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

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

Aparecida Leonir da Silva

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

Piracicaba
2019

Aparecida Leonir da Silva
Licenciada em Ciências Biológicas

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

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

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

Piracicaba
2019

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

Silva, Aparecida Leonir da

Interação do peptídeo hormonal AtRALF1 com a proteína de membrana MSBP1, uma proteína que regula negativamente a via de brassinosteróides/ Aparecida Leonir da Silva. - - Piracicaba, 2019.

117 p.

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

1. RALF 2. Inibição primária da raiz 3. Sinalização 4. Bak1 I. Título

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Leonor Dadon da Silva e Izidio Pereira da Silva.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, porque sem Ele nada seria possível.

À nossa senhora Aparecida por guiar meu caminho.

Ao professor, pesquisador e orientador Dr. Daniel Scherer de Moura, pela oportunidade, orientação, paciência, dedicação e confiança.

À Universidade de São Paulo e ao programa de Pós-graduação em Fisiologia e Bioquímica de plantas, pela oportunidade de realização do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo apoio e concessão da bolsa.

Aos meus pais (Leonor Dadon da Silva e Izidio Pereira da Silva) e minha irmã (Andréia Pereira da Silva), pelo amor, carinho e apoio.

Em especial aos professores Carlos Alberto Montanari, Andrei Leitão, Helaine Carrer e Márcio de Castro Silva Filho, pela disponibilização de seus laboratórios, o que foi fundamental para a conclusão da tese.

Aos técnicos de laboratório Fabiana Rosini, Rodinei de Jesus Graciane, Antônio F. C. Amaral, Valentina de Fátima De Martin, Felipe Gabriel Andrino, Luiz Humberto Gomes e Felippe Buck Campana, por todo o auxílio com os experimentos e a secretária da pós-graduação Maria Solizete Granziol Silva pelo carinho e auxílio.

As minhas orientadoras de iniciação científica Glaucia Almeida de Morais e de mestrado Denise Cunha F. S. Dias, pelos primeiros ensinamentos na área científica, dedicação, amor e carinho.

Ao Douglas de Araújo, pela paciência e apoio durante todos esses anos. Obrigada pelo carinho, dedicação e amor.

À minha amiga “pessoal” Perla Novais de Oliveira pelo carinho, parceria e compreensão.

Ao Rafael Vela pela amizade, carinho e compreensão.

Ao Glauco Garcia pelo carinho e paciência em permanecer até as 03:00h da manhã comigo no laboratório.

Aos meus amigos do Laboratório de Bioquímica de proteínas: Keini Dressano, Paulo Ceciliato, Juan Carlos Guerrero Abad, Tabata Bergonci, Wellington Campos, Lucas Claus e Talieisse Gomes Fagundes pelo apoio e amizade. Em especial à Akemi Lueli Niitsu pelo carinho, apoio e amizade.

Aos meus amigos do Laboratório de Biologia Molecular: Aline Politano, Gabriel L. L. S. Moreira e Fernando M. M. Hurtado pela amizade.

Aos meus amigos do Laboratório de biologia molecular de plantas: Larissa Spoladore, Flavia Franco, Karina Lopes, Márcia Leite, Thais Paula Souza, Diego Gallan, Alex Velasquez e Maressa de Oliveira Henrique pelo apoio e amizade. Em especial à Camila Moro pela parceria nos westerns, apoio e amizade.

Aos meus amigos do Grupo de Estudos em Química Medicinal: Júnior Quilles, Daniela de Vita, Murillo D. Leite, Juliana Jarussi, Camila Melo, Lorenzo Cianni, Fernanda Reis, Pedro Henrique J. Batista, Thiago Kelvin. Em especial ao João Victor Basolli Borsatto e Samelyn da Costa Martins Silva por passarem noites e mais noites comigo no laboratório observando os "picos".

Aos alunos de iniciação científica: Larissa H. Visioli, Ana Melo, Karine, Alessandro Ramos, Ariane Hannes, Giovanna A. Boaventura, Gabriel Mateuzzo, Gabriel Silva Souza, Werbson Lima Barroso, Gisele Silveira Guimarães, Lucas C. Ferreira e Jéssica F. Mendes pela amizade.

Aos professores Fábio Tebaldi Silveira Nogueira, Lázaro Eustáquio Pereira Peres, Ricardo Alfredo Klugue, Marcílio de Almeida, Carlos Alberto Labate, Taitiâny Karita Bonzanini, Núbia Barbosa Eloy e Vinícius A. C. Abreu, pelos ensinamentos.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo financiamento das pesquisas em nosso laboratório.

A todos que de alguma forma contribuíram para minha formação.

Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer.

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO 9
ABSTRACT 10
LISTA DE FIGURAS 11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS 113
1. INTRODUÇÃO 15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 17
2.1 Sinalização de Brassinosteróide (BR) 17
2.2 Peptídeo hormonal RALF 21
2.3 Relação do peptídeo hormonal AtRALF1 com outros hormônios 24
2.4 Antagonismo nas vias de sinalização de AtRALF1 e Brassinosteróides 25
2.4.1 MSBP1 regula negativamente a via de Brassinosteróide 26
2.4.2 Sinalização do peptídeo AtRALF1 27
3. MATERIAIS E MÉTODOS 31
3.1 Clonagem e ensaio de duplo híbrido em leveduras *Sacharomyces cerevisae* 31
3.2 Pellet X-Gal (PXG) 32
3.3 Material vegetal e condições de crescimento 32
3.4 Obtenção de transgênicos da proteína MSBP1 32
3.5 Extração de DNA genômico de arabidopsis 33
3.6 Extração de RNA total de arabidopsis e síntese de cDNA 33
3.7 Transformação de *Escherichia coli* 34
3.7.2 Eletroporação de *E. coli* 35
3.8 Extração de DNA plasmidial de *E. coli* 35
3.9 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* 36
3.8.2 Eletroporação de *A. tumefaciens* 36
3.10 Extração de DNA plasmidial de *A. tumefaciens* 36
3.11 Análise de expansão celular em mutantes MSBP1: Medições das células da endoderme e da epiderme em raiz primária de arabidopsis 37

3.12 Produção e purificação de peptídeos AtRALFs [1, 19, 23, 34 e 1 (9-49)] 37
3.13 Inibição de crescimento de raiz primária com AtRALF1 em placa vertical 38
3.14 Inibição de crescimento de raiz primária com AtRALF1 (9-49), AtRALF19, AtRALF23 e AtRALF34 em placa vertical 39
3.15 Inibição de crescimento de raiz primária com outros hormônios: Citocinina (BAP) Auxina (NAA) e Brassinolide (BL) em placa vertical 39
3.16 Análise do pH da rizosfera através de gel indicador 40
3.17 Análise de expressão de genes induzidos por AtRALF1 por PCR semiquantitativo.....40
3.18 Análise de expressão de genes induzidos por AtRALF1 por PCR quantitativo (qRT-PCR).....40
3.19 Análises estatísticas.....41
4 RESULTADOS 43
5 CONCLUSÕES.....93
REFERÊNCIAS 95
APÊNDICE 105
ANEXOS 113

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

Keywords: RALF; Primary root inhibition; Signaling; BAK1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sinalização do hormônio Brassinosteróide (BR).....20

Figura 2. Estrutura primária do prepropeptídeo NtRALF.....22

Figura 3. Sinalização do peptídeo hormonal AtRALF1.....28

Figura 4. Interação da proteína MSBP1 com o peptídeo AtRALF1 no sistema de duplo híbrido de levedura.....44

Figura 5. Interação da proteína MSBP1 com as proteínas: BAK1, CML38 (A e B) e a interação da proteína BAK1 com CML38 (C) no sistema de duplo híbrido de levedura.....45

Figura 6. Quantificação por HPLC do AtRALF1 recombinante.....49

Figura 7. Análise de mutantes obtidos por silenciamento do gene *MSBP1*.....51

Figura 8. Análise de mutantes superexpressando o gene *MSBP1*.....53

Figura 9. Representação *in silíco* do padrão de expressão gênica dos genes *AtRALF1* e *MSBP1*.....54

Figura 10. Medidas de células endodérmicas de mutantes *irmsbp1* e *msbp1*.....55

Figura 11. Crescimento de raiz primária em plantas selvagens (Wt) e mutantes *irmsbp1* (L14.4, L16.16, L16.3, L10.18), *msbp1*, *bak1-1* e *fer4* tratadas com 0, 2 e 5 µM do peptídeo AtRALF1.....56

Figura 12. Crescimento de raiz primária de plantas selvagens (Wt) e mutantes 35S:MSBP1 (L6.1, L6.2, L10.1, L20.1) tratadas com 0, 2 e 5 µM do peptídeo AtRALF1.....57

Figura 13. Ensaio de inibição de raiz primária de mutantes *irmsbp1* (L14.4, L16.16, L16.3, L10.18), Wt, *msbp1*, *bak1-1* e *fer4* com os peptídeos AtRALF1(9-49), AtRALF19, AtRALF23 e AtRALF34 (1 e 2 µM) 59

Figura 14. Ensaio de crescimento da raiz primária de plantas selvagens (Wt) e mutantes *irmsbp1, msbp1, bak1-1* e *fer4* em meio contendo 0,1 µM de auxina NAA (ácido naftil acético), 0,1 µM de citocinina BAP (6-Benzilaminopurina) ou H_2O (controle) 62

Figura 15. Efeito do brassinolide (BL) no crescimento da raiz primária de plantas selvagens (Wt), mutantes *irmsbp1* e *msbp1*: 63

Figura 16. Avaliação das respostas dos mutantes *irmsbp1*, *msbp1*, *bak1-1* e *fer4* ao ensaio de alcalinização induzida por AtRALF1.....65

Figura 17. Análise de expressão gênica por PCR semi-quantitativo de genes induzidos por AtRALF1 em mutantes *irmsbp1* (L14.4, L16.16, L16.3, L10.18), *msbp1*, *bak1-1* e *fer4*.....66

Figura 18. Análise de expressão gênica por qRT-PCR do gene *PHOTOMORPHISM AND DWARFISM (*CPD) induzido por AtRALF1 (0, 1 e 2 µM) em mutantes *irmsbp1* (L14.4, L16.16, L16.3, L10.18), *msbp1*, *bak1-1* e *fer4*.....68

Figura 19. Análise de expressão gênica por qRT-PCR do gene PROLINE-RICH PROTEIN *(*PRP3) induzido por AtRALF1 (0, 1 e 2 µM) em mutantes *irmsbp1* (L14.4, L16.16, L16.3, L10.18), *msbp1*, *bak1-1* e *fer4*.....69

Figura 20. Análise de expressão gênica por qRT-PCR do gene *DWARF4* (*DWF4*) induzido por AtRALF1 (0, 1 e 2 µM) em mutantes *irmsbp1* (L14.4, L16.16, L16.3, L10.18), *msbp1*, *bak1-1* e *fer4*.....71

Figura 21. Análise de expressão gênica por qRT-PCR do gene *PHOTOMORPHISM AND DWARFISM (*CPD) em mutantes *irmsbp1* (L14.4, L16.16, L16.3, L10.18, *msbp1*, *bak1-1* e *fer4*).....73

Figura 22. Análise de expressão gênica por qRT-PCR do gene PROLINE-RICH PROTEIN *(PRP3*) em mutantes *irmsbp1* (L14.4, L16.16, L16.3, L10.18, *msbp1*, *bak1-1* e *fer4*).....75

Figura 23. Análise de expressão gênica por qRT-PCR do gene *DWARF4* (*DWF4*) em mutantes *irmsbp1* (L14.4, L16.16, L16.3, L10.18, *msbp1*, *bak1-1* e *fer4*).....77

Figura 24. Análise de expressão gênica por PCR semi-quantitativo de genes induzidos por AtRALF1 em mutantes 35S:MSBP1.....79

Figura 25. Análise de expressão gênica por qRT-PCR dos genes: MEMBRANE STEROID BINDING PROTEIN-1 (*MSBP1*), *PHOTOMORPHISM AND DWARFISM* (*CPD*), *DWARF4* (*DWF4*) e PROLINE-RICH PROTEIN (*PRP3*) em mutantes 35S:MSBP1(L6.1, L6.2, L10.1, L20.1), sem aplicação de AtRALF1.....80

Figura 26. Análise de expressão gênica por qRT-PCR do gene MEMBRANE STEROID BINDING PROTEIN-1 (*MSBP1*) em mutantes *irmsbp1* (L14.4, L16.16, L16.3, L10.18), *msbp1*, *bak1-1* e *fer4*.....82

Figura 27. Análise de expressão gênica por PCR semi-quantitativo do gene MEMBRANE STEROID BINDING PROTEIN-1 (*MSBP1*) em Wt, *bak1-1* e *fer4*.....83

Figura 28. Análise de expressão gênica por qRT-PCR do gene MEMBRANE STEROID BINDING PROTEIN-1 (*MSBP1*) induzido por AtRALF1 em Wt, *bak1-1* e *fer4*.....84

Figura 29. Modelo proposto para a ação do AtRALF1.....91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abreviação ou símbolo	Significado
BR	Brassinosteróide
BL	Brassinolide
E	Einstein
°C	Graus Celsius
L	Litro
d	Dia
h	Hora
min	Minuto
s	Segundo
Ω	Ohm
F	Farad
kV	Kilovolt
g	Grama
Xg	Aceleração da gravidade
rpm	Rotação por minuto
U	Unidade
ABS	Absorbância
kDa	Kilodalton
Psi	libra força por polegada quadrada
OD	Densidade óptica
V	Volts
M	Mol
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
µM	Micro molar

1. INTRODUÇÃO

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

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

Posterior a descoberta de RALF em tabaco, o peptídeo foi encontrado em outras espécies vegetais e é tido como ubíquo no reino vegetal (Moura; Silva-Filho, 2006). Na espécie modelo *Arabidopsis thaliana*, foram encontradas 37 isoformas de AtRALFs (Morato do Canto et al., 2104; Lamesch et al., 2012), dentre as 37, há um subgrupo de 9 isoformas que possui maior identidade de estrutura primária com o RALF previamente isolado de tabaco. A isoforma pólen-específica AtRALF4, não foi capaz de induzir a alcalinização ou inibir o crescimento da raiz primária (Morato do Canto et al., 2014). A isoforma de RALF mais estudada é a AtRALF1, que além de inibir o crescimento de raízes e expansão de hipocótilos, promove um rápido aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular (Haruta et al., 2008; Morato do Canto et al., 2014).

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

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

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

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

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

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sinalização de Brassinosteróide (BR)

Durante o desenvolvimento, crescimento e defesa das plantas os hormônios apresentam múltiplas funções fundamentais. Dentre essas funções a auxina (AUX), o primeiro hormônio a ser descoberto, afeta tanto a expansão como a divisão celular, sendo assim considerado um regulador essencial no controle do crescimento e do desenvolvimento das plantas (Dharmasiri et al., 2005). As citocininas (CKs) influenciam no crescimento e desenvolvimento das plantas, como divisão celular, desenvolvimento de cloroplastos, senescência foliar, crescimento e ramificações radiculares e de parte aérea (Yamaguchi, 2008; Schaller et al., 2011) estando presentes em todos os tecidos e órgãos das plantas (Keshishian e Rashotte, 2015). As giberelinas (GAs) regulam a germinação, crescimento de raiz, controlam o florescimento e determinação do sexo em plantas (Murase et al., 2008; Yamaguchi, 2008).

O ácido abscísico (ABA) é um hormônio inibidor do crescimento, que apresenta um importante papel na resistência aos estresses ambientais, como deficiência hídrica, temperatura e salinidade. O ABA também está envolvido nos processos de maturação do embrião, dormência e germinação de sementes, divisão e alongamento celular e indução floral (Eckardt, 2002; Fujii et al., 2009). As estrigolactonas (SL) inibem ramificações da raiz, modulando a germinação e fotomorfogênese de plântulas (Zhou et al., 2013).

Outros hormônios são conhecidos por atuarem no sistema de defesa das plantas como o ácido jasmônico (JAs) que controlam a defesa da planta contra ferimentos, herbivorias, patógenos e também são cruciais para a fertilidade e reprodução das plantas (Wasternack, 2007; Sheard et al., 2010). O ácido salicílico (AS) regula a imunidade das plantas e induz a resistência sistêmica adquirida quando as plantas estão sendo atacadas por patógenos (Loake e Grant, 2007; Fu et al., 2012). O etileno (ETH) é um hormônio vegetal gasoso que regula tanto os processos de desenvolvimento quanto de defesa na planta, como germinação, amadurecimento de frutos, senescência, abscisão e respostas aos estresses bióticos e abióticos (Abeles et al., 2004, Qiao et al., 2012).

Os hormônios brassinosteroides (BRs) são conhecidos em plantas desde o isolamento da brassina (renomeada posteriormente brassinolide, BL) de extratos de pólen de *Brassica*

napus (Mitchell et al., 1970; Grove at al., 1979). Os BRs estão envolvidos no alongamento e divisão celular, diferenciação vascular, desenvolvimento reprodutivo, vegetativo, no crescimento radicular, fotomorfogênese, germinação, florescimento, fertilidade masculina, senescência, alongamento celular direcionado e formação de aurícula em milho. (Clouse et al., 1996; Clouse e Sasse, 1998; Müssig et al., 2003, Wang et al., 2012, Kir et al., 2015).

A expansão celular mediada por BR envolve proteínas de modificação de parede, como xyloglucan endotransglucosylase (XETs) e influenciam na orientação e na estabilidade dos microtúbulos corticais (Mayumi e Shibaoka, 1995; Clouse e Sasse, 1998; Wang et al., 2012). Desde sua descoberta, esteróides com estrutura e função similares a BL têm sido identificados em várias espécies vegetais e são chamados BRs (Clouse; Sasse, 1998).

A atividade do BL é mediada por BRI1, um receptor com domínio quinase com repetições ricas em leucina (LRR) (Clouse et al., 1996; Li e Chory, 1997; He et al., 2000), BRI1 possui dois homólogos BRI1-LIKE 1 (BRL1) e BRI1 LIKE 3 (BRL3) (Wang et al.,2001; Cano-Delgado et al., 2004; Kinoshita et al., 2005). Várias são as evidências que demonstram que BRI1 é o receptor dos brassinosteróides. Mutantes com perda de função (*bri*1) apresentam similaridade morfológica aos mutantes de biossíntese de BR e são insensíveis a aplicação exógena de BL (Clouse et al., 1996; Kauschmann et al., 1996; Li e Chory, 1997; Noguchi et al., 1999; Friedrichsen et al., 2000). Uma segunda evidência foi a demonstração de que uma proteína quimérica, contendo o domínio extracelular de BRI1 fusionado ao domínio quinase citoplásmico da Xa21 (uma proteína receptora de membrana envolvida com resistência a doenças em arroz), foi capaz de ativar respostas relacionadas com defesa, quando as plantas foram expostas a BL, sugerindo que o domínio extracelular de BRI1 ao interagir com BR ativou o domínio quinase de Xa21 (He et al., 2000). Experimentos de imunoprecipitação da proteína quimérica BRI1-GFP com BL também comprovaram a relação direta ligante-receptor entre ambas moléculas (Wang et al., 2001).

Em *Arabidopsis,* a proteína BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE1 (BAK1) também conhecida como SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE3 (SERK3), interage com o receptor BRI1 e modula a sinalização de BR (Li et al., 2002). Os receptores quinase como o BAK1 estão localizados na membrana e, geralmente, funcionam na percepção de ligantes

extracelulares, ativando estes receptores e desencadeando uma cascata de sinalização (Song et al., 2017).

Quando a proteína BAK1 é superexpressa, as plantas apresentam órgãos alongados, enquanto plantas com um alelo nulo de *BAK1* possuem um fenótipo semi-anão e a sensibilidade a BRs reduzida (Li et al., 2002). A expressão de um alelo mutante dominante negativo de *BAK1* levou a um fenótipo de nanismo severo, semelhante ao fenótipo de alelos nulos do receptor BRI1 (Li et al., 2002). BAK1 é uma proteína serina/treonina quinase, que interage com BRI1 *in vivo* e *in vitro* sugerindo que BAK1 é um componente da via de sinalização de BRs (Li et al., 2002). De fato, o BR ao se ligar ao receptor BRI1, desencadeia a autofosforilação do domínio quinase, associando-se ao coreceptor quinase BAK1, resultando na ativação de genes responsivos ao BR (Clouse, 2004;. Vert et al., 2005; Chinchilla et al., 2009; Li e Jin, 2007). O receptor BRI1 interage também com a proteína BRI1 KINASE INHIBITOR1 (BKI1), um regulador negativo da via de sinalização de BRs (Wang e Chory, 2006), sendo BKI1 o substrato quinase de BRI1 que limita a interação do receptor BRI1 com o coreceptor BAK1.

Quando BR está em níveis baixos ou ausentes, o domínio quinase de BRI1 interage com BKI1 (Wang et al., 2005; Wang & Chory, 2006), BRASSINOSTEROID-SIGNALING KINASE (BSK), e CONSTITUTIVE DIFFERENTIAL GROWTH1 (CDG1), não permitindo a ligação do coreceptor BAK1 ao receptor de brassinosteróide (Figura 1). Os fatores de transcrição BRASSINAZOLE RESISTANT1 (BZR1) e BZR2 são fosforilados por BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE2 (BIN2) e, posteriormente, retidos pelas proteínas 14-3-3 [GENERAL REGULATORY FACTOR (GRF)] levando a degradação citoplasmática (Gampala et al., 2007; Nam e Li, 2002; Peng et al., 2008).

Quando BR está em níveis altos ou, simplesmente, presente, BRs ligam-se a BRI1, provocando a dissociação de BKI1 e a associação com o coreceptor BAK1, com subsequente ativação de BRI1. Quando BRI1 está ativado, BRI1 fosforila BSK (TANG et al., 2008) e CDG1, que, consequentemente, fosforila BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 SUPPRESSOR1 (BSU1) (MORA-GARCIA et al., 2004), BSU1 desfosforila e inativa BIN2, que codifica uma GSK3 quinase que sofre degradação proteossomal. A fosfatase PP2A desfosforila BZRs, o que

resulta na liberação de BZRs das proteínas da GRF. BZR1 e BZR2/BES1, em seguida, ligam-se e regulam os genes responsivos a BR no núcleo (VERT; CHORY, 2006; PENG et al., 2008).

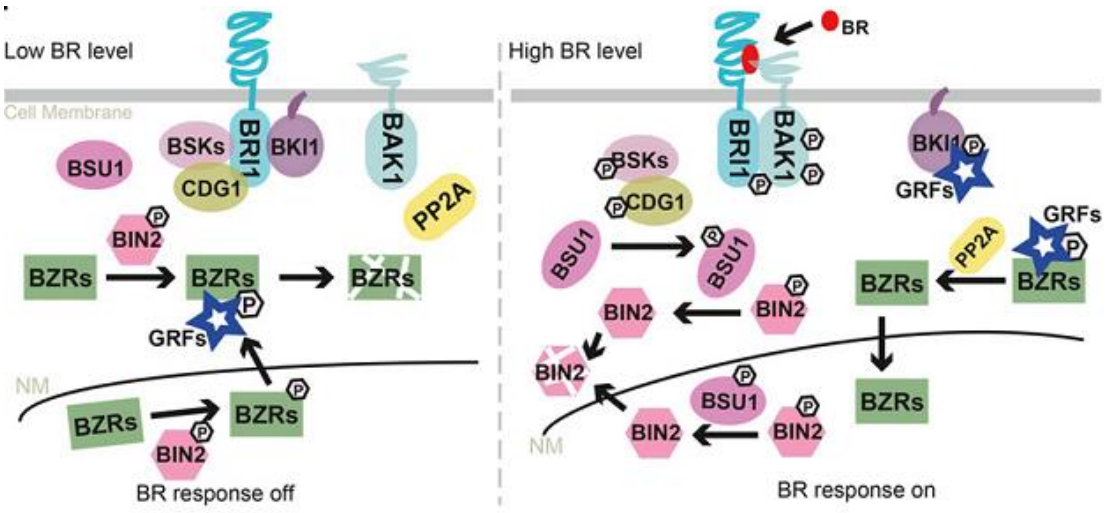


Figura 1. Sinalização do hormônio Brassinosteróide (BR) (Wang et al., 2015). BR em níveis baixos, o domínio quinase de BRI1 interage com BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 KINASE INHIBITOR (BKI1), BRASSINOSTEROID-SIGNALING KINASE (BSK), e CONSTITUTIVE DIFFERENTIAL GROWTH1 (CDG1), não permitindo a ligação do coreceptor BAK1 ao receptor de brassinosteróides. Os fatores de transcrição BRASSINAZOLERESISTANT1 (BZR1) e BZR2 são fosforilados por BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE2 (BIN2) e posteriormente retido pelas proteínas 14-3-3 (GENERAL REGULATORY FACTOR [GRF]). Quando os níveis de BR são altos, BRs ligam-se a BRI1, provocando a dissociação de BKI1 e a associação com o coreceptor BAK1 e em seguida ativando BRI1. Quando BRI1 está ativado, ele fosforila BSKs e CDG1, que consequentemente fosforila BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 SUPPRESSOR1 (BSU1). BSU1 desfosforila e inactiva BIN2. PP2A desfosforila BZRs, o que resulta na liberação de BZRs das proteínas da FRS. BZRs em seguida, se liga e regula os genes responsivos a BR.

A proteína *Botrytis*-INDUCED KINASE1 (BIK1), também se associa com o receptor BRI1 e regula negativamente a via de BR, ela foi caracterizada por mediar a resistência de plantas a fungos patógenos necrotróficos (VERONESE et al., 2006). Após a interação de BIK1 com o receptor BRI1 somente ocorrerá a dissociação quando BL se ligar ao receptor, resultando na fosforilação de BIK1 pelo BRI1 (LIN et al., 2013).

A proteína BAK1 possui um homólogo, a proteína SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE4 (BAK7/ SERK4), podendo atuar de maneira redundante a BAK1 (Jeong et al., 2010). A proteína SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1 (SERK1) também está envolvida com a via de BRs interagindo com a proteína BRI1, onde o hormônio BL age como uma ''cola molecular'' interagindo com ambas proteínas (KARLOVA et al., 2006; SANTIAGO; HENZLER; HOTHORN, 2013).

Outra proteína que interage com o receptor BRI1 é a TRANSTHYRETIN-LIKE (TTL), que, ao interagir com o receptor, é fosforilada pelo mesmo. Plantas superexpressoras de *TTL* apresentam fenótipos similares aos mutantes *bri1* onde os mutantes são semi-anãs, e em plantas mutantes por inserção de T-DNA o gene *TTL* promove o crescimento das plantas e a sensibilidade ao BR, demonstrando inibição destes genes na via de BR, no entanto, diferentemente de BSK1, TTL interage fortemente com o domínio quinase ativo de BRI1, sugerindo que TTL pode inibir a sinalização do BRI1 após sua ativação (NAM; LI, 2004; WANG; CHORY, 2006).

2.2 Peptídeo hormonal RALF

Em 1991, foi descoberto o primeiro peptídeo hormonal, a sistemina, que surge como uma nova classe de hormônios vegetais (Pearce et al., 1991; Ryan et al., 2002). Eles são pequenas proteínas que atuam na comunicação intracelular e nos processos de crescimento, desenvolvimento, defesa e reprodução vegetais (Whitford et al., 2012). Desde a descoberta da sistemina, vem sendo descoberto uma variedade de peptídeos que se diferenciam em tamanho, estrutura, modificações pós-traducionais e funções.

Em 2001, foi isolado de folhas de tabaco, um polipeptídeo de 5kDa que induz uma rápida alcalinização em células cultivadas em suspensão, sendo, por esta razão, denominado *R*apid *AL*kalinization *F*actor, ou simplesmente RALF. Esta resposta de alcalinização rápida em meio de cultivo celular também foi constatada em peptídeos RALF purificados de folhas de tomateiro e alfafa (Pearce et al., 2001). Além disso, o peptídeo também ativa uma proteína-quinase ativada por mitógeno - MAP quinase (Pearce et al., 2001). RALF possui 49 aminoácidos, derivados da porção C-terminal de um prepropeptídeo de 115 aminoácidos que apresenta um peptídeo sinal composto de 23 aminoácidos na porção N-terminal e uma porção intermediária de 43 aminoácidos, com função ainda desconhecida (Pearce et al., 2001). O processamento do precursor é realizado por convertases, que reconhecem um sítio dibásico composto por duas argininas, clivando e liberando o peptídeo maduro (Matos et al., 2008; Srivastava et al., 2009). Desde sua descoberta, um papel básico na biologia celular, tal como a regulação do crescimento ou do desenvolvimento, tem sido sugerido para os peptídeos RALF nas plantas (Pearce et al., 2001).

A estrutura primária do peptídeo maduro é altamente conservada entre os homólogos do RALF identificado em tabaco (NtRALF), sendo uma das características marcantes o motivo YISY (Pearce et al., 2001; Pearce et al., 2010) (Figura 2). A substituição da isoleucina do motivo YISY por uma alanina leva a uma redução na atividade do peptídeo (Pearce et al., 2010). Na estrutura do peptídeo maduro existem quatro cisteínas que formam duas pontes dissulfeto e a redução e alquilação dessas cisteínas tornam o peptídeo inativo (Matos et al., 2008; Pearce et al., 2001).

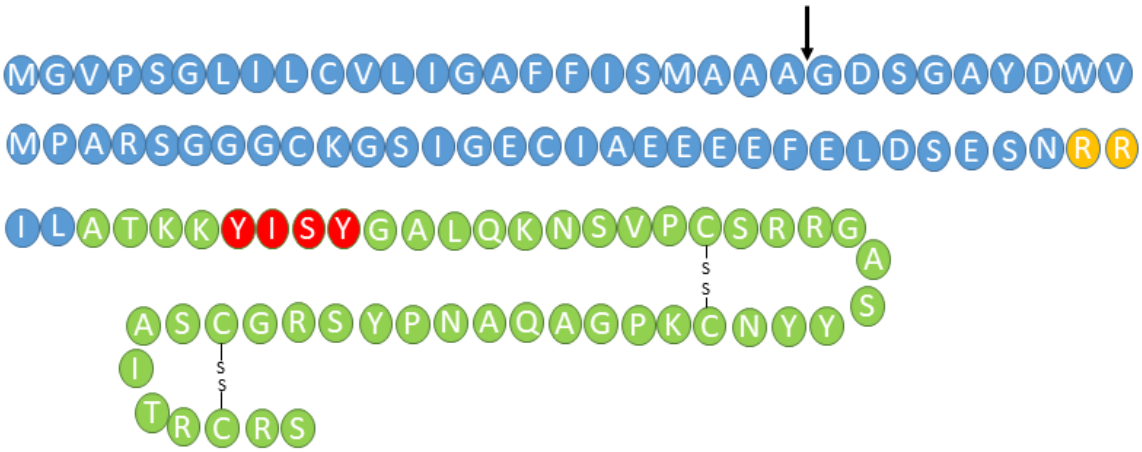


Figura 2. Estrutura primária do prepropeptídeo NtRALF. Seta: local de clivagem do peptídeo sinal; dupla arginina (amarelo): sítio de clivagem para liberação do peptídeo maduro; peptídeo maduro (aminoácidos em verde) onde duas características são essenciais para sua atividade: o motivo YISY (aminoácidos em vermelho) e quatro cisteínas que formam duas pontes de sulfeto (-SS-). O código de uma letra dos aminoácidos foi utilizado.

Posterior a descoberta do NtRALF, o peptídeo foi encontrado em outras espécies vegetais e hoje é tido como ubíquo no reino vegetal (Pearce et al., 2001; Moura; Silva-Filho, 2006). Na espécie modelo *Arabidopsis thaliana*, foram encontrados 37 genes semelhantes ao NtRALF (AtRALFs) (Morato do Canto et al., 2014; Lamesch et al., 2012). No entanto, famílias multigênicas com mais de 30 isoformas parecem mais exceção do que regra para os RALFs. Em *Populus tremula*, *Oryza Sativa* e *Zea mays*, as famílias apresentam 23, 16 e 19 isoformas respectivamente (Cao e Shi., 2012). No híbrido de álamo *Populus trichocarpa x Populus deltoides* e em *Solanum chacoense* foram encontradas somente cinco isoformas de RALF (Haruta e Constabel, 2003; Germain et al., 2005). Já em *Saccharum* spp (cana-de-açúcar), quatro isoformas foram bioquimicamente isoladas também através do ensaio de

alcalinização (Mingossi et al., 2010). Surpreendentemente, em *Nicotiana attenuata,* somente uma isoforma foi encontrada (Wu et al., 2007). No entanto, foi encontrado também uma isoforma de RALF em fungo (*Fusarium oxysporum)*, onde a isoforma é causadora da alcalinização do meio extracelular promovendo a infecção causada pelo fungo em plantas (Masachis et al., 2016).

Das 37 isoformas encontradas em *Arabidopsis*, um subgrupo de 9 isoformas (AtRALF1, 4, 19, 22, 23, 24, 31, 33 e 34) possui maior identidade de estrutura primária com o RALF previamente isolado de tabaco (Morato do Canto et al., 2014). Oito destas 9 isoformas de AtRALF induziram a alcalinização e inibiram o crescimento de raízes em pequenas concentrações, sendo exceção uma isoforma pólen-específica, a AtRALF4, que, mesmo em concentrações micromolares, não foi capaz de induzir a alcalinização ou inibir o crescimento da raiz primária (Morato do Canto et al., 2014).

