

RAQUEL GOMES RODRIGUES

**REDUNDÂNCIA FUNCIONAL DOS RECEPTORES NIK1 E NIK2 NA IMUNIDADE
ANTIVIRAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Elizabeth Batista Pacheco Fontes

Coorientador: Humberto Josué de Oliveira Ramos
Pedro Augusto Braga dos Reis

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

R696r
2024
Rodrigues, Raquel Gomes, 1994-
Redundância funcional dos receptores NIK1 e NIK2 na
imunidade antiviral / Raquel Gomes Rodrigues. – Viçosa, MG,
2024.

1 dissertação eletrônica (45 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Geral, 2024.

Referências bibliográficas: f. 41-45.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.645>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Begomovírus. 2. Vírus de plantas. 3. Proteínas -
Transporte. 4. Quinases. I. Fontes, Elizabeth Pacheco Batista,
1957-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Genética e
Melhoramento. III. Título.

CDD 22. ed. 579.28

RAQUEL GOMES RODRIGUES

**REDUNDÂNCIA FUNCIONAL DOS RECEPTORES NIK1 E NIK2 NA IMUNIDADE
ANTIVIRAL**


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2024.

Assentimento:



Raquel Gomes Rodrigues
Autor

Documento assinado digitalmente
 ELIZABETH PACHECO BATISTA FONTES
Data: 01/10/2024 14:37:37-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Elizabeth Batista Pacheco Fontes
Orientadora

AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda força concedida.

Aos meus pais, que sempre apoiaram meus sonhos e me deram força para estar aqui.

À minha orientadora, Elizabeth Batista Pacheco Fontes, pela orientação e incentivo nesta longa caminhada.

À toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (LBMP) e, principalmente, aos meus colegas de laboratório, Marco Aurélio, Sâmera Breves, Fellipe Sampaio, Rafinha Bastos e Vívian Sodré.

À minha amiga Márcia Helena Esteves, pelo apoio e amizade sempre.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação e ao programa de Genética e Melhoramento, por todo aprendizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Nível Superior – CAPES Brasil-, FAPEMIG e FINEP pelos recursos que possibilitaram realizar todo este projeto.

RESUMO

RODRIGUES, Raquel Gomes. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2024. **Redundância funcional de NIK1 e NIK2 na imunidade antiviral.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Coorientadores: Humberto Josué de Oliveira Ramos e Pedro Augusto Braga dos Reis.

Devido a relevância da subfamília II de receptores do tipo quinase ricos em repetições em leucina (LRRII-RLK), há um interesse crescente na elucidação da função de proteínas dessa subfamília, pois atuam como correceptores de várias vias de sinalização celular. NIK1 “*NUCLEAR SHUTTLE PROTEIN (NSP)-INTERACTING KINASE 1*” pertence a esta subfamília e foi identificada por interagir com a proteína de begomovírus, NSP. NIK1 demonstra atividade antiviral e atua como correceptor em uma via de sinalização antiviral, ativada por begomovírus, estando mais relacionado a NIK2. Para determinar se NIK2 e NIK1 são funcionalmente redundantes na imunidade antiviral, foi realizada inicialmente uma análise filogenética da subfamília LRRII-RLK, utilizando proteínas de 100 espécies de plantas. As LRRII-RLKs foram divididas em cinco clados principais com alto grau de estabilidade. Consistente com a hipótese de redundância funcional, NIK1 e NIK2 foram agrupadas juntas, designando o clado como NIK e demonstrando alta conservação de sequência. Ensaio de infecção viral, utilizando os nocautes simples *nik1-1* e *nik2-1* e o nocaute duplo *nik1-1/nik2-1*, forneceram evidências de que, similar a NIK1, NIK2 está envolvida em resistência contra begomovírus. A inativação de NIK2 aumentou a suscetibilidade ao *begomovirus cabbage leaf curl virus* (CabLCV), com sintomas mais severos e acúmulo do DNA viral superior àqueles exibidos por Col-0, embora similares a *nik1-1*. No mutante duplo *nik1-1/nik2-1*, o fenótipo de suscetibilidade aumentada foi acentuado e a carga viral foi ainda maior do que nos mutantes simples. Coletivamente estes resultados indicam que NIK2 atua na imunidade antiviral de maneira similar a NIK1. Para confirmar que NIK1 e NIK2 compartilham a mesma via de sinalização antiviral, foi avaliado se padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) virais, ácidos nucleicos derivados de begomovírus, induziriam a mesma via de sinalização antiviral nos nocautes. A ativação da via de sinalização de NIK1 foi monitorada por meio de determinação da repressão de genes marcadores da referida via de sinalização. Tanto RNA quanto DNA preparados de plantas infectadas induziram a repressão dos genes marcadores em *nik1-1* e *nik2-1*, embora em níveis inferiores a Col-0. Estes resultados confirmaram que NIK1 e NIK2 participam da mesma via de sinalização antiviral mediada por NIK1/NIK2. Também foi avaliado se o genoma do vírus funcionava como PAMP viral. Para isso, DNA-A de CabLCV foi purificado de *Escherichia coli* e o fragmento do genoma contendo a região intergênica foram usados para tratamento dos nocautes e Col-0. Ambos os DNAs funcionaram como PAMPs virais e ativaram a via de sinalização antiviral de NIK1/NIK2. Devido à facilidade de produção da região intergênica em altas quantidades, estas PAMPs poderão ser utilizadas em escrutínios para identificar possíveis receptores sensores desses padrões moleculares (PRRs antivirais).

Palavras-chave: Redundância funcional. Receptores. Imunidade antiviral.

ABSTRACT

RODRIGUES, Raquel Gomes. Universidade Federal de Viçosa, February, 2024. **Functional Redundancy of NIK1 and NIK2 receptors in the antiviral immunity.** Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-advisers: Humberto Josué de Oliveira Ramos e Pedro Augusto Braga dos Reis.

Due to the relevance of subfamily II of leucine repeat-rich kinase receptors (LRRII-RLK), there is a growing interest in elucidating the function of proteins from this subfamily, as they act as coreceptors for several cellular signaling pathways. NIK1 [“NUCLEAR SHUTTLE PROTEIN (NSP)-INTERACTING KINASE 1”] belongs to this subfamily and was identified via interaction with the begomovirus protein NSP. NIK1 demonstrates antiviral activity and acts as a coreceptor in an antiviral signaling pathway activated by begomovirus and is more related to NIK2. To determine whether NIK2 and NIK1 are functionally redundant in antiviral immunity, a phylogenetic analysis of the LRRII-RLK subfamily was initially performed using proteins from 100 plant species. The LRRII-RLKs were divided into five main clades with high stability. Consistent with the functional redundancy hypothesis, NIK1 and NIK2 were clustered together, designating the clade as NIK and demonstrating high sequence conservation. Viral infection assays, using the *nik1-1* and *nik2-1* single knockouts and the *nik1-1/nik2-1* double knockout, provided evidence that, like NIK1, NIK2 is involved in resistance against begomoviruses. Inactivation of NIK2 increased susceptibility to the begomovirus cabbage leaf curl virus (CabLCV), with more severe symptoms and viral DNA accumulation greater than those exhibited by Col-0, although similar levels to *nik1-1*. In the *nik1-1/nik2-1* double mutant, the increased susceptibility phenotype was accentuated, and the viral load was even higher than in the single mutants. Collectively, these results indicate that NIK2 functions in antiviral immunity in a similar manner to NIK1. To confirm that NIK1 and NIK2 share the same antiviral signaling pathway, we evaluated whether viral pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), nucleic acids derived from begomoviruses, would induce the same antiviral signaling pathway in the knockouts. The activation of the NIK1 signaling pathway was monitored by determining the repression of marker genes associated with the signaling pathway. Both RNA and DNA prepared from infected plants induced repression of marker genes in *nik1-1* and *nik2-1*, although at lower levels than Col-0. These results confirmed that NIK1 and NIK2 participate in the same NIK1/NIK2-mediated antiviral signaling pathway. To assess whether the virus genome functioned as a viral PAMP, CabLCV DNA-B was purified from *E. coli*, and the genome fragment containing the intergenic region was used to treat the knockouts and Col-0. Both DNAs functioned as viral PAMPs and activated the NIK1/NIK2 antiviral signaling pathway. Due to the ease of producing the intergenic region in high quantities, these PAMPs can be used in screenings to identify possible antiviral sensing receptors for these molecular patterns (antiviral PRRs).

Keywords: Functional redundancy. Receptors. Antiviral immunity.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	7
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2.1	Imunidade Inata em Plantas.....	10
2.2	Receptores integrais de membrana do tipo quinase com repetições ricas em leucinas (LRR-RLKs, LEUCINE-RICH REPEATS, RECEPTOR-LIKE KINASES).....	11
2.3	Via de sinalização antiviral mediada por NIK1	13
2.4	A família Geminiviridae	17
3.	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1	Material vegetal e caracterização molecular dos nocautes de <i>nik1</i> , <i>nik2</i> e <i>nik1/2</i>	20
3.2	Purificação do vírus de cabbage leaf curl vírus (CabLCV).....	20
3.3	Ensaio de infecção em <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
3.4	Extração de DNA por método CTAB 2%	21
3.5	Extração de RNA por TRIzol	22
3.6	Amplificação e purificação dos fragmentos de cabbage leaf curl vírus	22
3.7	Obtenção de cDNA de <i>Arabidopsis thaliana</i> para análise de expressão gênica	23
3.8	Diagnóstico da infecção viral por PCR convencional	24
3.9	Análise de qPCR para quantificar o acúmulo do DNA viral.....	24
3.10	Análise de RT-PCR para análise de expressão gênica dos genes marcadores da via de sinalização antiviral mediada por NIK1.	24
3.11	Análise filogenética	25
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1	Reconstrução filogenética da subfamília LRR-II-RLK em mono e dicotiledôneas	26
4.2	NIK2 participa na imunidade antiviral contra o begomovírus CabLCV ("cabbage leaf curl virus").	29
4.3	Natureza química das PAMPs virais elicitoras da via antiviral mediada por NIK1/NIK2 34	
5.	CONCLUSÕES	40
6.	REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO

Como organismos sésseis, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa contra patógenos, naturalmente dispersos na natureza. Receptores de superfície celular conhecidos como PRRs “*Pattern Recognition Receptors*”, que reconhecem padrões moleculares de microorganismo, compõem a primeira camada de defesa da planta, sendo conhecida como PTI “*PAMP-triggered immunity*” (BJORNS & ZIPFEL, 2021; PRUITT *et al.*, 2021). A PTI é um tipo de imunidade que confere resistência basal contra a maioria dos organismos invasores. O segundo tipo de imunidade, designada ETI “*Effector-triggered immunity*”, é formada por proteínas de resistência (R) que reconhecem especificamente efetores de virulência de patógenos (Avr), desencadeando uma resposta hipersensível (HR) que, geralmente, resulta em morte celular programada no local de infecção (VUOUNG *et al.*, 2023).

Os receptores de superfície celular são divididos em dois grupos: receptores do tipo quinase (RLKs) e receptores do tipo proteína (RLPs) (BOUTROT & ZIPFEL, 2016). Os receptores do tipo quinase constituem o maior grupo, sendo constituído por mais de 600 RLKs no genoma de *Arabidopsis thaliana*. Alguns RLKs funcionam como receptores que percebem específicos estímulos na superfície celular e outros funcionam como correceptores que participam da ativação de receptores específicos de sinais. Estruturalmente, são compostos por um domínio extracelular (ectodomínio) divergente, um domínio transmembrana e uma porção intracelular com domínio de quinase do tipo serina/treonina. Apesar de terem estrutura semelhante as LRR-RLKs, os receptores RLPs não possuem o domínio de quinase citoplasmático e, por isso, geralmente associam-se a correceptores, como BAK1 “*BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-ASSOCIATED KINASE 1*”, para que ocorra a transdução do sinal (CHO *et al.*, 2022).

A superfamília RLK é subdividida em famílias de acordo com a conservação do domínio de quinase e a natureza estrutural do ectodomínio. A maior família (> 200 membros), designada LRR-RLKs, contém repetições ricas de leucina (LRR) no ectodomínio, sendo filogeneticamente subdividida em 13 subfamílias (I-XIII), variando em número de LRRs no ectodomínio. Filogeneticamente a subfamília II de LRR-RLKs, caracterizada pela presença de cinco LRRs no ectodomínio, é representada por 13 membros em *Arabidopsis*, apresentando dois clusters de receptores intimamente relacionados, o grupo de SERKs “*SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE*” e NIKs “*NSP-INTERACTING KINASE 1*”, além de um terceiro cluster de proteínas cujas funções são desconhecidas, LRRIIc

(SAKAMOTO *et al.*, 2012). Foi demonstrado que a proteína de NSP “*NUCLEAR SHUTTLE PROTEIN*” de begomovírus é capaz de interagir *in vitro* e *in vivo* com alguns membros da subfamília LRR-RLK, designados NIK1, NIK2 e NIK3. Esses três membros foram descritos inicialmente por serem quinases de Ser/Thr com propriedades de sinalização de receptor que mediam a resposta de defesa antiviral (FONTES *et al.*, 2004).

Mais recentemente, NIK1 foi descrito como um “*hub*” central de sinalização que coordena repostas moleculares de natureza biótica e abiótica, permitindo a múltipla integração de sinais por meio de complexos de receptores/correceptores distintos (FONTES *et al.*, 2023; TEIXEIRA *et al.*, 2023). Por outro lado, foi observado que NIK3 atua como correceptor de outras LRR-RLKs como CLAVATA1, CLAVATA2 e RPK2 (HU *et al.*, 2018). Estes resultados corroboram com a análise filogenética dos membros da subfamília LRR-RLK realizada tanto em tomateiro quanto em *Arabidopsis* de maneira que NIK1 e NIK2 foram agrupados em ramos próximos e distantes de NIK3, que se agrupou com outras RKLs (SAKOMOTO *et al.*, 2012). Estes resultados sugerem que NIK1 e NIK2 são parálogos, levantando a hipótese de que NIK2 poderia estar envolvida na imunidade antiviral, similarmente a NIK1, embora resultados contrastantes tenham sido reportados (FONTES *et al.*, 2004; ZORZATTO *et al.*, 2015; GOUVEIA *et al.*, 2017; TEIXEIRA *et al.*, 2019; TEIXEIRA *et al.*, 2023).

O mecanismo de sinalização antiviral mediada por NIK1 sugere que, após o reconhecimento do estímulo por um receptor específico, o domínio LRR extracelular desse receptor induz oligomerização com NIK1, aproximando seus domínios de quinase, que culmina na fosforilação de NIK1 na posição treonina 474 dentro da alça de ativação de quinase (SANTOS *et al.*, 2010). Esta ativação induz a fosforilação da proteína ribossomal RPL10 (L10) e sua subsequente translocação para o núcleo, onde interage com o transfator LIMYB “*L10-INTERACTING MYB DOMAIN-CONTAINING PROTEIN*” para reprimir a expressão de genes relacionados à maquinaria de tradução, o que leva à supressão de tradução global. Vírus de DNA de plantas não conseguem escapar desse mecanismo regulatório de tradução e, portanto, o RNA mensageiro viral não é traduzido com eficiência comprometendo o processo de infecção (TEIXEIRA *et al.*, 2019).

