elmonsef Mahmoud, Mona F. -A. Dawood, et al. 2023. “Jasmonic acid regulates plant development and orchestrates stress response during tough times”. *Environmental and Experimental Botany* 208 (abril): 105260. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2023.105260>.
- Huang, Peixin, Zhonghai Li, e Hongwei Guo. 2022. “New Advances in the Regulation of Leaf Senescence by Classical and Peptide Hormones”. *Frontiers in Plant Science* 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2022.923136>.
- Jia, Yancui, e Youguo Li. 2023. “Genome-Wide Identification and Comparative Analysis of RALF Gene Family in Legume and Non-Legume Species”. *International Journal of Molecular Sciences* 24 (10): 8842. <https://doi.org/10.3390/ijms24108842>.
- Kaniganti, Sirisha, Joorie Bhattacharya, Bhanu Prakash Petla, e Palakolanu Sudhakar Reddy. 2022. “Strigolactone, a neglected plant hormone, with a great potential for crop improvement: Crosstalk with other plant hormones”. *Environmental and Experimental Botany* 204 (dezembro): 105072. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2022.105072>.
- Kende, H., e JAD. Zeevaart. 1997. “The Five ‘Classical’ Plant Hormones.” *The Plant Cell* 9 (7): 1197–1210. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.7.1197>.
- Kim, Minsung, Sheila McCormick, Marja Timmermans, e Neelima Sinha. 2003. “The Expression Domain of PHANTASTICA Determines Leaflet Placement in Compound Leaves”. *Nature* 424 (6947): 438–43. <https://doi.org/10.1038/nature01820>.
- Kimura, Seisuke, e Neelima Sinha. 2008. “Tomato (*Solanum Lycopersicum*): A Model Fruit-Bearing Crop”. *Cold Spring Harbor Protocols* 2008 (11): pdb.emo105. <https://doi.org/10.1101/pdb.emo105>.
- Lan, Zijun, Zihan Song, Zhijuan Wang, Ling Li, Yiqun Liu, Shuaihua Zhi, Ruihan Wang, et al. 2023. “Antagonistic RALF peptides control an intergeneric hybridization barrier on Brassicaceae stigmas”. *Cell*, outubro. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.09.003>.
- Li, Chao, H.-M. Wu, e Alice Y. Cheung. 2016. “FERONIA and Her Pals: Functions and Mechanisms1[OPEN]”. *Plant Physiology* 171 (4): 2379–92. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00667>.
- Li, Lanxin, Huihuang Chen, Saqer S. Alotaibi, Aleš Pěňčík, Maciek Adamowski, Ondřej Novák, e Jiří Friml. 2022. “RALF1 peptide triggers biphasic root growth inhibition upstream of auxin biosynthesis”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 119 (31): e2121058119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2121058119>.

- Li, Ning, Qiang He, Juan Wang, Baike Wang, Jiantao Zhao, Shaoyong Huang, Tao Yang, et al. 2023. “Super-Pangenome Analyses Highlight Genomic Diversity and Structural Variation across Wild and Cultivated Tomato Species”. *Nature Genetics* 55 (5): 852–60. <https://doi.org/10.1038/s41588-023-01340-y>.
- Lin, Huan, Xiulan Han, Xuemei Feng, Xiugui Chen, Xuke Lu, Zeze Yuan, Yan Li, Wuwei Ye, e Zujun Yin. 2022. “Molecular Traits and Functional Analysis of Rapid Alkalinization Factors (RALFs) in Four *Gossypium* Species”. *International Journal of Biological Macromolecules* 194 (janeiro): 84–99. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.127>.
- Lindsey, Keith. 2001. “Plant peptide hormones: The long and the short of it”. *Current Biology* 11 (18): R741–43. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00435-3](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00435-3).
- Liu, Pei, Miyoshi Haruta, Benjamin B. Minkoff, e Michael R. Sussman. 2018. “Probing a Plant Plasma Membrane Receptor Kinase’s Three-Dimensional Structure Using Mass Spectrometry-Based Protein Footprinting”. *Biochemistry* 57 (34): 5159–68. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00471>.
- Mamaeva, Anna, Irina Lyapina, Andrey Knyazev, Nina Golub, Timur Mollaev, Elena Chudinova, Sergey Elansky, et al. 2023. “RALF peptides modulate immune response in the moss *Physcomitrium patens*”. *Frontiers in Plant Science* 14. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2023.1077301>.
- Matos, Juliana L., Celso S. Fiori, Marcio C. Silva-Filho, e Daniel S. Moura. 2008. “A conserved dibasic site is essential for correct processing of the peptide hormone AtRALF1 in *Arabidopsis thaliana*”. *FEBS Letters* 582 (23): 3343–47. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.08.025>.
- Matsubayashi, Yoshikatsu, e Youji Sakagami. 2006. “Peptide Hormones in Plants”. *Annual Review of Plant Biology* 57 (1): 649–74. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144204>.
- Mecchia, Martin A., Gorka Santos-Fernandez, Nadine N. Duss, Sofia C. Somoza, Aurélien Boisson-Dernier, Valeria Gagliardini, Andrea Martínez-Bernardini, et al. 2017. “RALF4/19 peptides interact with LRX proteins to control pollen tube growth in *Arabidopsis*”. *Science* 358 (6370): 1600–1603. <https://doi.org/10.1126/science.aao5467>.
- Miyazaki, Saori, Takashi Murata, Nami Sakurai-Ozato, Minoru Kubo, Taku Demura, Hiroo Fukuda, e Mitsuyasu Hasebe. 2009. “ANXUR1 and 2, Sister Genes to FERONIA/SIRENE, Are Male Factors for Coordinated Fertilization”. *Current Biology: CB* 19 (15): 1327–31. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.06.064>.
- Morato do Canto, Amanda, Paulo H. O. Ceciliato, Bianca Ribeiro, Fausto Andrés Ortiz Morea, Antonio Augusto Franco Garcia, Marcio C. Silva-Filho, e Daniel S. Moura. 2014. “Biological activity of nine recombinant AtRALF peptides: Implications for their perception and function in *Arabidopsis*”. *Plant Physiology and Biochemistry* 75 (fevereiro): 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.12.005>.