Plantas de arabidopsis que superexpressam a isoforma AtRALF1 são semi-anãs e uma mutação no sítio dibásico do peptídeo (dupla arginina) é suficiente para impedir o processamento correto da proteína precursora, fazendo com que as plantas que superexpressam o gene AtRALF1 mutado não exibam o fenótipo semi-anão (Matos et al., 2008). Plantas que superexpressam AtRALF23 também são semi-anãs e apresentam redução no crescimento radicular e foliar (Srivastava et al.,2009).

Dentre as isoformas de RALF, a mais estudada é a AtRALF1, que além de inibir o crescimento de raízes e expansão de hipocótilos, ainda promove um rápido aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular (Haruta et al., 2008; Morato do Canto et al., 2014). Genes responsivos a AtRALF1, dentre eles, quatro relacionados com o rearranjo de parede celular, dois que codificam proteínas ricas em prolina (*AtPRP1* e *AtPRP3*) um que codifica uma glicoproteína rica em hidroxiprolina (*AtHRGP2*) e um que codifica a proteína xiloglucana endotransglucosilase *TCH4*, foram relatados pela primeira vez em um estudo que mostrou antagonismo entre os efeitos do peptídeo AtRALF1 e os dos brassinosteróides (Bergonci et al., 2014a).

Além das funções como regulação do crescimento ou do desenvolvimento, outros estudos mostraram que os pepídeos RALF também estão relacionados com o controle da germinação de grãos de polén, sugerindo que esta classe de peptídeo hormonal pode estar

relacionada com a regulação do alongamento do tubo polínico (Zhang et al., 2010; Covey et al., 2010; Morato do Canto et al., 2014). Novos estudos mostraram que os peptídeos RALF também regulam a fecundação em arabidopsis, controlando a integridade do tubo polínico e a liberação dos núcleos espermáticos do gameta masculino (Ge et al., 2017). Durante o crescimento/expansão do tubo polínico em direção ao óvulo, os peptídeos AtRALF4 e AtRALF19, são produzidos pelo tubo polínico e, de modo autócrino, ligam-se aos seus receptores BUPS1/2 e ANX1/2, mantendo a integridade do tubo polínico. Quando o tubo polínico atinge o óvulo, local de produção do peptídeo AtRALF34, este liga-se aos receptores BUPS1/2 e ANX1/2 agora de modo parácrino, competindo com o AtRALF4 e 19, provocando o rompimento do tubo polínico, liberando os núcleos espermáticos e proporcionando a fertilização (Ge et al., 2017). Em outro estudo foi mostrado que os AtRALF4 e 19 interagem com uma proteína LEUCINE RICH REPEAT EXTENSIN (LRX) para provocar o rompimento do tubo polínico (Mecchia et al., 2017).

Os peptídeos RALFs também estão envolvidos na tolerância ao estresse salino, onde a associação das LEUCINE-RICH REPEAT EXTENSINS (LRXs) com os peptídeos AtRALF22/23, que, por sua vez, interagem com FERONIA transduzem a parede celular sinais para regular o crescimento das plantas e tolerância ao estresse (Zhao et al., 2018). Em outro estudo os autores mostraram que FERONIA induz Ca^{2+} que mantêm a integridade da parede celular durante o estresse salino (Feng et al., 2018).

2.3 Relação do peptídeo hormonal AtRALF1 com outros hormônios

Devido às características hormonais do peptídeo AtRALF1 e ao fato dos hormônios, via de regra, agirem em conjunto, é provável que haja uma interação deste com os demais hormônios que também controlam o desenvolvimento vegetal. Em um estudo realizado com híbrido de álamo (*Populus trichocarpa x Populus deltoides*), não foi constatado aumento na expressão dos genes de RALF (*PtdRALF1* e *PtdRALF2*) após o tratamento com os hormônios auxina (ácido naftaleno acético - ANA) e citocinina (benzilaminopurina - BAP) em células em suspensão. No entanto, quando as mesmas foram tratadas com metil jasmonato, houve redução na expressão dos genes RALFs (Haruta e Constabel, 2003). Porém, em ovários de

Solanum chacoense tratados com ANA, a expressão gênica de *ScRALF3* foi induzida (Chevalier et al., 2013).

O nível de expressão do gene que codifica a isoforma *AtRALF8* foi maior em mutantes *ein3-1* (*ethylene-insensitive*), insensíveis a etileno. O peptídeo AtRALF1 induz o gene *ETHYLENE RESPONSE FACTOR* (*ERF*), que codifica para um fator de transcrição envolvido com a via de transdução de sinal do etileno e o gene *AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLIC AND SYNTHASE (ACS*), que codifica uma enzima envolvida com a biossíntese do etileno (Haruta et al., 2014). Em outro estudo, foi demonstrado que RALF e ABA atuam em conjunto ativando o receptor FERONIA e inibindo o crescimento radicular desempenhando um papel crítico na resistência aos estresses abióticos (Chen et al., 2016).

Plantas de arabidopsis tratadas por 30 min com AtRALF1 apresentaram mudanças no perfil transcricional de alguns genes envolvidos com a expansão celular e genes que também são induzidos por auxina e giberelina, tais como o SMALL AUXIN UP RNA (*SAUR63*) e GIBBERELIN 3-OXIDASE (*GA3OX*) (Haruta et al., 2014).

Em plantas de arabidopsis tratadas com BL, o gene *AtRALF23* tem sua expressão reduzida (Nemhauser; Mockler; Chory, 2004), no entanto isso não acontece com o gene *AtRALF1* (Srivastava et al., 2009). Em plantas superexpressando *AtRALF23* tratadas com BL não apresentaram o comportamento típico de elongação de hipocótilo, apresentando uma insensibilidade ao hormônio (Srivastava et al., 2009).

2.4 Antagonismo nas vias de sinalização de AtRALF1 e Brassinosteróides

Plantas que superexpressam *AtRALF1* são menos sensíveis à BL, não apresentando aumento significativo no comprimento da raiz uma vez expostas ao BL (Bergonci et al., 2014a). AtRALF1 também induz os genes reprimidos por BL, *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHISM AND DWARFISM* (*CPD*) e *DWARF4* (*DWF4*), e reprime o gene induzido por BR, *EXPANSINA A5* (Bergonci et al., 2014b). O tratamento simultâneo com AtRALF1 e BL causou uma redução na expressão dos genes responsivos a AtRALF1, o que sugere que ambas as vias podem estar competindo por componentes em comum (Bergonci et al., 2014a). Conforme já mencionado, esses resultados sugerem que AtRALF1 interfere na via de sinalização de BR agindo de forma antagônica a BL (Bergonci et al., 2014a).

Para entender qual componente da via de BR o peptídeo RALF1 estaria competindo e interferindo na via de sinalização de BL, foram testadas diferentes proteínas da via (Dressano et al., 2017). Ao testar mutantes de arabidopsis com perda de função da proteína BAK1, os mutantes mostraram insensibilidade a aplicação exógena de AtRALF1, não sendo sensíveis a inibição do crescimento de raízes, mostrando assim que BAK1 está envolvida na percepção do peptídeo e é essencial para a inibição do crescimento da raiz primária causada pelo AtRALF1. Foi demonstrado também que ambas proteínas, BAK1 e AtRALF1, interagem fisicamente, sendo que BAK1 foi necessária para a indução dos genes responsivos ao AtRALF1 (Dressano et al., 2017).

2.4.1 MSBP1 regula negativamente a via de Brassinosteróide

A MEMBRANE STEROID BINDING PROTEIN-1 (MSBP1) é uma proteína de 220 aminoácidos que atua como reguladora negativa do alongamento célular em *Arabidopsis thaliana*, de forma semelhante ao descrito para o peptídeo AtRALF1 (Yang et al., 2005, Bergonci et al., 2014a). Enquanto as plantas transgênicas superexpressando *MSBP1* apresentam fenótipo de hipocótilo curto e aumento da capacidade de ligação de esteróides em frações de membrana, as plantas silenciadas para o *MSBP1* mostram fenótipos de hipocótilo longo e redução na capacidade de MSBP1 ligar-se ao esteróide, indicando que *MSBP1* regula negativamente o crescimento do hipocótilo (Yang et al., 2005). Essa regulação negativa do crescimento do hipocótilo em plantas que superexpressam *MSBP1* foi correlacionado com o comprimento das células e também com a diminuição da expressão de genes envolvidos no alongamento celular, tais como expansinas e extensinas (Yang et al., 2005).

Em outro estudo com MSBP1, foi demonstrada a interação específica com o domínio extracelular de BAK1, regulando negativamente a sinalização de BRs, aumentando a endocitose de BAK1 (Song et al., 2009). Em mutantes com superexpressão de MSBP1, as respostas de expansão e alongamento celular causadas por BL exógeno são suprimidas, no entanto, podem ser resgatadas com a superexpressão de *BAK1*, sugerindo que MSBP1 suprime a sinalização de BR através da interação com BAK1. A colocalização subcelular revelou que tanto MSBP1 como BAK1 estão localizadas na membrana plasmática e vesículas

endocíticas, onde MSBP1 acelera a endocitose de BAK1, suprimindo assim a sinalização de BR (Song et al., 2009).

2.4.2 Sinalização do peptídeo hormonal AtRALF1

O peptídeo AtRALF1 liga-se ao receptor FERONIA desencadeando uma cascata de fosforilação, inibindo a atividade da H^+-ATPase AHA2, aumentando o pH do apoplasto, reduzindo a expansão celular e o crescimento da raiz primária. O mutante *fer4* com perda de função para FERONIA é insensível ao efeito inibitório do crescimento de raízes causado pelo AtRALF1, mas somente quando este está em baixas concentrações, até 1 µM. Mutantes *fer4* expostos a concentrações acima de 2 µM já apresentam sensibilidade a AtRALF1 (Haruta et al., 2014).

De acordo com o modelo proposto por Dressano et al., 2017 (Figura 3), na ausência de AtRALF1 (Figura 3A), o complexo BRI1-BL-BAK1 está ativo na membrana plasmática e ocorre a cascata de sinalização do hormônio brassinosteróide e a célula se expande. Na presença do peptídeo AtRALF1 (Figura 3B), o mesmo se liga ao complexo FER-LLG1 / LRE, recruta a quinase citoplasmática RIPK e inativa a bomba de prótons AHA2, aumentando o pH apoplástico. A alcalinização apoplástica dissocia o complexo BRI1-BL-BAK1, permitindo a interação entre AtRALF1 e BAK1, interrompendo a sinalização BL, ativando os genes induzidos por AtRALF1, inibindo a expansão celular.

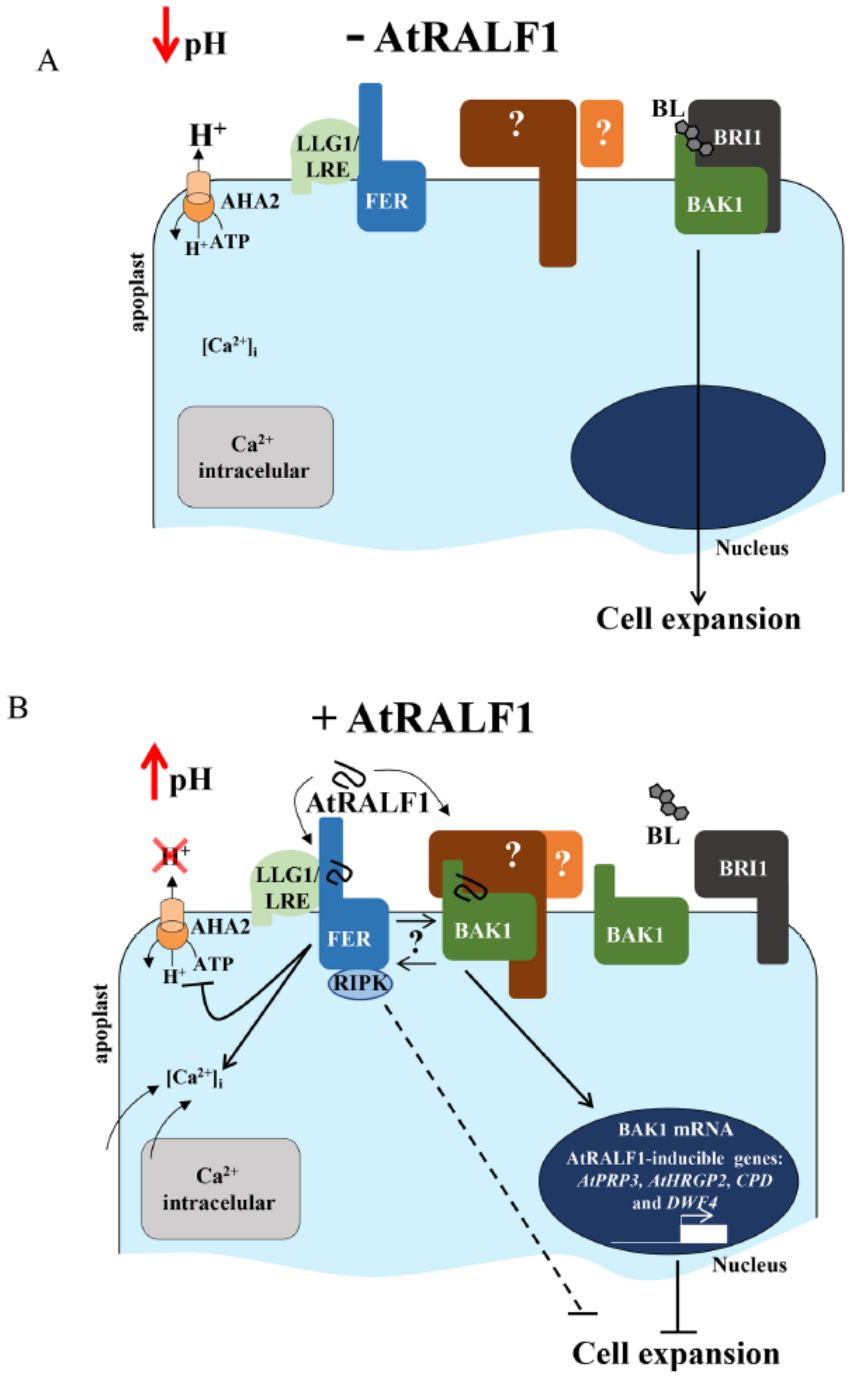


Figura 3. Sinalização do peptídeo hormonal AtRALF1 (Dressano et al., 2017). A: Na ausência do peptídeo AtRALF1, o complexo BRI1-BL-BAK1 está ativo na membrana plasmática levando à expansão celular. O apoplasto é ácido como o bomba de prótons de membrana plasmática AHA2 é funcional e FERONIA (FER) está na membrana celular complexada com GPI-AP1 tipo LRE (LLG1) / LORELEI (LRE). B: Na presença do peptídeo AtRALF1, o mesmo se liga no complexo FER-LLG1 / LRE, recruta o receptor quinase citoplasmático RIPK e inativa o AHA2, aumentando o pH apoplástico. Essa alcalinização apoplástica dissocia o complexo BRI1-BL-BAK1, permitindo a ligação de AtRALF1 a BAK1, interrompendo a sinalização BL, ativa genes induzíveis por AtRALF1 e, em última análise, inibe a expansão celular. Ponto de interrogação (?): possível interação entre FER e BAK1.

O peptídeo AtRALF1 marcado com o radioisótopo ^{125}I e incubado com a membrana plasmática isolada do mutante *fer4*, apresentou uma redução da marcação das membranas em torno de 40% quando comparado com membranas de plantas selvagens (Haruta et al., 2014). A insensibilidade do mutante *fer4* condicionada a baixas concentrações do peptídeo e o fato da marcação com ^{125}I-AtRALF1 apresentar somente 40% de redução, sugerem a existência de mais de uma proteína receptora do peptídeo AtRALF1. AtRALF1 marcado com acridíneo quimioluminescente demonstrou que o receptor BAK1 é responsável por aproximadamente 30% da ligação de AtRALF1 nas raízes intactas e 15% da ligação de AtRALF1 nas frações microssomais (Dressano et al., 2017). A diferença na redução da ligação específica encontrada entre os experimentos realizados com mudas intactas e com frações microssomais sugerem a existência de um componente apoplástico que pode auxiliar na ligação de AtRALF1 (Dressano et al., 2017).

Recentemente, foi identificada uma proteína semelhante a calmodulina (*CALMODULIN-LIKE PROTEIN 38*, CML38), uma proteína apoplástica, que interage com o peptídeo AtRALF1, sendo essencial para o efeito de inibição de crescimento de raiz, mas sem papel na alcalinização (Campos et al., 2018). Além disso, de maneira controversa, foi demonstrado em outro trabalho, que a proteína FERONIA é necessária para o alongamento celular durante o desenvolvimento de *Arabidopsis thaliana* (Guo et al., 2009). Assim, justificam-se estudos mais aprofundados que visem a descoberta de outro(s) receptor(es) do peptídeo AtRALF1 para esclarecer estas contradições.

Como MSBP1 age como uma reguladora negativa do alongamento celular e AtRALF1 possui a mesma função, o objetivo do trabalho foi investigar, por meio de ferramentas genéticas e bioquímicas, a existência da interação entre as proteínas AtRALF1 e MSBP1, o papel da proteína MSBP1 nas respostas ao peptídeo AtRALF1 e integrar a proteína MSBP1 na via de sinalização do AtRALF1.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Clonagem e ensaio de duplo híbrido em leveduras *Sacharomyces cerevisae*

Os fragmentos de DNA codificadores do peptídeo ativo AtRALF1 (At1g02900), peptídeo modificado AtRALF1 (9-49) (At1g02900), peptídeo ativo AtRALF34 (At5g67070), dos domínios extracelulares das proteínas BAK1(At4g33430) e BAK7(At2g13790) e as proteínas CML38 (At1g76650), CML39 (At1g76640) e MSBP1(At5g52240) foram obtidos através de reações padrão de PCR utilizando iniciadores específicos contendo os sítios de restrição *Nde*I e *Bam*HI com exceção da proteína MSBP1 onde foram utilizados os sítios *Eco*R1 e *Bam*HI (ANEXO B). Após a amplificação, os fragmentos foram digeridos com as enzimas apropriadas, purificados e clonados nos vetores pGADT7 e/ou pGBKT7 (Clontech Laboratories) com a enzima T4 DNA ligase. As construções foram confirmadas por PCR e sequenciamento.

As transformações e crescimento da levedura *S. cerevisae* foram realizados conforme descrito por Gietz e Woods (2002). Foi isolada uma colônia de levedura da cepa AH109, crescida em placa contendo meio YPDA (10 g/L extrato de levedura, 20 g/L peptona, 20 g/L glicose, 1 mg adenina e 20 g/L ágar, pH 6,5) e inoculada no mesmo meio líquido por 24 h, 180 rpm a 30°C. No dia seguinte, 1 mL da cultura foi centrifugado por 30 s a 8000 rpm. O precipitado foi lavado 2 vezes com 500 µL de água ultra-pura (milli-Q) autoclavada. Após a lavagem, foi descartado o sobrenadante e adicionados: 50% PEG 3500, 1 M LiAc, 2 mg/mL espermidina e 500 mg de DNA plasmidial de interesse. Após 60 min de incubação em banho-maria a 42°C, a reação foi centrifugada por 1 min a 8000 rpm e o sobrenadante foi descartado. O precipitado de células de levedura foi ressuspendido em 50 µL de água ultra-pura e plaqueado em meio TRAFO (6,5 mg/L nitrogênio base, 20 g/L glicose, 2 g/L Dropout, 20 g/L ágar, pH 5,6) sem leucina e triptofano para seleção das células de levedura transformadas. A placa foi incubada a 30°C por 4 d. As células de levedura transformadas com os vetores de interesse foram selecionadas em meio TRAFO sem leucina, triptofano e histidina (-L –W -H) e em meio sem leucina, triptofano, histidina e adenina (-L -W -H -A).

3.2 Pellet X-Gal (PXG)

Para cada par de interação, três colônias foram coletadas de placas de meio TRAFO (6,5 mg/L nitrogênio base, 20 g/L glicose, 2 g/L Dropout, 20 g/L ágar, pH 5,6) sem leucina e triptofano, e inoculadas em tubos contendo 5 mL de meio YPDA (10 g/L extrato de levedura, 20 g/L peptona, 20 g/L glicose, 1 mg adenina e 20 g/L ágar, pH 6,5) overnight a 30°C. Todas as interações foram padronizadas a partir de uma absorbância de A_{546} com uma OD de 1.8. De cada amostra foi centrifugado 1 mL de levedura por 5 min a 2000 x g. O sobrenadante foi descartado, e a lise celular foi realizada por dois ciclos de congelamento-descongelamento (3 min em nitrogênio líquido, 3 min em banho-maria a 37°C). Os precipitados foram ressuspendidos em 20 µL de água ultra pura e transferidos para uma microplaca de 96 poços. Foi adicionado em cada poço 100 µL de tampão salino fosfato (PBS, pH 7,4), contendo 500 µg/Ml de X-gal, 0.5% (w/v) agarose, e 0.05% (v/v) β-mercaptoetanol, posteriormente foram incubadas em temperatura ambiente. A atividade enzimática da X-Gal foi monitorada a cada 30 min e o registro foi efetivado após 3 h com pingos das mesmas em parafilme (Möckli e Auerbach, 2004).

3.3 Material vegetal e condições de crescimento

Sementes de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) ou mutantes para perda e/ou ganho de função de MSBP1 (*msbp1*, SALK_035827), BAK1 (*bak1-1*, CS6125) e FERONIA (*fer4*) foram esterilizadas superficialmente com hipoclorito (50% por 10 min), incubadas a 4°C por 4 d e germinadas em solo (2:1 substrato:vermiculita) ou meio MS (0,5X) pH 5,8 (Murashige e Skoog, 1962) contendo 6 g/L de ágar, sem adição de sacarose. O cultivo das plantas foi realizado em câmaras de crescimento sob fotoperíodo controlado [16 h de luz, 150 µE m^{-2}. s^{-1} (E, Einstein; 1 E = 1 mol de fótons) e 8 h de escuro a 23°C.

3.4 Obtenção de transgênicos da proteína MSBP1

Foram obtidos transgênicos que superexpressam gene *MSBP1* (35S:MSBP1: L6.1, L6.2, L10.1, L20.1) e silenciam o gene MSBP1 (irMSBP1: L14.4, L16.16, L16.3 e L10.18). Para tanto, foi utilizado o sistema Gateway (Life Technologies), no qual o gene *MSBP1* amplificado por iniciadores específicos (ANEXO B) foi clonado no vetor de entrada pENTR/D-TOPO e

recombinado nos vetores de destino PK7WG2 e pK7GWIWG2. Para a construção contendo a proteína MSBP1 fusionada à GFP, o vetor de destino foi o pK7FWG2. As plantas transgênicas foram geradas de acordo com o método da imersão das inflorescências em solução contendo *Agrobacterium* (Clough e Bent 1998). As análises de localização das proteínas de fusão serão avaliadas mediante visualização de fluorescência, em microscópio confocal, usando a epiderme das folhas. Todas as clonagens foram verificadas por sequenciamento.

3.5 Extração de DNA genômico de arabidopsis

O reagente Plant DNAzol foi utilizado para extração e purificação de DNA genômico de plantas de arabidopsis, seguindo instruções do fabricante. Foram coletados 50 mg de tecido vegetal e homogeneizado em 500 µL de DNAzol, seguida de centrifugação por 10 min a 4°C em 13000 x g. Posteriormente o sobrenadante foi coletado e centrifugado por 5 min a 4°C em 13000 x g e o sobrenadante transferido para novo tubo. O DNA foi precipitado com a adição de 250 µL de etanol 100%. Após 2 min em temperatura ambiente, a solução foi centrifugada por 5 min a 4°C, 13000 x g. O DNA foi lavado duas vezes com 250 µL de etanol 70% e centrifugado por 2 min a 4°C, 13000 x g cada lavagem e após a secagem o pellet foi eluído em 20 µL de água ultra-pura.

3.6 Extração de RNA total de arabidopsis e síntese de cDNA

A extração de RNA total de arabidopsis foi feita após 9 ou 11 d da germinação, utilizando o reagente TRIzol (Life Technologies). Cada repetição contou com 50-100 mg do tecido vegetal que foi macerado com o auxílio de nitrogênio líquido e homogeneizado em 1 mL de TRIzol. Após 5 min de incubação em temperatura ambiente, foi adicionado 200 µL de clorofórmio, agitando vigorosamente por 15 s. Após 5 min de incubação em temperatura ambiente, a amostra foi centrifugada a 11000 x g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e transferido para novo tubo de 1,5 mL, onde foi adicionado 500 µL de isopropanol, seguida de incubação em temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 11000 x g por 10 min a 4°C para precipitação do RNA. O sobrenadante foi descartado e o RNA suspenso com 1mL de etanol 75%. Após agitação, a amostra foi centrifugada a 10500 x g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado

seco eluído em 20 µL de água ultra-pura. Para uma melhor qualidade do RNA extraído foi utilizada uma DNAse por 30 min a 37°C e a reação do mesmo foi parada pela adição de EDTA (50 mM) a 65°C por 10 min.

A síntese de cDNA foi realizada com o kit *ImProm-IITM Reverse Transcriptase* (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, o RNA total (1 µg) mais 1 µL de OligodT (50 µM) foram incubados a 70°C por 5 min e, em seguida, cinco min no gelo. Foi adicionada uma solução contendo tampão *ImProm-II* 1X, 1,5 mM $MgCl_2$, dNTPmix (10 mM) e *ImProm-II Reverse Transcriptase* (1 U). A reação foi incubada a 25°C por 5 min, 42°C por 60 min e 70°C por 15 min. O cDNA sintetizado (1,5 µL de cada) foi utilizado em reações de PCR semiquantitativo e quantitativo.

3.7 Transformação de *Escherichia coli*

3.7.1 Preparação de células eletrocompetentes de *E. coli*

Células desarmadas de *E. coli* cepa TOP10 (Life Technologies) foram estriadas em placa contendo meio 2xYT (16 g/L triptona, 10 g/L extrato de levedura, 5 g/L NaCl e 12 g/L de ágar), e incubada por 16 h a 37°C. Colônias isoladas foram selecionadas e pré-inoculadas em 50 mL de meio 2xYT líquido sem antibióticos por 16 h a 200 rpm, 37°C. Em seguida, o pré-inóculo foi adicionado em 500 mL de meio 2xYT líquido. Este inóculo foi incubado a 37°C sob agitação de 200 rpm até atingir a OD (ABS_{600}) de 0,6. As células foram precipitadas a 1100 x g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 500 mL de água ultra-pura autoclavada e gelada. As células foram novamente precipitadas a 1100 x g por 10 min a 4°C e lavadas mais 4 vezes com 250 mL de água ultra-pura autoclavada e gelada. Após a centrifugação a 1600 x g por 10 min a 4°C, a última lavagem das células foi realizada com 10 mL de glicerol 10% gelado. As células foram precipitadas novamente a 1600 x g por 10 min a 4°C e ressuspensas em 3-5 mL de glicerol 10% gelado. Foram feitas alíquotas de 70 µL, as quais foram congeladas em nitrogênio líquido imediatamente e armazenadas em freezer -80°C.

3.7.2 Eletroporação de *E. coli*

Para a inserção dos vetores em células de *E. coli*, o vetor de interesse foi adicionado a 70 µL de células competentes, sendo colocados em uma cubeta de eletroporação (largura da ranhura, 2 mm, BioRad) previamente resfriada. A eletroporação foi efetuada no eletroporador *Gene Pulse* II (BioRad) usando resistência 200 Ω, capacitância 25 µF e voltagem 2,5 kV. Em seguida, um mL de meio 2xYT foi adicionado à cubeta e a solução foi transferida para um tubo de 1,5 mL e incubada por 1 h a 37°C, 200 rpm. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 4000 x g por 5 min, 800 µL do sobrenadante foram descartados e as células foram ressuspensas nos 200 µL de meio restante. Por fim, os 200 µL da solução bacteriana foram plaqueadas em meio 2xYT contendo ágar (12 g/L) mais antibióticos (ANEXO A). A placa foi incubada a 37°C por 16 h.

3.8 Extração de DNA plasmidial de *E. coli*

Colônias isoladas de *E. coli* foram dispostas para crescer em meio contendo 5 mL de meio 2xYT líquido com os antibióticos apropriados (ANEXO A) por 16 h a 37°C, sob agitação de 200 rpm. Em seguida, 1,5 mL de cultura bacteriana foi centrifugado a 13000 x g por 3 min. As células foram ressuspendidas em 100 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA), adicionando-se em seguida 200 µL de tampão TENS (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 100 mM NaOH, 0,5% SDS). Após agitação por inversão, a solução foi incubada por 5 min em gelo. Posteriormente, foram adicionados 150 µL de acetato de potássio 3 M (pH 5,2), agitando a solução por inversão e incubando por 5 min no gelo. O material lisado foi centrifugado a 13000 x g por 25 min, 4°C, e o sobrenadante tratado com 3 µL de RNAse (10 U/µL) a 37°C por 20 min. O DNA foi precipitado com a adição de 1 mL de etanol 100% e a sedimentação por centrifugação a 13000 x g por 30 min, 4°C. O plasmídeo foi lavado com 1 mL de etanol 70% e centrifugado a 13000 x g por 20 min, 4°C, o DNA foi seco a 37°C por 30 min e ressuspenso em 20 µL de água ultra-pura autoclavada.

3.9 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

3.9.1 Preparação de células eletrocompetentes de *A. tumefaciens*

Células desarmadas de *A. tumefaciens* cepa GV3101 foram estriadas em placa contendo meio 2xYT mais 12 g/L de ágar suplementado com os antibióticos gentamicina (50 µg/mL) e rifampicina (50 µg/mL). A placa foi incubada por 48 h a 28°C. Posteriormente, uma colônia isolada foi pré-inoculada em 50 mL de meio 2xYT líquido com os mesmos antibióticos por 18 h a 180 rpm, 28°C. Em seguida, a cultura do pré-inóculo foi adicionada em 500 mL de meio 2xYT líquido contendo os antibióticos. Este inóculo foi incubado a 37°C sob agitação de 200 rpm até atingir a OD (ABS_{600}) de 0,6. Posteriormente a esta etapa, as células eletrocompetentes de agrobactéria foram preparadas como descrito anteriormente para as células de *E. coli*.

3.9.2 Eletroporação de *A. tumefaciens*

A eletroporação de células competentes de *A. tumefaciens* com os vetores de interesse foi realizada conforme descrito para as células competentes de *E. coli*. No entanto, após a eletroporação, a solução com meio de cultura foi incubada por 2 h a 28°C, 180 rpm. A solução foi centrifugada a 4000 x g por 5 min, e, após o descarte de 800 µL do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 200 µL de meio restante. Os 200 µL foram plaqueados em meio 2xYT contendo ágar (12 g/L) mais antibióticos gentamicina (50 µg/mL) e rifampicina (50 µg/mL). A placa foi incubada a 28°C por 2 d.

3.10 Extração de DNA plasmidial de *A. tumefaciens*

Colônias isoladas de *A. tumefaciens* foram dispostas para crescer em 5 mL de meio 2xYT líquido com os antibióticos apropriados (ANEXO A) por 48 h a 28°C, sob agitação de 200 rpm. Posteriormente a esta etapa, o DNA plasmidial de agrobactéria foi extraído como descrito para as células de *E. coli* anteriormente.

3.11 Análise de expansão celular em mutantes MSBP1: Medições das células da endoderme em raiz primária de arabidopsis

As sementes do tipo selvagem (Wt), irmsbp1 e *msbp1*, após a esterilização e quebra de dormência, foram dispostas para germinar em meio MS 0,5X sem vitaminas e sacarose, pH 5,6, sob luz constante (150 µE m-2. s-1) à 24°C por 9 d. As raízes foram coradas com 0,01% (w/v) *Calcofluor White* por 5 min no escuro e lavadas em água, posteriormente o comprimento das células da endoderme na zona de diferenciação foram medidas em confocal (Olympus FV1000). As células coradas foram observadas no filtro DAPI com o comprimento de onda de 358 a 461nm.

3.12 Produção e purificação de peptídeos AtRALFs [1, 19, 23, 34 e 1 (9-49)]

As sequências codificadoras dos peptídeos ativos das isoformas AtRALF1 (At1g02900), AtRALF1 (9-49) (At1g02900, com deleção dos 8 aminoácidos iniciais), AtRALF19 (At2g33775), AtRALF23 (At3g16570) e AtRALF34 (At5g67070) foram amplificadas por PCR convencional, usando primers específicos (ANEXO B). Os fragmentos amplificados correspondentes aos peptídeos AtRALF1 e 34 foram clonados no vetor pET-28b (Morato do Canto et al., 2014). As isoformas AtRALF1 (9-49), AtRALF19 e AtRALF23 foram clonadas em pDEST17. Para as clonagens nas quais foram utilizadas o sistema Gateway os fragmentos amplificados em PCR foram introduzidos no vetor pENTR D-TOPO e recombinados em pDEST17. Todos foram fusionados a uma histidine-tag no N-terminal. Posteriormente, os vetores foram introduzidos em *E. coli* cepas BL21 ou Rosetta.