NIK1 foi identificada pela primeira vez como alvo de virulência da proteína NSP de begomovírus (FONTES *et al.*, 2004). *Begomovirus* constituem o maior gênero que pertence à família *Geminiviridae*. Esta família compreende vírus de partícula icosaédrica geminada com DNA fita simples, que após a infecção, é direcionado para dentro do núcleo das células infectadas, onde é convertido em DNA cadeia dupla. Os begomovírus são subdivididos em

monossegmentados, com genoma de uma única molécula, ou bissegmentados, com genoma de duas moléculas (DNA-A e DNA-B), e cada molécula apresenta cerca de 3 kb (FERREIRA *et al.*, 2021; HANLEY-DOWDOIN *et al.*, 2013; RAMESH *et al.*, 2017).

Adicionalmente, ambos componentes genômicos (DNA A e B) codificam ORFs (*Open Reading Frames*) com orientação bidirecional (DEVENDRAN *et al.*, 2022). Begomovírus monossegmentados codificam seis proteínas conhecidas como REP/C1 “*REPLICATION INITIATOR PROTEIN*”, TrAP/C2 “*TRANSACTIVATOR PROTEIN*”, REn/C3 “*REPLICATION ENHANCER PROTEIN*”, C4, V1/CP “*COAT PROTEIN*” e V2. Homólogos dessas proteínas em bissegmentados são codificados pelo componente A (C1/Rep, AC2/TrAP, AC3/REn, AC4, AV1/CP e AV2). Por sua vez, o componente B codifica duas proteínas responsáveis pelo movimento intracelular e intercelular do DNA gênomico: a proteína de movimento “*MOVEMENT PROTEIN*” e a proteína de transporte de nuclear, “*NUCLEAR SHUTTLE PROTEIN*” (LUNA & LOZANO-DURÁN, 2020).

Por possuírem um potencial de codificação limitado, os geminivírus dependem das proteínas do hospedeiro para que seu ciclo de infecção se complete (KUMAR, 2019). As proteínas dos geminivírus atuam de maneira coordenada para facilitar processos de infecção viral como replicação, movimento e evasão do sistema imune das células hospedeiras. Elas desempenham papéis que são cruciais na apropriação da maquinaria celular do hospedeiro, manipulação da expressão gênica e regulação das vias de sinalização celular (HANLEY-BOWDOIN *et al.*, 2013; GUPTA *et al.*, 2021). Em relação às respostas de sinalização, foi demonstrado que PAMPs derivados de ácidos nucleicos de begomovírus ativam a sinalização celular mediada por NIK1 (TEIXERA *et al.*, 2019). Embora a função de NIK1 na imunidade viral é muito bem descrita, não se sabe a natureza química das PAMPs virais que ativam NIK1 e tampouco se NIK2 é funcionalmente redundante. Os objetivos da presente investigação foram elucidar se componentes específicos do vírus que podem funcionar como gatilho para ativação da via de sinalização de NIK1 e, ainda, elucidar a redundância funcional de NIK2 como um correceptor genuíno para estas PAMPs.

Neste estudo, plantas de *Arabidopsis thaliana* do ecótipo selvagem (Col-0) e mutantes com perda de função (*nik1-1*, *nik2-1*, *nik1/nik2-1*) foram inoculadas com clones infecciosos de CabLCV (*cabbage leaf curl vírus*). Foi demonstrado que a suscetibilidade a infecção viral foi aumentada pelo silenciamento duplo de NIK1 e NIK2. Além disso, foi demonstrado que tanto RNA total ou DNA total de plantas infectadas induziram a repressão de genes ribossomais (*RPL13* e *RPL25*). As PAMPs virais resultaram em menor repressão destes genes em nocautes NIK1 ou NIK2, sendo a regulação negativa totalmente bloqueada no duplo mutante *nik1/nik2*.

Importante enfatizar que a sinalização antiviral só foi elicitada em folhas injuriadas por tratamento abrasivo, confirmando que para que haja infecção deve ocorrer injúria mecânica a fim de que as PAMPs tenham acesso intracelular. Estes resultados indicam que NIK1 e NIK2 exibem redundância funcional na resposta antiviral, sendo considerados parálogos verdadeiros.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Imunidade Inata em Plantas

Diferentemente dos mamíferos que possuem um sistema imunológico adaptativo, as plantas dependem da imunidade inata proveniente de sinais fornecidos por cada célula e de sinais provenientes dos locais de infecção (JONES & DANGL, 2006). O reconhecimento de elicitores microbianos ocorre por meio de receptores localizados na superfície celular designados de PRRs “*PATTERN RECOGNITION RECEPTORS*” e receptores intracelulares. PRRs percebem os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que são apresentados pelo patógeno durante a infecção desencadeando a primeira linha de defesa da planta, designada imunidade desencadeada por PAMPs (PTI). Os receptores intracelulares reconhecem de uma maneira específica efetores liberados intracelularmente pelo patógeno, engatilhando a segunda linha de defesa, designada imunidade desencadeada por efetores (ETI). A primeira barreira contra infecção composta destas proteínas de membrana promove um tipo de resistência basal contra a maioria dos patógenos não adaptados, enquanto a segunda é mais ativa contra micróbios adaptados (DODDS & RATHJEN, 2010).

Este mecanismo de defesa das plantas durante a invasão de patógenos ocorre em três fases que correspondem a reconhecimento, integração de sinais e, por fim, defesa. Durante a primeira fase, os receptores imunes de superfície percebem padrões moleculares derivados de patógenos (PAMPs) ou do próprio hospedeiro “*DAMAGE-ASSOCIATED MOLECULAR PATTEN*”. Ultrapassado esse reconhecimento, proteínas de resistência R reconhecem efetores microbianos intracelularmente (WANG *et al.*, 2022). A integração de sinais é realizada por cascatas e vias de sinalização que ativam eventos como influxo de cálcio, ativação de quinases ativadas por mitógeno (MAPK), reprogramação transcricional, como também, sinalização de hormônios. Todos estes eventos culminam com a defesa, que ocorre em cada compartimento na célula da planta (WANG *et al.*, 2022). No momento que ocorre a percepção das PAMPs, o fluxo de íons é alterado na membrana plasmática. O aumento do influxo de cálcio no citosol ativa as proteínas quinases que são dependentes de cálcio (CDPKs) que, por sua vez, fosforilam

fatores de transcrição como, por exemplo, fatores de transcrição da família WRKY, de maneira que a resposta culmina com a reprogramação transcricional. Como consequência, há um reforço das barreiras extracelulares devido à produção de compostos da parede celular e enzimas antimicrobianas (COUTO & ZIPFEL, 2016).

A imunidade desencadeada por efetores, caracterizada como ETI, envolve proteínas de resistência R que reconhecem especificamente efetores de cepas microbianas por interação direta ou indireta, culminando com a reação de hipersensibilidade (HR). Como resultado da HR, o fluxo de íons na membrana plasmática é perturbado, com ativação de enzimas de degradação celular, encolhimento do citoplasma, desmontagem do vacúolo e tonoplasto (GOUVEIA *et al.*, 2017; ROUDAIRE *et al.*, 2021).

Muitos PRRs já foram bem caracterizados como FLAGELLIN-SENSING 2 (*FLS2*) e ELONGATION FACTOR-TU RECEPTOR (*EFR*), que reconhecem os epítomos bacterianos flg22 (flagelina) e elf18 (fator de elongação Tu) e atuam na regulação da imunidade bacteriana. Estes estudos foram importantes para o estabelecimento da sinalização das RKs em plantas e, como consequência, interação de ligantes entre receptores e correceptores (DEFALCO & ZIPFEL, 2021).

2.2 Receptores integrais de membrana do tipo quinase com repetições ricas em leucinas (LRR-RLKs, LEUCINE-RICH REPEATS, RECEPTOR-LIKE KINASES).

As quinases de receptor integral de membranas (RLKs, *RECEPTOR-LIKE KINASES*) são fundamentais para a comunicação intercelular das plantas visto que percebem sinais e permitem que as plantas respondam aos diferentes estímulos internos e externos para regulação de crescimento e desenvolvimento (HOSSEINI *et al.*, 2020). Em *Arabidopsis*, RLKs formam uma grande família contendo aproximadamente 420 membros com a configuração de receptores com segmento transmembrana único (TANG; WANG; ZHOU, 2017). Estes receptores do tipo quinases são estruturalmente organizados em um domínio extracelular divergente no N-terminal, cuja função seria conferir especificidade ao ligante (estímulo), seguindo de um segmento transmembrana e um domínio citoplasmático de transdução de sinais que inclui o domínio intramembranar, um domínio de kinase conservado do tipo serina/treonina e uma região C-terminal. Baseado na conservação do domínio de quinase, estes receptores são divididos em diversas classes estruturalmente diferentes quando ao tipo de domínio extracelular. Diversas RLKs foram descobertas por suas funções como percepção de

hormônios, regulação de crescimento, desenvolvimento e imunidade de plantas (CHAKRABORTY *et al.*, 2019).

A classe de RLKs com o ectodomínio composto de repetições-ricas em leucina representa a maior classe de RLKs, contendo aproximadamente 200 membros (CHAKRABORTY *et al.*, 2019). Os LRR-RLKs são proteínas que apresentam em sua estrutura um domínio extracelular com repetições LRR responsável pela ligação do ligante, um domínio de transmembrana com passagem única, um domínio intracelular e um domínio de quinase intracelular. Estruturalmente, aproximadamente 22 a 24 aminoácidos de comprimento formam o domínio LRR, com um núcleo hidrofóbico composto de leucinas e outros resíduos apolares. Vários ectodomínios foram caracterizados estruturalmente, porém é o tamanho que define sua classificação visto que o número de LRRs individuais é consideravelmente variável (HOHMANN; LAU; HOTHORN, 2017). Estes receptores são classificados em 13 subfamílias (I to XIII) baseado na organização de LRRs, variando de 3 a 26 repetições.

Outra classe de receptores de superfície é formada pelas RLPs, que apresentam um ectodomínio LRR “*LEUCINE-RICH REPEAT*”, embora sejam desprovidas de domínio de quinase citoplasmático. Frequentemente, estão associadas a outras proteínas que transmitam os sinais extracelulares para participarem de uma determinada via de sinalização (CHO *et al.*, 2023).

O conhecimento estrutural das RLKs fornece informação sobre as interações entre receptores e seus respectivos ligantes; complexos de receptores/correceptores e como são organizados estruturalmente os domínios de quinases após sua ativação. Esses receptores são divididos em dois grandes grupos: ectodomínios LRR grande e ectodomínios LRR pequenos.

Além de resposta imune, RLKs de ectodomínios grandes participam ativamente dos processos de desenvolvimento das plantas. Um exemplo é o receptor CLV1 em *A. thaliana* que está relacionado à atividade de meristemas. Junto ao peptídeo CLV3, atua inibindo a expressão de um fator de transcrição (WUS), e medeia o controle do meristema floral e o número de órgãos florais. Algumas famílias de receptores de membrana não só atuam na iniciação e desenvolvimento de órgãos, mas também, no desenvolvimento foliar como *ERECTA*, reprodutivo como *BAM1/2*, crescimento e alongação como *BRI1* (ZHU *et al.*, 2023). Todos esses processos são controlados rigidamente em intensidade e duração porque estes receptores estão sob regulação dinâmica. A fosforilação de componentes do complexo de PRR é um importante evento para ativação do receptor. Exemplo é a fosfatase do tipo 2A de Ser/Thr conhecida como *PP2A* em *A. thaliana*, que atua na regulação negativa de EFR (*ELONGATION*

FACTOR-TU RECEPTOR) controlando a fosforilação de BAK1(TANG; WANG; ZHOU, 2017).

A subfamília II de LRR-RLKs (LRRII-RLK) é composta por membros com ectodomínios pequenos, ou seja, organizados em quatro repetições ricas de leucina contínuas e completas (LxxLxxLxLxxNxLSGxIPxxLGx, onde x é resíduo não conservado) e um LRR incompleto (FONTES, 2024). Baseado em análise filogenética, a subfamília LRRII-RLK possui três subgrupos, designado SERK, contendo SERK1-4 e um pseudogene, SERK5; um subgrupo desconhecido contendo três membros, e o subgrupo NIK, contendo NIK1, NIK2, NIK3/CIK1 “*CLAVATA3 INSENSITIVE RECEPTOR KINASES*”, além de CIK2-CIK4 (ZHANG *et al.*, 2006). Baseado no interactoma de receptores do tipo quinase, SERKs e NIKs são considerados “*hubs*” de interações proteína-proteína, influentes na transmissão de informações nas células vegetais. Entre eles, SERK3, também conhecido como BAK1 “*BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-ASSOCIATED KINASE 1*” é um dos membros mais extensivamente estudado e interage com outros grandes ectodomínios de LRR-RKs para mediar a resposta imune, atuando como correceptor para FLS2 “*FLAGELLIN SENSING 2*” (CHAKRABORTY; NGUYEN, XU, 2019) e em desenvolvimento, como correceptor de BRI1 “*BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1*” (ZHU *et al.*, 2023).

Quanto ao cluster NIK, NIK1 e NIK2 são mais conservados e acredita-se que agem como parálogos na resposta imune, enquanto NIK3/CIK1, CIK2 e CIK3 estão envolvidos na sinalização por Clavata (HU *et al.* 2018). Evidências de que NIK1 e NIK2 são parálogos na resposta imune foram derivadas de resultados demonstrando o efeito negativo de NIK1 e NIK2 na resposta imune antibacteriana (LI *et al.*, 2019). Entretanto, com relação à resposta imune antiviral, não se estabeleceu ainda se NIK2 também participa da via de sinalização antiviral mediada pelo receptor NIK1. Nesta investigação, a participação de NIK2 na resposta antiviral é avaliada em maiores detalhes.

2.3 Via de sinalização antiviral mediada por NIK1

A proteína NIK1 foi descoberta como sendo um alvo de virulência da proteína NSP de Begomovírus (FONTES *et al.*, 2004). Os membros da subfamília NIK foram caracterizados como sendo receptores de Serina/Treonina capazes de mediar a sinalização antiviral em plantas e pertencentes a subfamília LRRII-RLK (FONTES *et al.*, 2004).

NIK1 foi inicialmente isolada de tomateiros e designada como LeNIK (*Lycopersicon esculentum* NSP- INTERACTING KINASE) (MARIANO *et al.*, 2004). Posteriormente, foi demonstrado a interação da proteína NSP com o domínio de quinase de proteínas NIKs. Em A.

thaliana, foi demonstrado que os mutantes nulos de NIK1 e NIK3 são mais susceptíveis à infecção por geminivírus (CabLCV) (FONTES *et al.*, 2004). Entretanto, estes resultados têm sido questionados com a demonstração de que NIK1 e NIK2 são estruturalmente mais conservados e se agrupam em *clusters*, separados de NIK3, em estudos de interações proteína-proteína, indicando que provavelmente NIK1 e NIK2 também sejam parálogos na imunidade antiviral (LI *et al.*, 2019), embora ainda não comprovado experimentalmente.