- Moretti, Celso L., Steven A. Sargent, Donald J. Huber, Adonai G. Calbo, e Rolf Puschmann. 1998. "Chemical Composition and Physical Properties of Pericarp, Locule, and Placental Tissues of Tomatoes with Internal Bruising". *Journal of the American Society for Horticultural Science* 123 (4): 656–60. <https://doi.org/10.21273/JASHS.123.4.656>.
- Murashige, Toshio, e Folke Skoog. 1962. "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures". *Physiologia Plantarum* 15 (3): 473–97. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- Murphy, Evan, Lam Dai Vu, Lisa Van den Broeck, Zhefeng Lin, Priya Ramakrishna, Brigitte van de Cotte, Allison Gaudinier, et al. 2016. "RALFL34 regulates formative cell divisions in Arabidopsis pericycle during lateral root initiation". *Journal of Experimental Botany* 67 (16): 4863–75. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw281>.
- Nakayama, Hokuto, Steven D. Rowland, Zizhang Cheng, Kristina Zumstein, Julie Kang, Yohei Kondo, e Neelima R. Sinha. 2021. "Leaf form diversification in an ornamental heirloom tomato results from alterations in two different HOMEBOX genes". *Current Biology* 31 (21): 4788-4799.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.08.023>.
- Nam, Kyoung Hee, e Jianming Li. 2002. "BRI1/BAK1, a Receptor Kinase Pair Mediating Brassinosteroid Signaling". *Cell* 110 (2): 203–12. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00814-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00814-0).
- Nautiyal, P. C., K. Sivasubramaniam, e Malavika Dadlani. 2023. "Seed Dormancy and Regulation of Germination". Em *Seed Science and Technology: Biology, Production, Quality*, editado por Malavika Dadlani e Devendra K. Yadava, 39–66. Singapore: Springer Nature. [https://doi.org/10.1007/978-981-19-5888-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-19-5888-5_3).
- Noble, Jennifer A, Nicholas V Bielski, Ming-Che James Liu, Thomas A DeFalco, Martin Stegmann, Andrew D L Nelson, Kara McNamara, et al. 2022. "Evolutionary analysis of the LORELEI gene family in plants reveals regulatory subfunctionalization". *Plant Physiology* 190 (4): 2539–56. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac444>.
- Pearce, G., D. Strydom, S. Johnson, e C.A. Ryan. 1991. "A Polypeptide from Tomato Leaves Induces Wound-Inducible Proteinase Inhibitor Proteins". *Science* 253 (5022): 895–98. <https://doi.org/10.1126/science.253.5022.895>.
- Pearce, Gregory, Daniel S. Moura, Johannes Stratmann, e Clarence A. Ryan. 2001. "RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (22): 12843–47. <https://doi.org/10.1073/pnas.201416998>.
- Pearce, Gregory, Yube Yamaguchi, Gerhard Munske, e Clarence A. Ryan. 2010. "Structure–activity studies of RALF, Rapid Alkalinization Factor, reveal an essential – YISY – motif". *Peptides* 31 (11): 1973–77. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.08.012>.
- Pereira, Wilson Vicente Souza, Anderson Cleiton José, Olívia Alvina Oliveira Tonetti, Lucas Amaral de Melo, e José Marcio Rocha Faria. 2022. "Imbibition curve in forest

- tree seeds and the triphasic pattern: theory versus practice”. *South African Journal of Botany* 144 (janeiro): 105–14. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.08.032>.
- Poole, Rebecca L. 2007. “The TAIR Database”. Em *Plant Bioinformatics: Methods and Protocols*, editado por David Edwards, 179–212. *Methods in Molecular Biology*<sup>TM</sup>. Totowa, NJ: Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-535-0\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-535-0_8).
- Rossi, Christina A. M., Eric J. R. Marchetta, Jong Hum Kim, e Christian Danve M. Castroverde. 2023. “Molecular regulation of the salicylic acid hormone pathway in plants under changing environmental conditions”. *Trends in Biochemical Sciences* 48 (8): 699–712. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2023.05.004>.
- Salehin, Mohammad, Rammyani Bagchi, e Mark Estelle. 2015. “SCFTIR1/AFB-Based Auxin Perception: Mechanism and Role in Plant Growth and Development”. *The Plant Cell* 27 (1): 9–19. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.133744>.
- Sharma, Rupali, Shashwat Sharad, Gillipsie Minhas, Deep Raj Sharma, Kulsajan Bhatia, e Neel Kamal Sharma. 2023. “Chapter 12 - DNA, RNA isolation, primer designing, sequence submission, and phylogenetic analysis”. Em *Basic Biotechniques for Bioprocess and Bioentrepreneurship*, editado por Arvind Kumar Bhatt, Ravi Kant Bhatia, e Tek Chand Bhalla, 197–206. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816109-8.00012-X>.
- Song, Xiu-Fen, Shi-Chao Ren, e Chun-Ming Liu. 2017. “11 - Peptide hormones”. Em *Hormone Metabolism and Signaling in Plants*, editado por Jiayang Li, Chuanyou Li, e Steven M. Smith, 361–404. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811562-6.00011-6>.
- Srivastava, Renu, Jian-Xiang Liu, Hongqing Guo, Yanhai Yin, e Stephen H. Howell. 2009. “Regulation and Processing of a Plant Peptide Hormone, AtRALF23, in Arabidopsis”. *The Plant Journal* 59 (6): 930–39. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03926.x>.
- Taylor, I. B. 1986. “Biosystematics of the Tomato”. Em *The Tomato Crop: A Scientific Basis for Improvement*, editado por Jeff G. Atherton e Jehoshua Rudich, 1–34. The Tomato Crop. Dordrecht: Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-3137-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-009-3137-4_1).
- Teufel, Felix, José Juan Almagro Armenteros, Alexander Rosenberg Johansen, Magnús Halldór Gíslason, Silas Irby Pihl, Konstantinos D. Tsirigos, Ole Winther, Søren Brunak, Gunnar von Heijne, e Henrik Nielsen. 2022. “SignalP 6.0 Predicts All Five Types of Signal Peptides Using Protein Language Models”. *Nature Biotechnology* 40 (7): 1023–25. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01156-3>.