Para a produção dos peptídeos recombinantes, colônias contendo o vetor de interesse foram crescidas em 5 mL de meio LB líquido (10 g/L triptona, 5 g/L extrato de levedura e 10 g/L NaCl), contendo o antibiótico específico (ANEXO A) por 16 h a 37°C, sob agitação de 200 rpm. Em seguida, as culturas foram transferidas para 500 mL de meio LB líquido sob as mesmas condições até atingir a densidade óptica (OD) de 0,6. Posteriormente, foi adicionado 1 mM do indutor IPTG (Isopropil β-D-1- tiogalactopiranosidio) por 4 h a 37°C, 200 rpm. Após 4 h as culturas foram centrifugadas em temperatura ambiente a 5000 rpm por 6 min e o precipitado de bactérias congelado e armazenado a -80°C. As células bacterianas descongeladas foram ressuspendidas em tampão de extração (100 mM

NaH_2PO_4, 10 mM Tris-HCl, 8 M ureia, pH 8,0) sob agitação por 60 min e lisadas sob pressão de 1500 Psi em bomba de ruptura celular por pressão de gás nitrogênio (Parr Instruments Co), seguido de centrifugação por 40 min a 4ºC, 12000 rpm. Os sobrenadantes foram aplicados em coluna de cromatografia de afinidade com resina de níquel (Ni-NTA, Qiagen) previamente equilibrada com 10 volumes de tampão de ligação (100 mM NaH_2PO_4,10 mM Tris-HCl, 8 M, pH 8,0). As colunas foram lavadas com 5 volumes de tampão de lavagem (100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris-HCl, 8 M ureia, pH 6,3) e a proteína de interesse eluída com 3 mL de tampão de eluição (100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris-HCl, 8 M ureia, pH 3,3). As proteínas recombinantes purificadas foram dialisadas (4 d) contra 16 L de solução 0,1% de ácido fórmico, com troca de diálise diária (4x4 L, 4ºC, sob leve agitação). Após a diálise, as amostras foram liofilizadas e 10% do total de proteína ressuspendida em 0,1% de ácido fórmico e quantificada por HPLC com coluna de fase reversa C18 (8-mm 4,6 x 25 cm Kromasil®) previamente equilibrada com 0,1% de ácido fórmico. A separação e eluição foram feitas utilizando um gradiente de 0 a 50% de acetonitrila/ 0,1% ácido fórmico por 30 min; com fluxo na coluna de 1 mL/min.

3.13 Inibição de crescimento de raiz primária com AtRALF1 em placa vertical

Os ensaios de inibição de crescimento de raízes de plantas de arabidopsis foram descritos por Pearce et al. (2001). As sementes de arabidopsis foram esterilizadas superficialmente com hipoclorito de sódio 50% por 10 min e em seguida lavadas quatro vezes com água milli-Q. Após serem desinfestadas, as sementes foram mantidas por 4 d a 4°C e em seguida dispostas para germinar em placa vertical com 0,5X de meio MS (sem adição de sais e vitaminas, pH 5,8, Murashige e Skoog, 1962) contendo 6 g/L de ágar sem adição de sacarose, por 2 d.

Posteriormente, as plantas foram dispostas em novas placas verticais com o mesmo meio com a adição dos respectivos tratamentos: com ou sem a adição de 1, 2 e 5 µM de AtRALF1. Os ensaios foram conduzidos em fotoperíodo de 16 h de luz (150 µE m^{-2}. s^{-1}), 8 h de escuro, a 24°C. O crescimento das raízes foi avaliados 7 d após a transferência das plantas para os respectivos tratamentos. Na análise dos dados quantitativos foi usada a metodologia

descrita por Weigel e Glazebrook (2002) e o programa ImageJ (*National Institutes of Health*, USA).

3.14 Inibição de crescimento de raiz primária com AtRALF1 (9-49), AtRALF19, AtRALF23 e AtRALF34 em placa vertical

Os ensaios de inibição de crescimento de raízes de plantas de arabidopsis com os peptídeos AtRALF1 (9-49), AtRALF19, AtRALF23 e AtRALF34 foram realizados como descrito no item anterior. Após 2 d germinando em meio MS as plantas foram dispostas em novas placas verticais com os respectivos tratamentos: com ou sem a adição de 1 e 2 µM de AtRALF1 (9-49), AtRALF19, AtRALF23 e AtRALF34. Os ensaios foram conduzidos em fotoperíodo de 16 h de luz (150 µE m^{-2}. s^{-1}), 8 h de escuro, a 24°C. O crescimento das raízes foi avaliados 7 d após a transferência das plantas para os respectivos tratamentos. Na análise dos dados quantitativos foi usada a metodologia descrita por Weigel e Glazebrook (2002) e o programa ImageJ (*National Institutes of Health*, USA).

3.15 Inibição de crescimento de raiz primária com outros hormônios: Citocinina (BAP), Auxina (NAA) e Brassinolide (BL) em placa vertical

Para os ensaios de inibição de crescimento de raízes de plantas de arabidopsis com os hormônios: citocinina BAP (6-Benzilaminopurina), auxina NAA (ácido naftil acético) e o brassinosteróide BL (24 epi-brassinolide), as sementes foram dispostas para germinar por 2 d em meio MS e as plantas foram transferidas para novas placas verticais com os respectivos tratamentos: com ou sem a adição de 0,1 µM de BAP; 0,1 µM de NAA ou 0,00, 0,01, 0,10, 1,00, 10,00 e 100,00 nM de BL ao invés de AtRALF1. Os ensaios foram conduzidos em fotoperíodo de 16 h de luz (150 µE m^{-2}. s^{-1}), 8 h de escuro, a 24°C. O crescimento das raízes foi avaliado 7 d após a transferência das plantas para os respectivos tratamentos. Na análise dos dados quantitativos foi usada a metodologia descrita por Weigel e Glazebrook (2002) e o programa ImageJ (*National Institutes of Health*, USA).

3.16 Análise do pH da rizosfera através de gel indicador

O gel indicador de pH foi elaborado conforme descrito por Wu et al. (2007), adaptado por Silva et al. (2018) (APÊNDICE). Plantas de arabidopsis foram crescidas por 9 d em placa vertical contendo meio MS 0,5X acrescido de 12 g/L de Phytagel®, pH 5,6. As plantas foram transferidas cuidadosamente para o gel indicador de pH (0,006% de *bromocresol purple*, 1 mM de $CaSO_4$, pH 5,7) e foi aplicado 10 µM de AtRALF1 ou água (controle) nas raízes. O registro da mudança de coloração no gel foi realizado em até 30 min após o tratamento das raízes.

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

Plantas de arabidopsis foram crescidas por 10 d em placa vertical contendo meio MS 0,5X pH 5,6, sem sacarose/vitaminas, acrescido de 6 g/L de ágar. As condições de crescimento foram luz constante (150 µE m^{-2}. s^{-1}) a 24°C. Para análises de PCR semi-quantitativo, aproximadamente 25 plantas foram submetidas ao mesmo meio MS líquido e tratadas por 1 h com 0, 1 e 2 µM de AtRALF1 em temperatura ambiente. Em seguida, as raízes foram cortadas e colocadas em nitrogênio líquido e o RNA total foi isolado usando o reagente Trizol (Life Technologies), seguindo recomendações do fabricante. O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA usando o sistema *ImProm-II Reverse Transcription* (Promega). As reações de PCR (30 ciclos) usaram 1,5 µL de cDNA e iniciadores específicos (ANEXO B).

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

As análises de qRT-PCR foram realizadas usando cDNA diluído 10 vezes, *Maxima SyBR Green Rox/qPCR Master Mix* (Thermo Scientific) e um *StepOne™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Foram analisados: um gene que codifica *PROLINE-RICH PROTEIN* (*PRP3*, At3g62680), *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHISM AND DWARFISM* (*CPD*, At5g05690), *DWARF4* (*DWF4*, At3g50660), MEMBRANE STEROID BINDING PROTEIN-1 (*MSBP1*, At5g52240) e o gene *GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE* (*GAPDH,*

At1g13440) foi usado como controle. Reações sem cDNA foram usadas como controle negativo. Três amostras biológicas com 3 replicatas técnicas foram analisadas para cada tratamento. O ciclo limiar foi determinado automaticamente pelo aparelho e a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001) foi usada para calcular o nível de expressão de cada gene. O valor arbitrário 1 foi atribuído aos tratamentos controle.

3.19 Análises estatísticas

A comparação das médias foi por meio do teste de Tukey, juntamente com análise de variância (STEEL et al., 1996) ou pelo teste de Student T (http://www.chem.uoa.gr/applets/AppletTtest/ Appl_Ttest2.html) com significância de $P < 0,001$; 0,05 e 0,01.

4 RESULTADOS

4.1 MSBP1 interage com AtRALF1 no sistema de duplo-híbrido de levedura

Para investigar uma possível interação entre as proteínas MSBP1 e AtRALF1, os cDNAs que codificam as proteínas foram clonados nos vetores pGADT7 e/ou pGBKT7 e os ensaios de duplo híbrido de levedura foram realizados. As leveduras transformadas com as construções gênicas foram colocadas para crescer em meio não seletivo (-L-W) e seletivo (-L-W-H/ -L-W-H-A). As diluições das culturas de leveduras (1, 0,1 e 0,01) foram feitas a fim de mostrar o quão forte são essas interações.

Em meio seletivo e em todas as diluições, MSBP1 interagiu com o peptídeo AtRALF1 nas duas combinações, ou seja, MSBP1 como “isca” (vetor pGADT7) e AtRALF1 como “presa” (vetor pGBKT7) ou vice-versa (Figura 4), em ambos os meios seletivos. Quando usado em transformações com os vetores sem DNA codificando proteína (construção de vetor vazio), AtRALF1 ou MSBP1 não cresceram em meio seletivo, indicativo de ausência de interação. Para testar a especificidade da interação AtRALF1/MSBP1, foi utilizado outro cDNA codificando o peptídeo AtRALF34 (Figura 4). MSBP1 não interagiu com AtRALF34, sugerindo que a interação com MSBP1 e AtRALF1 é específica. Como controle positivo foi utilizado a interação AtRALF1/BAK1 (Dressano et al., 2017).

No teste de transativação do gene repórter LacZ, as duas combinações de isca e presa com MSBP1 e AtRALF1 foram capazes de ativar o sistema, apresentando coloração azul no ensaio com X-Gal, semelhante ao controle positivo.

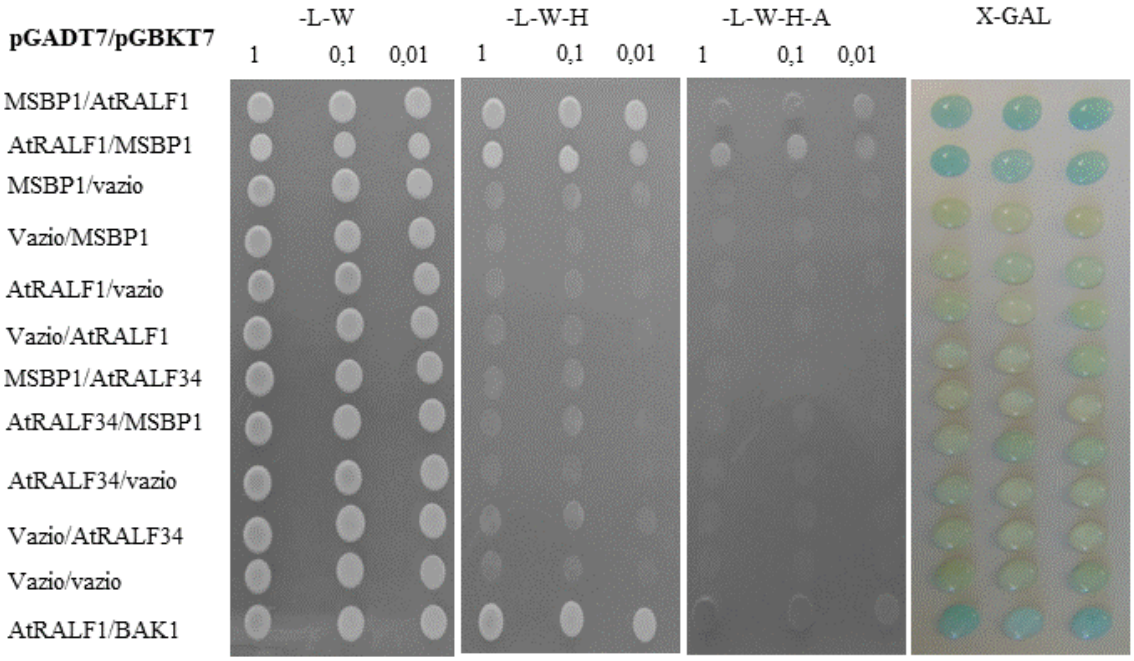
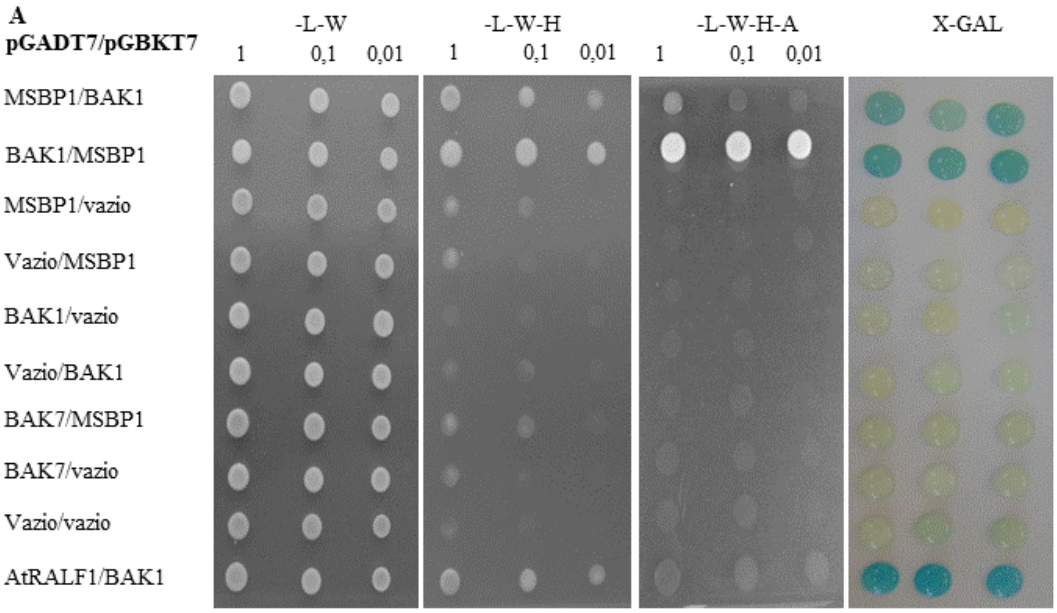


Figura 4. Interação da proteína MSBP1 com o peptídeo AtRALF1 no sistema de duplo híbrido de levedura. MSBP1 e AtRALF1 foram fusionadas tanto com o domínio de ativação GAL4 (pGADT7) quanto com o domínio de ligação do DNA GAL4 (pGBKT7). As células de levedura transformadas foram cultivadas em um meio completo sintético sem leucina e triptofano (-L-W), e selecionadas em um meio completo sintético sem leucina, triptofano e histidina (-L-W-H) e um meio completo sintético sem leucina, triptofano, histidina e adenina (-L-W-H-A) para testar as interações. Foram feitas diluições de OD: 1, 0,1 e 0,01. Controle positivo: BAK1-pGBKT7/AtRALF1-pGADT7. X-Gal: ensaios utilizando a atividade da β-Galactosidase (são mostradas três repetições).

4.2 Interação da proteína MSBP1 com as demais proteínas que interagem com AtRALF1 no sistema de duplo-híbrido de levedura

Com a finalidade de investigar a formação de um possível complexo de proteínas interligadas pelo peptídeo AtRALF1, foram avaliadas as interações entre as demais proteínas já descritas como interagentes e sua possível interação com MSBP1. Foi realizado o teste do duplo-híbrido de levedura com a proteína MSBP1 e o domínio extracelular de BAK1 como descrito anteriormente. Em ambos os meios seletivos, MSBP1 interagiu com o domínio extracelular de BAK1, assim como descrito por Song et al. (2009). Foi possível observar que em todas as diluições testadas houve uma interação forte entre as duas proteínas. Quando usado em transformações com os vetores vazios, MSBP1 ou BAK1 não interagiram com os vetores vazios. Para testar a especificidade da interação MSBP1/BAK1, foi usado um homológo de BAK1, denominado BAK7, sendo que, neste caso, não houve interação

detectável. Como controle positivo foi utilizado a interação AtRALF1/BAK1 (Figura 5A). Foi possível constatar a interação entre MSBP1 e BAK1 no ensaio da atividade da β-Galactosidase, onde essa interação apresentou coloração azul semelhante ao controle positivo.



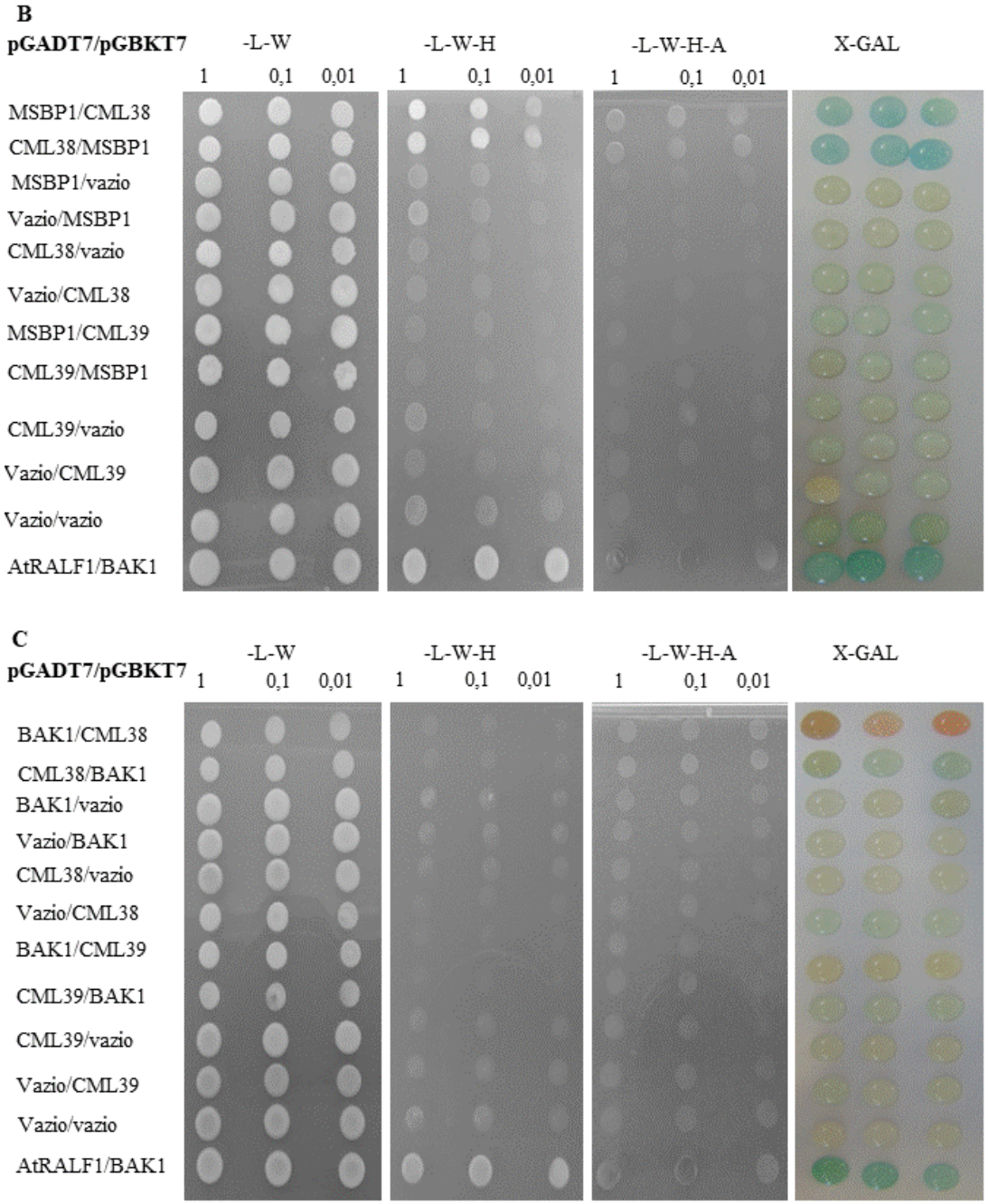


Figura 5. Interação da proteína MSBP1 com as proteínas: A: BAK1, B: CML38, C: interação da proteína BAK1 com CML38 no sistema de duplo híbrido de levedura. MSBP1, BAK1 e CML38 foram fusionadas tanto com o domínio de ativação GAL4 (pGADT7) quanto com o domínio de ligação do DNA GAL4 (pGBKT7). As células de levedura transformadas foram cultivadas em um meio completo sintético sem leucina e triptofano (-L-W), e selecionadas em um meio completo sintético sem leucina, triptofano e histidina (-L-W-H) e um meio completo sintético sem leucina, triptofano, histidina e adenina (-L-W-H-A) para testar as interações. Foram feitas diluições de OD: 1, 0,1 e 0,01. Controle positivo: BAK1-pGBKT7/AtRALF1-pGADT7. X-Gal: ensaios utilizando a atividade da β-Galactosidase (são mostradas três repetições).

O ensaio do duplo híbrido de levedura também demonstrou interação entre a proteína MSBP1 e CML38, ao passo que nenhuma interação foi constatada quando se utilizou CML39, proteína homóloga a CML38 (Figura 5B, Vanderbeld e Snedden, 2007). Já a interação entre a proteína BAK1 e CML38 não foi observada, o mesmo acontecendo com BAK1 e a CML39 (Figura 5C).

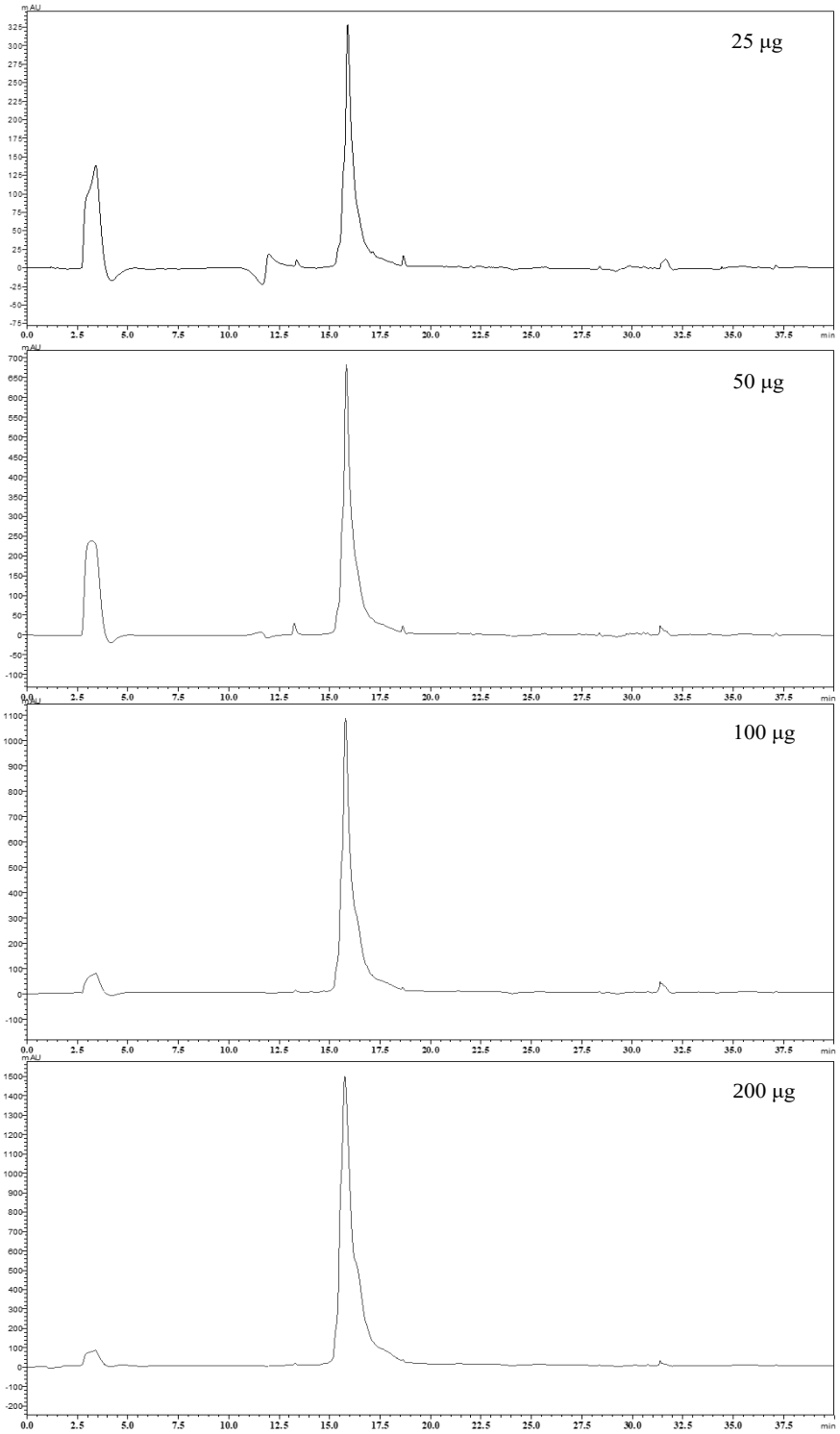
Estas interações foram comprovadas também nos ensaios com o gene repórter Lac-Z, onde as leveduras apresentaram uma coloração azul, semelhante ao controle positivo.

Com base nos dados obtidos no sistema de duplo híbrido de levedura podemos inferir que MSBP1 interage com AtRALF1, BAK1 e CML38, enquanto que BAK1 interage com AtRALF1, mas não interage com CML38. Já o peptídeo AtRALF1 interage com todas as proteínas, podendo então ser uma molécula chave dessas interações, sugerindo a possível formação de um complexo mediador da resposta ao peptídeo.

4.3 Produção heteróloga do peptídeo AtRALF1

Para testar a sensibilidade dos mutantes com perda de função da proteína MSBP1 foram aplicadas, exogenamente, diferentes concentrações do peptídeo AtRALF1. Para realização deste teste foi produzido o peptídeo AtRALF1 de forma heteróloga e quantificado por HPLC, (Figura 6A). Após a coleta desses dados foi gerado a regressão linear entre a área integrada do pico e a concentração AtRALF1 correspondente (Figura 6B).

A



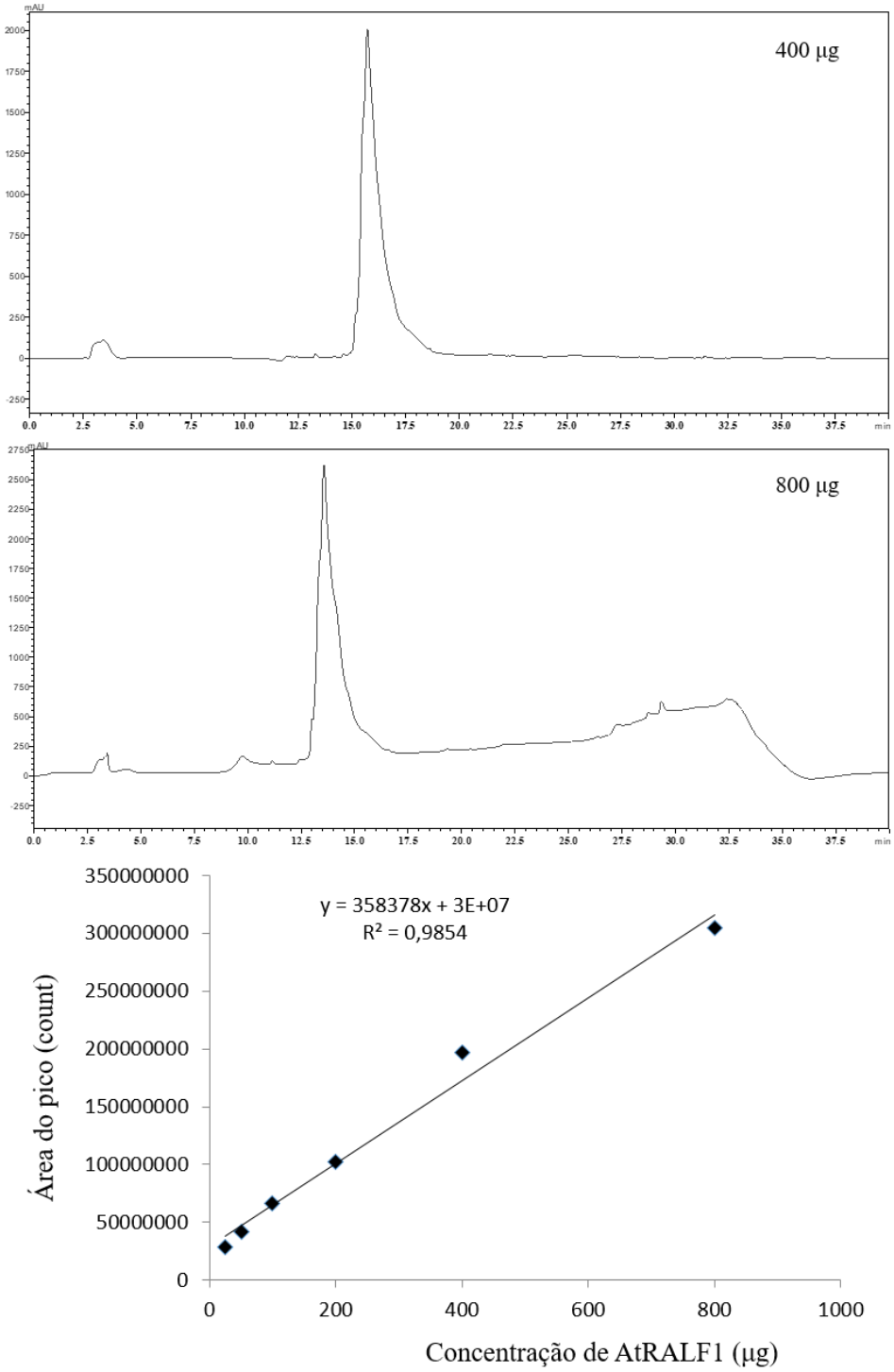


Figura 6. Quantificação por HPLC do AtRALF1 recombinante. A: Perfis do HPLC do peptídeo AtRALF1 recombinante. O peptídeo recombinante foi extraído de *E. coli*, purificado por afinidade com uma resina Ni^{2+}, dialisado em 0,1% de ácido fórmico, purificado em HPLC, liofilizado, ressuspenso (0,1% de ácido fórmico) e injetado novamente em uma coluna C18 de HPLC de fase reversa (8 mm 4,6 x 25 cm Kromasil®), equilibrada com ácido fórmico (0,1%) previamente. Foram carregadas concentrações crescentes (25, 50, 100, 200, 400 e 800 µg) na coluna e eluído usando um gradiente de acetonitrilo (0 a 50% em 30 min). B: Regressão linear entre a área integrada do pico e a concentração AtRALF1 correspondente. A equação linear e o coeficiente R^2 são mostrados (Dressano et al., 2017).

4.4 Obtenção e caracterização de mutantes por silenciamento e superexpressão de *MSBP1*

Para testar a sensibilidade dos mutantes com perda de função da proteína MSBP1 foi selecionado o mutante *msbp1* (SALK_035827, inserção T-DNA, Figura 7E) e foram criados transgênicos que silenciam o gene *MSBP1*. Foram obtidas 4 linhagens: *irmsbp1L14.4*, *L16.16*, *L16.3* e *L10.18*, onde foi possível observar a expressão reduzida do gene *MSBP1* (Figura 7D), enquanto o *GAPDH* não foi alterado. Foi observado que todos os mutantes *irmsbp1* e o mutante *msbp1* apresentaram um crescimento radicular maior que as plantas controle (Figura 7A). Como controles positivos do experimento foram utilizados os mutantes *bak1-1* e *fer4* (Dressano et al., 2017 e Haruta et al., 2014).

Foi possível observar esse aumento no crescimento da raiz e da planta tanto nas plantas que estavam com 9 d (Figura 6B) quanto nas plantas que estavam com 30 d (Figura 7C). Esse aumento na raiz primária com 9 d foi de 26%, 17%, 15%, 10% e 16% nos mutantes de *msbp1 L14.4*, *16.16*, *16.3*, *10.18* e *msbp1* respectivamente (Figura 7A e B).