Quanto à atividade antiviral de NIK1, foi inicialmente demonstrado que a resposta antiviral é ativada por meio de fosforilação de NIK1 que modula a resposta subsequente (FONTES *et al.*, 2004), Figura 1. Progressos na elucidação da via antiviral identificaram a proteína ribossomal RPL10 como um componente a jusante da via de sinalização de NIK1 (CARVALHO *et al.*, 2008). O modo pelo qual NIK1 intermedia a fosforilação de RPL10 é devido a sua capacidade de autofosforilação e transfosforilação dos seus domínios de quinase (SANTOS *et al.*, 2009). Esses estudos conduzidos com mutações individuais nos resíduos da alça de ativação de NIK1 revelaram que o resíduo de Treonina-474 é essencial para ativação do domínio de quinases e indução da fosforilação de RPL10 e sua subsequente translocação para o núcleo para mediação da resposta antiviral (SANTOS *et al.*, 2009). Posteriormente, um fator de transcrição com domínio MYB (LIMYB) foi evidenciado como um novo componente a jusante, tendo sido isolado pela sua capacidade de interagir com RPL10 (ZORZATTO *et al.*, 2015). Em linhagens superexpressando LIMYB, foi observado diminuição da expressão dos genes relacionados à maquinaria de tradução do hospedeiro e, ainda, em experimentos de imunoprecipitação de cromatina (ChIP), um fragmento de 150 pb do promotor de L18 apresentou regiões de enriquecimento em amostras que foram precipitadas com a tag GPF, corroborando que LIMYB funciona como uma proteína de ligação aos genes de RP *in vivo* (ZORZATTO *et al.*, 2015).

A proteína NSP de begomovírus se liga a um segmento de 80 aminoácidos (402-502) na alça de ativação de NIK1 (FONTES *et al.*, 2004, Figura 1). Essa ligação promove restrições estéricas, bloqueando a fosforilação em Thr-474 dentro da alça de ativação (*A-loop*) de NIK1, culminando com supressão da atividade de quinase deste receptor (GOUVEIA *et al.*, 2017). O modelo para ativação da sinalização mediada por NIK1 preconiza que em resposta à infecção viral (ácidos nucléicos derivados de begomovírus), NIK1 sofre homodimerização ou heterodimerização com um receptor desconhecido, promovendo a transfosforilação de treonina 474 dentro da alça de ativação da quinase (Figura 1). NIK1 ativada, intermedia a fosforilação de RPL10, que por sua vez é redirecionada ao núcleo, onde interage com a LIMYB, e induz a downregulação dos genes relacionados à maquinaria de tradução. A repressão prolongada

desses genes leva a supressão da tradução global e, portanto, o mRNA do vírus não consegue escapar deste mecanismo de supressão de tradução do hospedeiro, comprometendo a eficiência da infecção viral (Fontes *et al.*, 2021), Figura 1. Contrapondo este mecanismo de defesa, a proteína viral NSP associa-se ao domínio quinase de NIK1 para inibir a atividade de quinase. Dessa forma, os begomovírus elevam sua capacidade de patogenicidade em hospedeiros suscetíveis pela supressão da atividade de quinase de NIK1.

Além de sua função antiviral, tem sido demonstrado que NIK1 está envolvida na imunidade antibacteriana (LI *et al.*, 2019), Figura 1. Em condições normais, NIK1 associa-se com FLS2 e BAK1 para prevenir autoimunidade que poderia afetar o crescimento das plantas. Durante infecção bacteriana, a PAMP bacteriana, flagelina, é reconhecida por FLS2 o que induz sua dimerização com BAK1, resultando em transfosforilação recíproca entre o receptor FLS2 e o correceptor BAK1 e assim formando um complexo imune ativado para iniciar PTI. BAK1 ativada fosforila NIK1 no resíduo essencial Thr-474, levando à ativação da via de sinalização antiviral mediada por NIK1. Consequentemente, infecção bacteriana possivelmente induz resistência-mediada por NIK1 a subseqüentes infecções por begomovírus. Além disso, NIK1 fosforilada interage mais fortemente com o complexo imune FLS2-BAK1, levando a um controle mais apurado de PTI. Infecção por begomovírus antes do ataque bacteriano fornece NSP, o supressor viral de fosforilação de NIK1, o que deve aliviar o efeito negativo de NIK1 sobre a ativação de PTI, portanto, aumentando a resistência do hospedeiro contra bactéria. Consequentemente, a comunicação cruzada entre NIK1 e receptores imunes de PTI pode prevenir infecções simultâneas por patógenos diferentes no mesmo hospedeiro, permitindo que vírus e bactérias ativem respostas imunes um contra o outro.

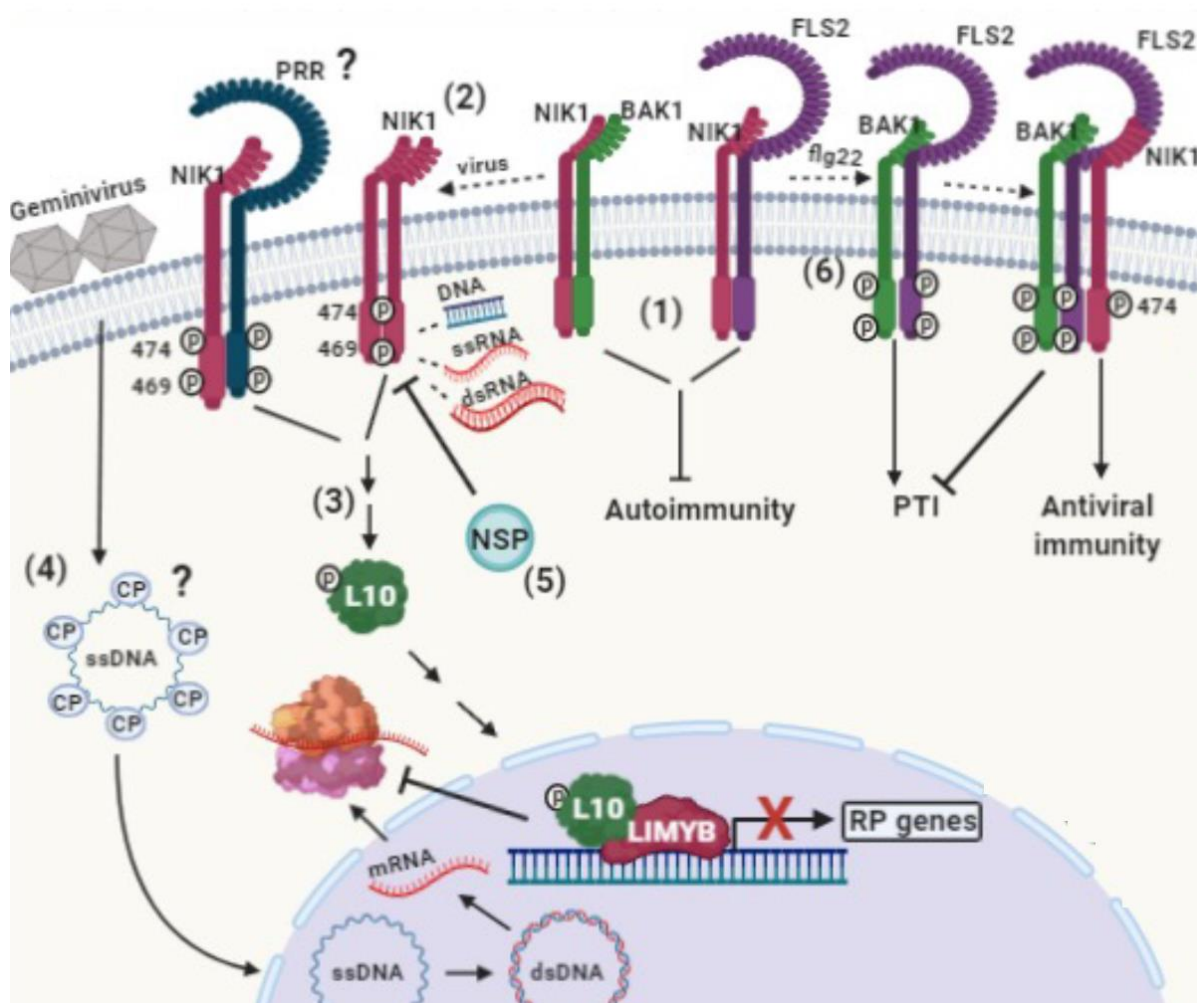


Figure 1. Interação da via de sinalização mediada por NIK1 com imunidade antibacteriana e supressão pela proteína NSP. (1) Sob condições normais, NIK1 liga ao receptor FLS2 e ao receptor BAK1 para prevenir autoimunidade. (2) Durante infecção viral, ácidos nucleicos derivados de begomovírus promovem a dimerização de NIK1 com ele mesmo ou com um receptor desconhecido de reconhecimento de padrões (PRR), causando as fosforilações sequenciais no resíduo Thr-474 para ativação de NIK1 e de Thr-469 para modulação da atividade. (3) NIK1 ativado intermedia a fosforilação de RPL10 e então é redirecionado para o núcleo onde interage com LIMYB a fim de reprimir a expressão de genes de proteínas ribossomais (RB) levando à supressão global de tradução. (4) Em células infectadas, os begomovirus são desempacotados no citoplasma e o DNA viral cadeia simples (ssvDNA) ligado à proteína do capsídeo (CP) é translocado para o núcleo onde é convertido em DNA cadeia dupla (dsvDNA) para replicação do genoma viral e transcrição de genes virais. mRNAs virais não podem escapar do mecanismo de supressão de tradução mediado por NIK1 comprometendo a infecção. Em interações compatíveis, NSP contrapõe este mecanismo antiviral interagindo com a alça de ativação de NIK1 para prevenir fosforilação de Thr-474 e consequente ativação da via de defesa. (6) Infecção bacteriana, por outro lado, apresenta a PAMP (flg22) bacteriana para o hospedeiro que é reconhecida por FLS2, formando com BAK1 um complexo imune ativado para iniciar imunidade engatilhada por PAMP (PTI). NIK1 ligada à FLS2-BAK1 serve como um substrato para BAK1, sendo então fosforilada no resíduo Thr-474 ativando o ramo de controle traducional da imunidade antiviral. Adaptado de Fontes *et al.*, 2021.

2.4 A família Geminiviridae

Os geminivírus são conhecidos pela sua capacidade de infectar plantas e causarem grandes prejuízos econômicos a uma gama de culturas como milho, feijão, tomate, mandioca e algodão, representando sérios riscos à segurança alimentar (RIZVI *et al.*, 2014). *Geminiviridae* é considerada uma das mais importantes famílias de vírus que infectam plantas. Apresentam genomas circulares de DNA fita simples encapsulados em partículas icosaédricas geminadas e compreendem o principal grupo de vírus que infecta plantas contendo mais de 500 espécies (FIALLO-OLIVÉ *et al.*, 2021). Baseado na organização do genoma, filogenia, hospedeiro e tipo de inseto vetor, o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) classificou a família em 14 gêneros e, dentre eles, o gênero *Begomovirus* se destaca por possuir o maior número de espécies, sendo o mais estudado e de maior relevância em termos de perdas econômicas (ZHAN *et al.*, 2023).

Os genomas dos begomovírus podem ser monossegmentados com apenas um componente genômico ou bissegmentado com dois componentes, designados DNA-A e DNA-B, cada um apresentando aproximadamente 2,5 a 2,7 kb (Figura 2). Cada componente possui uma região intergênica (IR) com uma estrutura de grampo contendo uma sequência conservada TAATATTAC que abrange a origem de replicação. IR, compartilhada por ambos os componentes genômicos, é uma região altamente conservada de aproximadamente 200 pares de bases (FONDONG, 2013; Figura 2). Os geminivírus codificam de 6 a 8 proteínas multifuncionais essenciais para o processo de infecção. A proteína de replicação (Rep), codificada pela ORF AC1, desempenha papéis cruciais na replicação, transcrição e silenciamento gênico. A ORF AC2 codifica a proteína TrAP, que atua como supressora de silenciamento transcricional (TGS) e pós-transcricional (PTGS), desempenhando também um papel significativo na transcrição de genes virais e no desenvolvimento dos sintomas. A proteína REn (ORF AC3) interage com Rep, otimizando o acúmulo de DNA viral. Além disso, a proteína AC4, encontrada dentro da ORF AC1, é fundamental na supressão do silenciamento gênico, na regulação do ciclo celular e no movimento sistêmico viral. A proteína do capsídeo, conhecida como CP e codificada pela ORF AV1, desempenha um papel importante no empacotamento do genoma viral, na transmissão por insetos e no movimento sistêmico célula a célula no caso de begomovírus monossegmentados. Por fim, a proteína AV2 é um determinante de patogenicidade. Em conjunto, o DNA-B codifica para duas proteínas responsáveis pelo transporte de DNA do núcleo para o citoplasma (NSP) e pelo movimento intercelular via plasmodesmas realizado pela proteína de movimento (ZHAN *et al.*, 2023).

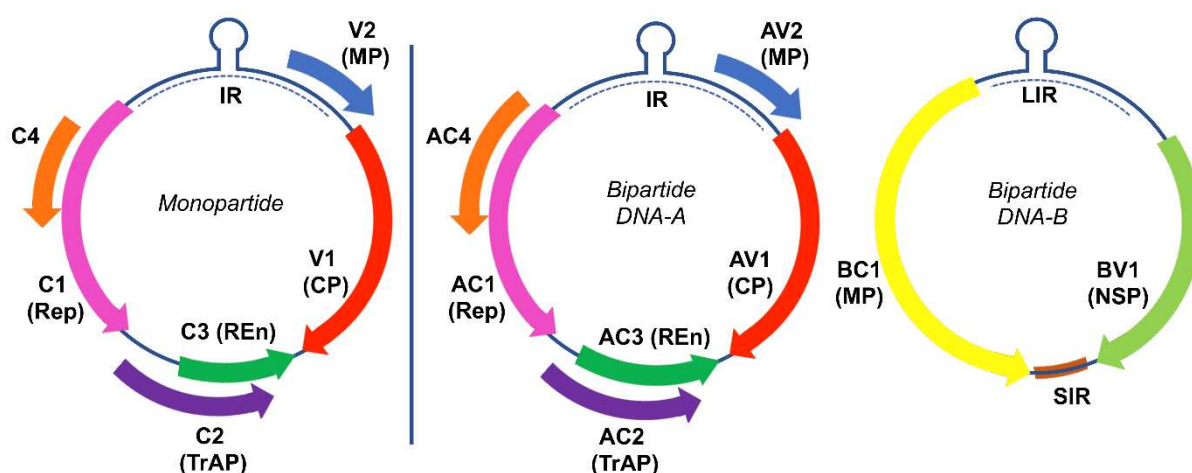


Figura 2- Organização do genoma de espécies monossegmentadas (*monopartite*) e bissegmentadas (*bipartite*) do gênero *Begomovirus* (*Geminiviridae*). Os begomovírus monossegmentados têm um único componente genômico, enquanto os bissegmentados são compostos por duas moléculas, designadas DNA-A e DNA-B. As ORFs (sequências abertas de leitura) são representadas por setas e designadas de acordo com a cadeia de DNA codificadora (viral senso, V ou complementar senso, C) e para espécies bissegmentadas, a designação do DNA componente, A ou B, precede o nome da ORF. IR é a região intergênica, contendo o sítio de iniciação de replicação (hairpin); LIR, região intergênica larga; SIR, região intergênica pequena. CP, proteína do capsídeo; MP, proteína de movimento; REEn, proteína intensificadora de replicação; Rep, proteína associada à replicação; TrAP, proteína ativadora transcricional; NSP, proteína de redirecionamento nuclear. Reproduzido de Fontes *et al.*, 2021.