- Thynne, Elisha, Isabel M. L. Saur, Jaime Simbaqueba, Huw A. Ogilvie, Yvonne Gonzalez-Cendales, Oliver Mead, Adam Taranto, et al. 2017. “Fungal Phytopathogens Encode Functional Homologues of Plant Rapid Alkalinization Factor (RALF) Peptides”. *Molecular Plant Pathology* 18 (6): 811–24. <https://doi.org/10.1111/mpp.12444>.
- Torres, Miguel Angel, Jonathan D.G. Jones, e Jeffery L. Dangl. 2006. “Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens”. *Plant Physiology* 141 (2): 373–78. <https://doi.org/10.1104/pp.106.079467>.
- Wieghaus, Annika, Dirk Prüfer, e Christian Schulze Gronover. 2019. “Loss of Function Mutation of the Rapid Alkalinization Factor (RALF1)-like Peptide in the Dandelion *Taraxacum Koksaghyz* Entails a High-Biomass Taproot Phenotype”. *PLOS ONE* 14 (5): e0217454. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217454>.
- Wu, Jinsong, Erin L. Kurten, Gabriele Monshausen, Grégoire M. Hummel, Simon Gilroy, e Ian T. Baldwin. 2007. “NaRALF, a Peptide Signal Essential for the Regulation of Root Hair Tip Apoplastic pH in *Nicotiana Attenuata*, Is Required for Root Hair Development and Plant Growth in Native Soils”. *The Plant Journal* 52 (5): 877–90. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03289.x>.
- Xiao, Yu, Martin Stegmann, Zhifu Han, Thomas A. DeFalco, Katarzyna Parys, Li Xu, Youssef Belkhadir, Cyril Zipfel, e Jijie Chai. 2019. “Mechanisms of RALF Peptide Perception by a Heterotypic Receptor Complex”. *Nature* 572 (7768): 270–74. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1409-7>.
- Zhang, Ning, Holly M. Roberts, Joyce Van Eck, e Gregory B. Martin. 2020. “Generation and Molecular Characterization of CRISPR/Cas9-Induced Mutations in 63 Immunity-Associated Genes in Tomato Reveals Specificity and a Range of Gene Modifications”. *Frontiers in Plant Science* 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.00010>.
- Zhang, Xin, Huan Peng, Sirui Zhu, Junjie Xing, Xin Li, Zhaozhong Zhu, Jingyuan Zheng, et al. 2020. “Nematode-Encoded RALF Peptide Mimics Facilitate Parasitism of Plants through the FERONIA Receptor Kinase”. *Molecular Plant*, Special Issue on Plant-Microbe Interactions, 13 (10): 1434–54. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.08.014>.
- Zhao, Chunzhao, Omar Zayed, Zheping Yu, Wei Jiang, Peipei Zhu, Chuan-Chih Hsu, Lingrui Zhang, W. Andy Tao, Rosa Lozano-Durán, e Jian-Kang Zhu. 2018. “Leucine-rich repeat extensin proteins regulate plant salt tolerance in *Arabidopsis*”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 (51): 13123–28. <https://doi.org/10.1073/pnas.1816991115>.
- Zhu, Lei, Liang-Cui Chu, Yan Liang, Xue-Qin Zhang, Li-Qun Chen, e De Ye. 2018. “The *Arabidopsis* CrRLK1L Protein Kinases BUPS1 and BUPS2 Are Required for Normal Growth of Pollen Tubes in the Pistil”. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 95 (3): 474–86. <https://doi.org/10.1111/tjp.13963>.

## ANEXOS

ANEXO A. Tabela de identidade dos RALFs de *Solanum* em comparação com os SIRALFs

	RALF1	RALF2	RALF3	RALF4	RALF5	RALF6	RALF7	RALF8	RALF9	RALF10	RALF11
<i>S. lycopersicoides</i>	100	98	80	-	100	98	-	-	98	79	100
<i>S. galapagense</i>	100	100	100	100	100	98	100	100	100	100	36
<i>S. peruvianum</i>	98	100	98	84	100	98	100	-	100	100	98
<i>S. pimpinellifolium</i>	100	100	100	98	100	100	100	-	100	-	100
<i>S. pennellii</i>	100	100	98	9	100	98	100	98	100	98	-
<i>S. chmielewskii</i>	100	100	100	96	100	98	100	100	100	100	66
<i>S. neorickii</i>	100	100	100		100	98	100	-	100	100	100
<i>S. chilense</i>	100	100	96	98	100	-	98	100	100	100	100
<i>S. habrochaites</i>	100		98	89	100	81	100	-	98	98	100
<i>S. corneliomulleri</i>		100	98	89	100	98	100	-	100	100	98