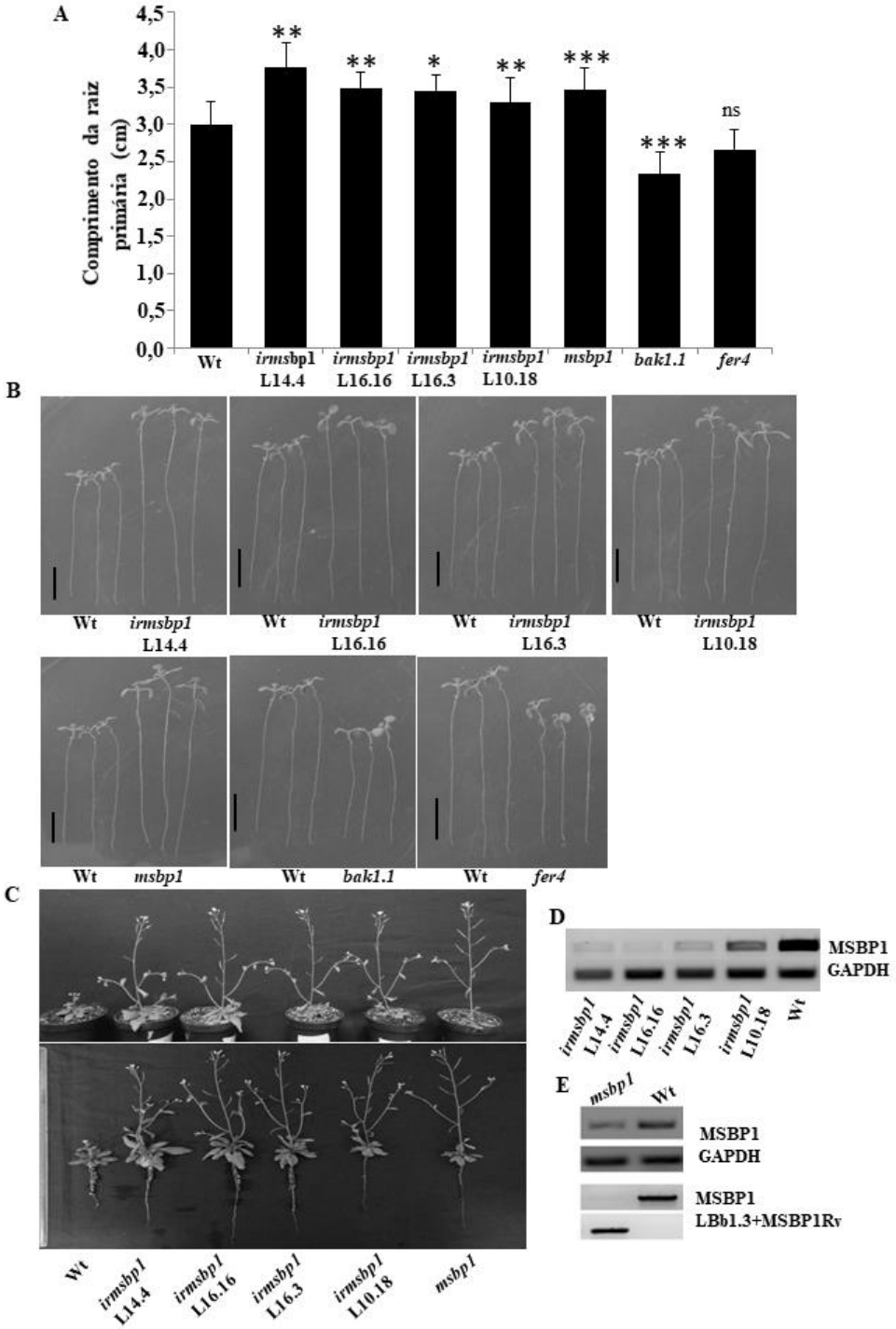


Figura 7. Análise de mutantes obtidos por silenciamento do gene *MSBP1*. A e B: Crescimento de raiz primária dos mutantes *irmsbp1* (*L14.4*, *L16.16*, *L16.3*, *L10.18*) e Wt, *msbp1*, *bak1-1* e *fer4*. As sementes foram dispostas para germinar em meio MS (0,5 X) por 9 d. C: Imagens representativas das plantas após 30 d em câmara de crescimento Wt, *irmsbp1 L14.4*, *L16.16*, *L16.3*, *L10.18* e *msbp1*. D: Análise de expressão gênica de *MSBP1* e *GAPDH* em plantas Wt e mutantes *msbp1* por PCR semi-quantitativo. E: análise da inserção de T-DNA no mutante *msbp1* por PCR semi-quantitativo. Os dados representam a média do crescimento da raiz primária de 100 plantas. ***, **, * diferença significativa pelo test t, P ≤ 0,001, 0,01 e 0,05 respectivamente. Ns, não significativo. Escala: 1cm.

Para caracterização de plantas superexpressando *MSBP1* foram obtidas quatro linhagens *35S:MSBP1*: L6.1, L6.2, L10.1, L20.1, onde a expressão do gene *MSBP1* é aumentada nesses mutantes em relação ao Wt (Figura 8D). Foi possível observar que todas as linhagens de superexpressão apresentaram um fenótipo de crescimento radicular reduzido em relação as plantas do controle (Figura 8A e B). Essa redução em plantas com 9 d foi de 11%, 24%, 21% e 28% em L6.1, L6.2, L10.1, L20.1 respectivamente. Tanto nas plantas com 9 d (Figura 8B) quanto nas plantas com 35 d, o crescimento da raiz e da planta foi menor (Figura 8C).

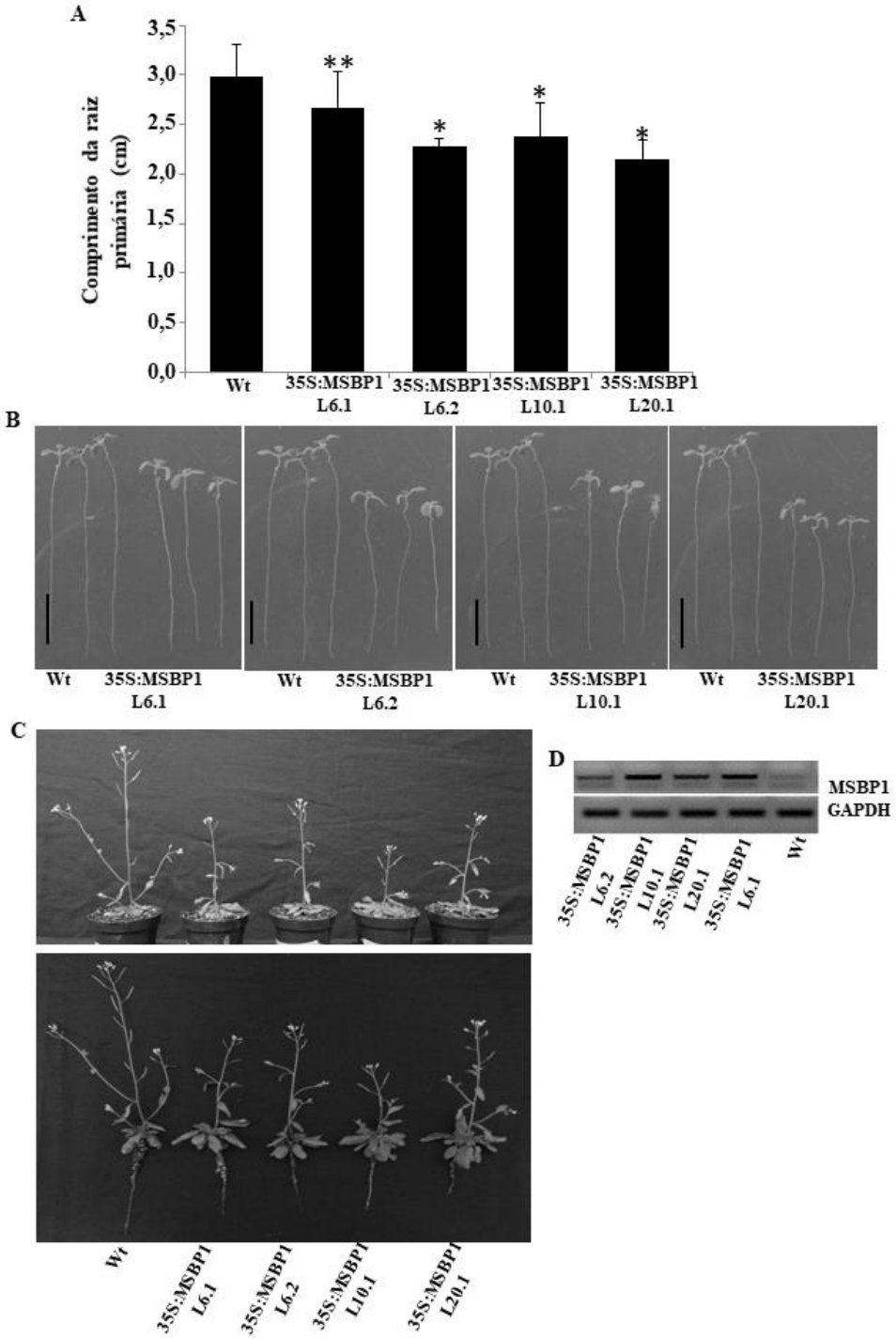


Figura 8. Análise de mutantes superexpressando o gene *MSBP1*. A e B: Crescimento de raiz primária dos mutantes *35S:MSBP1*(L6.1, L6.2, L10.1, L20.1) e Wt. As sementes foram dispostas para germinar em meio MS (0,5 X) por 9 d. C: Imagens representativas das plantas após 35 d em câmara de crescimento Wt, e plantas de *35S:MSBP1*. D: análise de expressão gênica de *MSBP1* e *GAPDH* em plantas Wt e mutantes de superexpressão de *MSBP1* (L6.1, L6.2, L10.1, L20.1) por PCR semi-quantitativo. Os dados representam a média do crescimento da raiz primária de 100 plantas. **, * diferença significativa pelo test t, P ≤ 0,01 e 0,05 respectivamente. Ns, não significativo. Escala: 1cm.

4.5 Crescimento celular em mutantes *irmsbp1* e *msbp1*

Em uma análise *in silíco* foi possível observar que *AtRALF1* e *MSBP1* se encontram na mesma camada celular da raiz, na endoderme (Figura 9).

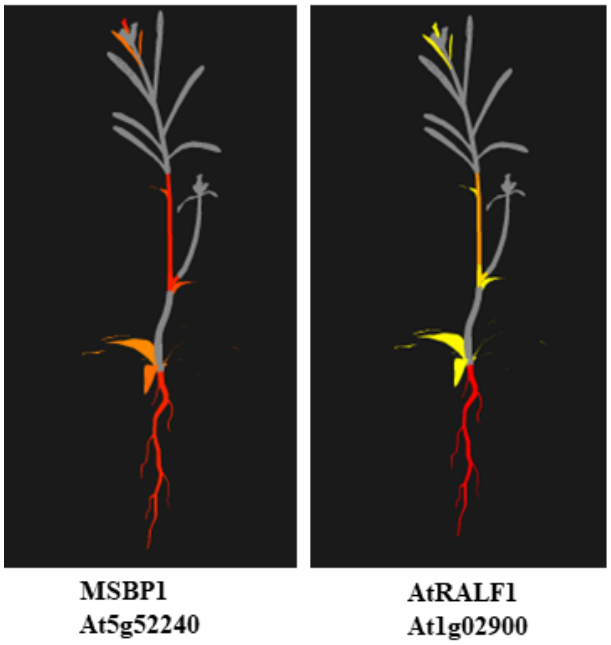


Figura 9. Representação *in silíco* do padrão de expressão gênica de *AtRALF1* e *MSBP1.* Disponibilizados no programa *eplant* da plataforma BAR (http://bar.utoronto.ca/eplant_legacy/). A coloração varia de cinza (baixa expressão) à vermelho (alta expressão).

Mutantes silenciados para o gene *AtRALF1* (*irAtRALF1*) apresentam células endodérmicas maiores em comprimento em relação ao controle (Wt) (Bergonci et al., 2014). Devido a possível interação entre MSBP1 e AtRALF1, foram medidas células da endoderme de plantas *irmsbp1*.

Foi observado um aumento no comprimento das células da endoderme na zona de diferenciação da raiz de 62,3, 48,9, 45,8, 43,42 e 38,93% nos mutantes *irmsbp1L14.4, L16.16, L16.3, L10.18* e *msbp1*, respectivamente, em relação ao tipo selvagem (Figura 10).

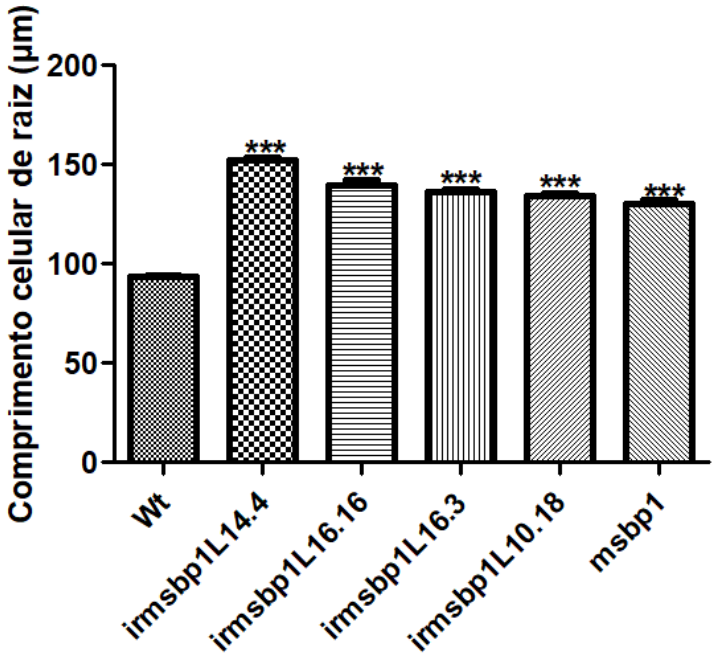


Figura 10. Medidas de células endodérmicas de mutantes *irmsbp1* e *msbp1*. Os mutantes *irmsbp1* (*L14.4, L16.16, L16.3, L10.18*), *msbp1* e Wt foram dispostos para germinar em meio MS (0,5 X) por 9 d, foram coradas com *Calcofluor White* por 5 min e lavados em água. As células da endoderme da zona de diferenciação da raiz foram mensuradas. Valores representam as médias ± desvio padrão de aproximadamente 150 células. ***, diferença significativa pelo test t, P ≤ 0,001.

4.6 Efeito do AtRALF1 na inibição do crescimento da raiz primária de mutantes *irmsbp1, msbp1* e *35S:MSBP1*

Após constatarmos uma relação da redução ou aumento da expressão do gene *MSBP1* com o tamanho da planta, resultados similares ao encontrado em mutantes e plantas superexpressando o gene *AtRALF1*, surgiu a hipótese de que MSBP1 poderia ser requerida para que AtRALF1 pudesse agir e exercer sua função. Para testar essa hipótese, os mutantes *irmsbp1*, *msbp1*, *fer4, bak1-1* e Wt foram tratados com 0, 2 e 5 µM do peptídeo AtRALF1 e avaliadas o crescimento da raiz primária após 7 d de tratamento.

Todos os mutantes apresentaram insensibilidade ao peptídeo AtRALF1 na concentração de 2 µM. Plantas controle (Wt) apresentaram uma redução de 48% no tamanho das raízes primárias. No entanto, na concentração de 5 µM os mutantes demonstraram sensibilidade e foram inibidos, exceto os mutantes *irmsbp1L10.18* e *bak1-1* (Figura 11A e B). Essa inibição observada em alta concentração foi inferior ao encontrado para o tipo selvagem; para os mutantes *irmsbp1 L14.4, L 16.16, L16.3* e *msbp1* foi de 48%,

35%, 23% e 30%, enquanto para o tipo selvagem inibiu 82%. A inibição com alta dose do peptídeo também foi observada no mutante *fer4* (44%).

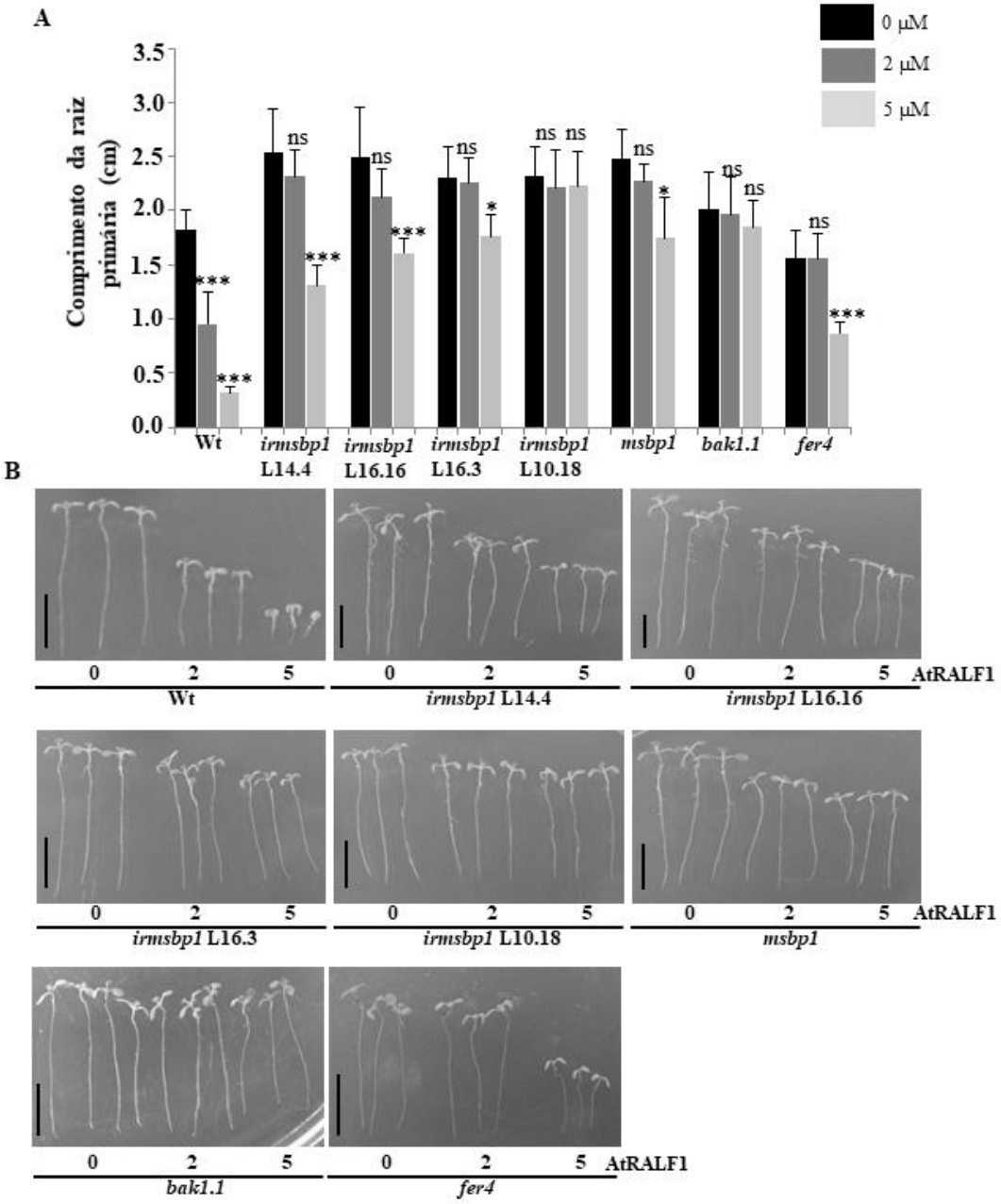


Figura 11. Crescimento de raiz primária em plantas selvagens (Wt) e mutantes *irmsbp1* (*L14.4, L16.16, L16.3, L10.18*), *msbp1*, *bak1-1* e *fer4* tratadas com 0, 2 e 5 µM do peptídeo AtRALF1. A e B: As sementes foram dispostas para germinar por 2 d em meio MS (0,5X) e transferidas para o mesmo meio contendo as diferentes concentrações do AtRALF1. As plantas foram avaliadas e fotografadas 7 d após serem transferidas para os tratamentos. Os dados representam a média do crescimento da raiz primária de 20 plantas e 10 plantas no caso de *fer4*. ***, **, * diferença significativa pelo test t, P ≤ 0,001, 0,01 e 0,05 respectivamente. Ns, não significativo. Escala: 1cm.

Ao avaliar as respostas dos mutantes de superexpressão *35S:MSBP1* (L6.1, L6.2, L10.1, L20.1) foi possível observar uma redução severa no crescimento das plantas com aplicação exógena do peptídeo (Figura 12A e B), sugerindo uma hipersensibilidade destas plantas ao peptídeo AtRALF1. A inibição do crescimento da raiz primária observada nos mutantes *35S:MSBP1* foi acima de 80% já na concentração menor de AtRALF1. Redução semelhante em plantas controle (Wt) só é observada em altas concentrações. Com base nesses resultados é possível afirmar que MSBP1 é requerida pelo peptídeo AtRALF1 em baixas concentrações para seu efeito de inibição de crescimento radicular.

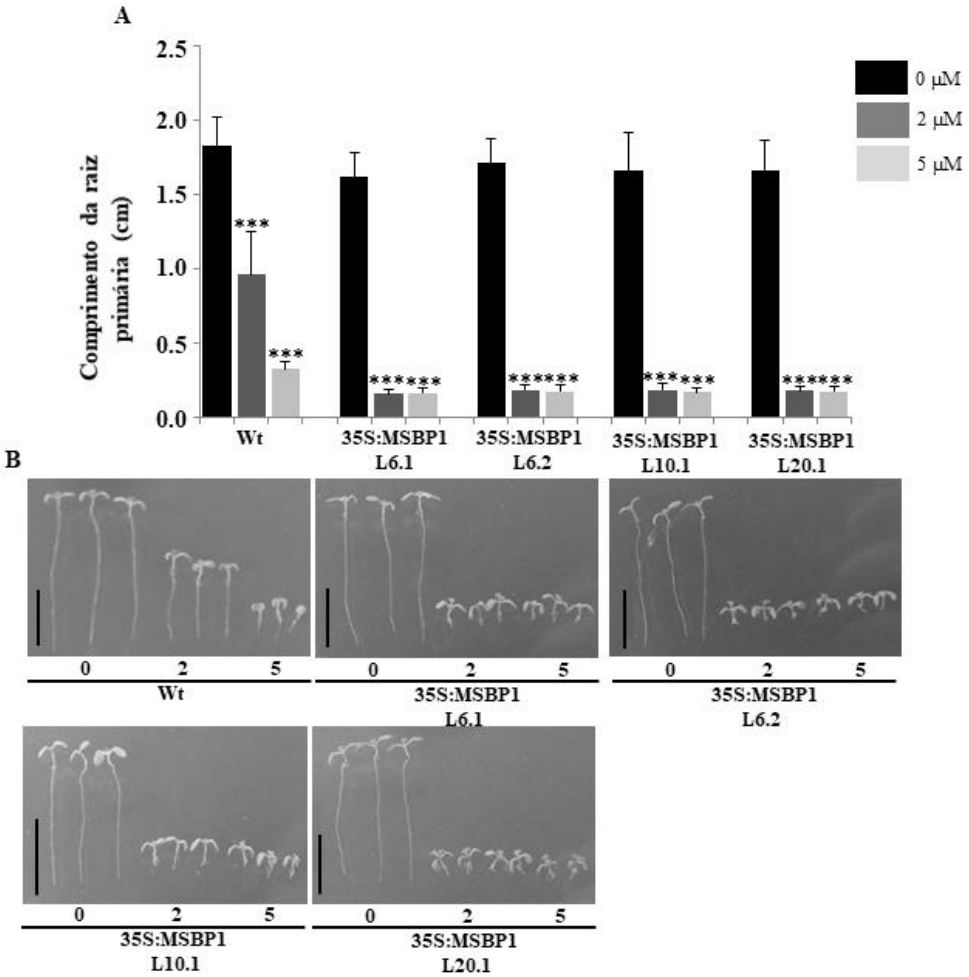
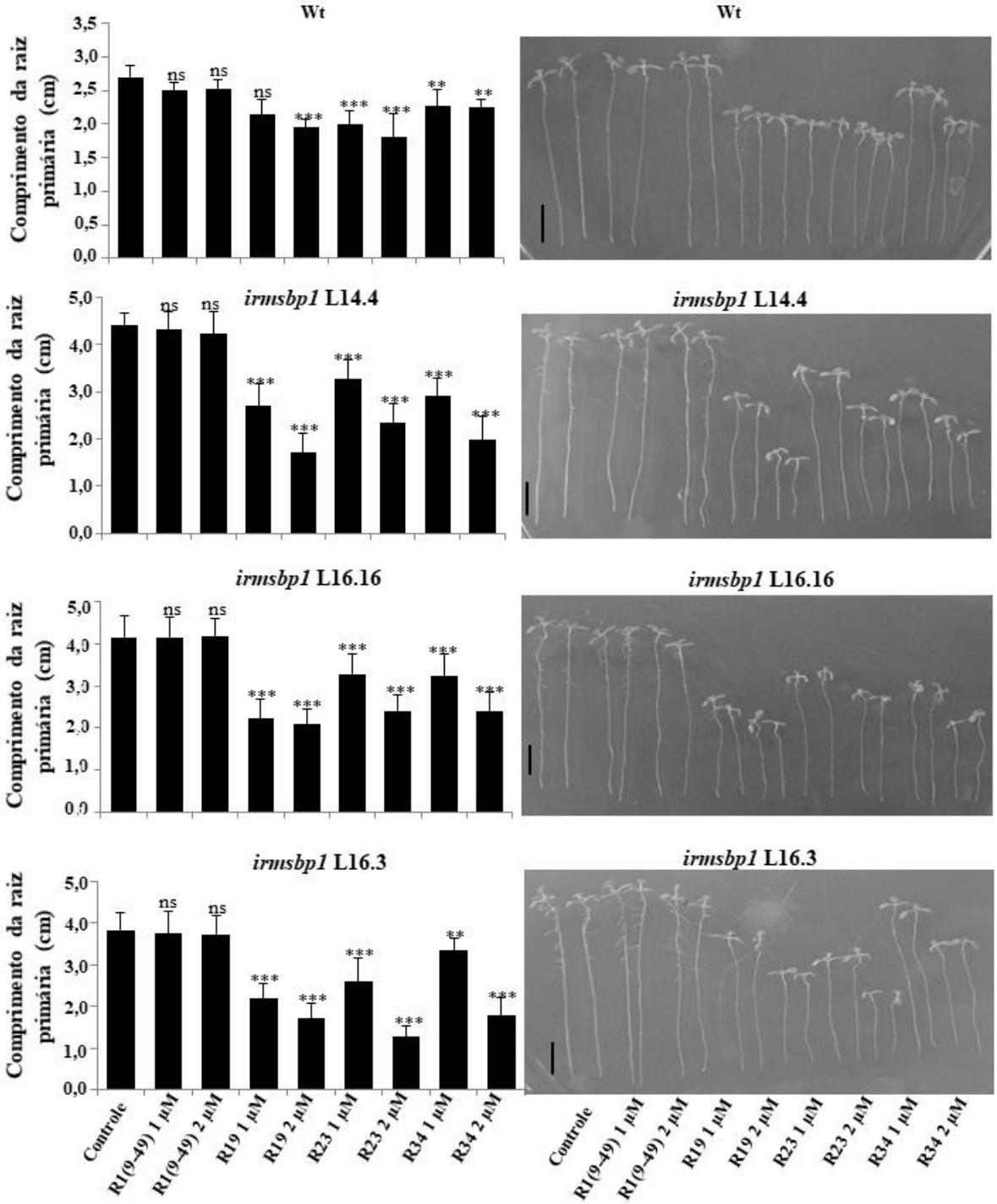


Figura 12. Crescimento de raiz primária de plantas selvagens (Wt) e mutantes *35S:MSBP1* (L6.1, L6.2, L10.1, L20.1) tratadas com 0, 2 e 5 µM do peptídeo AtRALF1. A e B: As sementes foram dispostas para germinar por 2 d em meio MS (0,5X) e transferidas para o mesmo meio com adição dos tratamentos. As plantas foram avaliadas e fotografadas 7 d após serem transferidas para o tratamento. Os dados representam a média do crescimento da raiz primária de 20 plantas. ***, diferença significativa pelo test t, P ≤ 0.001. Ns, não significativo. Escala: 1cm.

Para avaliar a especificidade da resposta ao peptídeo AtRALF1 no ensaio de crescimento das raízes primárias do mutante *msbp1,* foram aplicados, exogenamente, outros peptídeos RALFs [AtRALF19, AtRALF23, AtRALF34 e o peptídeo AtRALF1 inativo AtRALF1(9-49)].

O peptídeo AtRALF1(9-49) possui uma deleção de 8 aminoácidos no N-terminal e não é capaz de inibir a raiz primária tão pouco de causar a alcalinização do meio extracelular (Pearce et al., 2010). Já o AtRALF34 possui a estrutura primária mais diferenciada dentre os nove AtRALFs com alta identidade de estrutura primária ao peptídeo RALF isolado de tabaco originalmente. O AtRALF34 inibe o crescimento de raiz primária e alcaliniza o meio extracelular de suspensões celulares de forma similar ao AtRALF1 (Morato do Canto et al., 2014). Os AtRALF19 e AtRALF23 são os únicos AtRALFs entre os 9 que são expressos ubiquamente (Morato do Canto et al., 2014). A isoforma AtRALF23 foi selecionada por apresentar a maior inibição de crescimento radicular com 10 µM (Morato do Canto et al., 2014).

Como os mutantes *irmsbp1* foram sensíveis ao AtRALF1 na concentração mais altas (5 µM, Figura 11), os demais peptídeos foram testados nas concentrações 1 e 2 µM. Constatou-se que os peptídeos AtRALF19, AtRALF23 e AtRALF34 inibiram, significativamente, o crescimento radicular dos mutantes com 2 µM, enquanto que o peptídeo inativo AtRALF1(9-49) não promoveu a inibição da raiz primária (Figura 13). Essa inibição foi de no mínimo 28% (*bak1-1* e Wt) e no máximo de 61% (L14.4) com a aplicação do peptídeo AtRALF19, de no mínimo 27% (*msbp1*) e no máximo 67% (L16.3) com AtRALF23 e de no mínimo 16% (Wt) e no máximo 55% (*msbp1* e L14.4) com AtRALF34.


Wt
Wt
irmsbp1 L14.4
irmsbp1 L14.4
irmsbp1 L16.16
irmsbp1 L16.16
irmsbp1 L16.3
irmsbp1 L16.3
Comprimento da raiz primária (cm)
Controle
R1(9-49) 1 µM
R1(9-49) 2 µM
R19 1 µM
R19 2 µM
R23 1 µM
R23 2 µM
R34 1 µM
R34 2 µM

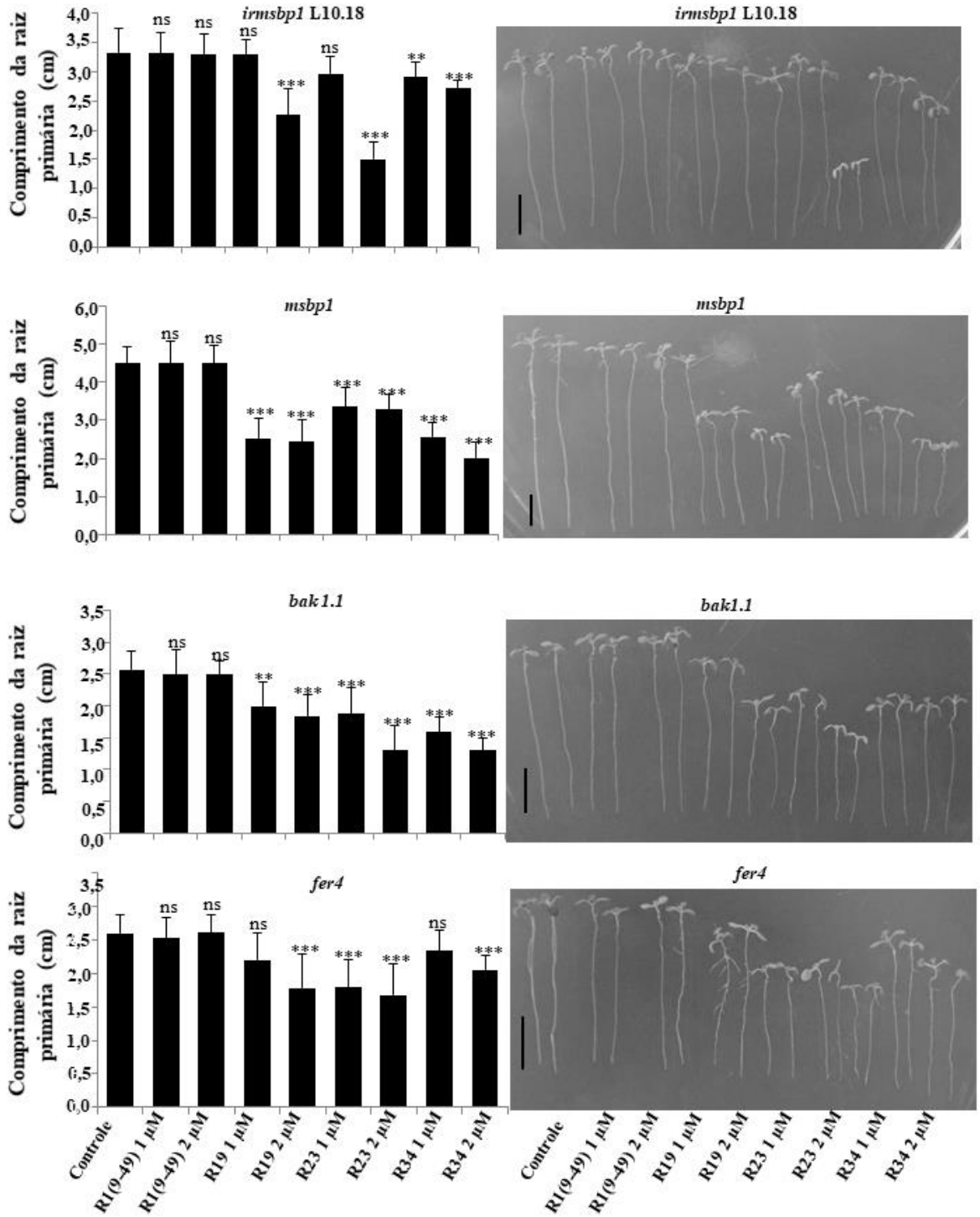


Figura 13. Ensaio de inibição de raiz primária de mutantes *irmsbp1* (L14.4, L16.16, L16.3, L10.18), Wt, *msbp1*, *bak1-1* e *fer4* com os peptídeos AtRALF1(9-49), AtRALF19, AtRALF23 e AtRALF34 (1 e 2 µM). As sementes foram dispostas para germinar por 2 d em meio MS (0,5X) e transferidas para o mesmo meio com adição dos tratamentos. As plantas foram avaliadas após 7 d de crescimento nos tratamentos. Os valores representam as médias ± desvio padrão de 10 a 20 plantas. ***, **, * diferença significativa pelo test t, P ≤ 0,001, 0,01 e 0,05 respectivamente. Ns, não significativo. Escala: 1cm.