O ciclo de infecção se inicia quando o inseto vetor (mosca-branca), contendo o vírus, se alimenta da seiva carregada pelo floema de uma folha saudável, transmitindo assim o vírus para as células que estão associadas ao floema (HANLEY-BOWDOIN *et al.*, 2013). Primeiramente, o vírus penetra na célula hospedeira e o ssDNA viral é convertido em DNA fita dupla com auxílio de fatores do hospedeiro. O dsDNA passa por um processo de duplicação usando o modo de replicação conhecido como replicação por círculo rolante (RCR). Posteriormente, a proteína de replicação (Rep) realiza uma clivagem no DNA viral em um local específico para iniciar o RCR. Após a síntese, novos ssDNA virais poderão ser convertidos em dsDNA e usados como molde para a replicação. Portanto, novas cópias serão produzidas e serão empacotadas em vírions ou transportados para fora da célula com auxílio da proteína de movimento. O transporte ocorre via plasmodesmas célula a célula, promovendo a disseminação viral a longas distâncias (PRADHAN *et al.*, 2017).

Em relação ao ciclo celular e ao processo de infecção em plantas, os geminivírus são excluídos dos meristemas e, por isso, não acessam a maquinaria de replicação do hospedeiro. Em contrapartida, eles podem infectar tecidos jovens em processos de endoreduplicação, tecidos de plantas que estão em processo de desenvolvimento e células parenquimáticas (HANLEY-BOWDOIN; SETTLAGE; ROBERTSON, 2004). Além disto, os geminivírus alteram os controles transcricionais do hospedeiro por meio da indução da maquinaria de síntese

de DNA através de um regulador-chave conhecido como proteína relacionada ao retinoblastoma (RBR). A pRBR interage com o fator de transcrição E2F para abolir a expressão de genes que codificam proteínas de replicação do hospedeiro. Algumas proteínas como a Rep se ligam a pRBR para interferir no complexo RBR-E2F e, como consequência, alterar o perfil transcricional da célula infectada (HANLEY-BOWDOIN *et al.*, 2013).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e caracterização molecular dos nocautes de *nik1*, *nik2* e *nik1/2*

Em todos os experimentos foram utilizadas as linhagens de *Arabidopsis thaliana* ecótipo Columbia (Col-0), mutantes *nik1-1* (salk_060808), *nik2-1* (Salk_044363) (FONTES *et al.*, 2004), o duplo mutante *nik1-1/nik2-1* (LI *et al.*, 2019), e a linhagem transgênica 35S::NIK1-HA-7.0 em Col-0. Sementeiras foram crescidas em câmara de crescimento a 22°C sob condições de fotoperíodo de 16 horas/luz e, posteriormente, transplantadas para vasos individuais. Para a caracterização molecular dos nocautes *nik1-1*, *nik2-1* e o duplo mutante realizou-se a extração do DNA genômico e, posteriormente, foi feita a amplificação por PCR das regiões flaqueadoras com primers de cada gene em combinação com os oligonucleotídeos específicos de inserção do T-DNA (Tabela 1).

3.2 Isolamento dos componentes genômicos

Os clones infecciosos pUFV 3367 (1,5 cópias do componente A) e pUFV 3368 (1,5 cópias do componente B), propagados em *Escherichia coli*, foram incubados por 12 h em 5 mL de meio LB (Luria Bertani) a 37°C com antibiótico de resistência (Ampicilina - 100 mg/mL). Após crescimento, as colônias foram centrifugadas por 2 min a 6000 rpm e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em 200 µL de Tris-HCL 1M, pH 8, contendo EDTA 0,25 M e incubadas por 10 min à temperatura ambiente. Logo após, foram adicionados NaOH 2M, SDS 1% (p/v), e a mistura incubada por 10 min no gelo, seguida da adição de 200 µL de ácido acético KOH 5M, para neutralizar a reação e a solução incubada novamente por 10 min em gelo. O lisado foi centrifugado por 10 min a 13 000 rpm para remoção dos restos celulares. Após centrifugação, o sobrenadante foi recuperado e transferido para novos microtubos, e aproximadamente 700 µL de clorofórmio foram adicionados. As amostras foram homogeneizadas por 30 segundos e centrifugadas por 10 min a 1300 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para novos microtubos e 700 µL de isopropanol foram adicionados para precipitação de DNA plasmidial. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuspensado em água ultrapura autoclavada, previamente preparada com 10 mg/mL de RNase. A concentração de DNA foi medida em espectrofotômetro, sendo que 1 µL foi utilizado para verificação da qualidade e integridade por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v).

3.3 Ensaio de infecção em *Arabidopsis thaliana*

Utilizou-se os clones infecciosos da espécie *Cabbage leaf curl virus*, conforme descrito, sendo inoculadas por biobalística 12 plantas de cada linhagem, Col-0, *nik1-1*, *nik2-1*, o duplo mutante *nik1-1/nik2-1* e a linhagem transgênica 35S::NIK1-HA. Previamente, 60 mg de tungstênio foi pesado e lavado com 1 mL de etanol 70% e a mistura levada ao vórtex sob agitação constante por 15 minutos. Posteriormente, o material foi centrifugado a 15 000 rpm por 5 min e o etanol descartado. Após o descarte, 1 mL de água destilada estéril foi acrescentada à amostra e centrifugada por 5000 rpm por 8 min. O passo de lavagem foi repetido 5 vezes até que as partículas fossem ressuspensas em 1 mL de glicerol 50% (v/v). Em seguida, 70 µL das partículas de tungstênio foram transferidas para microtubos e, então, foram adicionados 7 µL de DNA plasmidial dos componentes A e B a uma concentração de 1000 ng/ µL. Adicionaram-se 50 µL de cloreto de cálcio (CaCl₂) a 2,5 M e as amostras foram homogeneizadas para evitar precipitação. Foram adicionados, em seguida, 20 µL de espermidina 0,1 M e o material foi deixado em temperatura ambiente por 10 min sob agitação lenta em vórtex. Logo depois, as amostras centrifugadas a 14000 rpm por 10 s e o sobrenadante descartado com auxílio de uma pipeta. O precipitado foi ressuspensionado em 200 µL de etanol absoluto e levado em sonificador de banho por 10 min. As mostras foram centrifugadas novamente e lavadas em etanol 100% para posteriormente serem centrifugadas novamente a 14000 g por 7 s. O sobrenadante foi descartado e o pellet resuspenso em 36 µL de etanol absoluto. Foram distribuídos 6 µL de amostra homogeneizada por membrana, que foram previamente embebidas em etanol absoluto. As membranas foram levadas e colocadas em bombardeador. No total, foram 12 plantas bombardeadas com tungstênio contendo os clones infecciosos e 3 plantas de cada linhagem foram utilizadas como controle e bombardeadas somente com tungstênio sem DNA viral. Posteriormente ao bombardeamento, os vasos foram aclimatados por 24 h em câmara de crescimento a 22 °C e observado o aparecimento de sintomas a cada 7 dias, por um período de 21 dias após inoculação.

3.4 Extração de DNA por método CTAB 2%

Cerca de 100 mg de tecido vegetal bombardeadas com DNA viral e grupo controle foram previamente pesados e macerados em nitrogênio líquido. Foram adicionados 800 µL do tampão de extração CTAB 2% (Tris-HCL 100 mM, EDTA 25 mM, NaCl 20mM, PVP 2%) e as amostras foram incubadas em banho maria a 65°C por 30 min. Em seguida, foi adicionado 80% do volume total de clorofórmio e o conteúdo foi homogeneizado e centrifugado a 13000 rpm por 10 min a 4°C. Coletou-se cerca de 600 µL de sobrenadante e foi adicionado mesmo

volume (1:1) de isopropanol para precipitação do DNA. Após 20 min em gelo, o material foi centrifugado por 15 min a 15000 rpm e o sobrenadante descartado. O DNA precipitado foi lavado em etanol 70% (v/v) e, posteriormente, eluído em 30 µL de água ultrapura autoclavada previamente preparada com RNase e, incubadas a 37°C por 10 min. Em seguida, foi verificada a qualidade e integridade do DNA em gel de agarose 1% (p/v) e quantificado em espectrofotômetro (NanoSpec). O DNA total foi utilizado como molde e amplificado com primers específicos de begomovírus (Tabela 1) para diagnóstico de infecção via PCR. O DNA total de plantas infectadas e não infectadas, utilizado com finalidade de PAMP viral, foi tratado com proteinase K a uma concentração de 20 µg/ml.

3.5 Extração de RNA por TRIzol

Para obtenção de RNA total, foram coletados 100 mg de folhas infectadas e não infectadas. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e, em seguida, adicionaram-se 1000 µL de TRIzol (Invitrogen). Após 5 minutos em temperatura ambiente, 200 µL de clorofórmio foram adicionados. Incubou-se o extrato por 5 minutos a temperatura ambiente sob agitação lenta. Em seguida, o material foi centrifugado a 13000 rpm a 4°C por 10 min para separação de fases. A fase aquosa foi coletada e transferida para novos tubos, onde 500 µl de isopropanol foram adicionados para precipitação do RNA. As amostras foram incubadas em gelo durante 20 min e levadas para centrifugação a 13 000 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com etanol 75% (v/v) e as amostras centrifugadas por 9500 rpm durante 5 min. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o pellet levado para secagem. Após secagem, o RNA foi eluído em 30 µL de água DEPC. Em seguida, as amostras foram levadas para quantificação em espectrofotômetro. Para verificação de qualidade e integridade, 1 µL das amostras foi corrido em gel de agarose 1% (p/v). Com finalidade de obtenção de PAMPs virais, o RNA foi tratado com DNase com o kit de DNase I (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida, a remoção de proteínas contaminantes foi realizada com tratamento de proteinase K (20 µg/µL).

3.6 Amplificação e purificação dos fragmentos de genômicos

As regiões do genoma de CablCV foram utilizadas como PAMPs virais e amplificadas por PCR utilizando DNA dos componentes A e B e oligonucleotídeos específicos (Tabela 1). Os resultados das amplificações foram avaliados em gel de agarose 1,2 % (p/v), previamente corado com brometo de etídeo. Posteriormente cada banda amplificada foi eluída, e purificada do gel utilizando o kit Qiaquick® Gel Extraction Kit (250). Os fragmentos amplificados e

cortados do gel foram eluídos em tampão QG (tiocianato de guanidina) e as amostras foram encubadas por 50 °C durante 10 min e levadas ao vórtex para homogeneização. Igual volume de isopropanol foi adicionado e, logo após, as amostras foram transferidas para a colunas de retenção de DNA e levadas por centrifugação por 1 min a 14000 rpm. Em seguida, foram adicionados 750 µL de tampão PE e novamente centrifugado por 1 min a 14000 rpm. Realizou-se nova centrifugação para retirada de excesso de tampão e o DNA retido na coluna foi eluído em 30 µL de água morna. Em seguida, a integridade do fragmento purificado foi examinada por eletroforese (1 µL da solução do fragmento purificado) em gel de agarose 1% (p/v).

3.7 Obtenção de cDNA de *Arabidopsis thaliana* para análise de expressão gênica

Com a finalidade de obtenção de transcritos das folhas que foram submetidas a tratamento de PAMPs virais, o cDNA foi sintetizado por meio do kit M – MML *Reverse Transcriptase* (Invitrogen) utilizando-se oligonucleotídes dT como iniciador. Para tanto, o RNA total foi isolado e tratado com DNase I e padronizado para 4 000 ng. Foram adicionados 1 µL de oligo-dT e 1 µL de dNTPs às amostras e, em seguida, foram incubadas a 65°C por 5 min. Para a síntese de cDNA, foram adicionados 4 µL de Buffer, 2 µL de DTT, 1 µL de água DEPC e 1 µL de MMLV e a reação prosseguiu por 1 hora e 15 min a 37°C e, posteriormente, por 15 min a 70 °C para inativação da transcriptase reversa.

Tabela 1. Lista de primers que foram utilizados para PCR convencional

Primers	Sequência 5' – 3'	Fragmento amplificado
Salk_06808 nik1 RP	5' TGTTGTGTTTCATCAGGA 3'	NIK1 posições 1260 a 1277
Salk_06808 nik1 LP	5' GATACACAAGCCCTCTTGCCAG 3'	NIK1 posições 2420 a 2400
Salk_044363 nik2 RP	5' AGAGAAGCTCCAAGCCAAAAC 3'	NIK2 posições 731 a 751
Salk_044363 nik2 LP	5' CCAAAGAAGAAAACCAAAGCC 3'	NIK2 posições 1816 a 1796
Lbb1.3	5' GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT 3'	Região de inserção de T-DNA
PCRc1	5' CTAGCTCAGCATATTTACRARWATGCCA 3'	Região comum do componente B de begomovírus
PBL1v 2040	5'GCCTCTGACGCACARTGRTKATCTTCAT ACA3'	Região comum do componente B de begomovírus

3.8 Diagnóstico da infecção viral por PCR convencional

O DNA genômico das amostras coletadas de plantas infectadas e não infectadas foi amplificado com oligonucleotídeos específicos do componente B de begomovírus (Tabela 1). As condições de reação adotadas foram de 3 min a 94 °C, seguidos de 40 ciclos (45 s a 94°C, 45 s a 54°C e 1 min a 72°C), e posteriormente 10 min a 72 °C. Os produtos da amplificação foram analisados em gel de agarose 1% (p/v) para confirmação da infecção viral.

3.9 Análise de qPCR para quantificar o acúmulo do DNA viral

O número de cópias genômicas de CabLCV foi determinado a partir de análise quantitativa por PCR em tempo real. A reação foi realizada no equipamento 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando o kit *SYBR Green* PCR Master Mix (Applied Biosystems). As condições de amplificação foram 95°C por 10 min, 40 ciclos de 94°C por 15 s e 60°C por 1 min. Oligonucleotídeos específicos (Tabela 2) foram utilizados para detecção do vírus e o gene ribossomal 18S de *A. thaliana* foi utilizado como controle endógeno para normalização dos dados. A quantificação da carga viral foi realizada pelo método Ct: $2^{-\Delta Ct}$, utilizando a curva padrão de titulação do DNA viral para conversão em número de cópias genômicas do componente viral.

3.10 Análise de RT-PCR para análise de expressão gênica dos genes marcadores da via de sinalização antiviral mediada por NIK1.

Para análise de expressão gênica por PCR em tempo real foram utilizados 2 µL de cDNA, 5 µL de Syber e 3 µL de oligonucleotídeos específicos para os genes marcadores de ativação da via de sinalização de NIK1 (Zorzatto *et al.*, 2015; Teixeira *et al.*, 2023; Tabela 2) e *SYBER Green* PCR Master Mix (Applied Biosystems), conforme as instruções do fabricante. Como marcador endógeno da reação foi utilizado o gene de Actina e os primers utilizados foram listados na Tabela 2. As amostras foram levadas para o termociclador utilizando-se as condições: 95°C por 10 min, 40 ciclos de 94°C por 15 s e 60 °C por 1 min. A verificação da especificidade dos resultados foi dada por meio de análise das curvas de dissociação dos oligonucleotídeos gerados pelo termociclador e a expressão gênica obtida quantificada por método Ct: $2^{-\Delta Ct}$.

Tabela 2. Lista de primers que foram utilizados para RT-PCR em tempo real.