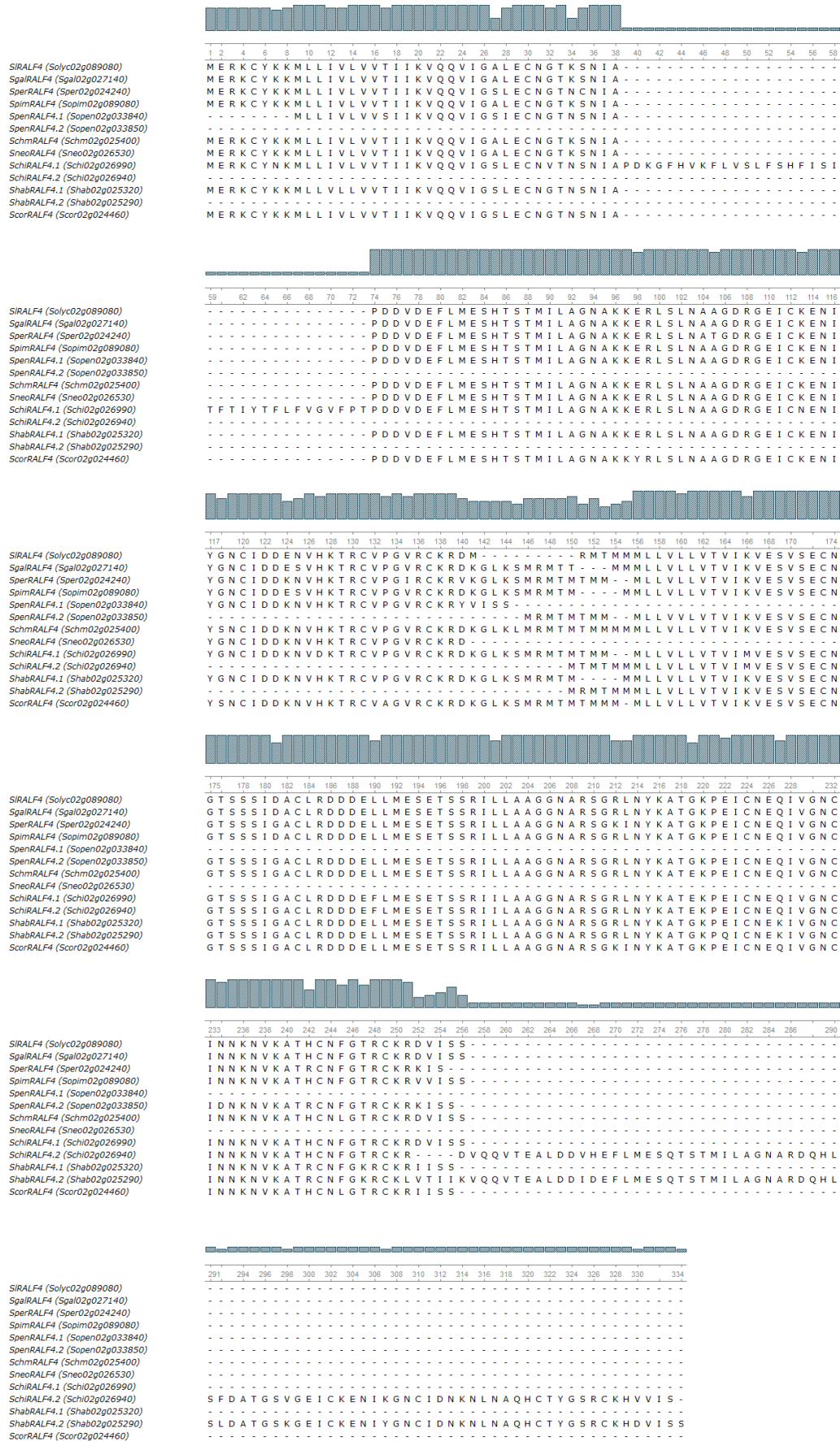
ANEXO B. Tabela de similaridade dos RALFs de *Solanum* em comparação com os SIRALFs

	RALF1	RALF2	RALF3	RALF4	RALF5	RALF6	RALF7	RALF8	RALF9	RALF10	RALF11
<i>S. lycopersicoides</i>	100	100	94	-	100	98	-	-	100	81	100
<i>S. galapagense</i>	100	100	100	100	100	98	100	100	100	100	38
<i>S. peruvianum</i>	98	100	98	91	100	98	100	-	100	100	98
<i>S. pimpinellifolium</i>	100	100	100	98	100	100	100	-	100	-	100
<i>S. pennellii</i>	100	100	98	9	100	98	100	100	100	100	-
<i>S. chmielewskii</i>	100	100	100	96	100	98	100	100	100	100	67
<i>S. neorickii</i>	100	100	100		100	98	100	-	100	100	100
<i>S. chilense</i>	100	100	96	98	100	-	100	100	100	100	100
<i>S. habrochaites</i>	100	-	98	93	100	81	100	-	100	100	100
<i>S. corneliomulleri</i>	-	100	98	95	100	98	100	-	100	100	98



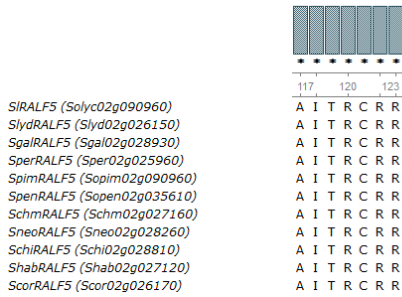
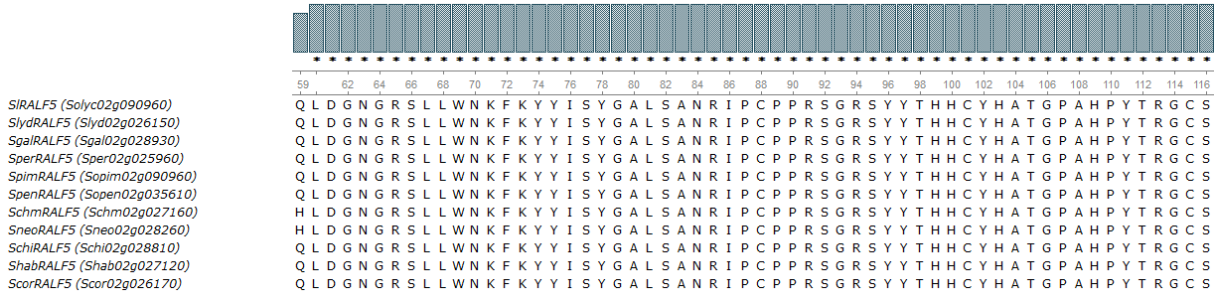
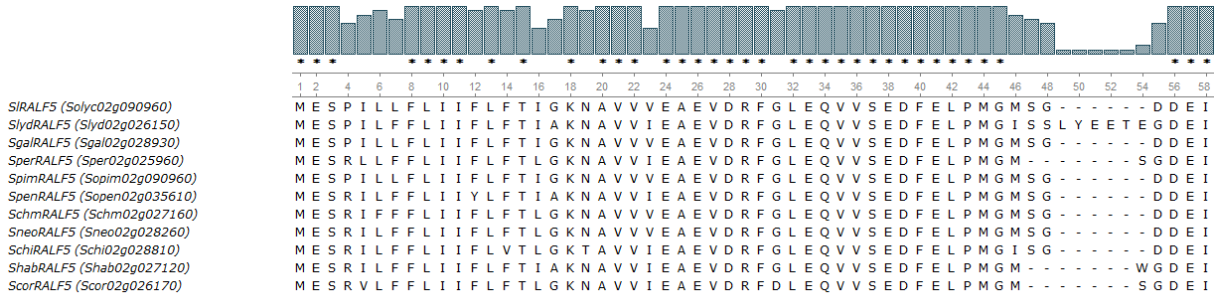


## ANEXO F. Alinhamento dos RALF4 de *Solanum* por ClustalO



ANEXO G.

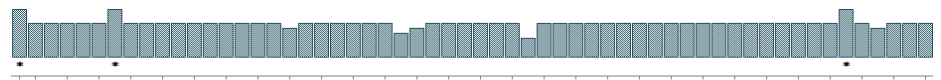
Alinhamento dos RALF5 de *Solanum* por ClustalO



ANEXO H.