4.7 Crescimento da raiz primária dos mutantes *irmsbp1* e *msbp1* com outros hormônios: auxina, citocinina e brassinosteróide

A citocinina 6-Benzilaminopurina (BAP) e a auxina ácido naftil acético (NAA) inibem o crescimento de raízes primárias de arabidopsis (Mulkey et al., 1982; Cary et al., 1995). A fim de avaliar a resposta dos mutantes *irmsbp1* e *msbp1* as demais classes de hormônios capazes de inibir o crescimento das raízes primárias, auxinas e citocininas, as plantas foram crescidas em placas verticais na presença de 0,1 µM de BAP e 0,1 µM de NAA ou em H_2O (controle). Tanto BAP quanto NAA inibiram, significativamente, o crescimento de raízes primárias de mutantes *irmsbp1* e *msbp1* (Figura 14A e B), demonstrando assim que estes mutantes podem ser inibidos por outros hormônios. Essa inibição nas raízes causadas por 0,1 µM de NAA foram de no mínimo 58% (*bak1-1*) e no máximo 72% (L14.4, L16.16 e *msbp1*) e para 0,1 µM de BAP foram de no mínimo 59% (*bak1-1*) e no máximo 79% (L14.4).

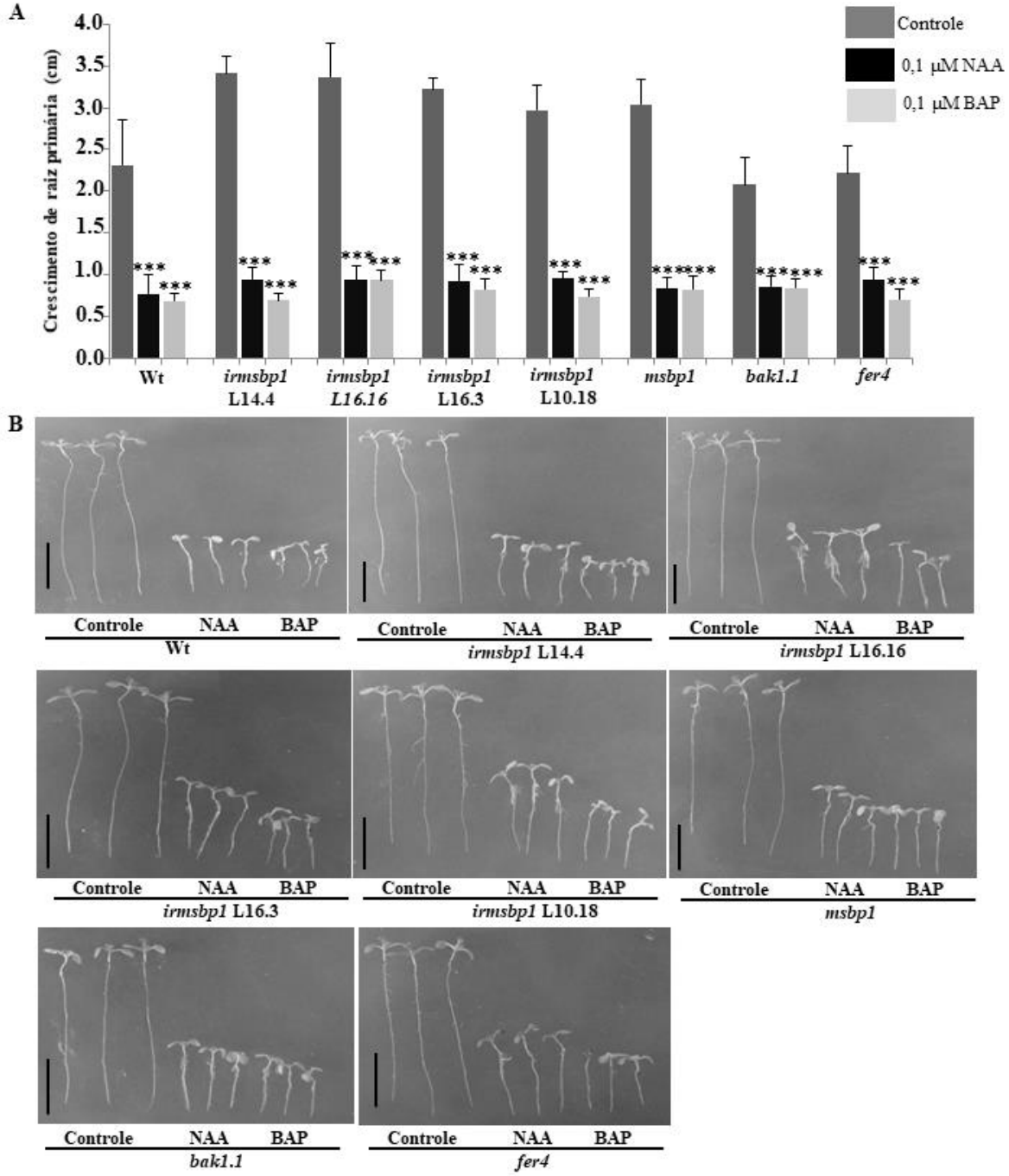
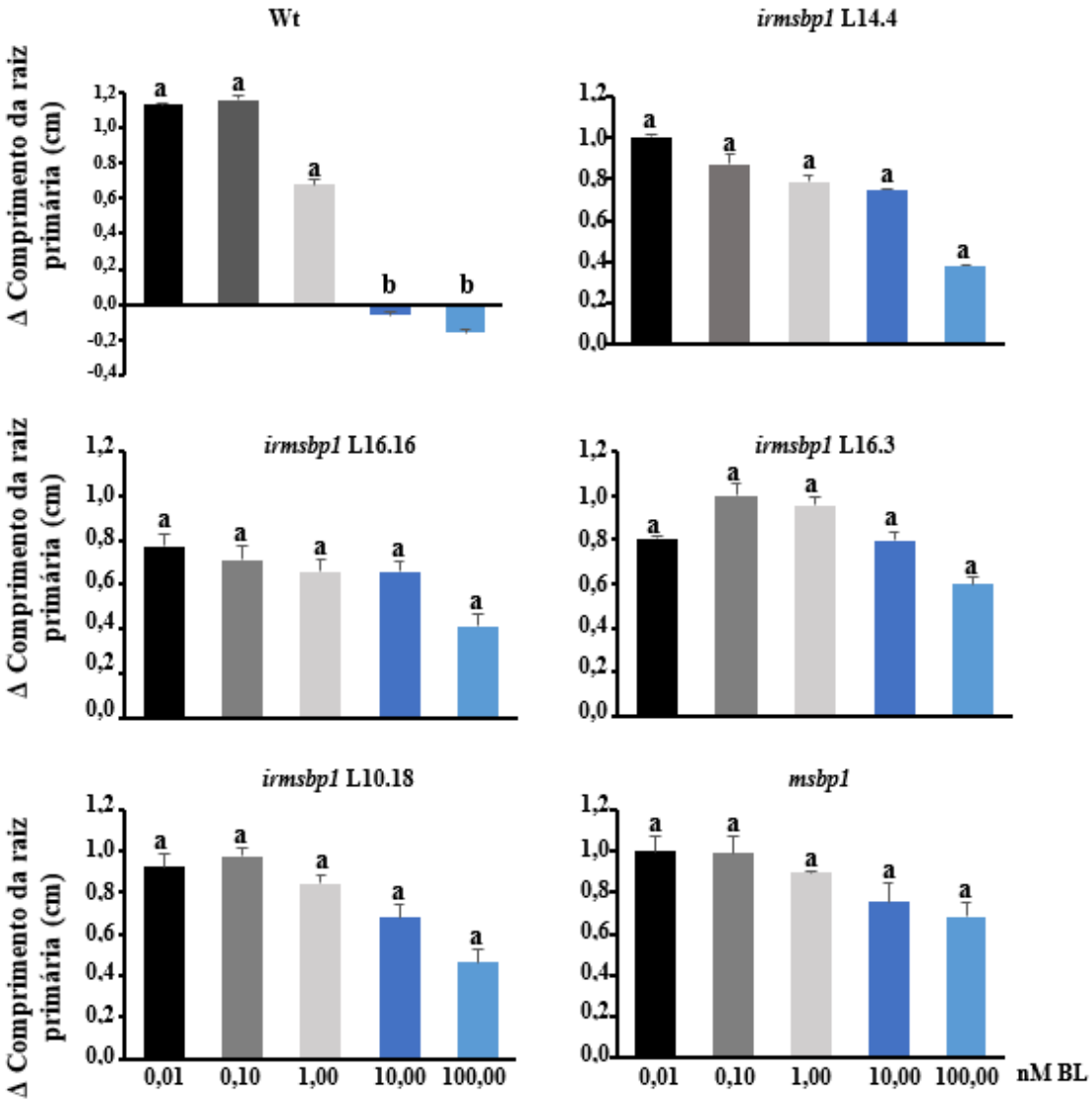


Figura 14. Ensaio de crescimento da raiz primária de plantas selvagens (Wt) e mutantes *irmsbp1, msbp1, bak1-1* e *fer4* em meio contendo 0,1 µM de auxina NAA (ácido naftil acético), 0,1 µM de citocinina BAP (6-Benzilaminopurina) ou H_2O (controle). A e B: Plantas foram crescidas em placas verticais (2 d) em meio MS 0,5X, posteriormente, transferidas para o mesmo meio de cultura contendo NAA, BAP ou H_2O. As plantas foram avaliadas e fotografadas após 7 d. Dados representam a média do comprimento da raiz primária de 50 plantas. ***, significativamente diferentes entre o tratamento em relação ao controle em cada dia, pelo teste t, $P \leq 0,001$. Escala: 1cm.

Com a finalidade de avaliar a resposta dos mutantes *msbp1* e *irmsbp1* quando expostos ao hormônio brassinoteróide, foram aplicadas diferentes concentrações do hormônio BL em plantas selvagens (Wt) e mutantes e o crescimento das raízes foi comparado. Plantas selvagens exibiram o comportamento esperado, ou seja, em baixas concentrações (0,01, 0,10 e 1,00 nM) BL estimula o crescimento das raízes, enquanto que em altas concentrações (10,00 e 100,00 nM) inibe (Figura 15). No entanto, os mutantes *irmsbp1* e *msbp1* mostraram-se sensíveis ao efeito estimulatório, mas insensíveis ao inibitório, respondendo somente com um aumento do crescimento da raiz em baixas concentrações.



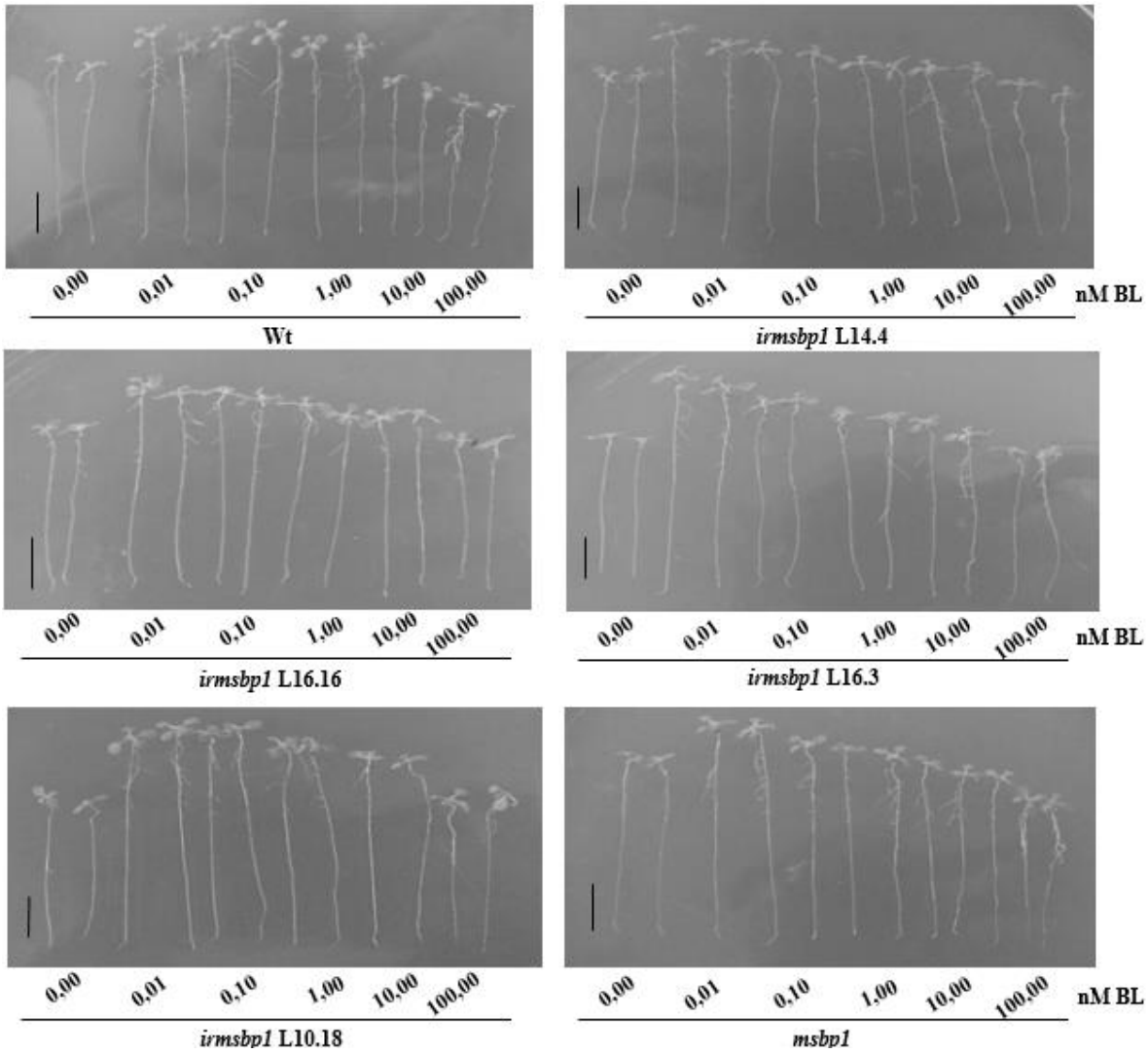


Figura 15. Efeito do brassinolide (BL) no crescimento da raiz primária de plantas selvagens (Wt), mutantes *irmsbp1* e *msbp1*: Plantas foram crescidas em placas verticais (2 d) em meio MS 0,5X, posteriormente, transferidas para o mesmo meio de cultura contendo diferentes concentrações de BL (0,00, 0,01, 0,10, 1,00, 10,00, e 100,00 nM). As plantas foram avaliadas e fotografadas após 7 d. Dados representam a média do comprimento da raiz primária de 50 plantas. Δ, diferença entre cada tratamento e o controle (0 nM de BL); significativamente diferentes entre o tratamento em relação ao controle em cada dia, pelo teste Tukey, $P \leq 0,05$. Escala: 1cm.

4.8 Envolvimento de MSBP1 com a alcalinização do meio extracelular

Desde a descoberta do peptídeo AtRALF1 foi demonstrado que o mesmo alcaliniza o meio extracelular de células em suspensão (Pearce et al., 2001). Usando-se um gel indicador de pH (Silva et al., 2018), é possível verificar que raízes de plantas de arabidopsis tratadas com o peptídeo AtRALF1 também alteram o pH da rizosfera através da mudança da coloração do meio de crescimento das raízes (Figura 16).

Raízes de plantas mutantes *irmsbp1* e *msbp1* tratadas com AtRALF1 alteraram a coloração do meio, de amarelo para roxo, indicando aumento de pH. O mesmo foi observado no mutante com perda de função *bak1-1* (Figura 16). Já o mutante *fer4*, que não apresenta a resposta de alcalinização do meio extracelular, não apresentou mudança de coloração no meio com indicador de pH. Os resultados sugerem que MSBP1 não está envolvida com as atividades de alcalinização do meio extracelular, embora deva-se salientar que os mutantes aqui testados sejam "knock-down" e que, dada a sensibilidade do método, é possível que o nível de expressão residual nestes mutantes seja responsável pela resposta positiva nos ensaios.

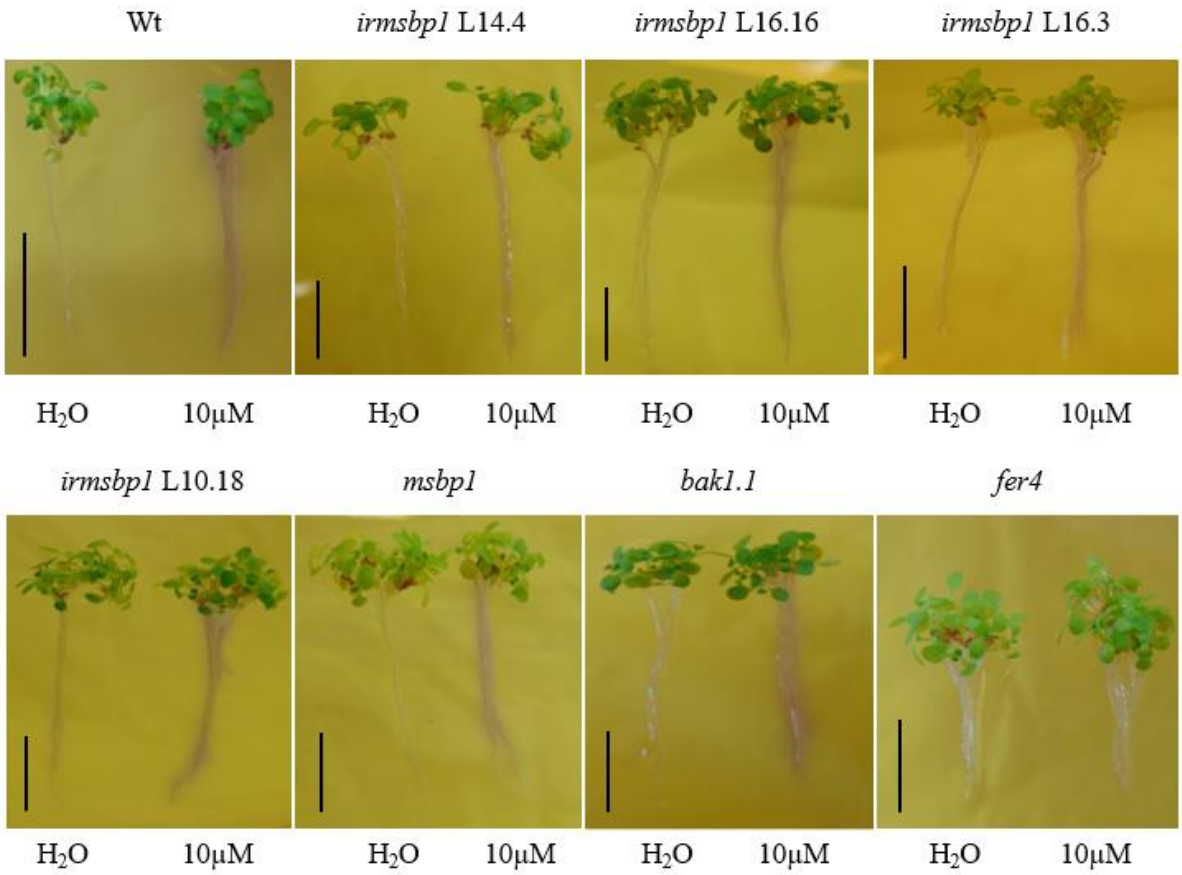


Figura 16. Avaliação das respostas dos mutantes *irmsbp1*, *msbp1*, *bak1-1* e *fer4* ao ensaio de alcalinização induzida por AtRALF1. Plantas de arabidopsis crescidas em meio MS 0,5x por 9 d foram transferidas para o gel indicador de pH (bromocresol purple) e tratadas com 10 µM de AtRALF1. As imagens foram capturadas 30 min após o tratamento. Escala: 1cm.

4.9 Avaliação dos genes responsivos a AtRALF1 em mutantes *irmsbp1* e *msbp1*

Os genes que codificam *PROLINE-RICH PROTEIN* (*PRP3*), *PHOTOMORPHISM AND DWARFISM (CPD)* e *DWARF4 (DWF4)* são induzidos pelo peptídeo AtRALF1 (Bergonci et al., 2014). Dressano et al, (2017) mostraram que BAK1 é essencial para a indução dos genes responsivos ao AtRALF1. A análise por PCR semi-quantitativo revelou que nos mutantes *msbp1, irmsbp1 e bak1-1,* os genes *PRP3*, *CPD* e *DWF4* não são induzidos após o tratamento com o peptídeo nas concentrações de 1 e 2 µM (Figura 17). O mutante *fer4* mostrou um aumento da expressão destes genes com a aplicação do peptídeo, enquanto que o gene de referência *GAPDH* não mostrou alteração em nenhuma das concentrações.

Com base nos dados do PCR semi-quantitativo, MSBP1 é necessário para que os genes *CPD, PRP3* e *DWF4* sejam induzidos após o tratamento com AtRALF1 (Figura 17), resultados similares aos encontrados para a proteína BAK1 (Dressano et al., 2017).

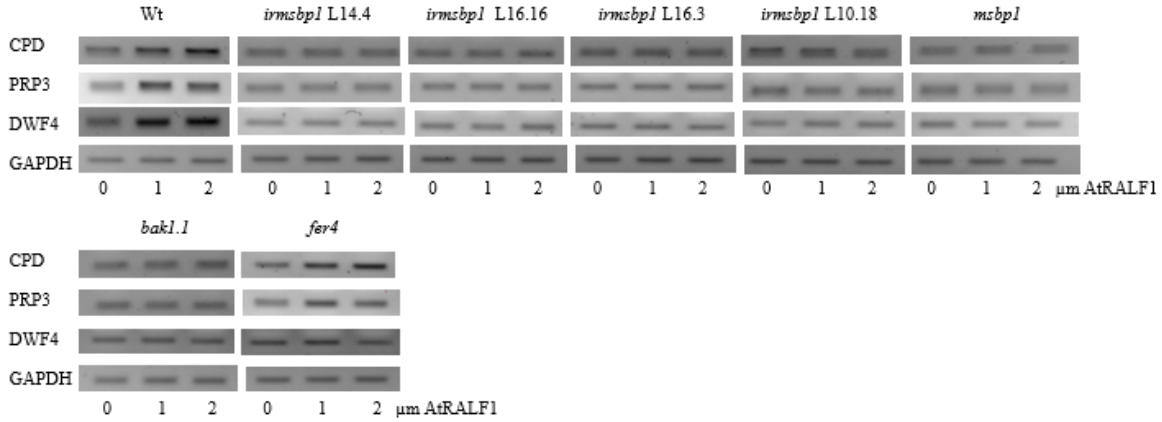


Figura 17. Análise de expressão gênica por PCR semi-quantitativo de genes induzidos por AtRALF1 em mutantes *irmsbp1* (L14.4, L16.16, L16.3, L10.18), *msbp1*, *bak1-1* e *fer4*. Plantas de arabidopsis foram crescidas por 10 d em placa vertical contendo meio MS 0,5X pH 5,6, sem sacarose/vitaminas, acrescido de 6 g/L de ágar. As condições de crescimento foram luz constante (150 µE m^{-2}. s^{-1}) a 24°C. Posteriormente, as plantas foram tratadas por 1 h com AtRALF1 (0, 1 e 2 µM). O PCR semi-quantitativo foi realizado usando o RNA total de 25 raízes de plantas para cada tratamento e as reações foram de 30 ciclos. *CPD* (At5g05690), *PRP3* (At3g62680), *DWF4*, (At3g50660), utilizando *GAPDH* (At1g13440) como controle. Este experimento é representativo de triplicatas biológicas com resultados similares.

Reações de PCR em tempo real foram utilizadas com a finalidade de quantificar as diferenças observadas na análise prévia por PCR-semi-quantitativo. Na análise quantitativa, a expressão dos genes *CPD*, *PRP3* e *DWF4* mostrou a indução causada pelo peptídeo em

plantas selvagens (Wt) já esperada e semelhante à previamente publicada (Figura 18, 19 e 20, Bergonci et al., 2014; Dressano et al., 2017). A indução do gene *CPD* em plantas selvagens após o tratamento com 1 e 2 µM de AtRALF1 foi de, aproximadamente, 4 e 5 vezes o nível encontrado em plantas não tratadas, respectivamente. A análise de expressão do gene *CPD* nos mutantes *irmsbp1L14.4, L16,16, L16.3, L10,18* e *msbp1* confirmou os resultados da análise semi-quantitativa, não apresentando indução com 1 µM e com 2 µM (Figura 18). Resultados semelhantes foram obtidos com o mutante *bak1-1*. O mutante *fer4* induziu o gene *CPD* em aproximadamente 2 e 3 vezes quando tratado com as concentrações de 1 e 2 µM, respectivamente.

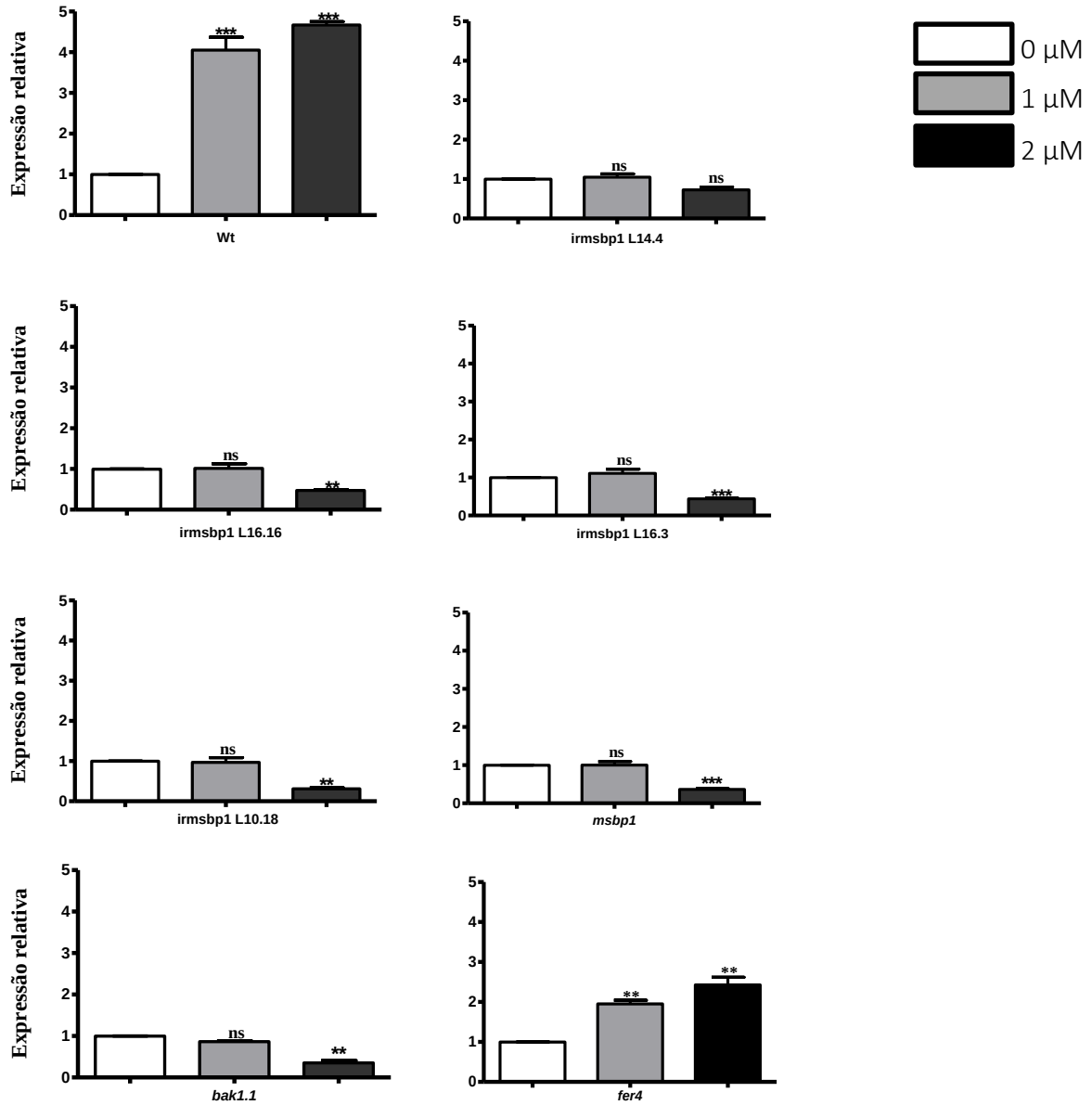
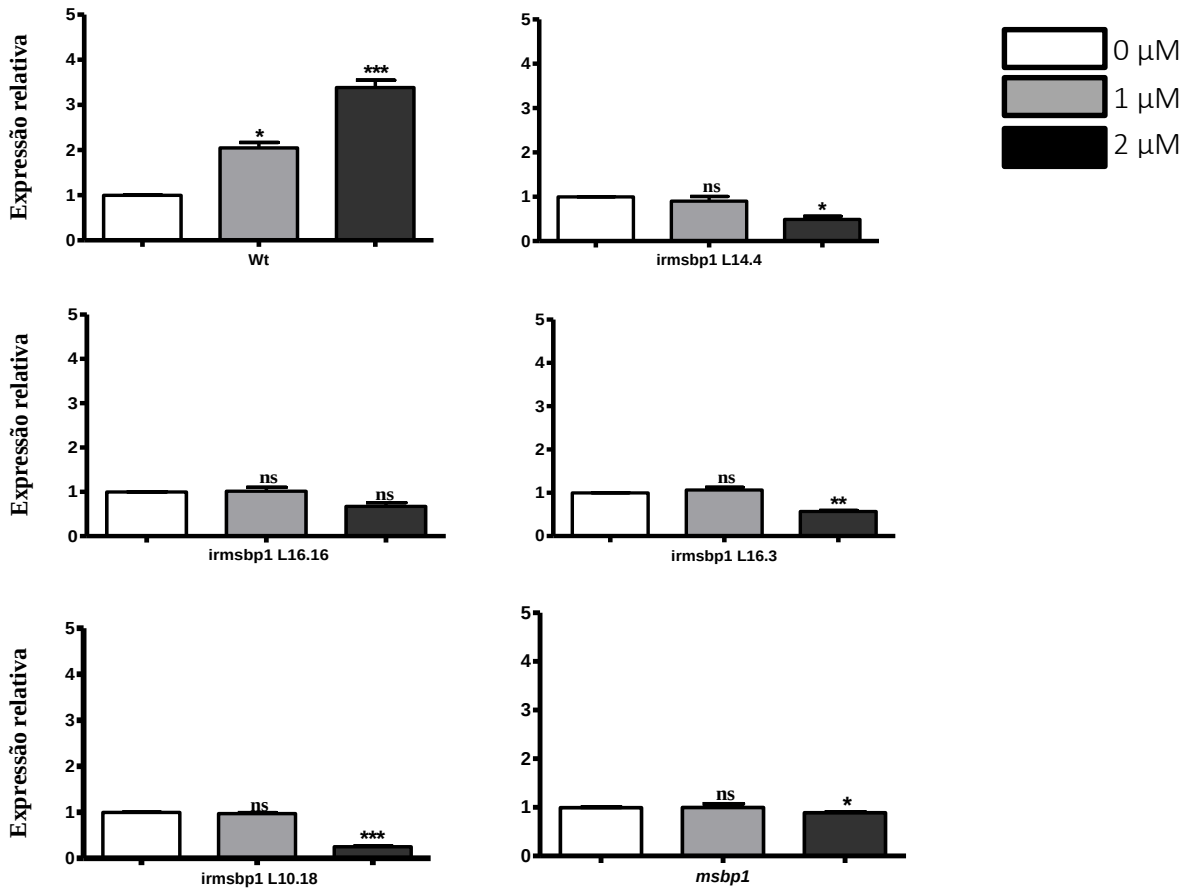


Figura 18. Análise de expressão gênica por qRT-PCR do gene *PHOTOMORPHISM AND DWARFISM (*CPD) induzido por AtRALF1 (0, 1 e 2 µM) em mutantes *irmsbp1* (L14.4, L16.16, L16.3, L10.18), *msbp1*, *bak1-1* e *fer4*. Plantas de arabidopsis foram crescidas por 10 d em placa vertical contendo meio MS 0,5X pH 5,6, sem sacarose/vitaminas, acrescido de 6 g/L de ágar. As condições de crescimento foram luz constante (150 µE m^{-2}. s^{-1}) a 24°C. Posteriormente, foram tratados por 1 h com AtRALF1 (0, 1 e 2 µM). As análises de qRT-PCR foram realizadas usando cDNA diluído 10 vezes de plantas tratada e não tratadas com o peptídeo, *Maxima SyBR Green Rox/qPCR Master Mix* (Thermo Scientific) e um *StepOne™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). O gene *GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE* (*GAPDH,* At1g13440) foi usado como controle. Reações sem cDNA foram usadas como controle negativo. Três amostras biológicas com 3 replicatas técnicas foram analisadas para cada tratamento. O ciclo limiar foi de 1,5 e a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001) foi usada para calcular o nível de expressão de cada gene. Valores representam as médias mais o desvio padrão. Este experimento é representativo de 2 repetições com resultados similares. ***, **, * significativamente diferentes entre o tratamento em relação a concentração zero do peptídeo dentro de cada genótipo pelo test t, P ≤ 0,001, 0,1 e 0,5 respectivamente. Ns, não significativo.