Primers	Sequência 5' – 3'	Gene
qRTActina_fwd	5' CTTGCACCAAGCAGCATGAA 3'	<i>Actina</i>
qRTActina_rvs	5' AGAATGGAACCACCGATCCA 3'	
RPS25_fwd	5' CCGATCGTTACTCCGTCG 3'	<i>RPS25</i>
RPS25_rvs	5' CCGATCGTTACTCCGTCG 3'	
qRTSIIOEC1	5' AGCTTATCAACGCAGAGAA 3'	<i>PSIIOEC</i>
qRTPSIIOEC1	5' TTGTTGTCCTAATCCTGCT 3'	
RTCALCUVBFWD	5'GGGCCTGGGCCTGTTAGT 3'	CabLCV-DNA-B
RTCALCUVBRVS	5' ACGGAAGATGGGAGAGGAAGA 3'	

3.11 Análise filogenética

Submetendo as sequências da família de LRR- RLK II em *Arabidopsis thaliana* no banco de dados público PLAZA 5.0 (<https://doi.org/10.1093/nar/gkab1024>) obtiveram-se os grupos de ortólogos nas dicotiledôneas e monocotiledôneas. Foram recuperadas sequências de proteínas de 100 espécies. Para fazer o alinhamento global, utilizou-se o programa mafft (<https://doi.org/10.1093/nar/gkab1024>) com o parâmetro automático. Para melhorar o alinhamento, utilizou-se o programa Trimal 1.2 (<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp348>). A árvore foi feita com o programa FastTree 2.1 (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>) que usa o método da máxima-verossimilhança aproximado para gerar as árvores com os valores de suporte gerados pelo método bootstrap.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

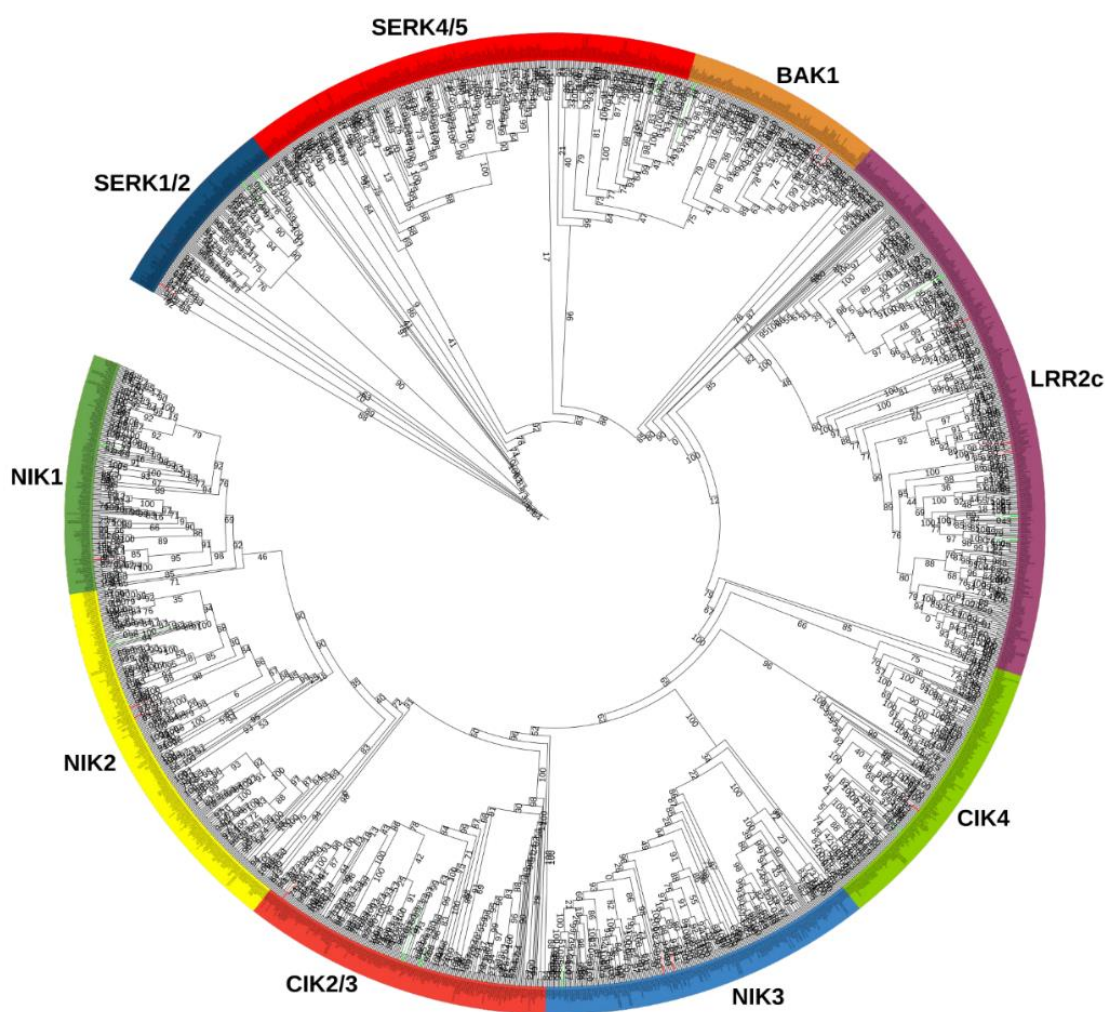
4.1 Reconstrução filogenética da subfamília LRRII-RLK em mono e dicotiledôneas

Devido à relevância da subfamília LRRII-RLK como correceptores de várias vias de sinalização em plantas, os membros dessa subfamília têm sido extensivamente estudados em diferentes espécies de plantas (SHIU *et al.*, 2003; MORRIS *et al.*, 2003; LEHTI-SHIU *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2009; DAMBROZ *et al.*, 2023). Esses estudos demarcaram filogeneticamente o clado correspondente à subfamília LRRII-RLK em *Arabidopsis*, arroz, soja e feijão por meio de análise filogenética da família RLKs e LRR-RLKs nestas espécies vegetais. Análises mais recentes caracterizaram filogeneticamente a subfamília LRRII-RLK dividindo-a em clados relacionados à conservação de sequências, análises funcionais e de expressão gênica (SAKAMOTO *et al.*, 2012, HOSSEINI *et al.*, 2020; FONTES *et al.*, 2024).

Usando as sequências derivadas do genoma de tomateiros e *Arabidopsis*, três clados distintos foram descritos para formar a subfamília monofilética de LRR-LRK II e compreendem os grupos de NIK, SERK e LRRIIc, cujos membros possuem padrões de expressão tecido-específico (SAKAMOTO *et al.*, 2012). A família SERK foi determinada com base na presença de 11 éxons que codificam para um domínio de proteína específico, mas o que caracteriza de fato estes genes é a presença de um domínio SPP (rico em serina e prolina) e o domínio C-terminal (HECHT *et al.*, 2001). Entretanto, foi observado que o domínio SPP não está presente em SERK4 e SERK5 (NOLAN *et al.*, 2011) e, conseqüentemente, foi proposto que as proteínas NIKs e SERKS não poderiam ser separadas estruturalmente. Além disso, NIKs compartilham algumas semelhanças com as SERKs em processos relacionados à defesa e desenvolvimento (HE *et al.*, 2018). Foi sugerido que, devido às correspondências tanto em estrutura quanto em função entre esses dois clados, eles não poderiam ser segregados com base em desenvolvimento ou defesa. Ambos contêm membros que atuam em ambos os processos, levando a considerá-los como uma superfamília SERK-NIK (NOLAN *et al.*, 2011).

Estudos posteriores, utilizando sequências para 1342 proteínas anotadas como SERK-like, para estimar a filogenia dentro da subfamília LRRII-RLK, reconstruíram cinco clados (LRRII-RLK 1-5), nos quais se conserva o mesmo padrão para plantas terrestre, sugerindo que duplicação de genes dessa subfamília tenha ocorrido antes que as plantas terrestres se divergissem em linhagens.

Nesta investigação, os estudos foram expandidos para incluir sequências da subfamília LRRII-RLK de 52 espécies de plantas, abrangendo monocotiledôneas e dicotiledôneas, para reconstrução filogenética da subfamília (Figura 3). Foram identificados cinco clados principais, com valores de *bootstraps* variando entre 99% e 79% (Tabela 3 - Anexos). Estes clados são exemplificados na Tabela 3 com membros de tomateiro e *Arabidopsis*. NIK2, NIK3 e BAK1/SERK3 são representados por duas cópias no genoma de tomateiros, enquanto CIK2/3 e SERK1/2 são representados por uma única cópia no genoma de tomateiros, indicando provável duplicação gênica e consequente funções redundantes.



Fonte: Otávio Brustolini, 2024.

Figura 3. Análise filogenética da subfamília II de LRR-RLKs de monocotiledôneas e dicotiledôneas. As sequências deduzidas de proteínas foram recuperadas da plataforma Plaza usando as sequências de proteínas de LRRII-RLKs de *Arabidopsis* como protótipos. A árvore filogenética foi reconstruída utilizando Máximo Verossimilhança com 1000 *bootstraps*. Os membros da subfamília foram agrupados em cinco clados, conforme descritos na Tabela 3. A contagem *bootstrap* para cada relacionamento filogenético é indicado na figura.

A ausência da função SERK4 no genoma de tomateiros provavelmente é compensada pela duplicação do gene BAK1 em tomateiros. De fato, BAK1 e SERK4 funcionam redundantemente em imunidade de plantas e em desenvolvimento (HE *et al.*, 2018). Similarmente, SERK1 e SERK2 de *Arabidopsis* funcionam de forma redundante como correceptores do receptor EMS1 ("EXCESS MICROSPOROCTES 1") na diferenciação de anteras além de mediar processos como abscisão dos órgãos florais e esporogênese masculina e, conseqüentemente, podem ser representados por uma única cópia no genoma de tomateiros (FONTES *et al.*, 2024).

Tabela 3. Membros da subfamília LRRII-RLK de *Arabidopsis* e Tomateiro

Nome	<i>Arabidopsis</i>	Tomateiro	Clado	Bootstrap
NIK1	AT5G16000	Solyc02g089550.3	NIK*	90%
NIK2	AT3G25560	Solyc04g005910.3 Solyc05g010400.3		
CIK2	AT2G23950	Solyc07g006110.3	CIK**	79%
CIK3	AT4G30520			
NIK3/CIK1	AT1G60800	Solyc04g039730.3 Solyc05g005140.4		
CIK4	AT5G45780	Solyc02g072310.3		
TIRK***	AT5G65240 AT5G10290	Solyc11g008960.3 Solyc03g078520.4	LRRIIc	99%
	AT5G63710	Solyc05g056370.4		
SERK1	AT1G71830	Solyc04g072570.3	SERK1/2*****	86%
SERK2	AT1G34210			
BAK1/SERK3	AT4G33430	Solyc10g047140.2 Solyc01g104970.3	SERK3/4	81%
SERK4	AT2G13790			
SERK5*****	AT2G13800			

* NSP-INTERACTING KINASE

** CLAVATA 3 INSENSITIVE RECEPTOR KINASE

*** THIOREDOXIN INTERACTING RECEPTOR KINASE

**** SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE

***** PSEUDOGENE

Evolutivamente, os genes NIK1 e NIK2 se agrupam juntos, sendo classificados dentro do mesmo clado NIK, sugerindo redundância funcional com cerca de 82% de sequências conservadas. Por outro lado, NIK3 se encontra em uma posição mais distante no ramo evolutivo, agrupando-se no clado CIK. De fato, NIK3 também foi descrito como CIK1, tendo sido demonstrado que participa da sinalização de Clavata (envolvendo o peptídeo CLV3, o *receptor-like kinase* CLV1 e o *receptor-like protein* CVL2), assim como CIK2 e CIK3, resultando na manutenção de meristema apical caulinar (HU *et al.*, 2018). Além disso, foi demonstrado que NIK3 participa da imunidade antiviral (FONTES *et al.*, 2004).

Quanto ao clado NIK, NIK1 é o membro mais bem caracterizado, participando na transdução de um sinal antiviral que culmina na supressão da tradução global, como mecanismo de proteção contra begomovírus (FONTES *et al.*, 2021). A ativação de NIK1 é induzida pela presença de ácidos nucleicos derivados de begomovírus em plantas infectadas, levando à fosforilação de RPL10 e consequente translocação para o núcleo, onde forma um complexo repressor com LIMYB para suprimir a expressão de genes envolvidos na maquinaria de tradução, como mecanismo de controle da tradução de mRNA viral (ZORZATTO *et al.*, 2015). Além disso, NIK1 regula negativamente a imunidade antibacteriana, interagindo *in vivo* com o receptor FLS2 e seu correceptor BAK1 (LI *et al.*, 2019).

Quanto a NIK2, tem sido demonstrado que, juntamente com NIK1, atua na imunidade antibacteriana (LI *et al.*, 2019), mas não participa da imunidade antiviral (FONTES *et al.*, 2004). Resultados controversos foram obtidos com a demonstração de que NIK2 também é ativado por PAMPs virais, causando a repressão de genes marcadores da via de sinalização antiviral mediada por NIK1 (TEIXEIRA *et al.*, 2019). Além da conservação de sequências, NIK2 se liga a um grupo pequeno de receptores do tipo LRR que também interage com NIK1, indicando que a NIK1 e NIK2 podem participar de vias de sinalização similares. Portanto, torna-se relevante resolver estes resultados controversos e examinar se NIK2 atua na imunidade antiviral.

4.2 NIK2 participa na imunidade antiviral contra o begomovírus CabLCV (cabbage leaf curl vírus)

Foram utilizadas diferentes abordagens complementares para analisar se NIK2 está envolvida na resistência à infecção por begomovírus. Inicialmente foi examinado se a expressão de NIK2 é induzida pelo vírus. Para isso, foram utilizados resultados de RNA-seq de folhas de *Arabidopsis* infectadas com CabLCV (ZORZATTO *et al.*, 2015), validados por RT-qPCR de plantas infectadas a 14 dias pós-inoculação (Figura 4). Similarmente a NIK1 (ZORZATTO *et*

al., 2015), foi demonstrado que a expressão de NIK2 é induzida pela infecção viral. Também foram identificados nocautes de T-DNA de *nik1-1*, *nik2-1* (FONTES et al., 2004) e duplos mutantes *nik1-1/nik2-1* (LI et al., 2019) a fim de avaliar se a inativação de NIK2 aumentaria a suscetibilidade à infecção viral.

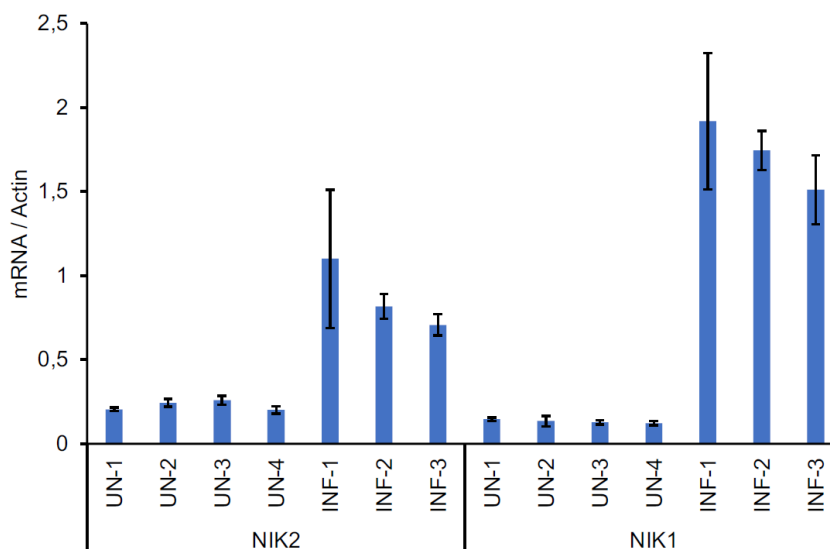


Figura 4. O gene NIK2 é induzido durante infecção por begomovírus. Plantas de *Arabidopsis* foram infectadas com os clones infecciosos DNA-A + DNA-B de CabLCV por meio de biolística e os níveis de expressão de NIK2 e NIK1 foram monitorados por RT-qPCR em folhas sistêmicas aos 14 dias após inoculação. UN indica folhas não infectadas e IN, folhas infectadas. As barras de erro indicam 95% intervalo de confiança.