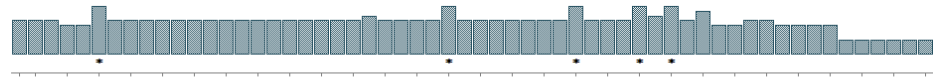
Alinhamento dos RALF6 de *Solanum* por ClustalO

SIRALF6 (Soly07g063030)  
 SlydRALF6 (Slyd07g018050)  
 SgalRALF6 (Sgal07g019900)  
 SperRALF6 (Sper07g018990)  
 SpimRALF6 (Sopim07g063030)  
 SpenRALF6 (Sopen07g031220)  
 SchmRALF6 (Schm07g018790)  
 SneoRALF6 (Sneo07g019180)  
 ShabRALF6 (Shab07g019340)  
 ScorRALF6 (Scor07g019760)

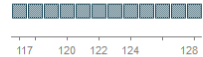


1 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44 46 48 50 52 54 56 58  
 M A S R P I F V F M L L A T L A F A M V A E S S F S S S S S F F N D P V V N S L G H N T G G G L D E W M T T G R I G  
 M V A E S S F S S S S S F F N D P A V N S L G H S S G G G L D E L M T T G R I G D T L F A D E E M M M P T E S A R R  
 M V A E S S F S S S S S F F N D P V V N S L G H N T G G G L D E W M T T G R I G D T L F A D E E M M M P T E L A R R  
 M V A E S S F S S S S S F F N D P V V N S L G H N T G G G L D E W M T T G R I G D T L F A D E E M M M P T E S A R R  
 M A S R P I F V F M L L A T L A F A M V A E S S F S S S S S F F N D P V V N S L G H N T G G G L D E W M T T G R I G  
 M A S R P I F V F M L L A T L A F A M V A E S S F S S S S S F F N D P V V N S L G H S T G G G L D E L M T T G R I G  
 M V A E S S F S S S S S F F N D P V V N S L G H N T G G G L D E W M T T G R I G D T L F A D E E M M M P T E S A R R  
 M V A E S S F S S S S S F F N D P V V N S L G H N T G G G L D E W M T T G R I G D T L F A D E E M M M P T E S A R R  
 M V A E S S F S S S S S F F N D P V V N S L G H S T G G G L D E L M T T G R I G D T L F A D E E M M M P T E S A R R  
 M V A E S S F S S S S S F F N D P V V N S L G H N T G G G L D E L M T T G R I G D T L F A D E E M M M P T E S A R R

SIRALF6 (Soly07g063030)  
 SlydRALF6 (Slyd07g018050)  
 SgalRALF6 (Sgal07g019900)  
 SperRALF6 (Sper07g018990)  
 SpimRALF6 (Sopim07g063030)  
 SpenRALF6 (Sopen07g031220)  
 SchmRALF6 (Schm07g018790)  
 SneoRALF6 (Sneo07g019180)  
 ShabRALF6 (Shab07g019340)  
 ScorRALF6 (Scor07g019760)



59 62 64 66 68 70 72 74 76 78 80 82 84 86 88 90 92 94 96 98 100 102 104 106 108 110 112 114 116  
 D T L F A D E E M M M P T E S A R R A L N N Q D H I S Y R A M S K N A I P C D R R H G A S Y Y Q C T R M Q K I R P Y R  
 A L N D Q D H I S Y R A M S K N A I P C D R R G A S Y Y Q C T R M Q K I R P Y R R G C S K I T R C Q R R - - - - -  
 A L N N Q D H I S Y R A M S K N A I P C D R R G A S Y Y Q C T R M Q K I R P Y R R G C S K I T R C Q R R - - - - -  
 A L N N Q D H I S Y R A M S K N A I P C D R R G A S Y Y Q C T R M Q K I R P Y R R G C S K I T R C Q R R - - - - -  
 D T L F A D E E M M M P T E S A R R A L N N Q D H I S Y R A M S K N A I P C D R R H G A S Y Y Q C T R M Q K I R P Y R  
 D T L F A D E E M M M P T E S A R R A L N N R D H I S Y R A M S K N A I P C D R R G A S Y Y Q C T R M Q K I R P Y R  
 A L N N Q D H I S Y R A M S K N A I P C D R R G A S Y Y Q C T R M Q K I R P Y R R G C S K I T R C Q R R - - - - -  
 A L N N Q D H I S Y R A M S K N A I P C D R R G A S Y Y Q C T R M Q K I R P Y R R G C S K I T R C Q R R - - - - -  
 A L N N R D H I S Y R A M S K N A I P C D R R G A S Y Y Q C T R M Q K I R P Y R R G C R T S T R M A N V S - - - - -  
 A L N N Q D H I S Y R A M S K N A I P C D R R G A S Y Y Q C T R M Q K I R P Y R R G C S K I T R C Q R R - - - - -




SIRALF6 (Soly07g063030)  
 SlydRALF6 (Slyd07g018050)  
 SgalRALF6 (Sgal07g019900)  
 SperRALF6 (Sper07g018990)  
 SpimRALF6 (Sopim07g063030)  
 SpenRALF6 (Sopen07g031220)  
 SchmRALF6 (Schm07g018790)  
 SneoRALF6 (Sneo07g019180)  
 ShabRALF6 (Shab07g019340)  
 ScorRALF6 (Scor07g019760)

117 120 122 124 128  
 R G C S K I T R C Q R R  
 - - - - -  
 - - - - -  
 - - - - -  
 R G C S K I T R C Q R R  
 R G C S K I T R C Q R R  
 - - - - -  
 - - - - -  
 - - - - -  
 - - - - -  
 - - - - -