Nas plantas selvagens a indução gênica de *PRP3* foi de aproximadamente 2 e 4 vezes o nível encontrado em plantas não tratadas nos tratamentos com 1 e 2 µM de AtRALF1, respectivamente, em relação a plantas selvagens não tratadas (Figura 19). Os mutantes *irmsbp1L14*.4, L16,16, L16.3, L10,18 e *msbp1* não mostraram indução com 1 e com 2 µM houve uma pequena redução na expressão (Figura 19), constatado também no mutante *bak1-1*. O mutante *fer4* induziu o gene *PRP3* em aproximadamente 2 e 3 vezes mais que as plantas desse mutante não tratado.



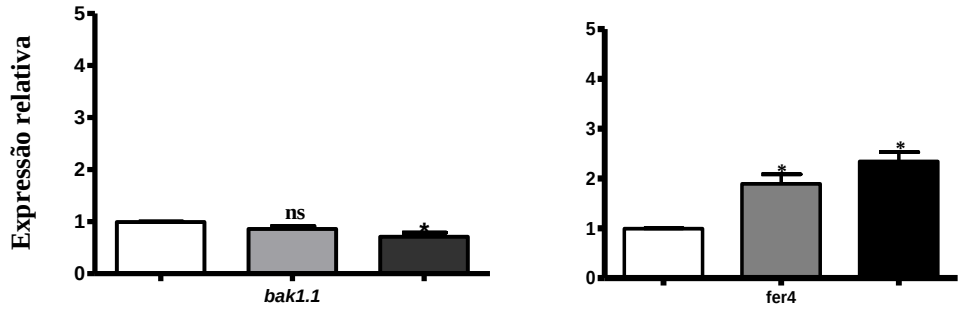


Figura 19. Análise de expressão gênica por qRT-PCR do gene *PROLINE-RICH PROTEIN (PRP3*) induzido por AtRALF1 (0, 1 e 2 µM) em mutantes *irmsbp1* (L14.4, L16.16, L16.3, L10.18), *msbp1*, *bak1-1* e *fer4*. Plantas de arabidopsis foram crescidas por 10 d em placa vertical contendo meio MS 0,5X pH 5,6, sem sacarose/vitaminas, acrescido de 6 g/L de ágar. As condições de crescimento foram luz constante (150 µE m^{-2}. s^{-1}) a 24°C. Posteriormente, foram tratados por 1 h com AtRALF1 (0, 1 e 2 µM). As análises de qRT-PCR foram realizadas usando cDNA diluído 10 vezes de plantas tratada e não tratadas com o peptídeo, *Maxima SyBR Green Rox/qPCR Master Mix* (Thermo Scientific) e um *StepOne™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). O gene *GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE* (*GAPDH,* At1g13440) foi usado como controle. Reações sem cDNA foram usadas como controle negativo. Três amostras biológicas com 3 replicatas técnicas foram analisadas para cada tratamento. O ciclo limiar foi de 1,5 e a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001) foi usada para calcular o nível de expressão de cada gene. Valores representam as médias mais o desvio padrão. Este experimento é representativo de 2 repetições com resultados similares. ***, **, * significativamente diferentes entre o tratamento em relação a concentração zero do peptídeo dentro de cada genótipo, pelo test t, P ≤ 0,001, 0,1 e 0,5 respectivamente. Ns, não significativo.

Resultados de indução também foram constatados em plantas selvagens para o gene *DWF4* em resposta aos tratamentos com 1 e 2 µM de AtRALF1, de aproximadamente, 2 e 3 vezes o nível encontrado em plantas não tratadas nos respectivamente (Figura 20). Os mutantes *irmsbp1L14*.4, L16,16, L16.3, L10,18, *msbp1, bak1-1* e *fer4* não mostraram indução com 1 e 2 µM de AtRALF1, no entanto o mutante *irmsbp1L10.18* mostrou uma redução na expressão com 2 µM de AtRALF1.

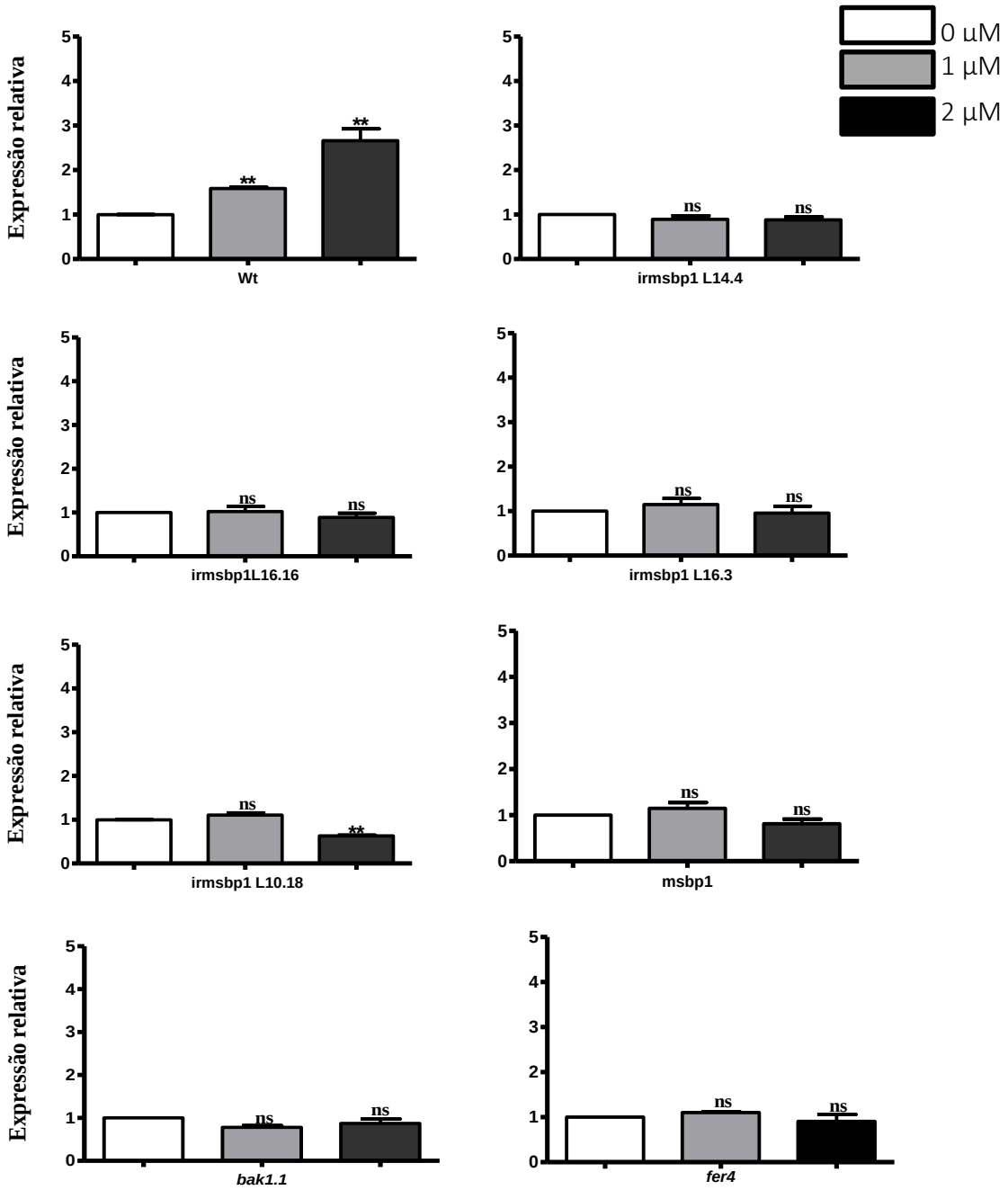


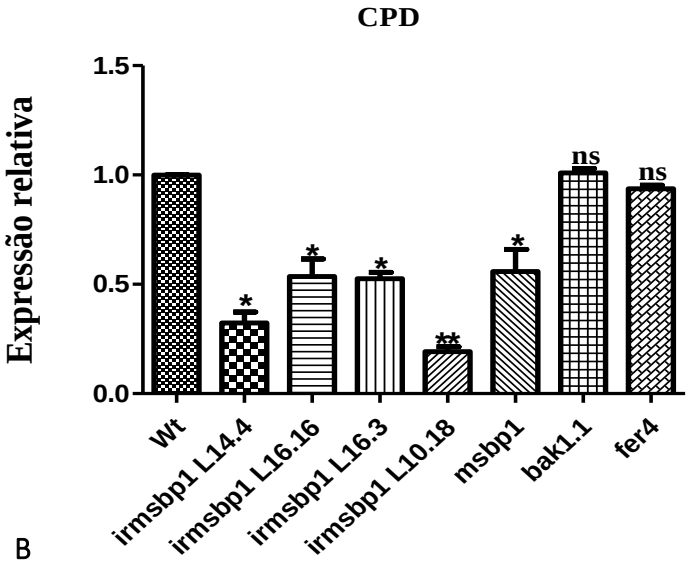
Figura 20. Análise de expressão gênica por qRT-PCR do gene *DWARF4* (*DWF4*) induzido por AtRALF1 (0, 1 e 2 µM) em mutantes *irmsbp1* (L14.4, L16.16, L16.3, L10.18), *msbp1*, *bak1-1* e *fer4*. Plantas de arabidopsis foram crescidas por 10 d em placa vertical contendo meio MS 0,5X pH 5,6, sem sacarose/vitaminas, acrescido de 6 g/L de ágar. As condições de crescimento foram luz constante (150 µE m^{-2}. s^{-1}) a 24°C. Posteriormente, foram tratados por 1 h com AtRALF1 (0, 1 e 2 µM). As análises de qRT-PCR foram realizadas usando cDNA diluído 10 vezes de plantas tratada e não tratadas com o peptídeo, *Maxima SyBR Green Rox/qPCR Master Mix* (Thermo Scientific) e um *StepOne™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). O gene *GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE* (*GAPDH,* At1g13440) foi usado como controle. Reações sem cDNA foram usadas como controle negativo. Três amostras biológicas com 3 replicatas técnicas foram analisadas para cada tratamento. O ciclo limiar foi de 1,5 e a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001) foi usada para calcular o nível de expressão de cada gene. Valores representam as médias mais o desvio padrão. Este experimento é representativo de 2 repetições com resultados similares. ***, **, * significativamente diferentes entre o

tratamento em relação a concentração zero do peptídeo dentro de cada genótipo, pelo test t, P ≤ 0,001, 0,1 e 0,5 respectivamente. Ns, não significativo.

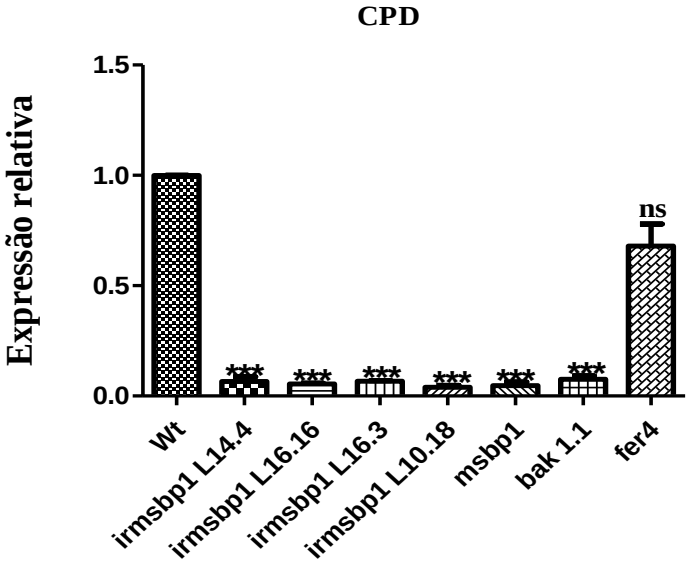
Para verificar se os níveis de expressão dos genes responsivos ao RALF1 diferiram nas diferentes concentrações dos mutantes em relação ao tipo selvagem (Wt) foram feitas as análises separadas de cada concentração do peptídeo aplicado. O nível de expressão do gene *CPD* variou entre os mutantes, onde os mutantes *irmsbp1L14*.4 e L10.18 foi, aproximadamente 0,7 e 0,8 vezes, respectivamente, e para os mutantes *irmsbp1*L16,16, L16.3, e *msbp1* foi de 0,5 vezes menor que o nível de expressão encontrado em plantas selvagens não tratadas (Figura 21A). Mutantes *bak1-1* e *fer4* não mostraram diferença no nível de indução do gene *CPD* em relação as plantas selvagens.

Com a aplicação exógena de 1 e 2 µM de AtRALF1 os mutantes *irmsbp1 L14*.4, L16,16, L16.3, L10,18, *msbp1* e *bak1-1* apresentaram um nível de expressão próximo a zero em comparação com as plantas selvagens (Figura 21B e C). O mutante *fer4* não mostrou diferença estatística no nível de expressão do *CPD* em relação as plantas selvagens em nenhumas das concentrações de AtRALF1 testadas.

A


CPD
Expressão relativa
1.5
1.0
0.5
0.0
ns
ns
*
*
*
*
**
Wt
irmsbp1 L14.4
irmsbp1 L16.16
irmsbp1 L16.3
irmsbp1 L10.18
msbp1
bak1.1
fer4

B


CPD
Expressão relativa
1.5
1.0
0.5
0.0
ns
***
***
***
***
***
***
Wt
irmsbp1 L14.4
irmsbp1 L16.16
irmsbp1 L16.3
irmsbp1 L10.18
msbp1
bak 1.1
fer4

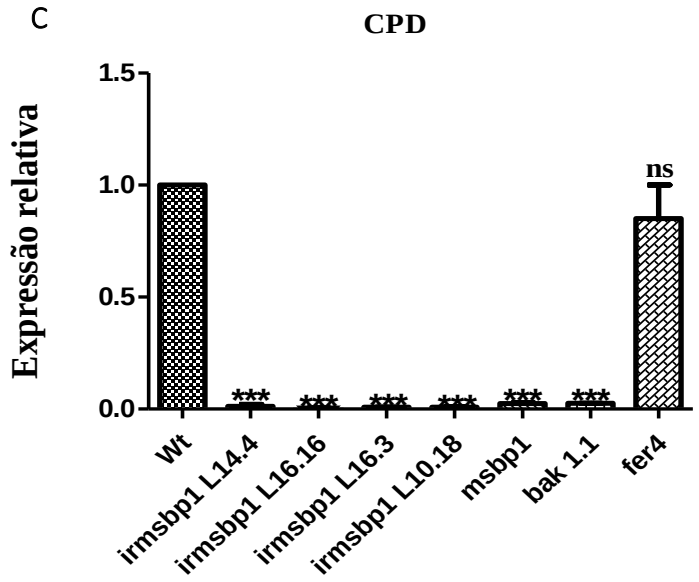
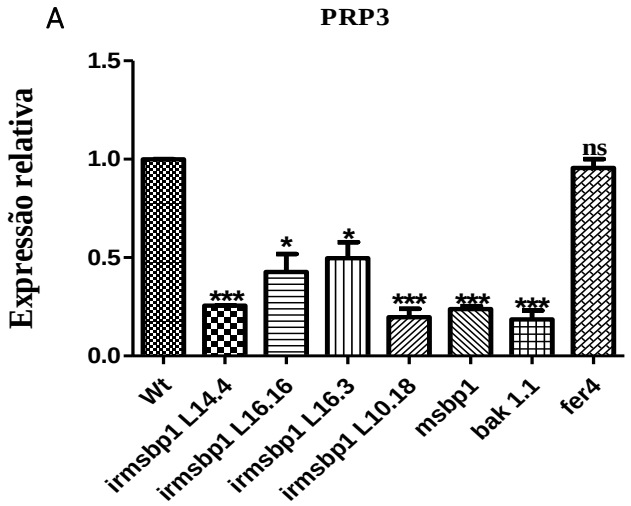


Figura 21. Análise de expressão gênica por qRT-PCR do gene *PHOTOMORPHISM AND DWARFISM (*CPD) em mutantes *irmsbp1* (L14.4, L16.16, L16.3, L10.18, *msbp1*, *bak1-1* e *fer4*). A: 0; B: 1 e C: 2 µm de AtRALF1. Plantas de arabidopsis foram crescidas por 10 d em placa vertical contendo meio MS 0,5X pH 5,6, sem sacarose/vitaminas, acrescido de 6 g/L de ágar. As condições de crescimento foram luz constante (150 µE m^{-2}. s^{-1}) a 24°C. Posteriormente, foram tratados por 1 h com AtRALF1 (0, 1 e 2 µM). As análises de qRT-PCR foram realizadas usando cDNA diluído 10 vezes de plantas tratada e não tratadas com o peptídeo, *Maxima SyBR Green Rox/qPCR Master Mix* (Thermo Scientific) e um *StepOne™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). O gene *GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE* (*GAPDH,* At1g13440) foi usado como controle. Reações sem cDNA foram usadas como controle negativo. Três amostras biológicas com 3 replicatas técnicas foram analisadas para cada tratamento. O ciclo limiar foi de 1,5 e a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001) foi usada para calcular o nível de expressão de cada gene. Valores representam as médias mais o desvio padrão. Este experimento é representativo de 2 repetições com resultados similares. ***, **, * significativamente diferentes entre o tratamento em relação ao controle (Wt), pelo test t, P ≤ 0,001, 0,1 e 0,5 respectivamente. Ns, não significativo.

Enquanto o nível de expressão do gene *PRP3* essas variações entre os mutantes, foi de aproximadamente 0,7 vezes menores nos mutantes *irmsbp1*L14,4, L10.18, *msbp1* e *bak1-1* e de 0,5 vezes menor nos mutantes *irmsbp1*L16.16 e L16.3 em relação ao nível de expressão das plantas selvagens de plantas não tratadas (Figura 22A), enquanto no mutante *fer4* não mostrou diferença no nível de indução do gene *PRP3* em relação as plantas selvagens.

Com a aplicação exógena de 1 µM de AtRALF1 os mutantes L14.4, L16,16, L16.3, L10,18, *msbp1* e *bak1-1* apresentaram um padrão no nível de expressão similar ao tratamento sem aplicação de AtRALF1, onde nos mutantes *irmsbp1*L14,4, L10.18, *msbp1* e *bak1-1* essa redução foi de 0,8 vezes menor e 0,7 vezes menor nos mutantes *irmsbp1*L16.16

e L16.3 em comparação com as plantas selvagens (Figura 22B e C). Na aplicação de 2 µM de AtRALF1 o nível de expressão foi próximo a zero em comparação com as plantas selvagens. O mutante *fer4* não mostrou diferença estatística no nível de expressão gênica do gene *PRP3* em relação as plantas selvagens em nenhumas das concentrações de AtRALF1.



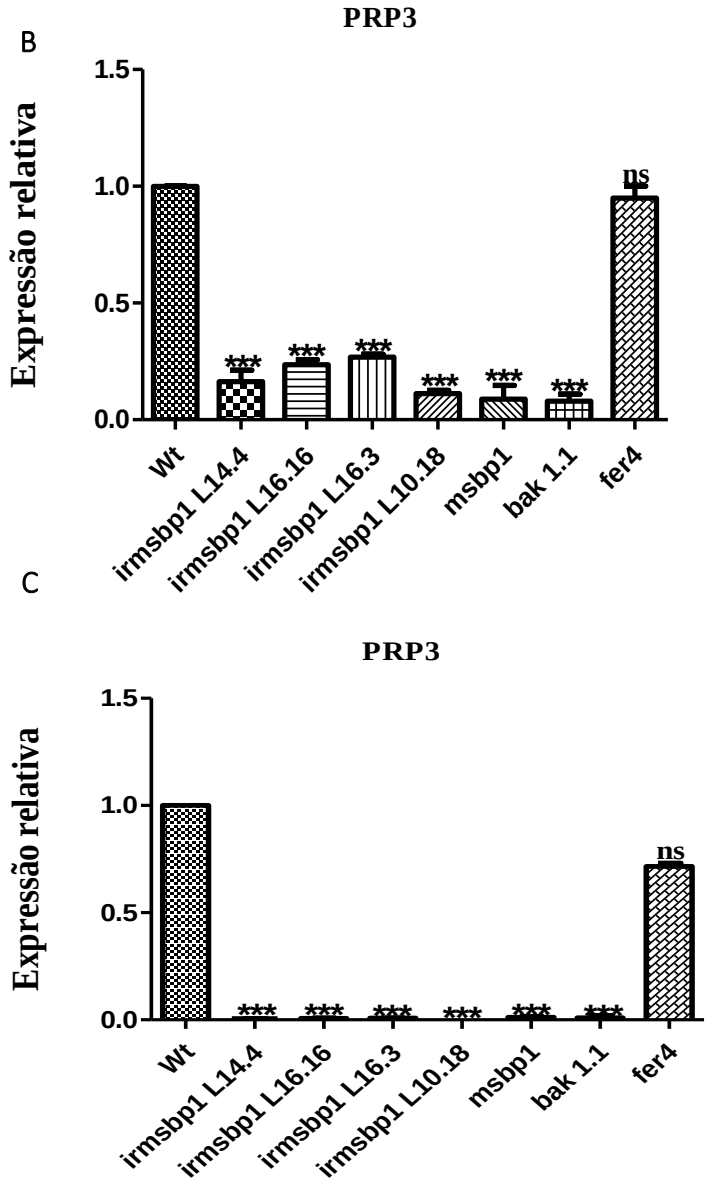
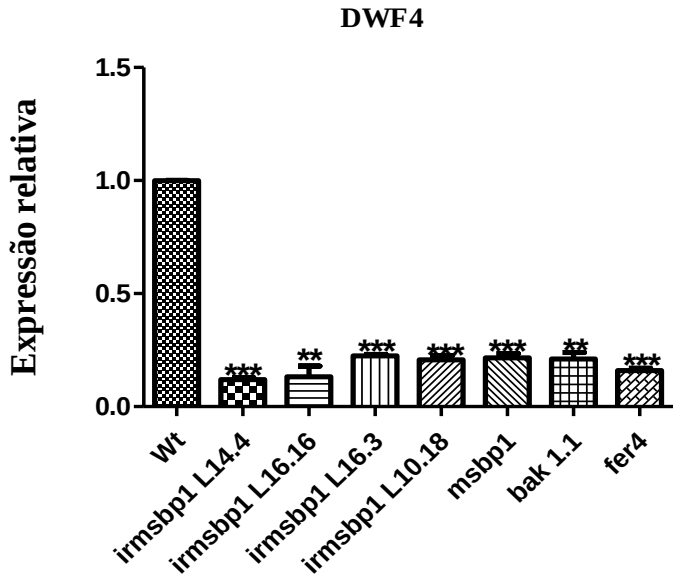


Figura 22. Análise de expressão gênica por qRT-PCR do gene PROLINE-RICH PROTEIN *(PRP3*) em mutantes *irmsbp1* (L14.4, L16.16, L16.3, L10.18, *msbp1*, *bak1-1* e *fer4*). A: 0; B: 1 e C: 2 µm de AtRALF1. Plantas de arabidopsis foram crescidas por 10 d em placa vertical contendo meio MS 0,5X pH 5,6, sem sacarose/vitaminas, acrescido de 6 g/L de ágar. As condições de crescimento foram luz constante (150 µE m^{-2}. s^{-1}) a 24°C. Posteriormente, foram tratados por 1 h com AtRALF1 (0, 1 e 2 µM). As análises de qRT-PCR foram realizadas usando cDNA diluído 10 vezes de plantas tratada e não tratadas com o peptídeo, *Maxima SyBR Green Rox/qPCR Master Mix* (Thermo Scientific) e um *StepOne™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). O gene *GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE* (*GAPDH,* At1g13440) foi usado como controle. Reações sem cDNA foram usadas como controle negativo. Três amostras biológicas com 3 replicatas técnicas foram analisadas para cada tratamento. O ciclo limiar foi de 1,5 e a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001) foi usada para calcular o nível de expressão de cada gene. Valores representam as médias mais o desvio padrão. Este experimento é representativo de 2 repetições com resultados similares. ***, **, * significativamente diferentes entre o tratamento em relação ao controle (Wt), pelo test t, P ≤ 0,001, 0,1 e 0,5 respectivamente. Ns, não significativo.

O nível de expressão do gene *DWF4* nos mutantes *irmsbp1* L14.4, L16,16, L16.3, L10,18, *msbp1, bak1-1 e fer4* foi de aproximadamente 0,7 vezes menor que o nível de expressão das plantas selvagens de plantas não tratadas (Figura 23A), e nos tratamentos com a aplicação exógena de 1 e 2 µM de AtRALF1 todos os mutantes apresentaram um nível de expressão próximo a zero em comparação com as plantas selvagens (Figura 23B e C).

Ao avaliarmos o nível de expressão gênica dos mutantes em comparação com as plantas selvagens (Wt), foi possível observar que desde o tratamento com 0 de AtRALF1 os mutantes *irmsbp1 L14*.4, L16,16, L16.3, L10,18 e *msbp1* apresentaram expressão reduzida dos genes *CPD*, *PRP3* e *DWF4* (Figura 21, 22 e 23). Com base nas análises de PCR semi-quantitativo e quantitativo foi possível observar que os genes *MSBP1* e *BAK1* são necessários para que os genes *CPD*, *PRP3* e *DWF4* sejam induzidos após o tratamento com AtRALF1.

A



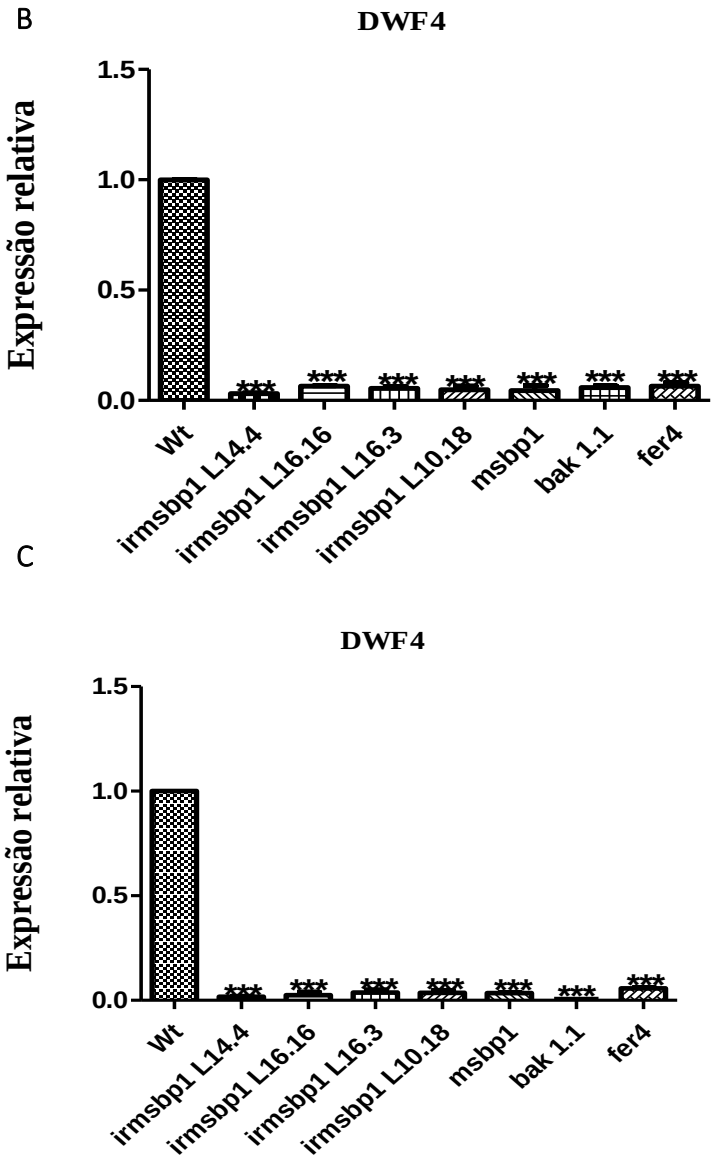


Figura 23. Análise de expressão gênica por qRT-PCR do gene *DWARF4* (*DWF4*) em mutantes *irmsbp1* (L14.4, L16.16, L16.3, L10.18, *msbp1*, *bak1-1* e *fer4*). A: 0; B: 1 e C: 2 µm de AtRALF1. Plantas de arabidopsis foram crescidas por 10 d em placa vertical contendo meio MS 0,5X pH 5,6, sem sacarose/vitaminas, acrescido de 6 g/L de ágar. As condições de crescimento foram luz constante (150 µE m^{-2}. s^{-1}) a 24°C. Posteriormente, foram tratados por 1 h com AtRALF1 (0, 1 e 2 µM). As análises de qRT-PCR foram realizadas usando cDNA diluído 10 vezes de plantas tratada e não tratadas com o peptídeo, *Maxima SyBR Green Rox/qPCR Master Mix* (Thermo Scientific) e um *StepOne™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). O gene *GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE* (*GAPDH,* At1g13440) foi usado como controle. Reações sem cDNA foram usadas como controle negativo. Três amostras biológicas com 3 replicatas técnicas foram analisadas para cada tratamento. O ciclo limiar foi de 1,5 e a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001) foi usada para calcular o nível de expressão de cada gene. Valores representam as médias mais o desvio padrão. Este experimento é representativo de 2 repetições com resultados similares. ***, **, * significativamente diferentes entre o tratamento em relação ao controle (Wt), pelo test t, P ≤ 0,001, 0,1 e 0,5 respectivamente. Ns, não significativo.

4.10 Avaliação dos genes responsivos a AtRALF1 em mutantes *35S:MSBP1*

Ao investigarmos o nível de expressão por PCR semi-quantitativo do gene *MSBP1* nos mutantes de superexpressão de *MSBP1*, foi possível constatar que a expressão foi maior nas linhagens de superexpressão em relação ao tipo selvagem (Figura 24). Os genes induzidos por AtRALF1 também apresentavam um nível de expressão maior do que as plantas selvagens (Figura 24).

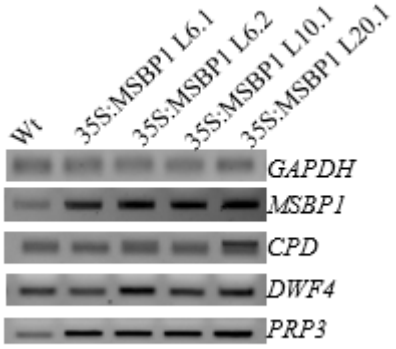
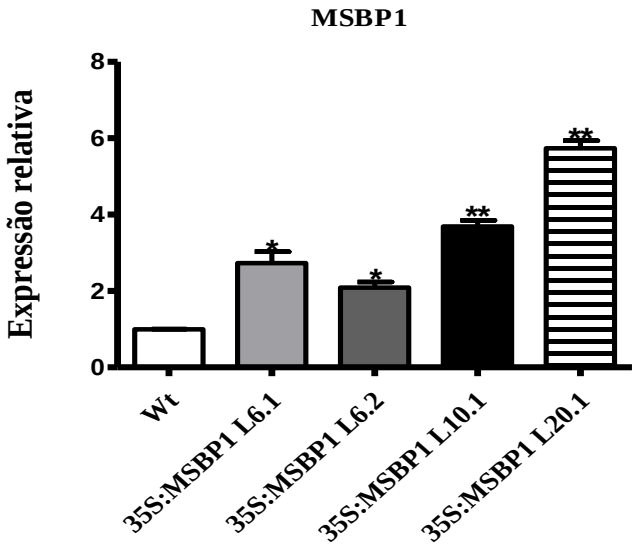
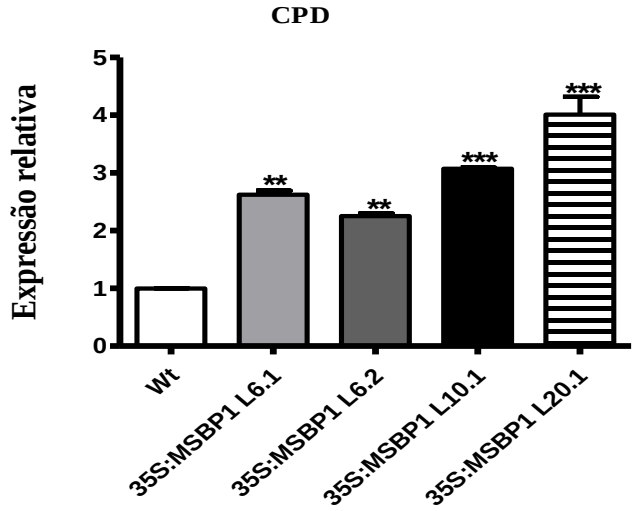


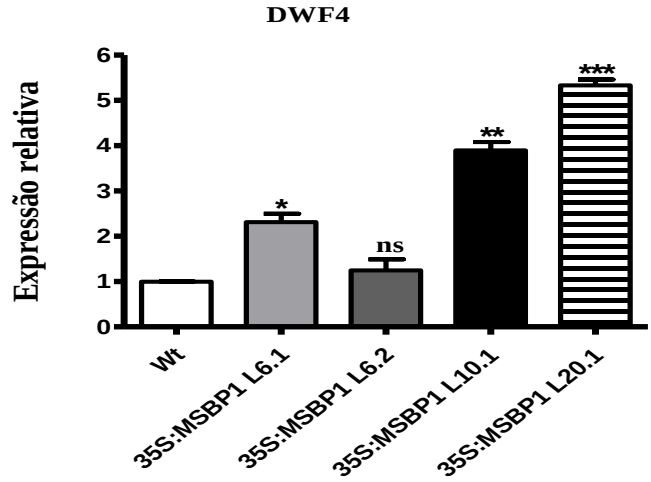
Figura 24. Análise de expressão gênica por PCR semi-quantitativo de genes induzidos por AtRALF1 em mutantes 35S:MSBP1. Plantas selvagens e mutantes 35S:MSBP1 foram tratadas por 1 h com AtRALF1 (0, 1 e 2 µM). O PCR semi-quantitativo foi realizado usando o RNA total de 25 raízes de plantas para cada tratamento e as reações foram de 30 ciclos. A expressão gênica de *GAPDH, GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE* (At1g13440), foi usada como controle. *MSBP1,* MEMBRANE STEROID BINDING PROTEIN-1 (At5g52240) *PRP3*, *PROLINE-RICH PROTEIN* (At3g62680); *CPD, CONSTITUTIVE PHOTOMORPHISM AND DWARFISM* (At5g05690) e *DWF4, DWARF4* (At3g50660). Este experimento é representativo de triplicatas biológicas com resultados similares.