Col-0, *nik1-1*, *nik2-1*, *nik1-1/nik2-1* foram inoculados com clones infecciosos de DNA-A e DNA-B de CabLCV e a infecção foi confirmada por PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos do DNA-B do vírus, aos 7, 14 e 21 dias após a infecção (Figura 5A). Oligonucleotídeos específicos para o T-DNA e sequências flanqueadoras dos genes *NIK1* e *NIK2* foram usados para genotipagem dos nocautes (Figuras 5B e 5C). Aos 7 dias pós-inoculação, o acúmulo do DNA viral nas folhas jovens sistêmicas era evidente em todas os genótipos analisados, conforme detectado pela amplificação específica do fragmento de 500 bp do DNA-B de CabLCV (Figura 5A).

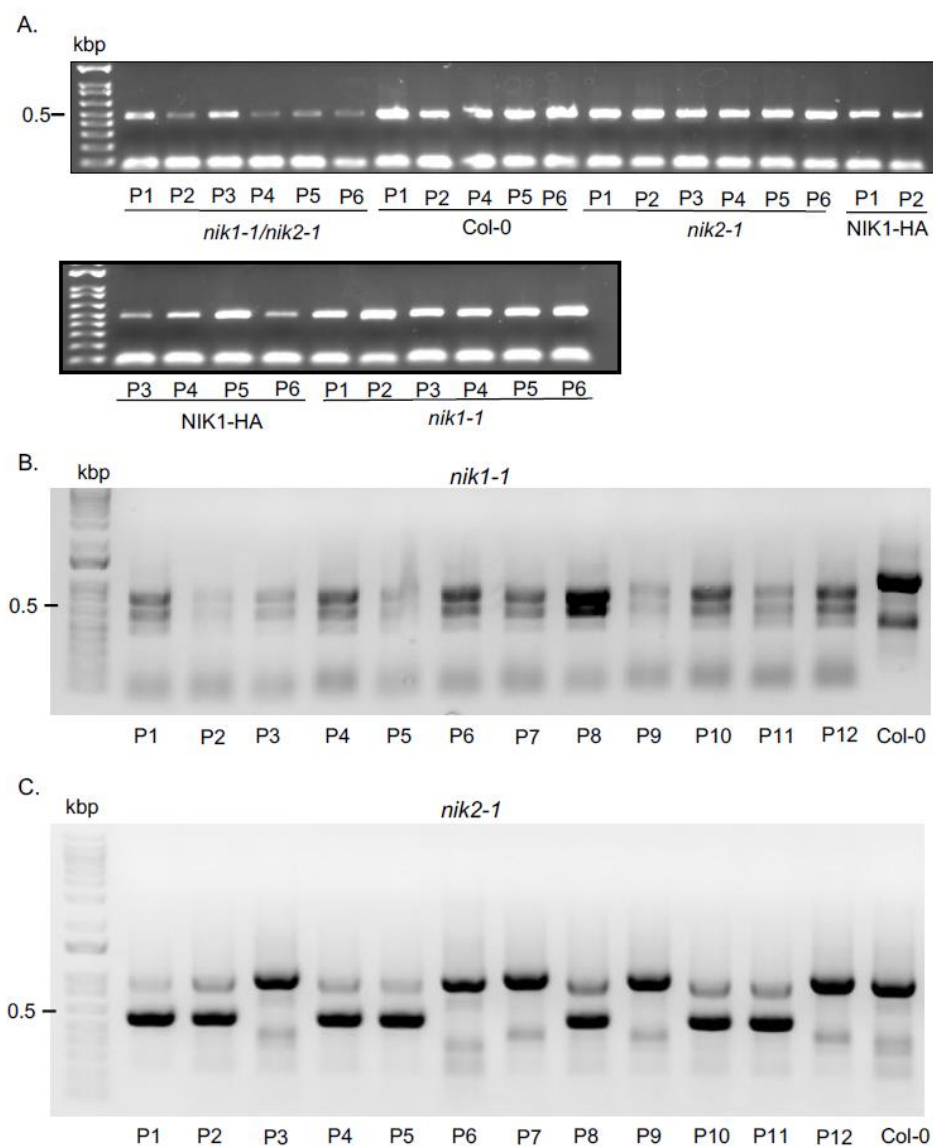


Figura 5. Diagnóstico baseado em PCR de infecção viral e alelos nulos. A. Diagnóstico por PCR de infecção viral. Plantas de *Arabidopsis* foram infectadas com os clones infecciosos DNA-A + DNA-B de CabLCV por meio de biobalística e o acúmulo do DNA viral foi monitorado por PCR em folhas sistêmicas a 7 dias após inoculação das linhagens Col-0, *nik1-1*, *nik2-1*, *nik1-1/nik2-1*. B e C. Genotipagem dos mutantes *nik1-1* e *nik2-1*. As plantas infectadas foram monitoradas quanto à homozigose dos alelos nulos *nik1* (B) e *nik2* (C), utilizando oligonucleotídeos que anelam no T-DNA e nas regiões flangeadoras dos respectivos genes.

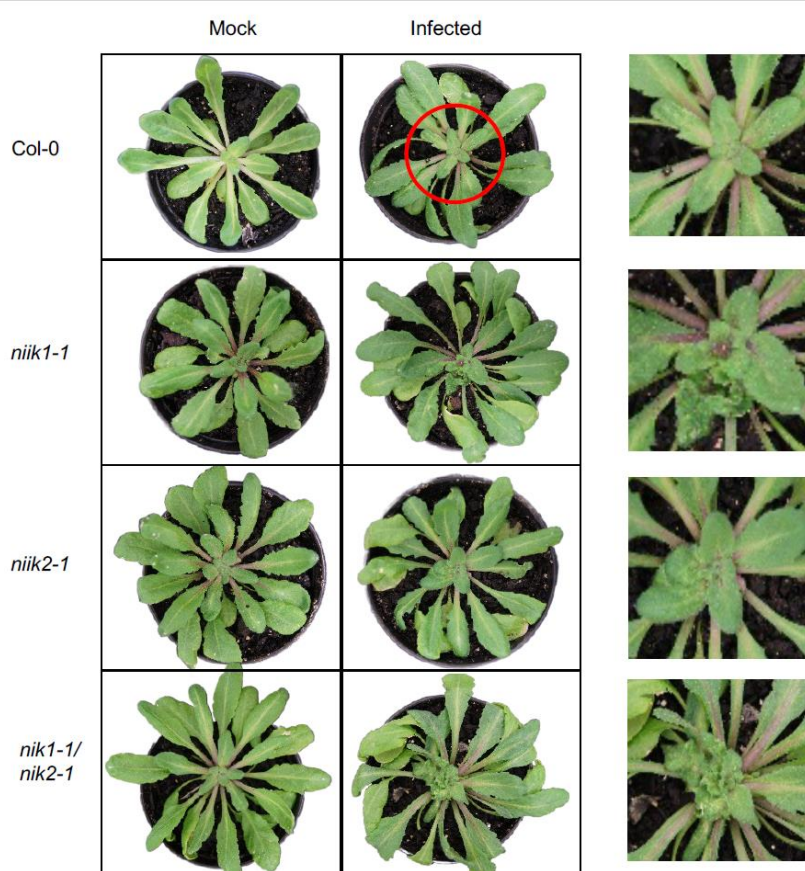


Figura 6. Sintomas associados à infecção de CabLCV em Col-0, aos 21 dias pós-inoculação. Plantas de *Arabidopsis* foram infectadas com os clones infecciosos DNA-A + DNA-B de CabLCV por meio de biolística e o acúmulo do DNA viral foi monitorado por PCR em folhas sistêmicas das linhagens Col-0, *nik1-1*, *nik2-1*, *nik1-1/nik2-1*. A figura mostra amostras representativas dos referidos genótipos infectados (infected) e não infectados (mock). As figuras à direita são closeups da região de folhas jovens marcada em vermelho.

Aos 21 dias após bombardeamento todas as linhagens desenvolveram sintomas típicos de infecção por begomovírus, como amarelecimento das folhas, cloroses e encarquilhamento das folhas, embora com intensidades diferentes (Figura 6). Foi utilizado um clone de DNA-A infeccioso atenuado pela remoção da proteína do capsídeo o que causou sintomas atenuados na linhagem Col-0.

Os sintomas observados na linhagem *nik2-1*, *nik1-1* e *nik1-1/nik2-1* foram similares, exibindo encarquilhamento acentuado e distorção das folhas jovens na região do meristema, além de amarelecimento foliar (Figura 6, veja o aumento da região meristemática caulinar). Sintomas da doença foram visivelmente mais severos do que aqueles da linhagem Col-0, indicando que a perda de função de *NIK2* resultou em aumento de suscetibilidade a begomovírus, similarmente ao resultado da inativação de *NIK1*.

Esta interpretação foi confirmada por ensaios complementares de quantificação da carga viral nas folhas sistemicamente infectadas aos 14 dias após a inoculação (Figura 7). As linhagens mutantes nulas *nik2-1* e *nik1-1* acumularam um nível superior de DNA viral em comparação com Col-0, com efeito aditivo para a linhagem mutante duplo *nik1-1/nik2-1*, ainda que *nik1-1/nik2-1* exibia heterozigose com relação aos alelos mutados. Consequentemente, a perda da função de NIK2 confere maior suscetibilidade à begomovírus, semelhante a NIK1, indicando que NIK1 e NIK2 são parálogos funcionais na imunidade antiviral contra begomovírus.

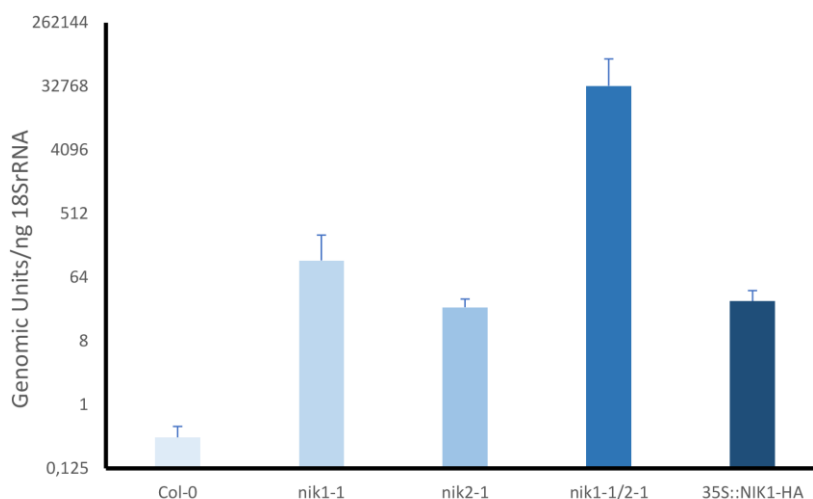


Figura 7. Quantificação absoluta das unidades genômicas em linhagens infectadas. O acúmulo do DNA viral foi determinado por qPCR aos 14 dias pós-inoculação. O gene 18SrRNA foi utilizado como normalizador. As barras de erros representam 95% de intervalo de confiança.

Estudos prévios são consistentes com a observação de que NIK2 atua redundantemente na via de sinalização antiviral mediada por NIK1 (TEIXEIRA *et al.*, 2019). Nesses estudos, similarmente a NIK1, foi demonstrado que ácidos nucleicos derivados de NIK1 e preparados de plantas infectadas atuam como PAMP virais e induzem a ativação de NIK2, levando à repressão de genes marcadores associados à via de sinalização antiviral mediada por NIK1 (TEIXEIRA *et al.*, 2019).

Ambos DNA e RNA preparados de plantas infectadas, mas não de plantas saudáveis, causaram repressão dos genes marcadores *RPL18* e *RPS25* em Col-0. Inativação de NIK2 em *nik2-1* causou um nível de repressão dos genes marcadores menor do que Col-0, mas similar àquele exibido por *nik1-1*. No entanto, a repressão dos genes *RPL18* e *RPS25* induzida por PAMPs virais foi totalmente bloqueada no mutante duplo *nik1-1/nik2-1*, confirmando que

NIK1 e NIK2 são funcionalmente redundantes e a ativação de uma resposta antiviral mediada por NIK1 por ácidos nucleicos derivados de begomovírus requer a função de NIK1 ou NIK2.

Em contraste com os resultados desta investigação, ensaios de infectividade em alelos nulos *nik2-1* demonstraram previamente que NIK2 não está envolvida na resistência contra begomovírus (FONTES *et al.*, 2004). Foi observado que tanto o nocaute *nik2-1* quanto Col-0 apresentaram similar fenótipo de suscetibilidade ao vírus. Precedentes na literatura tem indicado que inserções de T-DNA dentro do mesmo locus, mas em posições diferentes, em linhagens homozigotas exibem variações fenotípicas relacionadas a diferentes características (VALENTINE *et al.*, 2012).

No entanto, nesta investigação, foi usado o mesmo alelo de T-DNA de NIK2, designado *nik2-1* e caracterizado em FONTES *et al.* (2004). Ao contrário dos ensaios prévios, o estado de homozigose dos alelos nulos *nik2-1* foi avaliado em todas as plantas infectadas por genotipagem (Figura 5C). Enquanto todas as plantas *nik1-1* apresentaram os alelos mutados em homozigose (Figura 5B), as plantas *nik2-1* constituíram uma mistura de plantas com alelos selvagens em homozigose, alelos mutantes em homozigose e em heterozigose. Consequentemente, para os ensaios de acúmulo do DNA viral, foram selecionadas apenas plantas com alelos nulos em homozigose, o que não foi reportado como sendo o caso em FONTES *et al.* (2004).

Além disso, os ensaios de infectividade diferiram, sendo que a interpretação anterior de que NIK2 não tem atividade antiviral baseou-se apenas na análise do progresso da infecção em termos de números de plantas infectadas, sem qualquer quantificação do acúmulo do DNA viral em *nik2-1*. Embora a aparente contradição entre os resultados presentes e aqueles de FONTES *et al.* (2004) possa ser reconciliada devido a ensaios fenotípicos diferentes e heterogeneidade dos alelos nulos *nik2-1*, seria relevante realizar ensaios de complementação em *nik2-1* para confirmar que o fenótipo de suscetibilidade aumentada exibida por *nik2-1* nesta investigação é sem dúvida devido à perda de função gênica de NIK2.