**ANEXO I.**

**Alinhamento dos RALF7 de *Solanum* por ClustalO**




```

MAANSFCSIFIISSLLIAALIISGDATGGDFDVS GWIPMKSADSC EGSIAECMAAGEF
1 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44 46 48 50 52 54 56 58
SIRALF7 (Solyc09g074890) MAANSFCSIFIISSLLIAALIISGDATGGDFDVS GWIPMKSADSC EGSIAECMAAGEF
SgalRALF7 (Sgal09g016650) MAANSFCSIFIISSLLIAALIISGDATGGDFDVS GWIPMKSADSC EGSIAECMAAGEF
SperRALF7 (Sper09g015680) MAANSFCSIFIISSLLIAALIISGDATGGDFDVS GWIPMKSADSC EGSIAECMAAGEF
SpimRALF7 (Sopim09g074890) MAANSFCSIFIISSLLIAALIISGDATGGDFDVS GWIPMKSADSC EGSIAECMAAGEF
SpenRALF7 (Sopen09g029710) MAANSFCSIFIISSLLIAALIISGDATGGDFDVS GWIPMKSADSC EGSIAECMAAGEF
SchmRALF7 (Schm09g015580) MAANSFCSIFIISSLLIAALIISGDATGGDFDVS GWIPMKSADSC EGSIAECMAAGEF
SneoRALF7 (Sneo09g016530) MAANSFCSIFIISSLLIAALIISGDATGGDFDVS GWIPMKSADSC EGSIAECMAAGEF
SchiRALF7 (Schi09g015030) MAANSFCSIFIISSLLIAALIISGDATGGDFDVS GWIPMKSADSC EGSIAECMAAGEF
ShabRALF7 (Shab09g014360) MAANSFCSIFIISSLLIAALIISGDATGGDFDVS GWIPMKSADSC EGSIAECMAAGEF
ScorRALF7 (Scor09g015540) MAANSFCSIFIISSLLIAALIISGDATGGDFDVS GWIPMKSADSC EGSIAECMAAGEF
    
```



```

EMDSESNRRILATTDYISYGALQSN SVPCSRRGASYYNCKTGAEANPYTRGCSAITRC
59 62 64 66 68 70 72 74 76 78 80 82 84 86 88 90 92 94 96 98 100 102 104 106 108 110 112 114 116
SIRALF7 (Solyc09g074890) EMDSESNRRILATTDYISYGALQSN SVPCSRRGASYYNCKTGAEANPYTRGCSAITRC
SgalRALF7 (Sgal09g016650) EMDSESNRRILATTDYISYGALQSN SVPCSRRGASYYNCKTGAEANPYTRGCSAITRC
SperRALF7 (Sper09g015680) EMDSESNRRILATTDYISYGALQSN SVPCSRRGASYYNCKTGAEANPYTRGCSAITRC
SpimRALF7 (Sopim09g074890) EMDSESNRRILATTDYISYGALQSN SVPCSRRGASYYNCKTGAEANPYTRGCSAITRC
SpenRALF7 (Sopen09g029710) EMDSESNRRILATTDYISYGALQSN SVPCSRRGASYYNCKTGAEANPYTRGCSAITRC
SchmRALF7 (Schm09g015580) EMDSESNRRILATTDYISYGALQSN SVPCSRRGASYYNCKTGAEANPYTRGCSAITRC
SneoRALF7 (Sneo09g016530) EMDSESNRRILATTDYISYGALQSN SVPCSRRGASYYNCKTGAEANPYTRGCSAITRC
SchiRALF7 (Schi09g015030) EMDSESNRRILATTDYISYGALQSN SVPCSRRGASYYNCKTGAEANPYTRGCSAITRC
ShabRALF7 (Shab09g014360) EMDSESNRRILATTDYISYGALQSN SVPCSRRGASYYNCKTGAEANPYTRGCSAITRC
ScorRALF7 (Scor09g015540) EMDSESNRRILATTDYISYGALQSN SVPCSRRGASYYNCKTGAEANPYTRGCSAITRC
    
```

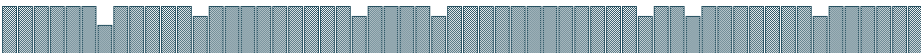


```

R S
1178
SIRALF7 (Solyc09g074890) R S
SgalRALF7 (Sgal09g016650) R S
SperRALF7 (Sper09g015680) R S
SpimRALF7 (Sopim09g074890) R S
SpenRALF7 (Sopen09g029710) R S
SchmRALF7 (Schm09g015580) R S
SneoRALF7 (Sneo09g016530) R S
SchiRALF7 (Schi09g015030) R S
ShabRALF7 (Shab09g014360) R S
ScorRALF7 (Scor09g015540) R S
    
```


**ANEXO J.**

**Alinhamento dos RALF8 de *Solanum* por ClustalO**



```

MEAPNFTKLFYFITFFVTILFIITCVNSQSQCNDTIAKCNDEDMEFLMESEISKRF LA
1 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44 46 48 50 52 54 56 58
SIRALF8 (Solyc09g092235) MEAPNFTKLFYFITFFVTILFIITCVNSQSQCNDTIAKCNDEDMEFLMESEISKRF LA
SgalRALF8 (Sgal09g021900) MEAPNFTKLFYFITFFVTILFIITCVNSQSQCNDTIAKCNDEDMEFLMESEISKRF LA
SpenRALF8 (Sopen09g035160) MEAPNFTKLFYFITFFVTILFIITCVNSQSQCNDTIAKCNDEDMEFLMESEISKRF LA
SchmRALF8 (Schm09g020810) MEAPNFTKLFYFITFFVTILFIITCVNSQSQCNDTIAKCNDEDMEFLMESEISKRF LA
SchiRALF8 (Schi09g020540) MEAPNFTKLFYFITFFVTILFIITCVNSQSQCNDTIAKCNDEDMEFLMESEISKRF LA
    
```



```


ERKKYISPGALKRDQPV CNGGGSGQPYSR SCLPPPSNPYNRGCSKY YRCRGDQ
59 62 64 66 68 70 72 74 76 78 80 82 84 86 88 90 92 94 96 98 100 102 104 106 108 111
SIRALF8 (Solyc09g092235) ERKKYISPGALKRDQPV CNGGGSGQPYSR SCLPPPSNPYNRGCSKY YRCRGDQ
SgalRALF8 (Sgal09g021900) ERKKYISPGALKRDQPV CNGGGSGQPYSR SCLPPPSNPYNRGCSKY YRCRGDQ
SpenRALF8 (Sopen09g035160) ERKKYISPGALKRDQPV CNGGGSGQPYSR SCLPPPSNPYDRGCSKY YRCRGDQ
SchmRALF8 (Schm09g020810) ERKKYISPGALKRDQPV CNGGGSGQPYSR SCLPPPSNPYNRGCSKY YRCRGDQ
SchiRALF8 (Schi09g020540) ERKKYISPGALKRDQPV CNGGGSGQPYSR SCLPPPSNPYNRGCSKY YRCRGDQ
    
```





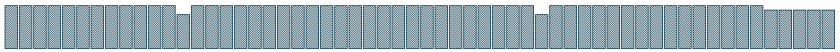
ANEXO L.