A análise quantitativa da expressão do gene *MSBP1* confirmou o resultado do semi-quantitativo, onde os mutantes *irmsbp1L6*.1, L6.2, L10.1, L20.1 mostraram a indução do gene em aproximadamente 2, 2, 4 e 6 vezes o nível de expressão encontrado no tipo selvagem respectivamente (Figura 25).

A expressão do gene *CPD* foi de aproximadamente 3, 2, 3 e 4 vezes maior nos mutantes 35S:MSBP1 (L6.1, L6.2, L10.1, L20.1, respectivamente) do que em plantas do tipo selvagem. Para o gene *PRP3* foi de 3, 2, 10 e 11 vezes e para o gene *DWF4* foi de 3, 1,5, 4 e 6 vezes mais expressos do que em plantas selvagens. No entanto, para o gene *DWF4,* a linhagem L6.2 não apresentou diferença estatística das plantas selvagens (Figura 25).


MSBP1
Expressão relativa
0
2
4
6
8
*
*
**
**
Wt
35S:MSBP1 L6.1
35S:MSBP1 L6.2
35S:MSBP1 L10.1
35S:MSBP1 L20.1


CPD
Expressão relativa
0
1
2
3
4
5
**
**
***
***
Wt
35S:MSBP1 L6.1
35S:MSBP1 L6.2
35S:MSBP1 L10.1
35S:MSBP1 L20.1


DWF4
Expressão relativa
0
1
2
3
4
5
6
*
ns
**
***
Wt
35S:MSBP1 L6.1
35S:MSBP1 L6.2
35S:MSBP1 L10.1
35S:MSBP1 L20.1

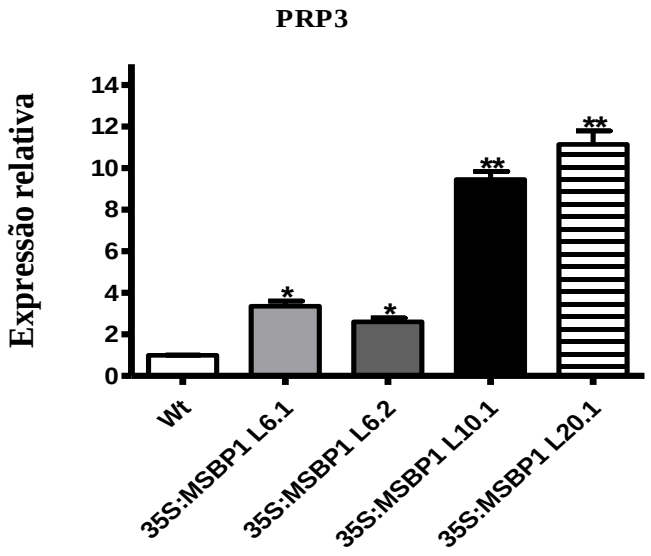


Figura 25. Análise de expressão gênica por qRT-PCR dos genes: MEMBRANE STEROID BINDING PROTEIN-1 (*MSBP1*), *PHOTOMORPHISM AND DWARFISM* (*CPD*), *DWARF4* (*DWF4*) e PROLINE-RICH PROTEIN (*PRP3*) em mutantes 35S:MSBP1(L6.1, L6.2, L10.1, L20.1), sem aplicação de AtRALF1. Plantas de arabidopsis foram crescidas por 10 d em placa vertical contendo meio MS 0,5X pH 5,6, sem sacarose/vitaminas, acrescido de 6 g/L de ágar. As condições de crescimento foram luz constante (150 µE m^{-2}. s^{-1}) a 24°C. As análises de qRT-PCR foram realizadas usando cDNA diluído 10 vezes, *Maxima SyBR Green Rox/qPCR Master Mix* (Thermo Scientific) e um *StepOne™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). O gene *GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE* (*GAPDH,* At1g13440) foi usado como controle. Reações sem cDNA foram usadas como controle negativo. Três amostras biológicas com 3 replicatas técnicas foram analisadas para cada tratamento. O ciclo limiar foi de 1,5 e a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001) foi usada para calcular o nível de expressão de cada gene. qRT-PCR foi realizado usando o RNA total de raízes de plantas não tratadas ou tratadas com o peptídeo. Valores representam as médias mais o desvio padrão. ***, **, * diferenças significativas pelo test t, P ≤ 0,001, 0,1 e 0,5 respectivamente. Ns, não significativo. Este experimento é representativo de 2 repetições com resultados similares.

O nível de expressão gênica de *MSBP1* nos mutantes de silenciamento de *irmsbp1*(L14.4, L16,16, L16.3, L10,18 e *msbp1*) foram menores que em plantas selvagens (Wt). O mutante *bak1-1* também apresentou um nível de expressão inferior ao Wt, enquanto no mutante *fer4* não houve diferença no nível de expressão em relação ao tipo selvagem (Figura 26).

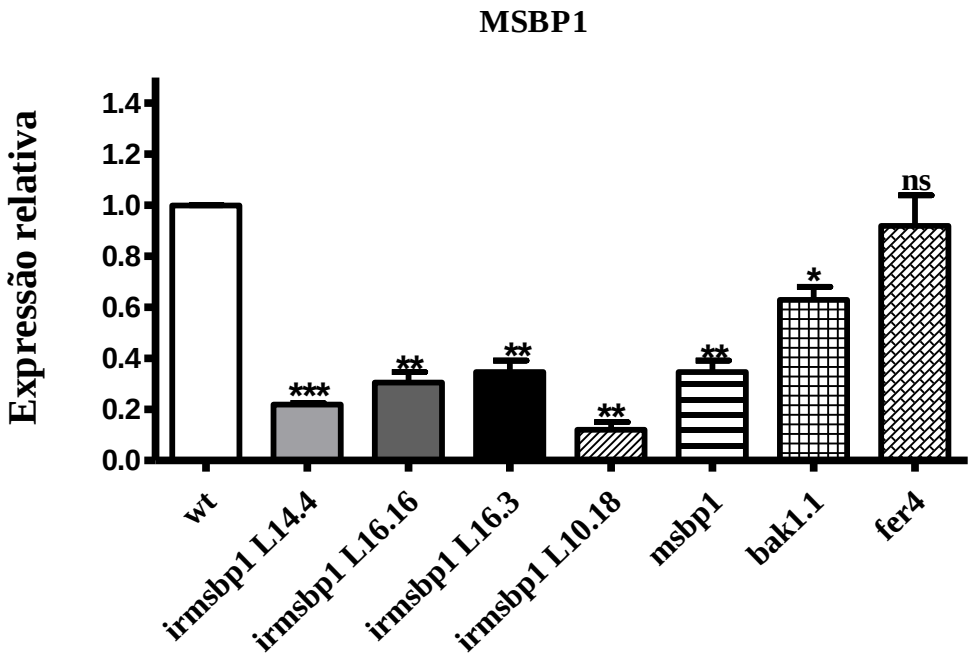


Figura 26. Análise de expressão gênica por qRT-PCR do gene MEMBRANE STEROID BINDING PROTEIN-1 (*MSBP1*) em mutantes *irmsbp1* (L14.4, L16.16, L16.3, L10.18), *msbp1*, *bak1-1* e *fer4*. Plantas de arabidopsis foram crescidas por 10 d em placa vertical contendo meio MS 0,5X pH 5,6, sem sacarose/vitaminas, acrescido de 6 g/L de ágar. As condições de crescimento foram luz constante (150 µE m^{-2}. s^{-1}) a 24°C. As análises de qRT-PCR foram realizadas usando cDNA diluído 10 vezes, *Maxima SyBR Green Rox/qPCR Master Mix* (Thermo Scientific) e um *StepOne™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). O gene *GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE* (*GAPDH,* At1g13440) foi usado como controle. Reações sem cDNA foram usadas como controle negativo. Três amostras biológicas com 3 replicatas técnicas foram analisadas para cada tratamento. O ciclo limiar foi de 1,5 e a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001) foi usada para calcular o nível de expressão de cada gene. Valores representam as médias mais o desvio padrão. ***, **, * diferenças significativas pelo test t, P ≤ 0,001, 0,1 e 0,5 respectivamente. Ns, não significativo. Este experimento é representativo de 2 repetições com resultados similares.

A avaliação do nível de expressão gênica de *MSBP1* por PCR semi-quantitativo, mostrou que AtRALF1 induz a expressão de *MSBP1* em plantas selvagens e mutantes *fer4* nas duas concentrações testadas (Figura 27). Já no mutante *bak1-1* não foi observado indução do gene *MSBP1*.

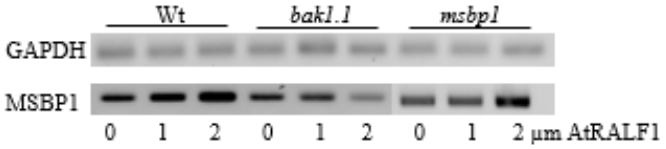


Figura 27. Análise de expressão gênica por PCR semi-quantitativo do gene MEMBRANE STEROID BINDING PROTEIN-1 (*MSBP1*) em Wt, *bak1-1* e *fer4*. Plantas de *arabidopsis* foram crescidas por 10 d em placa vertical contendo meio MS 0,5X pH 5,6, sem sacarose/vitaminas, acrescido de 6 g/L de ágar. As condições de crescimento foram luz constante (150 µE m^{-2}. s^{-1}) a 24°C. Posteriormente, foram tratados por 1 h com AtRALF1 (0, 1 e 2 µM). O PCR semi-quantitativo foi realizado usando o RNA total de 25 raízes de plantas para cada tratamento e as reações foram de 30 ciclos. A expressão gênica de *GAPDH, GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE* (At1g13440), foi usada como controle. Este experimento é representativo de triplicatas biológicas com resultados similares.

Ao realizarmos a análise quantitativa, foi confirmado os dados do semi-quantitativo, onde o nível de expressão de *MSBP1* foi de 4,5 e 5 vezes maiores no Wt tratados com 1 e 2 µM respectivamente (Figura 28). Em *fer4* esse aumento no nível de expressão foi de, aproximadamente, 1,5 e 4 vezes em relação ao mutante não tratado. Em *bak1-1* não foi observado indução.

Assim como *BAK1* é essencial para AtRALF1 induzir os genes *PRP3*, *CPD* e *DWF4, BAK1* também é necessário para a indução do gene *MSBP1*.

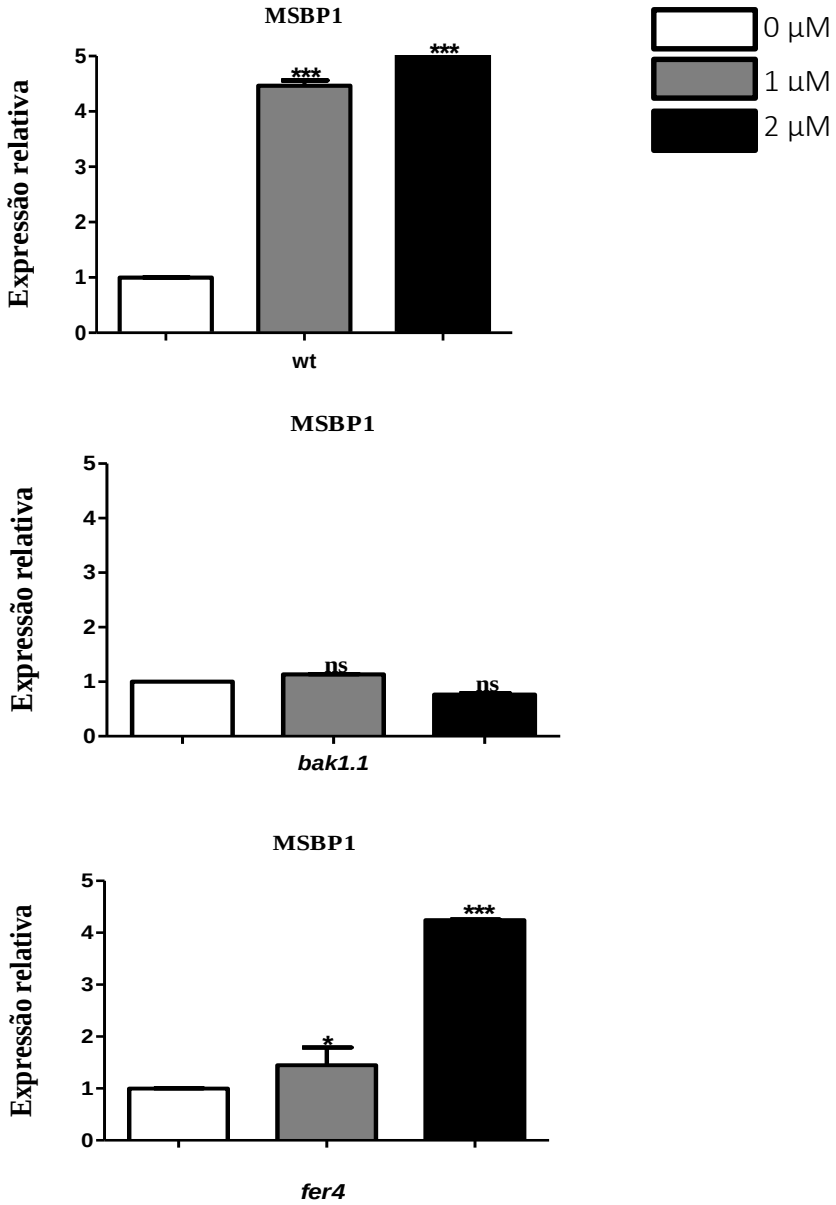


Figura 28. Análise de expressão gênica por qRT-PCR do gene MEMBRANE STEROID BINDING PROTEIN-1 (*MSBP1*) induzido por AtRALF1 em Wt, *bak1-1* e *fer4*. Plantas de arabidopsis foram crescidas por 10 d em placa vertical contendo meio MS 0,5X pH 5,6, sem sacarose/vitaminas, acrescido de 6 g/L de ágar. As condições de crescimento foram luz constante (150 µE m^{-2}. s^{-1}) a 24°C. Posteriormente, foram tratados por 1 h com AtRALF1 (0, 1 e 2 µM). As análises de qRT-PCR foram realizadas usando cDNA diluído 10 vezes de plantas tratada e não tratadas com o peptídeo, *Maxima SyBR Green Rox/qPCR Master Mix* (Thermo Scientific) e um *StepOne™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). O gene *GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE* (*GAPDH,* At1g13440) foi usado como controle. Reações sem cDNA foram usadas como controle negativo. Três amostras biológicas com 3 replicatas técnicas foram analisadas para cada tratamento. O ciclo limiar foi de 1,5 e a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001) foi usada para calcular o nível de expressão de cada gene. Valores representam as médias mais o desvio padrão. ***, **, * diferenças significativas pelo test t, P ≤ 0,001, 0,1 e 0,5 respectivamente. Ns, não significativo. Este experimento é representativo de 2 repetições com resultados similares.

5 DISCUSSÃO

A proteína MSBP1, do inglês MEMBRANE STEROID BINDING PROTEIN-1, foi caracterizada como uma proteína que interage com BAK1 e participa, desta forma, na regulação negativa da expansão celular e da sinalização de BRs em *A. thaliana* (Song et al., 2009). O peptídeo AtRALF1 inibe a expansão celular, atuando de forma antagônica aos brassinosteróides (BRs) (Bergonci et al., 2014). Com mecanismo distinto, mas com mesmo efeito, a proteína MSBP1 foi descrita como inibidora da expansão celular devido ao aumento da endocitose da proteína de membrana co-receptora de BR, BAK1 (Yang et al., 2005; Song et al., 2009). O objetivo deste trabalho foi elucidar o papel da MSBP1 nas respostas mediadas por AtRALF1 e integrar a proteína MSBP1 na via de sinalização do AtRALF1.

Ao testarmos a interação física das proteínas por meio do duplo híbrido de levedura constatamos que a proteína MSBP1 interage com o peptídeo AtRALF1 (Figura 4) e com os domínios extracelulares de BAK1 e CML38 (Figura 5A e B). Essas interações também foram confirmadas no teste de transativação do gene repórter LacZ. Ainda foi possível comprovar que MSBP1 não interagiu com homólogos dessas proteínas interagentes (AtRALF34, CML39 e BAK7), mostrando especificidade dessas interações. Nos estudos de Song et al. (2009), os autores comprovaram a interação de MSBP1 com BAK1 por meio do sistema de duplo híbrido, mostrando que esta interação se dá pelo domínio extracelular da proteína e não pelo domínio quinase intracelular.

Também foi constatado que o domínio extracelular de BAK1 e CML38 interagem com AtRALF1 tanto no sistema de duplo híbrido de levedura, quanto no teste com X-Gal, confirmando os dados da literatura (Dressano et al., 2017; Campos et al., 2018, respectivamente).

De acordo com esses dados o peptídeo AtRALF1 teria um papel de ligante chave dessas interações, sugerindo um possível complexo dessas proteínas (BAK1, MSBP1 e CML38).

Pouco se sabe sobre os receptores dos peptídeos RALFs, alguns receptores já foram identificados, sendo esses, membros da família *Catharanthus roseus* RECEPTOR-LIKE KINASE 1-LIKE (CrRLK1L) como o receptor FERONIA (FER) para o peptídeo AtRALF1 (Haruta et al., 2014) e para AtRALF23 (Stegmann et al., 2017), os receptores ANX1/2 e BUPS1/2 para

AtRALF4 e AtRALF19 (Ge et al., 2018), e o receptor THESEUS1 para o AtRALF23 (Gonneau et at., 2018).

A marcação de AtRALF1 com o radioisótopo ^{125}I e incubação com a membrana plasmática isolada do mutante *fer4*, apresentou uma redução da marcação das membranas em torno de 40% (Haruta et al., 2014). Enquanto o peptídeo AtRALF1 marcado com acridíneo quimioluminescente demonstraram que o receptor BAK1 é responsável por aproximadamente 30% da ligação de AtRALF1 nas raízes intactas e 15% da ligação de AtRALF1 nas frações microssomais (Dressano et al., 2017). Os dados de marcação com o peptídeo AtRALF1 com FER e BAK1 foram responsáveis por 70% na redução da ligação específica do peptídeo, sugerindo a existência de outra ou mais proteínas que possam atuar no reconhecimento do peptídeo (Dressano et al., 2017).

Os mutantes de silenciamento do gene *MSBP1* apresentaram raiz e parte aéreas maiores do que as plantas selvagens (Figura 7) e, de forma esperada, os mutantes de superexpressão apresentaram raiz e parte aéreas menores em relação as plantas selvagens (Figura 8). Já havia sido constatado em outro estudo, que plantas transgênicas superexpressando *MSBP1* apresentaram hipocótilo curto e aumentaram a capacidade de ligação a esteróides em frações de membrana, já plantas transgênicas antisenso para *MSBP1* mostraram hipocótilos longos e capacidade reduzida de ligação a esteróides, indicando que a *MSBP1* regula, negativamente, o alongamento do hipocótilo (Yang et al., 2005). Os autores ainda mostraram que as células do hipocótilo dos mutantes de silenciamento eram maiores que as células do tipo selvagem e que a superexpressão gerou células menores. Neste estudo também foi observado esse comportamento em células endodérmicas das raízes, onde os mutantes de silenciamento apresentaram um aumento na expansão acima de 38% em relação ao tipo selvagem (Figura 10).

Plantas que superexpressam *AtRALF1* também apresentam fenótipo semi-anãs e redução do crescimento radicular, enquanto que as plantas de silenciamento apresentaram maior crescimento radicular (Matos et al., 2008; Bergonci et al., 2014a). Esses resultados encontrados para o silenciamento de *MSBP1* também foram observados em células endodérmicas do mutante de silenciamento do peptídeo AtRALF1 (Bergonci et al., 2014),

sugerindo assim que MSBP1, a exemplo de AtRALF1, age de forma antagônica a via do hormônio BL, inibindo a expansão celular da endoderme.

Com a aplicação exógena de diferentes concentrações do peptídeo AtRALF1 nos mutantes com perda de função na proteína MSBP1 foi possível observar que, em baixas concentrações de peptídeo exógeno, MSBP1 é essencial para a atividade de inibição radicular causada pelo peptídeo (Figura 11). Ao passo que em concentração maior essa insensibilidade não foi observada, fato esse que pode ser decorrente de uma pequena produção da proteína que estaria respondendo a uma superdose do peptídeo aplicada exógenamente, visto que o mutante apresenta *MSBP1* silenciado. Já em mutantes nocaute para o gene *BAK1*, houve insensibilidade mesmo em altas concentrações de AtRALF1 aplicadas exogenamente (Dressano et al., 2017).

Essa insensibilidade parcial dos mutantes não foi observada com a aplicação de outros RALFs, ou seja, AtRALF19, AtRALF23 e AtRALF34, que foram capazes de causar inibição de raiz primária de mutantes de silenciamento de *MSBP1* e mutante *msbp1* (Figura 13). Além disso, os mutantes mostraram sensibilidade após tratamento com os hormônios auxina e citocinina (Figura 14), mostrando assim que a insensibilidade parcial dos mutantes com perda de função na proteína MSBP1 é uma resposta específica ao peptídeo AtRALF1. Dressano et al., 2017 também constataram a especificidade dos mutantes *bak1* ao peptídeo AtRALF1 quando aplicaram exogenamente os hormônios auxina e citocinina.

Nos mutantes de superexpressão de *MSBP1* foi possível ver um efeito contrário, em que a aplicação de diferentes concentrações de AtRALF1 intensificou a inibição do crescimento da raiz, indicando assim que MSBP1 é um regulador positivo da via de sinalização do peptídeo AtRALF1 (Figura 12).

Ao aplicar diferentes concentrações do hormônio BL em mutantes de silenciamento, em baixas concentrações BL estimulou o crescimento das raízes, enquanto que em altas concentrações os mutantes apresentaram insensibilidade ao efeito inibitório de BL, respondendo com um aumento do crescimento da raiz em baixas concentrações (Figura 15).

Os resultados de expressão dos genes responsivos ao AtRALF1 confirmam esse efeito positivo da proteína MSBP1 na via de AtRALF1, em que os genes *PRP3, CPD* e *DWF4* não foram induzidos em mutantes *msbp1* após tratamento com o peptídeo, indicando que na

ausência desta proteína, AtRALF1 não é percebido (Figura 17, 18, 19, 20, 21, 22 e 23). Resultados similares foram encontrados em mutantes com perda de função na proteína *BAK1* (Dressano et al., 2017). O mutante *fer4* mostrou um aumento da expressão destes genes com a aplicação do peptídeo. Estes dados indicam funções diferentes de BAK1 e FER4 para inibição da expansão celular, sugerindo a existência de vias de resposta ao peptídeo AtRALF1. O possível complexo formado por BAK1, CML38 e MSBP1 tem uma resposta parecida na indução destes genes na regulação negativa da expansão celular. Enquanto FER4 está mais implicado com o fluxo de íons, alcalinização e em última instância a inibição da expansão celular.

Esses dados corroboram com Dressano et al., 2017, onde os autores também sugeriram a existência de vias em resposta ao peptídeo, pois constataram que a alcalinização e a mobilização de Ca^{2+} induzida por AtRALF1 são independentes do gene *BAK1*. Vias distintas envolvidos na sinalização BR também foram sugeridos com base na resposta de Ca^{2+} e expressão gênica (Zhao; Qi; Berkowitz, 2013).

Outro estudo mostrou que MSBP1 regula, negativamente, fatores relacionados com a elongação celular como o gene *AtEXP1*, resultando em um fenótipo de células menores (Yang et al., 2005), enquanto AtRALF1 regula, negativamente, a expressão do gene *AtEXP5* (Bergonci et al., 2014). Seria interessante avaliar, no futuro, o efeito de *MSBP1* no gene *AtEXP5*.

Constatamos que AtRALF1 induz o gene *MSBP1* (Figura 27 e 28), essa indução por AtRALF1 também foi observada para *BAK1* (Dressano et al., 2017). É comum ligantes induzirem seus receptores (Jeong et al., 2010; Yamaguchi et al., 2010). Embora MSBP1 não se caracterize como receptor, ao verificarmos se há indução de *MSBP1* em mutantes *bak1-1*, curiosamente, observamos que *BAK1* é essencial para que haja indução do gene *MSBP1*, o que sugere a formação do complexo BAK1-AtRALF1-MSBP1.

A aplicação de diferentes hormônios como auxina, brassinosteróide, giberelina, citocinina, ácido absiscico em plantas de arabidopsis não resultou na indução de *MSBP1* (Yang et al., 2005).

Ao verificarmos como os mutantes com perda de função de MSBP1 respondem ao peptídeo em ensaio de alcalinização de raiz, foi possível observar que MSBP1 não é

necessária para a atividade de alcalinização causada por AtRALF1 (Figura 16), resultado similar ao obtido previamente com mutantes *bak1* (Dressano et al., 2017). Os resultados sugerem que tanto MSBP1 como BAK1 estão envolvidos com respostas de inibição de raiz, mas que não estão envolvidos com as atividades de alcalinização do meio extracelular. Tal similaridade de funções, além do fato de BAK1, MSBP1 e AtRALF1 interagirem em ensaio de duplo-híbrido, podem indicar uma possível formação de complexo entre estas proteínas.

Ainda foi mostrado que BAK1 também não é necessário para mobilização de Ca^{2+} (Dressano et al., 2017), no entanto, o receptor FERONIA é necessário tanto para a atividade de alcalinização como para a de mobilização de Ca^{2+} causada por AtRALF1 (HARUTA et al., 2014).

Em estudos com AtRALF34, o receptor FERONIA é parcialmente requerido pelo receptor THESEUS1 para que o AtRALF34 regule as divisões celulares do periciclo durante a iniciação da formação de raízes laterais em arabidopsis (Murph et al., 2016; Gonneau et al., 2018) e o receptor THESEUS1 em conjunto com FERONIA inibem o crescimento de raízes, ativam a alcalinização e a mobilização de Ca^{2+} causada por AtRALF1. Em outro estudo, RALF e ABA atuam em conjunto ativando o receptor FERONIA e inibindo o crescimento radicular (Chen et al., 2016), desempenhando um papel crítico na resistência aos estresses abióticos. Por outro lado, o receptor FERONIA em conjunto com THESEUS1 e HERCULES1 estão envolvidos na elongação celular (Guo et al., 2009).

A interação do peptídeo AtRALF1 com o receptor FERONIA inibe o crescimento em determinadas condições e a formação do complexo aqui proposto (MSBP1, BAK1, CML38 e AtRALF1) seria outra via de sinalização, visto que nenhuma das proteínas do possível complexo está relacionada com a alcalinização. No entanto, futuros estudos devem ser realizados para analisar se MSBP1 é necessária para a atividade de mobilização de Ca^{2+} e se o receptor FERONIA estaria associado com a formação desse complexo de proteínas.

Os resultados permitem elaborar um modelo ou hipótese de ação do peptídeo AtRALF1 que integraria a proteína MSBP1 (Figura 29). Os hormônios BR ligam-se ao receptor de membrana BRI1, levando a autofosforilação do domínio quinase e sua ativação (Wang et al., 2001). Muitos receptores quinases com repetições ricas em leucina (LRR-RKs) necessitam de

coreceptores da família SERK para a ligação do ligante (Hohmann et al., 2018), no entanto, BR consegue se ligar ao receptor BRI1 mesmo sem a proteína coreceptora.

Na ausência de AtRALF1 e em pH apoplástico ácido, o complexo BL/BRI1 recruta o co-receptor BAK1 formando um novo complexo onde ocorre fosforilação cruzada entre BRI1 e BAK1, causando as respostas já conhecidas ao brassinosteróide brassinolide-BL (Sun et al., 2013).

Na presença de AtRALF1, o peptídeo liga-se ao receptor FERONIA causando não somente a sua fosforilação, mas também a de outras proteínas como a AHA2 (Haruta et al., 2014). A AHA2, uma vez fosforilada, é inibida, levando a uma alcalinização do apoplasto que por sua vez leva a dissociação do complexo BRI1-BL-BAK1 (Sun et al., 2013). Após a dissociação deste complexo BRI1-BL-BAK1, a proteína BAK1 estaria livre para se ligar ao peptídeo AtRALF1. Simultaneamente e de forma independente, AtRALF1 liga-se a MSBP1, que agora poderia formar um novo complexo com BAK1. A formação deste novo complexo levaria a inibição das respostas a BL e culminaria na inibição da expansão celular e consequente inibição de crescimento de raiz primária. Song e colaboradores propõem que MSBP1 funcionaria como regulador negativo da expansão celular através do aumento da endocitose de BAK1 (Song et al 2009), interessante salientar que no modelo proposto, não há um mecanismo claro de dissociação do complexo BAK1/BRI1. No presente modelo, é proposto o mecanismo de dissociação, ligação de AtRALF1 a FERONIA, e o papel do AtRALF1 poderia ser de uma molécula cola, auxiliando na formação do complexo.

Futuros estudos devem ser realizados para analisar se realmente há a formação de um complexo proteico que envolve AtRALF1, BAK1, CML38 e MSBP1 *in planta*, e se tal complexo incluiria o receptor FERONIA.

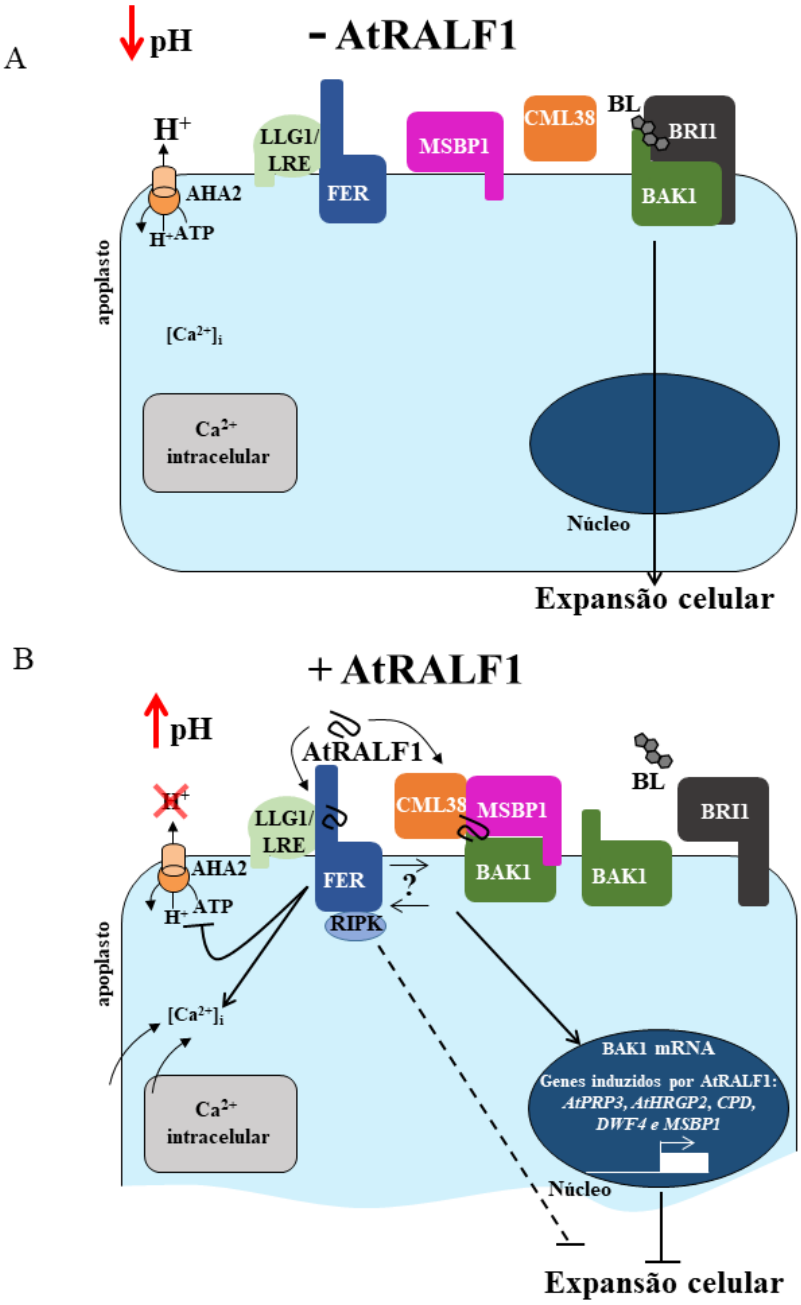


Figura 29. Modelo proposto para a ação do AtRALF1. Na ausência de AtRALF1, brassinolide (BL) liga-se a BRI1, ativando-o e iniciando a resposta parcial ao BL por autofosforilação. BRI1 ativado recruta BAK1 formando o complexo BRI1/BL/BAK1. Este complexo é dependente do pH ácido do apoplasto e fosforilações cruzadas entre BRI1 e BAK1 ativam totalmente a resposta ao BL. Quando presente, AtRALF1 liga-se a FERONIA (FER), mobiliza íons cálcio e inativa a H^+-ATPase AHA2, elevando o pH do apoplasto, desfazendo o complexo BRI1/BL/BAK1. AtRALF1 então liga-se a MSBP1 e forma um novo complexo com BAK1. A formação deste complexo AtRALF1/CML38/MSBP1/BAK1 induz a endocitose de BAK1 e desencadearia outras respostas intracelulares que levariam a inibição da expansão celular e supressão das respostas ao BL. Outros elementos da via de sinalização em resposta a BL foram omitidos para fins de clareza.