4.3 Natureza química das PAMPs virais elicitoras da via antiviral mediada por NIK1/NIK2

Estudos anteriores relevaram que a via de sinalização antiviral mediada por NIK1/NIK2 é ativada por ácidos nucleicos derivados de infecção por begomovírus. Foi demonstrado que RNA ou DNA preparados de plantas infectadas, mas não de plantas saudáveis, induzem a fosforilação de NIK1 e consequente repressão dos genes marcadores da ativação da via antiviral (TEIXEIRA *et al.*, 2023).

Adicionalmente, foi demonstrado que NIK2 também participa da via antiviral podendo substituir funcionalmente NIK1. Como demonstrado anteriormente, tratamento de plântulas com RNA preparado de plantas infectadas, mas não de plantas saudáveis promoveu a repressão dos genes marcadores, *RPS25* e *PSHIOEC* (TEIXEIRA *et al.*, 2023). Ao contrário, o marcador *UBQ5* não promoveu a repressão dos genes em LIMYB (Figura 8). Em mamíferos, RNA de cadeia dupla provenientes de vírus têm sido extensivamente caracterizados como PAMPs virais capazes de ativarem imunidade inata iniciada pelos receptores *Toll-like* nos endossomos ou pela proteína quinase citoplasmática de mamíferos ativada por RNA, conhecida como PKR (BALACHANDRAN *et al.*, 2000).

Na sinalização mediada por silenciamento de RNA, o mecanismo de reconhecimento de dsRNA pela enzima Dicer é bem caracterizado, em contraste ao mecanismo de percepção de dsRNA por PTI antiviral (NIEHL *et al.*, 2016; NIEHL & HEINLEIN, 2019). Tem sido demonstrado que a PTI induzida dsRNA restringe a progressão da infecção viral ativando deposição de calose nos plasmodesmata e, portanto, limitando o transporte macromolecular célula-a-célula através desses canais de comunicação intercelular (HUANG *et al.*, 2023).

Na sinalização antiviral mediada por NIK1, não somente PAMPs virais de RNA, mas também DNA de plantas infectadas induziu repressão dos genes marcadores, *RPS25* e *PSHIOEC*. Por outro lado, a diminuição da expressão dos genes não foi observada em uma via não relacionada (*UBQ5* – Figura 9). No entanto, a natureza química e a origem das PAMPs virais não foram examinadas em detalhes e ainda não foi determinado se DNA viral isolado funciona como PAMP viral ou se há necessidade de ser ativado por algum mecanismo durante a infecção.

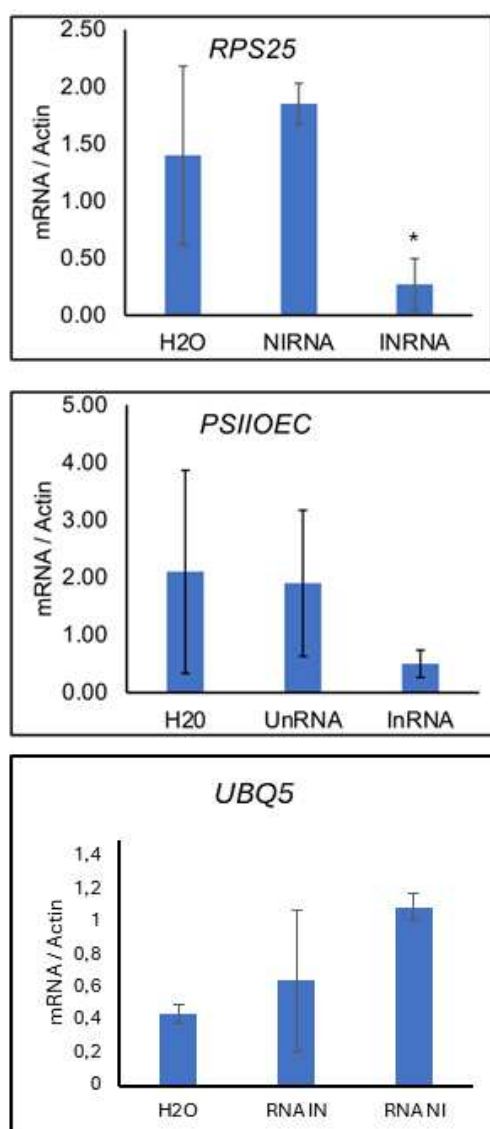


Figura 8. RNA preparado de plantas infectadas induzem ativação da via de sinalização antiviral mediada por NIK1/NIK2. Plântulas de *Arabidopsis* foram tratadas com RNA extraído de plantas infectadas (INRNA) e de plantas saudáveis (NIRNA). Após 1 h de tratamento, RNA total foi extraído e a expressão gênica dos genes marcadores *RPS25* e *PSIICEO* monitorada por RT-qPCR, utilizando actina como normalizador. Expressão relativa foi calculada pelo método $2^{-\Delta CT}$.

Para examinar esta hipótese, DNA-B do clone infeccioso foi preparado de *E. coli*, e folhas injuriadas com abrasivo de *Arabidopsis* Col-0 foram diretamente tratadas com 100 ng do plasmídeo purificado durante 1 h. A ativação da via de sinalização antiviral foi realizada pela análise da repressão de genes marcadores da via de sinalização (TEIXEIRA *et al.*, 2023). DNA-A do vírus (1.5 cópias, repetição da origem de replicação), propagado em *E. coli*, funcionou como PAMP viral, indicando que o genoma do vírus por si só tem propriedades de PAMP sendo capaz de induzir a ativação da sinalização antiviral por NIK1 (Figura 9).

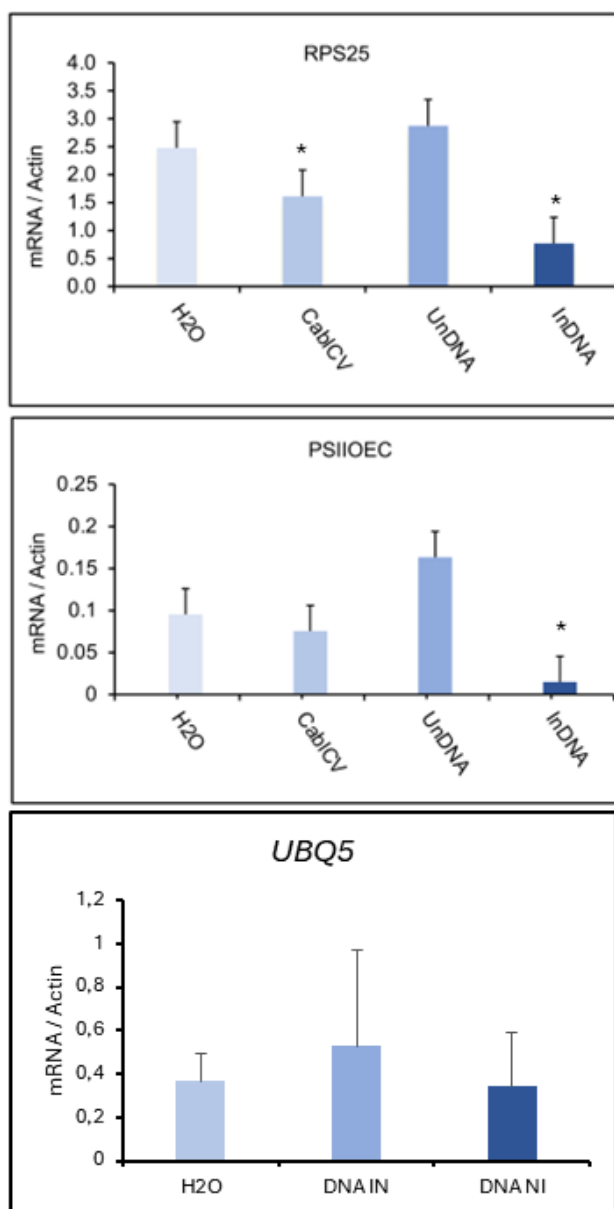


Figura 9. DNA derivado de begomovírus age como PAMPs virais. Plântulas de *Arabidopsis Col-0* foram tratadas com DNA extraído de plantas infectadas (InDNA), de plantas saudáveis (UnDNA) e DNA-A de CabLCV. Após 1 h de tratamento, RNA total foi extraído e a expressão gênica dos genes marcadores *RPS25* e *PSII OEC* monitorada por RT-qPCR, utilizando actina como normalizador. Expressão relativa foi calculada pelo método $2^{-\Delta CT}$.

Com o intuito de mapear regiões do genoma viral a serem utilizadas como PAMP viral, a região intergênica, contendo a origem de replicação e uma estrutura de grampo conservada, foi purificada e utilizada para tratamento de folhas injuriadas de *Arabidopsis* por 1 h (Figura 10). A região intergênica exibiu propriedade de PAMP viral e reprimiu a expressão do gene marcador *RPS25*. Provavelmente, a presença de uma estrutura de grampo conservada na região intergênica possa ser a característica química reconhecida pela planta como DNA estranho, ativando assim a via de sinalização de defesa. A perda de função de NIK1 ou NIK2 não

eliminou totalmente a ativação da via de sinalização antiviral mediada por NIK1/NIK2 induzida pela região intergênica, corroborando com a interpretação de que NIK1 e NIK2 agem redundantemente na via de sinalização antiviral.

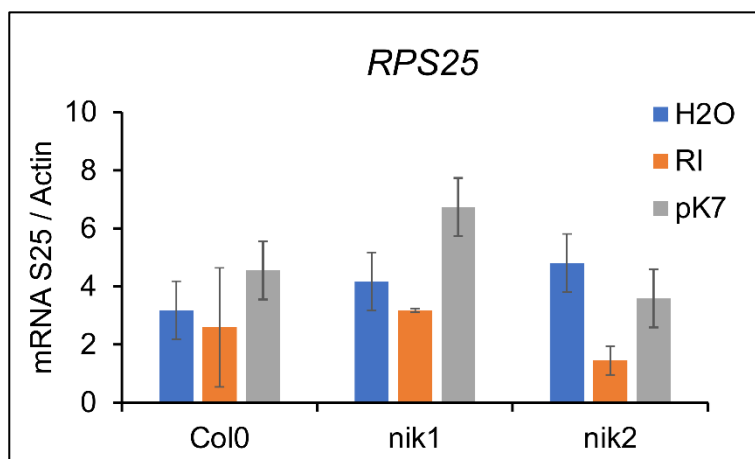


Figura 10. A região intergênica do DNA-B de CabLCV funciona como PAMP viral. Plantulas de Arabidopsis, genótipos Col-0, *nik1-1* e *nik2-1*, foram tratadas com um fragmento amplificado e purificado do DNA-B de CabLCV, contendo a região intergênica. Após 1 h de tratamento, RNA total foi extraído e a expressão gênica dos genes marcadores *RPS25* e *PSIIOCE* monitorada por RT-qPCR, utilizando actina como normalizador. Expressão relativa foi calculada pelo método $2^{-\Delta CT}$.

Apesar de nesta investigação tenha sido demonstrado que fragmentos do genoma viral possam ser reconhecidos como PAMPs virais que ativam a via de sinalização de NIK1/NIK2, ainda permanece para ser determinado como o vírus, sendo parasita intracelular obrigatório sem acesso ao apoplasto, pode ser percebido por PRRs extracelularmente. As PAMPs virais devem ser produzidas intracelularmente uma vez que vírus são parasitas intracelulares. Sabe-se que os genomas de vírus de plantas também não alcançam o apoplasto visto que se movimentam entre células via plasmodesmos. Portanto, PAMPs virais feitas de ácidos nucléicos dos vírus de plantas devem ser compartimentalizadas intracelularmente, não havendo qualquer evidência de que elas possam alcançar o apoplasto para serem detectadas pelo domínio extracelular de possíveis PRRs (“*viral PAMPs recognition receptors*”), especificamente sensores de PAMPs virais. Uma possibilidade seria que estes receptores transmembranas detectem PAMPs virais através de seus domínios intracelulares, assim PTI antiviral seria ativado por PAMP viral induzindo dimerização do receptor com o correceptor NIK1/NIK2 por meio do domínio quinase. A proteína quinase intracelular de mamíferos ativada por RNA (PKR) sofre dimerização e ativação induzida por dsRNA viral, após associação direta do dsRNA viral produzido durante a infecção com seu domínio quinase (BALACHANDRAN *et al.*, 2000).

Alternativamente, a via de reciclagem microsomal pode fornecer uma rota para colocalização de NIKs, SERKs e PRRs com as PAMPs virais. Recentemente, foi demonstrado que o DNA viral de begomovírus é endereçado para os endossomos por meio de interações com as proteínas NIG e NISP (CARVALHO *et al.*, 2008; GOUVEIA- MAGESTE *et al.*, 2021). As proteínas de movimento (MPs) dos vírus de plantas usam a via de reciclagem endocítica para mover complexos de proteínas virais com DNA viral ou RNA viral para os plasmodesmos e então para propagação do vírus célula-a-célula (LEWIS & LAZAROWITZ, 2010). Também foi demonstrado que os PRRs das plantas são internalizados via endossomas (MBENGUE *et al.*, 2016). Portanto, a percepção específica de um vírus por PRRs dependeria da colocalização de PRRs internalizados em endossomos com o genoma viral também direcionados para os endossomos por meio da via secretória.

Consistente com ambas as alternativas, para que ácidos nucleicos derivados de vírus ativem a via de sinalização antiviral NIK1/NIK2 é necessário que as folhas sejam danificadas mecanicamente, fornecendo o acesso intracelular para PAMPs virais. Embora a via de reciclagem endocítica seja uma hipótese plausível para percepção do vírus pelas PRRs das plantas, similar aos TLRs (“*toll-like receptors*”) dos endossomas em mamíferos, nesta rota não parece possível sincronizar a cinética precoce de ativação de PTI (resposta primária de defesa contra patógenos) com o movimento tardio do vírus para as células adjacentes. Apenas com a identificação e caracterização de PRRs virais será possível abordar essas possibilidades de percepção dos vírus por RLKs ancorados na membrana plasmática.

5. CONCLUSÕES

A relevância da subfamília II de LRR-RLKs tem sido expandida consideravelmente com as descobertas de que algumas proteínas dessa família formam “hubs” de interação proteína-proteína com alto grau de centralidade. Entre elas, destacam-se BAK1, NIK3 e NIK1, que funcionam como correceptores, estando entre os mais influentes transmissores de informação nas células vegetais. Análise filogenética dessa subfamília demonstrou que BAK1, NIK3 e NIK1 estão separados em clados distintos, atuando em vias de sinalização diferentes. O clado NIK foi formado por NIK1 e NIK2 que, apesar de conservados em estrutura e evolução, evidências controversas não permitia classificá-los como parálogos na imunidade antiviral. Nesta investigação, foram fornecidas diversas linhas de evidência indicando a redundância funcional entre NIK1 e NIK2 na via de sinalização antiviral. Inicialmente, por meio de uma reconstrução filogenética da subfamília LRR-RLK, utilizando sequências de proteínas de 100 espécies de plantas, demonstrou-se que NIK2 é mais relacionado a NIK1, agrupando-se no mesmo clado e separadamente de NIK3. Em segundo lugar, ensaios de infecção viral utilizando os nocautes *nik1-1*, *nik2-1* e *nik1-1/nik2-1* demonstraram que, em comparação com Col-0, a inativação de NIK2 aumentou a suscetibilidade ao begomovírus CabLCV a um nível similar à suscetibilidade conferida pela perda de função de NIK1, demonstrando assim que NIK2 está envolvido na resistência contra begomovírus. O nocaute *nik2-1* apresentou severidade de sintomas e carga viral similares a *nik1-1* aos 14 dias após inoculação. Além disso, o mutante duplo *nik1nik2* exibiu um fenótipo de suscetibilidade aumentada mais acentuado do que aquele das linhagens mutantes simples. O acúmulo de DNA viral no duplo mutante foi muito superior a *nik1-1* ou *nik2-1*, indicando que um correceptor poderia substituir o outro na via de sinalização antiviral. Finalmente, foi demonstrado que a via de sinalização antiviral foi ativada por PAMPs virais nos nocautes simples, embora com eficiência inferior do que em Col-0. Coletivamente, estes resultados demonstraram conclusivamente que NIK1 e NIK2 exibem redundância funcional na imunidade antiviral em plantas.