Alinhamento dos RALF1 de *Solanum* por ClustalO



```

1 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44 46 48 50 52 54 56 58
SIRALF10 (Solyc12013895)  M A T R S R L A V V L L L T L A M A M V A E S S F S H L D S T T M A F K V Q G S N D N N I G H V G D M L F E D E E M
SlydRALF10 (Slyd12g006190) M A T R S R L A V V L L L T L A M A M V A E S S F S H L D S T T M A F N V Q G S N D N N I G H V G D M L F E D E E M
SgaRALF10 (Sgal12g005890)  M A T R S R L A V V L L L T L A M A M V A E S S F S H L D S T T M A F K V Q G S N D N N I G H V G D M L F E D E E M
SperRALF10 (Sper12g005650) M A T R S R L A V V L L L T L A M A M V A E S S F S H L D S T T M A F K V Q G S N D N N I E H V G D M L F E D E E M
SpenRALF10 (Spen12g007220) M A T R S R L A V V L L L T L A M A M V A E S S F S H L D S T T M A F N V Q G S N D N N I G H V G D M L F E D E E M
SchmRALF10 (Schm12g005470) M A T R S R L A V V L L L T L A M A M V A E S S F S H L D S T T M A F K V Q G S N D N N I G H V G D M L F E D E E M
SneoRALF10 (Sneo12g005550) M A T R S R L A V V L L L T L A M A M V A E S S F L H L D S T T M A F K V Q G S N D N N I G H V G D M L F E D E E M
SchIRALF10 (SchI12g007600) M A T R S R L A V V L L L T L A M A M V A E S S F S H L D S T T M A F K V Q G S N D N N I G H V G D M L F E D E E M
ShabRALF10 (Shab12g005740) M A T R S R L A V V L L L T L A M A M V A E S - - - - - - - - - - S N D N N I G H V G D M L F E D E E M
ScorRALF10 (Scor12g006090) M A T R S R L A V V L L L T L A M A M V A E S S F S H L D S T T M A F N L Q G S N D N N I G H V G D M L F E D E E M
    
```



```

59 62 64 66 68 70 72 74 76 78 80 82 84 86 88 90 92 94 96 98 100 102 104 106 108 110 112 114 116
SIRALF10 (Solyc12013895)  M M P S E S A R R T L D E R D H I G Y R A L R A N N I P C D Q R G A S Y Y E C N R M S K I N P Y R R G C Q R I T G C
SlydRALF10 (Slyd12g006190) M M P S E S A R R T L D E R D H I G Y R A L R A N N I P C D Q R G A S Y Y E C N R M S K I N P Y R R G C Q R I T G C
SgaRALF10 (Sgal12g005890)  M M P S E S A R R T L D E R D H I G Y R A L R A N N I P C D Q R G A S Y Y E C N R M S K I N P Y R R G C Q R I T G C
SperRALF10 (Sper12g005650) M M P S E S A R R T L D E R D H I G Y R A L R A N N I P C D Q R G A S Y Y E C N R M S K I N P Y R R G C Q R I T G C
SpenRALF10 (Spen12g007220) M M P S E S A R R T L D E R D H I G Y R A L R A N N I P C D Q R G A S Y Y Q C N R M S K I N P Y R R G C Q R I T G C
SchmRALF10 (Schm12g005470) M M P S E S A R R T L D A R D H I G Y R A L R A N N I P C D Q R G A S Y Y E C N R M S K I N P Y R R G C Q R I T G C
SneoRALF10 (Sneo12g005550) M M P S E S A R R T L D A R D H I G Y R A L R A N N I P C D Q R G A S Y Y E C N R M S K I N P Y R R G C Q R I T G C
SchIRALF10 (SchI12g007600) M M P S E S A R R T L D E R D H I G Y R A L R A N N I P C D Q R G A S Y Y E C N R M S K I N P Y R R G C Q R I T G C
ShabRALF10 (Shab12g005740) M M P S E S A R R T L D E R D H I G Y R A L R A N N I P C D Q R G A S Y Y Q C N R M S K I N P Y R R G C Q R I T G C
ScorRALF10 (Scor12g006090) M M P S E S A R R T L D E R D H I G Y R A L R A N N I P C D Q R G A S Y Y E C N R M S K I N P Y R R G C Q R I T G C
    
```




```

117 122
SIRALF10 (Solyc12013895)  G R T N S -
SlydRALF10 (Slyd12g006190) - - - - -
SgaRALF10 (Sgal12g005890)  G R T N S -
SperRALF10 (Sper12g005650) G R T N S -
SpenRALF10 (Spen12g007220) G R T N S -
SchmRALF10 (Schm12g005470) G R T N S -
SneoRALF10 (Sneo12g005550) G R T N S -
SchIRALF10 (SchI12g007600) G R T N S -
ShabRALF10 (Shab12g005740) G R T N S -
ScorRALF10 (Scor12g006090) G R T N S -
    
```

ANEXO M.

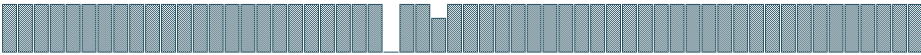
Alinhamento dos RALF11 de *Solanum* por ClustalO



**MTT p g E K I Q E i Q p Q t H K M Q K S Q L Y F N P L K T L F f L L L F S H A Q M R F C S G V S V L D L K S V K D**

1 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44 46 48 50 52 54 56 58


SIRALF11 (Solyc12g098510)  
 SlydRALF11 (Slyd12g018860)  
 SgalRALF11 (Sgal12g021830)  
 SpermRALF11 (Sper12g020110)  
 SpimRALF11 (Sopim12g098510)  
 SchmRALF11 (Schm12g019080)  
 SneoRALF11 (Sneo12g019880)  
 SchiRALF11 (Schi12g020830)  
 ShabRALF11 (Shab12g020230)  
 ScorRALF11 (Scor12g020570)



**S N F N L M G K R G C S E K L Q E C S E M V D E - E D M M D S E S N R R V L L M Q K K Y I S Y G T L K R D L V P C N**

59 62 64 66 68 70 72 74 76 78 80 82 84 86 88 90 92 94 96 98 100 102 104 106 108 110 112 114 116