6 CONCLUSÕES

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

Os resultados que sustentam essas conclusões:

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

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

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

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

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

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

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

CAO, J.; SHI, F. Evolution of the *RALF* Gene Family in Plants: Gene Duplication and Selection Patterns. **Evolutionary Bioinformatics**. v.8, p.271-292, 2012.

CAMPOS, W.F; DRESSANO, K.; CECILIATO, P.H.; GUERRERO-ABAD, J.C.; SILVA, A.L.; FIORI, C.S.; CANTO, A.M.; BERGONCI, T.; CLAUS, L.A.; FILHO, M.C.S.; MOURA, D.S. Arabidopsis thaliana rapid alkalinization factor 1-mediated root growth inhibition is dependent on calmodulin-like protein 38. **JBC**, v. 293, p. 2159-2171, 2018.

CAÑO-DELGADO, A.; YIN, Y.; YU, C.; VAFEADOS, D.; MORA-GARCIA, S.; CHENG, J.C.; NAM, K.H.; LI, J.; CHORY, J. BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in *Arabidopsis*. **Development**, v. 131, p. 5341–5351. 2004.

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

CHEN, J.; YU, F.; LIU, Y.; DU, C.; LI, X.; ZHU, S.; WANG, X.; LAN, W.; RODRIGUEZ, P. L.; LIU, X.; LI, D.; CHEN, L.; LUAN, S. FERONIA interacts with ABI2-type phosphatases to facilitate signaling cross-talk between abscisic acid and RALF peptide in *Arabidopsis*. **PNAS**, 2016.

CHEVALIER, E.; LOUBERT-HUDON, A.; MATTON, D.P. ScRALF3, a secreted RALF-like peptide involved in cell–cell communication between the sporophyte and the female gametophyte in a solanaceous species. **The Plant Journal**, v. 73, p. 1019–1033, 2013.

CHINCHILLA, D.; SHAN, L.; HE, P.; DE VRIES, S.; KEMMERLING, B. One for all: the receptor-associated kinase BAK1. **Trends in Plant Science***,* v. 14, p. 535–541, 2009.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

HARUTA, M.; MONSHAUSEN, G.; GILROY, S.; SUSSMAN, M.R. A cytoplasmic Ca^{2+} functional assay for identifying and purifying endogenous cell signaling peptides in *Arabidopsis* seedlings: identification of AtRALF1 peptide. **Biochemistry**, v. 47, p. 6311-6321, 2008.

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

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

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

JEONG, Y.J.; SHANG. Y.; KIM, B.H.; KIM, S.Y.; SONG, J.H.; LEE, J.S.; LEE, M. M.; LI, J.; NAM, K.H. BAK7 displays unequal genetic redundancy with BAK1 in brassinosteroid signaling and early senescence in *Arabidopsis*. **Molecules and Cells,** v. 29, p. 259-266, 2010.

KARLOVA, R.; BOEREN, S.; RUSSINOVA, E.; AKER, J.; VERVOORT, J.; DE VRIES, S. The *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1 Protein Complex Includes BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1. **The Plant Cell**, v. 18, p. 626-638, 2006.

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

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

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

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

LAMESCH, P.; BERARDINI, T.Z.; LI, D.; SWARBRECK, D.; WILKS, C.; SASIDHARAN, R.; MULLER, R.; DREHER, K.; ALEXANDER, D.L.; GARCIA HERNANDEZ, M.; KARTHIKEYAN, A.S.; LEE, C.H.; NELSON, W.D.; PLOETZ, L.; SINGH, S.; WENSEL, A.; HUALA, E. The *Arabidopsis* information resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p. 1202-1210, 2012.

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

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

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

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

LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-[Delta][Delta] CT method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SRIVASTAVA, R.; LIU, J.; GUO, H.; YIN, Y.; HOWELL, S.H. Regulation and processing of a plant peptide hormone, AtRALF23, in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 59, p. 930-939, 2009.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

WANG, X.; ZHANG, J.; YUAN, M.; EHRHARDT, D.W.; WANG, Z.; MAO, T. *Arabidopsis* MICROTUBULE DESTABILIZING PROTEIN40 is involved in brassinosteroid regulation of hypocotyl elongation. **Plant Cell**, v. 24, p. 4012–4025, 2012.

WANG, Z.Y.; BAIMY, O.H.E.; ZHU, J.Y. Brassinosteroid signaling network and regulation of photomorphogenesis. **Annu Rev Genet**, v. 46, p. 701–724, 2012.

WANG, C., LIU, Y., LI, S-S., HAN, G-Z. Insights into the Origin and Evolution of the Plant Hormone Signaling Machinery. **Plant Physiology**, v. 167, p. 872–886, 2015.

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

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

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

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

YANG, X.H.; XU, Z.H.; XUE H.W. *Arabidopsis* membrane steroid binding protein 1 is involved in inhibition of cell elongation. **Plant Cell**, v. 17, p.116-131, 2005.

YAMAGUCHI, S. Gibberellin metabolism and its regulation. **Annu. Rev. Plant Biol.** v. 59, p. 225-251, 2008.

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

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

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

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

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

APÊNDICE

bio-protocol www.bio-protocol.org/e2796 Vol 8 Iss 07, Apr 05, 2018
DOI:10.21769/BioProtoc.2796

Evaluation of Root pH Change Through Gel Containing pH-sensitive Indicator Bromocresol Purple

Aparecida L. Silva, Keini Dressano, Paulo H. O. Ceciliato,
Juan Carlos Guerrero-Abad and Daniel S. Moura*

Laboratório de Bioquímica de Proteínas, Departamento de Ciências Biológicas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), Piracicaba, SP, Brazil
*For correspondence: danielmoura@usp.br

[Abstract] The Rapid Alkalinization Factor (RALF) is a plant hormone peptide that inhibits proton transport causing alkalinization of the extracellular media. To detect the alkalinization response elicited by RALF peptides in root cells, *Arabidopsis* seedlings are carefully transferred to a gel containing the pH-sensitive indicator bromocresol purple, treated with the peptide and photographed after 30 min. Herein the protocol is optimized for evaluation of exogenous treatment, described in detail and expected results are presented.
Keywords: pH indicator, Alkalinization, RALF, Bromocresol purple

[Background] Proton transport is induced by a myriad of signals and is used by plants to coordinate growth, defense and development. Some plant hormone peptides can affect proton transport, causing a strong alkalinization of the extracellular medium (Felix and Boller, 1995; Pearce *et al.*, 2001a). The 5 kDa peptide hormone Rapid Alkalinization Factor (RALF), after being secreted, binds to its receptor FERONIA, and causes the phosphorylation of the plasma membrane H^+-Adenosine triphosphatase 2, inhibiting proton transport and alkalinizing the extracellular media (Pearce *et al.*, 2001b; Haruta *et al.*, 2014).

Growth media containing the pH indicator bromocresol purple is an effective method to visualize alkalinization or acidification in the media around the roots. This method has been used previously to show that NaRALF is required for regulating root hair extracellular pH (Wu *et al.*, 2007), and that roots of plants overexpressing AtRALF23 have reduced capacity to acidify the rhizosphere (Srivastava *et al.*, 2009). Growth medium with the pH indicator bromocresol purple was also used by Masachis *et al.* (2016) to demonstrate that RALF homologs produced by fungal pathogens induced alkalinization of media around the roots of tomato plants.

We have optimized the pH indicator bromocresol purple protocol and using the improved protocol we were able to visualize the alkalinization effect around *Arabidopsis* roots after AtRALF1 treatment in wild type and mutant seedlings (Dressano *et al.*, 2017). Here we demonstrate how this assay can provide qualitative information on the extracellular pH that surrounds *Arabidopsis* roots.

Copyright © 2018 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

bio-protocol www.bio-protocol.org/e2796 Vol 8 Iss 07, Apr 05, 2018
DOI:10.21769/BioProtoc.2796

Materials and Reagents

A. Biological material
   1. *Arabidopsis thaliana* seeds and seedlings (Ecotype Columbia, Col-0)
   2. In-house produced 6xHis AtRALF1 recombinant peptide

B. Chemicals and materials for seed sterilization and growth
   1. Square Petri dish with Grid 100 mm W x 15 mm H, sterile (Electron Microscopy Sciences, catalog number: 70691)
   2. Clear plastic wrap
   3. Graduated cylinder 1,000, 100 and 10 ml (Uniglas)
   4. 1,000 µl filter tips (NEST Scientific, catalog number: NPT1000-B-B)
   5. 200 µl filter tips (NEST Scientific, catalog number: NPT0200-B-Y)
   6. 10 µl filter tips (NEST Scientific, catalog number: 301001)
   7. Gellan Gum Powder (Culture Gel TM Type I- BioTech Grade) (PhytoTechnology Laboratories, catalog number: G434)
   8. Murashige & Skoog Basal Salt Mixture (PhytoTechnology Laboratories, catalog number: M524)
   9. Sterile distilled water
   10. Sodium hypochlorite solution
   11. Sodium hypochlorite (NaClO) solution 50% (v/v) (see Recipes)

C. Chemicals and materials for gel containing the pH-sensitive indicator bromocresol purple
   1. Graduated cylinder 100 ml (Uniglas)
   2. Petri dish 150 x 20 mm sterile
   3. Bromocresol purple free acid reagent Grade ($C_2H_{16}Br_2O_5S$, AMRESCO, catalog number: 0531-25G)
   4. Calcium sulfate dihydrate ($CaSO_4 \cdot 2H_2O$, Merck, catalog number: 102161)
   5. Potassium hydroxide (KOH)
   6. Hydrochloric acid (HCl)
   7. Agarose RA (Biotechnology Grade, AMRESCO, catalog number: N605-500G)
   8. Sterile distilled water

Equipment

1. Weighing balance (RADWAG Wagi Elektroniczne, model: AS 220/C/2)
2. Magnetic stirrer (Fisher Scientific)
3. pH meter (Thermo Orion, PerpHecT LongR meter, model: 350)
4. Pipettes (Nichipet EX, P1000, P200, P10)
5. Beaker 1,000 ml (PHOX, Boro 3.3)

Copyright © 2018 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

bio-protocol www.bio-protocol.org/e2796 Vol 8 Iss 07, Apr 05, 2018
DOI:10.21769/BioProtoc.2796

6. Beaker 250 ml (APRX, Boro 3.3)
7. Autoclave (Sercon, model: HS 1-0101)
8. Laminar flow hood (Pachane, model: PA 440)
9. Growth chamber/Controlled environment room
10. Erlenmeyer (PIREX)
11. Microwave (BRASTEMP, catalog number: BMJ38ARANA)
12. Tweezers
13. Digital camera (Cyber-shot, Sony, model: DSC-H300)

Procedure

A. Seed sterilization and germination

To analyze the root media alkalinization, seedlings were grown on plates containing half-strength MS medium (see Recipes) for 9 days.

1. Surface sterilize *A. thaliana* seeds in Eppendorf tubes using 1 ml sodium hypochlorite solution 50% (v/v) for 10 min followed by 5 washes using 1 ml sterile Milli-Q water each. Seeds are washed with the aid of a micropipette (1,000 µl) (Figures 1A).
2. Stratify the sterilized seeds for 72 h at 4 °C in water and then drop in a line using a micropipette (10 µl) on a square plate dish containing half-strength MS medium (Figures 1B-1D).
3. Seal the plates containing the seeds with clear plastic wrap.
4. Incubate the plates vertically in a controlled environmental growth chamber at 22 ± 2 °C, 16 h light (150 µmol m^{-2} sec^{-1}) and 8 h dark for 9 days (Figure 1E).

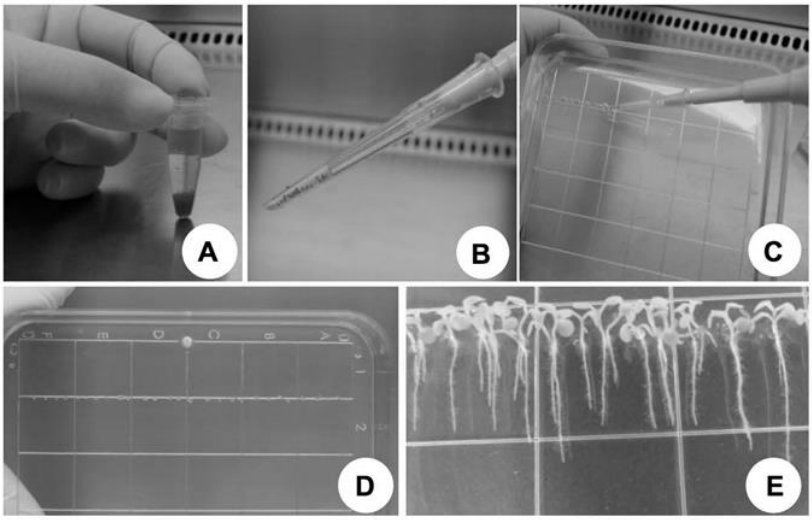


Figure 1. Seed sterilization and seedling growth. A. *A. thaliana* seeds during the surface sterilization procedure with sodium hypochlorite solution 50% (v/v); B. Pipette tip (which has

Copyright © 2018 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

bio-protocol www.bio-protocol.org/e2796 Vol 8 Iss 07, Apr 05, 2018
DOI:10.21769/BioProtoc.2796

been cut and then autoclaved) containing stratified seeds; C. Stratified seeds being disposed in half-strength MS medium; D. Seeds aligned on a square Petri dish containing half-strength MS medium; F. *Arabidopsis* seedlings (9 days old) grown in the growth chamber.

B. Gel containing the pH-sensitive indicator bromocresol purple

1. Prepare gel containing the pH-sensitive indicator bromocresol purple
   a. Add 0.006% (w/v) of bromocresol purple free acid reagent grade (60 g L^{-1}); 1 mM of $CaSO_4$ (172 g L^{-1}) in sterile distilled water. Adjust pH to 5.7 using KOH or HCl. Pour the solution into an Erlenmeyer.
   b. Add agarose (15 g L^{-1}) into the Erlenmeyer and heat in the microwave until completely dissolved.
2. Pour the melted gel into Petri dishes (150 x 20 mm), 50 ml per dish (approx. 0.4 cm thick), with the aid of a graduated cylinder (100 ml). The agarose gel is allowed to cool until solidified. (Figure 2).

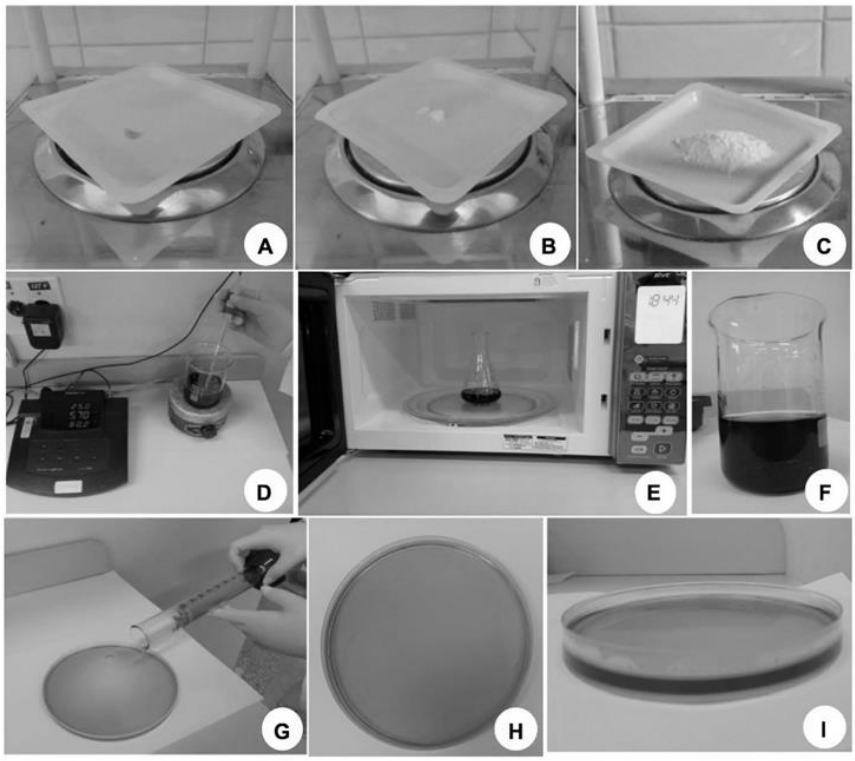


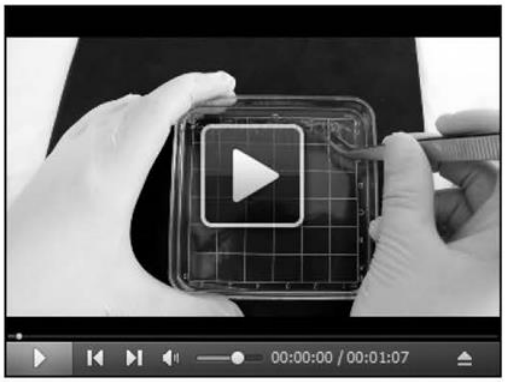
Figure 2. pH-Sensitive indicator bromocresol purple in gel. A. Bromocresol purple; B. Calcium sulfate ($CaSO_4$); C. Agarose; D. Bromocresol purple solution in sterile distilled water pH 5.7; E. The solution is heated in a microwave until agarose is completely dissolved; F. Gel

Copyright © 2018 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

bio-protocol www.bio-protocol.org/e2796 Vol 8 Iss 07, Apr 05, 2018
DOI:10.21769/BioProtoc.2796

containing bromocresol purple completely dissolved and ready to be poured. G. Gel being poured in a Petri dish. H. Plate containing the solidified gel and ready to receive the seedlings (top view). I. Lateral view of the plate shown in H. Gel should be about 0.4 cm thick and a dark yellow color is expected to allow detection of pH differences.

3. Gently transfer groups of seedlings (6-8) at once onto each Petri dish containing the pH indicator bromocresol purple (pH 5.7) with tweezers (Figures 3A-3B; see Video 1).



Video 1. Seedlings being transferred to Petri dish containing the pH indicator bromocresol purple

4. Once placed in the gel pH-sensitive indicator bromocresol purple, only the roots of the seedling are treated with 10 µl AtRALF1 (10 µM solution) or water (10 µl as a control) (see Video 2).

Video 2. Roots of *Arabidopsis* seedlings treated with AtRALF1 solution

5. Capture images with a digital camera (Sony, Cyber-shot) 30 min after treatment.

Copyright © 2018 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

bio-protocol www.bio-protocol.org/e2796 Vol 8 Iss 07, Apr 05, 2018
DOI:10.21769/BioProtoc.2796

Data analysis

1. The data produced is qualitative, highly reproducible but seedlings have to be manipulated carefully. Wounds that may be unintentionally inflicted by handling itself are a signal that causes proton fluxes and may cause alkalinization.
2. After 30 min, AtRALF1-treated seedlings show a purple color around the roots while water-treated control seedlings develop no color (Figures 3C-3D).
3. Photographic record: the best results that we have obtained are using a white background and a source of white light from behind the plate. Good photographic records are the result of good equipment, photographer skills and light setup. Reducing the distance between the plate and the white background increases the detection of the color change in the gel. An example of this effect is shown in Figure 3F.

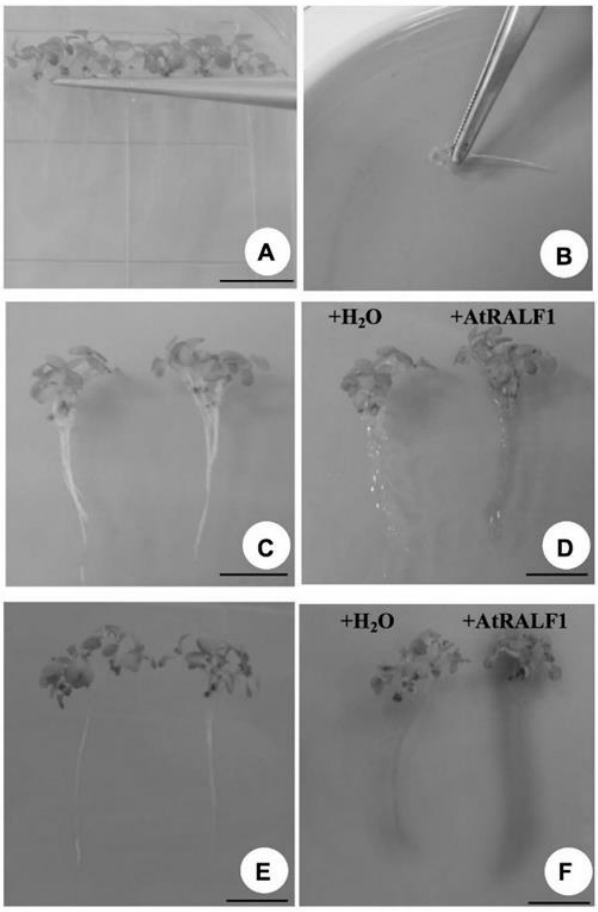


Figure 3. Evaluation of root pH change on a gel containing bromocresol purple. A. *Arabidopsis* seedlings being selected to be transferred onto a gel containing the pH indicator.

Copyright © 2018 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

bio-protocol www.bio-protocol.org/e2796 Vol 8 Iss 07, Apr 05, 2018
DOI:10.21769/BioProtoc.2796

B. Seedlings being placed on top of the gel. C. Pair of 6-8 seedlings before AtRALF1 or water treatment. D. The same pair shown in C, 30 min after treatment. E. Pair of 6-8 seedlings before AtRALF1 or water treatment. F. The same pair shown in E, 30 min after treatment. Image was taken after reducing the distance between the plate and the white background. Scale bars = 1 cm.

Notes

1. In-house produced 6xHis AtRALF1 recombinant peptide was obtained as described by do Canto *et al.* (2014).
2. In our experience, the most critical points for reproducibility are: the thickness of the gel (0.4 cm) that facilitates imaging; the time of incubation with the peptide (30 min); maintaining intact (roots should not be touched/injured with forceps or in any way during handling); and a small volume of peptide solution for root treatment (10 µl).
3. Recombinant AtRALF1 (7,631 g/mol) is dissolved in distilled water (7.631 µg/100 µl). The final concentration of the solution is 10 µM.

Recipes

1. Half-strength MS medium
   Note: Weigh all the chemicals used in weighing balance (± 0.0001). Adjust the pH of MS medium using a magnetic stirrer and a pH meter.
   a. Add 2.215 g L^{-1} MS salts without sucrose and vitamins (PhytoTechnology Laboratories), 10.0 g sucrose to 800 ml ddH_2O, adjust pH to 5.7 using KOH
   b. Add Gellan Gum Powder (6 g L^{-1}, PhytoTechnology Laboratories) and add up to 1 L with dH_2O
   c. Autoclave for 15 min at 121 °C
   d. After autoclaving, pour the half-strength MS medium in square Petri dishes, 30 ml per plate, with the aid of a graduated cylinder (100 ml) in a laminar flow hood
2. Gel containing bromocresol purple (pH 5.7)
   0.006% (w/v) bromocresol purple (free acid reagent grade) (60 g L^{-1})
   1 mM of $CaSO_4$ (172 g L^{-1})
   Sterile distilled water
   Agarose (15 g L^{-1})
3. Sodium hypochlorite (NaClO) solution 50% (v/v)
   50 ml of sodium hypochlorite solution
   50 ml of sterile distilled water

Copyright © 2018 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

bio-protocol www.bio-protocol.org/e2796 Vol 8 Iss 07, Apr 05, 2018
DOI:10.21769/BioProtoc.2796

Acknowledgments

This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). DSM is a research fellow of CNPq. This protocol was adapted from Wu *et al.* (2007). The authors declare that they do not have any conflicts of interest or competing interests.

References

1. Do Canto, A. M., Ceciliato, P. H. O., Ribeiro, B., Ortiz Morea, F. A., Franco Garcia, A. A., Silva-Filho, M. C. and Moura, D. S. (2014). Biological activity of nine recombinant AtRALF peptides: implications for their perception and function in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* 75: 45-54.
2. Dressano, K, Ceciliato, P. H. O., Silva, A. L., Guerrero-Abad, J. C., Bergonci, T., Ortiz-Morea, F. A., Bürger, M., Silva-Filho, M. C. and Moura, D. S. (2017). BAK1 is involved in AtRALF1-induced inhibition of root cell expansion. *PLoS Genet* 13 (10): e1007053.
3. Felix, G. and Boller, T. (1995). Systemin induces rapid ion fluxes and ethylene biosynthesis in *Lycopersicon peruvianum* cells. *Plant J* 7: 381-389.
4. Haruta, M., Sabat, G., Stecker, K., Minkoff, B. B. and Sussman, M. R. (2014). A peptide hormone and its receptor protein kinase regulate plant cell expansion. *Science* 343(6169): 408-411.
5. Masachis, S., Segorbe, D., Turra, D., Leon-Ruiz, M., Furst, U., El Ghalid, M., Leonard, G., Lopez-Berges, M. S., Richards, T. A., Felix, G. and Di Pietro, A. (2016). A fungal pathogen secretes plant alkalinizing peptides to increase infection. *Nat Microbiol* 1(6): 16043.
6. Pearce, G., Moura, D. S., Stratmann, J. and Ryan, C. A. (2001a). Production of multiple plant hormones from a single polyprotein precursor. *Nature* 411(6839): 817-820.
7. Pearce, G., Moura, D. S., Stratmann, J. and Ryan, C. A., Jr. (2001b). RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(22): 12843-12847.
8. Srivastava, R., Liu, J. X., Guo, H., Yin, Y. and Howell, S. H. (2009). Regulation and processing of a plant peptide hormone, AtRALF23, in *Arabidopsis*. *Plant J* 59(6): 930-939.
9. Wu, J., Kurten, E. L., Monshausen, G., Hummel, G. M., Gilroy, S. and Baldwin, I. T. (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. *Plant J* 52(5): 877-890.

Copyright © 2018 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

ANEXOS

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

Nome do vetor usado	**Antibiótico para seleção - concentração utilizada**
pET28b	Canamicina - 50 µg/mL
pGADT7	Ampicilina - 100 µg/mL
pGBKT7	Canamicina - 50 µg/mL
pENTR D-TOPO	Canamicina - 50 µg/mL
pDEST17	Ampicilina - 100 µg/mL
pK7FWG2 (GFP)	Espectinomicina - 50 µg/mL Estreptinomicina - 15 µg/mL
PK7GWIWG2 (I) (irMSBP1)	Espectinomicina - 50 µg/Ml Estreptinomicina - 15 µg/mL
PK7WG2 (35S)	Espectinomicina - 50 µg/Ml Estreptinomicina - 15 µg/mL

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

Gene (locus)	**Nome do iniciador**	**Sequência 5´ - 3´**
OBJETIVO: Clonagem para fusão a uma extensão de Histidinas (His)		
At1g02900	AtRALF1-***Nde*I**-Fw	GGG**CATATG**GCGACCACAAAATACAT
	AtRALF1-***Hind*III**-Rv	TTG**AAGCTT**CTAACTCCTGCAACGAGCAAT
At5g67070	AtRALF34-***Nde*I**-Fw	TT**CATATG**TACTGGCGGAGGACGAAGTA
	AtRALF34-***Hind*III**-Rv	T**AAGCTT**CTAGCGGCGGCAGCGGGTGATCG
At2g33775	AtRALF19-Fw	CACCGCCGCGAGGCGCAGCTACATCAGTTAC
	AtRALF19-Rv	CCCTCGAGTTAAGAAGTTTGCCTGTAGCA
At3g16570	AtRALF23-Fw	CACCGCTACGAGGAGGTACATC
	AtRALF23- Rv	AAAAGCTTTCATGAGCGCCGGCAGCGAGTATC
At1g02900	AtRALF1(9-49)-Fw	CACCCAGTCTTTGAAACGGAACAG
	AtRALF1(9-49)-Rv	CTAACTCCTGCAACGAGCAATTTTG
At5g52240	MSBP1-HA-Fw	CACCATGGCGTTAGAACTAT
	MSBP1-HA-Rv	CTACTCCTCCTTCTTCAACA
OBJETIVO: Confirmação da inserção de T-DNA		
At5g52240	MSBP1-Fw	GGATCAACTTTTCCAATGTGC
	MSBP1-Rv	TTAAATTCTGCATCCACGAAAC
	Lbb1.3	ATTTTGCCGATTTCGGAAC
OBJETIVO: Clonagem em pENTR para clonagem de MSBP1 fusionada a GFP e irMSBP1		
	MSBP1-Fw	CACCATGGCGTTAGAACTATGGCAA

At5g52240	MSBP1-Rv	CTCCTCCTTCTTCAACACAGTCT
OBJETIVO: Clonagem da superexpressão de MSBP1		
At5g52240	MSBP1-Fw	CACCATGGCGTTAGAACTATGGCAA
	MSBP1stop-Rv	CTACTCCTCCTTCTTCAACA
OBJETIVO: Clonagem para duplo-híbrido em leveduras		
At1g02900	AtRALF1- PA - ***Nde*I**-Fw	GGG**CATATG**ATATTGGCGACCACAAAATACAT
	AtRALF1-PA- ***Bam*HI**-Rv	TTG**GGATCC**GTCTAACTCCTGCAACGAGCAAT
At5g67070	AtRALF34-PA- ***Nde*I**-Fw	CG**CATATG**TATTACATATCGTACGG
	AtRALF34-PA ***Bam*HI** –Rv	TTA**GGATCC**CTTCATCTATCTCCGGCA
At2g13790	BAK7DE- ***Nde*I**-Fw	GCG**CATATG**GCTGAAGGTGATGCTTTGACT
	BAK7DE- ***Bam*HI**-Rv	CGC**GGATCC**CCATTTGCCCCCCTGAAGGT
At4g33430	BAK1DE- ***Nde*I**-Fw	GCG**CATATG**GCCGAAGGTGATGCTCTAA
	BAK1DE ***Bam*HI**-Rv	CGC**GGATCC**CTCTATTACTCCCTGCAGGTGAT
At1g76650	CML38-***Ned*I**-Fw	CCG**CATATG**AAGAATAATACTCAACC
	CML38- ***Bam*HI**-Rv	CT**GGATCC**TTAGCGCATCATAAGAGAAACT
At1g76640	CML39-***Ned*I**-Fw	CCG**CATATG**AAGAACACTCAACGTCAGTTATCTTC
	CML39- ***Bam*HI**-Rv	CT**GGATCC**GCGCATCATGAGGGCGAACT

At5g52240	MSBP1-***Eco*R1**-Fw	CCG**GAATTC**ATGGCGTTAGAACTATGGCAA
	MSBP1-***Bam*HI**-Rv	CGC**GGATCC**TACTCCTCCTTCTTCAACA
OBJETIVO: Genotipagem, RT-PCR e qRT-PCR		
At1g13440	GAPDH-Fw	TTGGTGACAACAGGTCAAGCA
	GAPDH-Rv	AAACTTGTCGCTCAATGCAATC
At3g62680	PRP3-Fw	GTTCCGACCCAGCATCATAC
	PRP3-Rv	GCAAGTCTCGACCGGAGATA
At5g19800	HRGP2-Fw	CACAGTTGCTAATGGAAACGA
	HRGP2-Rv	CGGCGGTGAATATCTCTTGT
At5g05690	CPD-Fw	AGCAACTCGGTAACGACAGG
	CPD-Rv	CAGAGAGTGCAACCCTAGCC
At3g50660	DWF4-Fw	GTGGGTGGAAAGTGTTACCG
	DWF4-Rv	CTGTTGCCATCTCCAAGGAT
At4g33430	BAK1-Fw	GTCAGAAAGTAGTGTCGCCA
	BAK1-Rv	ACTTGTAGCGTCAGGACAGC
At5g52240	MSBP1-Fw	GGATGTTCTACGGACCAGGA
	MSBP1-Rv	CTGAACCAGCCACTTTGACA

ANEXO C - Representação esquemática do local de inserção do T-DNA em mutantes *bak1-1* (CS6125) e *msbp1* (SALK_035827).

Gene BAK1 (At4g33430)

Gene MSBP1 (At5g52240)