6. REFERÊNCIAS

- BALACHANDRAN, S.; ROBERTS, P. C.; BROWN, L. E.; TRUONG, H.; PATTNAIK, A. K.; ARCHER, D. R.; BABER, G. B. Essential role for the dsRNA dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection, **Immunity**, vol. 13, p. 129-141, 2000. doi: doi.org/10.1016/s1074-7613(00)00014-5
- BJORNSON, M.; ZIPFEL, C. **Plant immunity**: Crosstalk between plant immune receptors. **Current Biology**, vol. 21, p. 796-798, 2021. doi: 10.1016/j.cub.2021.04.080
- BOLLER, T.; HE, S.Y. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. **Science**, vol. 324, p. 742-744, 2009. doi: 10.1126/science.1171647
- COUTO, D; ZIPFEL, C. Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. **Nature Reviews Immunology**, vol. 16, p. 537-553, 2016. doi:10.1038/nri.2016.77
- CHO, H.; LEE, J.; OH, E. Leucine-rich repeat receptor-like proteins in plants: structure, function, and signaling. **Jornal of plant biology**, vol. 66, p. 99-107, 2023. doi: 10.1007/s12374-022-09374-1
- CHAKRABORTY, S.; NGUYEN, B.; WASTI, S. D.; XU, G. Plant leucine-rich repeat receptor kinase (lrr-rk): structure, ligand perception, and activation mechanism. **Molecules**, vol. 24, p. 1-37, 2019. doi:10.3390/molecules24173081
- CHO, H.; LEE, J.; OH, E. Leucine-rich repeat receptor-like proteins in plants: structure, function, and signaling. **Journal of Plant Biology**, vol. 66, p. 99-107, 2023. doi:10.1007/s12374-022-09374-1
- DAMBROZ, C. M.; AONO, A. H.; ANDRADE SILVA, E. M.; PEREIRA, W. A. Genome-wide analysis and characterization of the LRR-RLK gene family provides insights into anthracnose resistance in common bea. **Scientific Reports**, vol. 13, p. 13330-13455. doi: 10.1038/s41598-023-40054-3.
- DARDICK, C.; CHEN, J.; RITCHER, J. C.; OUYANG, S.; RONALD, P. The rice kinase database. a phylogenomic database for the rice kinome. **Plant Physiol**, vol. 143, p. 579-586, 2007. doi: 10.3390/molecules24173081
- DEN TOORN, M.A.; ALBRECHT, C.; DE VRIES, S. On the Origin of serks: Bioinformatics Analysis of the Somatic Embryogenesis Receptor Kinases, **Molecular Plant**, vol. 5, p. 762-782, 2025. doi: 10.1016/j.molp.2015.03.015
- DEFALCO, T. A.; ZIPFEL, C. Molecular mechanism of early plant pattern-triggered immune signaling. **Molecular Cell**, vol. 81, p. 3449-3467, 2021. doi: 10.1016/j.molcel.2021.07.029
- DEVENDRAN, R.; NAMGIAL, T.; REDDY, K. K.; KUMAR, M. ZARREN, F. CHAKRABORTY, S. Insights into the multifunctional roles of geminivirus-encoded proteins in pathogenesis. **Archives of virology**, vol. 167, p. 307-326, 2022. doi: 10.1007/s00705-021-05338-x

DIEVART, A.; GOTTIN, C.; PÉRIN, C.; RANWEZ, V.; CHANTRET, N. Origin and diversity of plant receptor-like kinases. **Annual Review of Plant Biology**, vol. 71, p. 131-156, 2020. doi:10.1146/annurev-arplant-073019-025927

DODDS, P. N.; RATHJEN, J. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. **Nature**, vol. 11, p. 539-548, 2010. doi: /10.1038/nrg2812.

FERREIRA, M. A.; TEIXEIRA, R.M.; FONTES, E.P.B. Geminivirus-Host interactions: action and reaction in receptor-mediated antiviral immunity. **Viruses**, vol. 13, p. 1-11, 2021. doi:10.3390/v13050840

FIALLO-OLIVÉ, E.; NAVAS-CASTILLO, J. The Role of Extensive Recombination in the Evolution of Geminiviruses. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, p. 139-166, 2023. doi: 10.1007/978-3-031-15640-3_4

FIALLO-OLIVÉ, E.; LETT, J. M.; MARTIN, D. P.; ROUMAGNAC, P.; VARSANI, A.; ZERBINI, F. M.; NAVAS-CASTILLO, J. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Geminiviridae* 2021. **Journal of General Virology**, p. 1-2, 2021. doi: 10.1099/jgv.0.001696

FONTES, E. P. B.; SANTOS, A. A.; LUZ, D. F.; WACLAWOVSKY, A. J.; CHORY, J. The geminivirus nuclear shuttle protein is a virulence factor that suppresses transmembrane receptor kinase activity. **Genes & Development**, vol. 18, p. 2545-2256, 2004. doi: 10.1101/gad.1245904

FONTES, E. P. B. SERKs and NIKs: coreceptors or signaling hubs in a complex crosstalk between growth and defense?, **Plant Biology**, vol. 77, p. 1-7, 2024. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2023.102447>

FONDONG, V. N. Geminivirus protein structure and function. **Molecular Plant Pathology**, vol. 14, p. 635-639, 2013. doi: <https://doi.org/10.1111/mpp.12032>

GOUVEIA, B. G.; CALIL, I.P; MACHADO, J. P. B.; SANTOS, A. A.; FONTES, E. P. B. Immune Receptors and Coreceptors in Antiviral Innate Immunity in Plants. **Frontiers in Microbiology**, vol. 7, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2016.02139

HANLEY-DOWNDOIN, L. SETTLAGE, S.; ROBERTSON, D. Reprogramming plant gene expression: a prerequisite to geminivirus DNA replication. **Molecular Plant Pathology**, vol. 5, p. 149-156, 2004. doi: 10.1111/j.1364-3703.2004.00214.x

HANLEY-BOWDOIN, L.; BEJARANO, E. R.; ROBERTSON, D.; MANSOOR, S. Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. **Nature Reviews Microbiology**, vol. 11, p. 777-778, 2013. doi: 10.1038/nrmicro3117.

HE, Y.; ZHOU, J.; SHAN, L.; MENG, X. Plant cell surface receptor-mediated signaling – a common theme amid diversity, **Journal of Cell Science**, vol. 131, p. 1-11, 2018. doi:10.1242/jcs.209353

- HU, C.; ZHU, Y.; CUI, Y.; CHEN, K.; LIANG, W.; WEI, Z.; ZHU, M.; YIN, H.; ZENG, L.; XIAO, Y.; LV, M.; YI, J.; HOU, S.; HE, K.; GOU, X. A group of receptor kinases are essential for CLAVATA signalling to maintain stem cell Homeostasis. **Nature Plants**, vol. 4, p. 205–211, 2018. doi: <https://10.1038/s41477-018-0123-z>
- HOHMANN, U.; LAU, K.; HOTHORN, M. The structural basis of ligand perception and signal activation by receptor kinases. **Annual Review of Plant Biology**, vol. 68, p. 109-137, 2017. doi: 10.1146/annurev-arplant-042916-040957
- HOSSEINI, S.; SCHMIDT, E. D. L.; BAKER, F.T. Leucine-rich repeat receptor like kinase II phylogenetics reveals five main clades throughout the plant kingdom. **The Plant Journal**, vol. 103, p. 547-560, 2020. doi: 10.1111/tpj.14749
- KUMAR, R.V. Plant Antiviral Immunity against geminiviruses and viral counter-defense for survival. **Frontiers in Microbiology**, vol. 10, p. 1-17, 2019. doi: 10.3389/fmicb.2019.01460
- JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, vol. 444, p. 323-329, 2006. doi: 10.1038/nature05286
- LEHTI-SHIU, M. D.; ZOU, C.; HANADA, K.; SHIU, S. H. Evolutionary history and stress regulation of plant receptor-like kinase/pelle genes. **Plant Physiology**, vol. 150, p. 12-26, 2009. doi: [10.1016/S1673-8527\(08\)60153-8](https://10.1016/S1673-8527(08)60153-8)
- LUNA, A. P.; LOZANO-DURÁ, R. Geminivirus-Encoded Proteins: Not All Positional Homologs Are Made Equal. **Frontiers in Microbiology**, vol. 11, 2020. doi: 10.3389/fmicb.2020.00878
- LIU, P.; WEI, W.; OUYANG, S.; ZHANG, J. S.; CHEN, J. S.; ZHANG, W. K. Analysis of expressed receptor-like kinases (RLKs) in soybean, **Journal Genet Genomics**, vol. 36, p. 611–619, 2009. doi: [https://doi.org/10.1016/s1673-8527\(08\)60153-8](https://doi.org/10.1016/s1673-8527(08)60153-8)
- NAWAZ-UL-REHMAN, M.; FAUQUET, C. M. Evolution of geminiviruses and their satellites, **Febs Letters**, vol. 583, p. 1825-1832, 2009. doi: 10.1016/j.febslet.2009.05.045
- NOLAN, K.E.; KURDYUKOV, S; ROSE, J.R. Characterisation of the legume SERK-NIK gene superfamily including splice variants: implications for development and defence, **BMC Plant Biology**, vol. 11, p. 1-16, 2011. doi: 10.1186/1471-2229-11-44
- MARIANO, A. C. ANDRADE, M. O.; SANTOS, A. A.; CAROLINO, S. M. B.; OLIVEIRA, M. L.; BACARACT-PEREIRA, M. C.; BROMMONSHENKEL, S. H.; FONTES, E. P. B. Identification of a novel receptor-like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shuttle protein. **Virology**, vol. 318, p. 24-31, 2004. doi: 10.1016/j.virol.2003.09.038
- MORRIS, E. R.; WALKER, J. C.: Receptor-like protein kinases: the keys to response, **Current Opinion in Plant Biology**, vol. 6, p. 339-342, 2003. doi: [https://doi.org/10.1016/s1369-5266\(03\)00055-4](https://doi.org/10.1016/s1369-5266(03)00055-4)
- PRADHAN, B.; VU, T.; DEY, N.; MUKHERJEE, S. Molecular Biology of Geminivirus DNA Replication. **Avid Science**, p. 1-15, 2017.

PRUITT, R. N.; GUST, A. A.; NÜRNBERGER, T. Plant immunity unified. **Nature Plants**, vol. 7, p. 382-383, 2021. doi: <https://doi.org/10.1038/s41477-021-00903-3>

RAMESH, S. V.; SAHU, P. P.; PRASAD, M.; PRAVEEN, S.; PAPPU, H. R. Geminiviruses and plant hosts: a closer examination of the molecular Arms race. **Viruses**, vol. 9, p. 1-21, 2017. doi:10.3390/v9090256

ROCHA, C. S.; SANTOS, A. A.; MACHADO, J. P. B.; FONTES, E. P. B. The ribosomal protein L10/QM-like protein is a component of the NIK-mediated antiviral signaling. **Virology**, vol. 380, p. 165-169, 2008. doi: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.08.005>

ROUDAIRE, T.; HÉLOIR, M. C.; WENDEHENNE, D.; ZADOROZNYJ, A.; DUBREZ, L.; POINSSOT, B. Cross Kingdom Immunity: The role of immune receptors and downstream signaling in animal and plant cell death. **Frontiers in Microbiology**, vol. 11, p. 1-21, 2021. doi: 10.3389/fimmu.2020.612452

RIZVI, I.; CHOUDHURY, N. R.; TUTEJA, N. Insights into the functional characteristics of geminivirus rolling-circle replication initiator protein and its interaction with host factors affecting viral DNA replication. **Arch Virology**, vol. 160, p.375-387, 2015. doi: 10.1007/s00705-014-2297-7

SANTOS, A. A.; LOPES, K. V. G.; APFTA, J. A. C.; FONTES, E. P. B. NSP-interacting kinase, NIK: a transducer of plant defence signalling. **Journal of Experimental Botany**, vol. 61, p.3839-3845, 2010. doi: 10.1093/jxb/erq219

SAKAMOTO, T.; DEGUCHI, M.; BRUSTOLINI, O. J. B.; SANTOS, A. A.; SILVA, F. F.; FONTES, E. P. B. The tomato RLK superfamily: phylogeny and functional predictions about the role of the LRRII-RLK subfamily in antiviral defense. **Plant Biology**, vol. 12, p. 1-18, 2012. doi: <https://10.1186/1471-2229-12-229>

SHIU, S.H.; BLEECKER, A. B. Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases, **PNAS**, vol. 98, p.10763–10768, 2001. doi: <https://10.1073/pnas.181141598>

TEIXEIRA, R. M.; FERREIRA, M. A.; RAIMUNDO, G. A. S.; LORIATO, V. A. P.; REAIS, P. A. B.; FONTES, E. P. B. Virus perception at the cell surface: revisiting the roles of receptor-like kinases as viral pattern recognition receptors. **Molecular Plant Biology**, vol. 20, p. 1196-1202, 2019. doi: 10.1111/mpp.12816

TEIXEIRA, R. M. et al. Coordinated regulation of photosynthesis and translation via NIK1/RLP10/LIMYB signaling module in response to biotic and abiotic stress. 2023. doi: <https://doi.org/10.1101/2023.06.13.544461>

TANG, D.; WANG, G.; ZHOU, J. Receptor kinases in plant-pathogen interactions: more than pattern recognition. *The plant cell*, vol. 29, p. 618-637, 2017. doi: <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00891>

VALENTINE, M. E. et al. Extensive Phenotypic Variation among Allelic T-DNA Inserts in *Arabidopsis thaliana*. *Plos One*, 2012. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044981>

WANG, Y. et al. Evasion of plant immunity by microbial pathogens. *Nature*, vol. 20, p. 449-464, 2022. doi: <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00710-3>

ZHANG, J. et al. Plant Defense and Viral Counter-Defense during Plant-Geminivirus Interactions, *Viruses*, vol. 15, p. 1-15, 2023. doi: [10.3390/v15020510](https://doi.org/10.3390/v15020510)

ZHU, Q. et al. Advances in Receptor-like protein kinases in balancing plant growth and stress responses. *Plants*, vol. 12, p. 1-20, 2023. doi: <https://doi.org/10.3390/plants12030427>

ZORZATTO, C. et al. NIK1-mediated translation suppression functions as a plant antiviral immunity mechanism. *Nature*, vol. 520, p. 679-682, 2015. doi: [10.1038/nature14171](https://doi.org/10.1038/nature14171)

ZHOU, F.; GUO, Y. QIU, L. Genome-wide identification and evolutionary analysis of leucine-rich repeat receptor-like protein kinase genes in soybean, *BMC Plant Biology*, vol. 16, p.1-13, 2016. doi: <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0744-1>