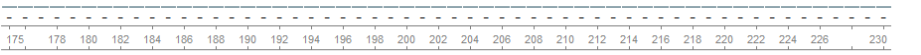
SIRALF11 (Solyc12g098510)  
 SlydRALF11 (Slyd12g018860)  
 SgalRALF11 (Sgal12g021830)  
 SpermRALF11 (Sper12g020110)  
 SpimRALF11 (Sopim12g098510)  
 SchmRALF11 (Schm12g019080)  
 SneoRALF11 (Sneo12g019880)  
 SchiRALF11 (Schi12g020830)  
 ShabRALF11 (Shab12g020230)  
 ScorRALF11 (Scor12g020570)



**T P G A S Y Y N C K A P G A A N N Y N R G C E I I T R C A R E V S D I K S r r r h s f f l e q f v f i c v k m - - k -**

117 120 122 124 126 128 130 132 134 136 138 140 142 144 146 148 150 152 154 156 158 160 162 164 166 168 170 174

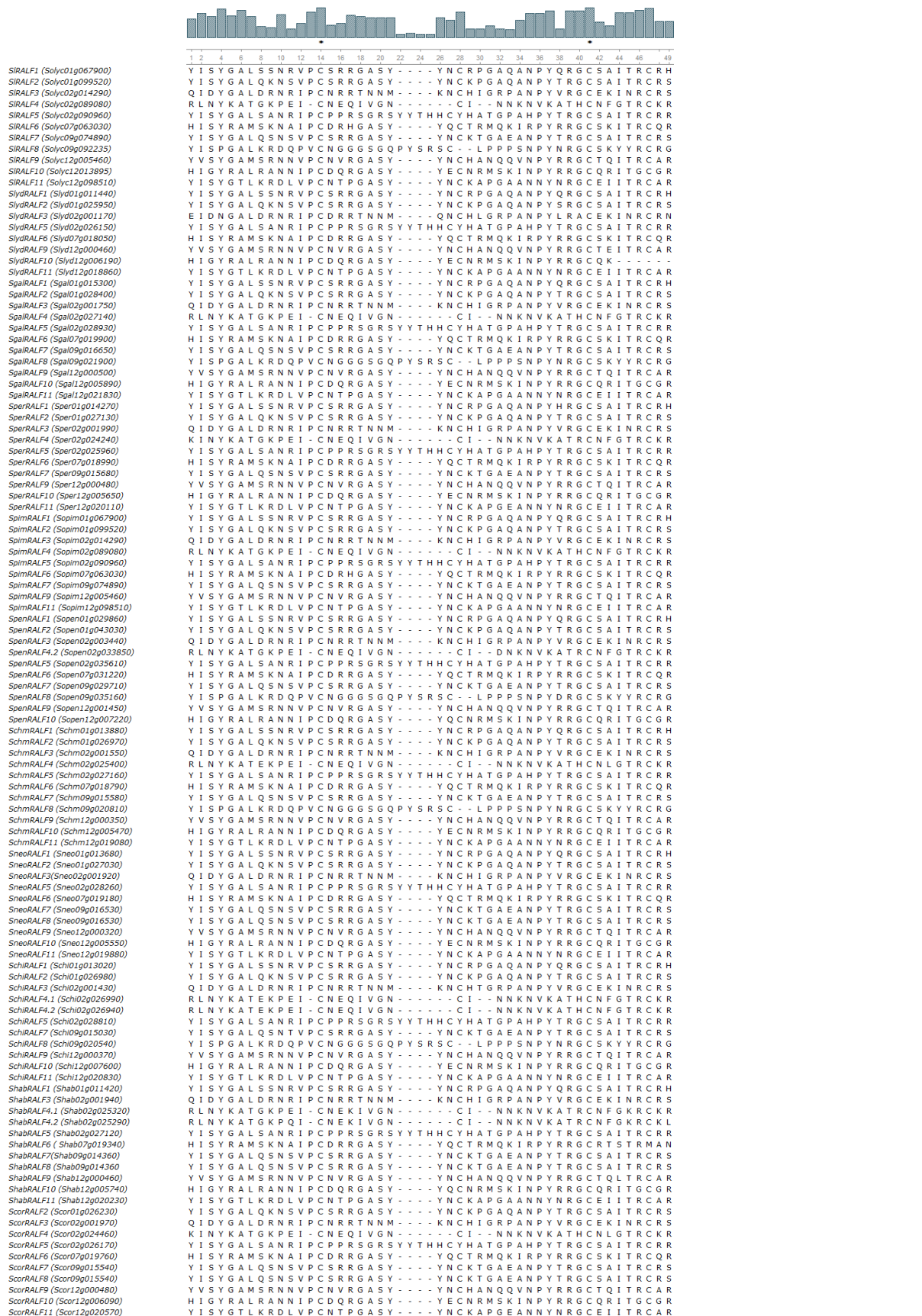
SIRALF11 (Solyc12g098510)  
 SlydRALF11 (Slyd12g018860)  
 SgalRALF11 (Sgal12g021830)  
 SpermRALF11 (Sper12g020110)  
 SpimRALF11 (Sopim12g098510)  
 SchmRALF11 (Schm12g019080)  
 SneoRALF11 (Sneo12g019880)  
 SchiRALF11 (Schi12g020830)  
 ShabRALF11 (Shab12g020230)  
 ScorRALF11 (Scor12g020570)



175 178 180 182 184 186 188 190 192 194 196 198 200 202 204 206 208 210 212 214 216 218 220 222 224 226 230

SIRALF11 (Solyc12g098510)  
 SlydRALF11 (Slyd12g018860)  
 SgalRALF11 (Sgal12g021830)  
 SpermRALF11 (Sper12g020110)  
 SpimRALF11 (Sopim12g098510)  
 SchmRALF11 (Schm12g019080)  
 SneoRALF11 (Sneo12g019880)  
 SchiRALF11 (Schi12g020830)  
 ShabRALF11 (Shab12g020230)  
 ScorRALF11 (Scor12g020570)

ANEXO N. Alinhamento dos RALFs de *Solanum* usado para a análise filogenética (Figura 2) por ClustalO



**ANEXO O.** Alinhamento dos RALFs de arabidopsis e tomateiro usado para a análise filogenética (Figura 5) por ClustalO

