

JORGE ALBERTO CONDORI APFATA

**ANÁLISE FUNCIONAL DA VIA DE SINALIZAÇÃO ANTIVIRAL
MEDIADA POR NIK EM TOMATEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2010**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C746a
2010

Condori Apfata, Jorge Alberto, 1976-

Análise funcional da via de sinalização antiviral mediada
por NIK em tomateiro / Jorge Alberto Condori Apfata.

- Viçosa, MG, 2010.

v, 53f. : il (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 49-53.

1. Biologia molecular. 2. Plantas - Biologia molecular.
3. Plantas - Transgênicas. 4. Engenharia genética vegetal.
5. Fisiologia vegetal. 6. Tomate. 7. Vírus de plantas.
8. Bioquímica. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 572.8

JORGE ALBERTO CONDORI APFATA

**ANÁLISE FUNCIONAL DA VIA DE SINALIZAÇÃO ANTIVIRAL
MEDIADA POR NIK EM TOMATEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 18 de fevereiro de 2010

**Marcelo Ehlers Loureiro
(Coorientador)**

**Francisco Murilo Zerbini
(Coorientador)**

Anesia Aparecida dos Santos

Claudine Márcia Carvalho

**Elizabeth Pacheco Bastista Fontes
(Orientadora)**

AGRADECIMENTOS

A meus pais e irmãos pelo incentivo e confiança durante todo este tempo fora de casa.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Fisiologia Vegetal pela oportunidade de realização do curso.

À empresa Fitotek S. A. e ao Ing. Oscar Granados Aliaga, pelo apoio.

À professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes, pela orientação e oportunidade de crescimento profissional.

Aos professores Marcelo Ehlers Loureiro e Francisco Murilo Zerbini pela co-orientação e colaboração dada ao trabalho.

A Anessia pela ajuda e orientação nos experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas pela amizade, convívio e colaboração no meu trabalho.

Aos colegas da Fisiologia Vegetal pela convivência, companherismo e amizade.

A todos os amigos e familiares, que de alguma forma, contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

ÍNDICE

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	3
1. Geminivírus	3
1.1 Características dos Geminivírus	3
1.2 Taxonomia	3
1.3 Replicação dos Geminivírus	6
1.4 Movimento intra e intercelular dos geminivírus	6
2. Interação geminivírus – hospedeiro	7
2.1 Interações da proteína NSP com proteínas do hospedeiro	7
3. Receptores quinase em plantas	8
3.1 Características	8
3.2 Família RLKs em plantas	9
3.3 Receptores quinase na sinalização de Brassinosteróides	10
4. Receptores NIK (“NSP-Interacting Kinase”)	12
5. Modelo da via de sinalização antiviral mediada por NIK	13
MATERIAL E METODOS	15
1. Construções de DNA	15
1.1 Plasmídios do sistema duplo-híbrido de leveduras	15
1.2 Construção do clone pK7FNIK1-T474D	15
2. Ensaio de interação proteína-proteína pelo sistema de Duplo Híbrido	17
3. Material Vegetal	17
4. Transformação de tomateiros	18
4.1 Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404 com o clone pk7FNIK1-T474D 18	
4.2 Transformação de tomateiro	19
4.3 Diagnóstico molecular dos transformantes	19
4.4 Aclimação dos transformantes primários	21
4.5 Expressão do transgene	21
5. Análise de desenvolvimento da progênie dos transformantes primários em casa – de - vegetação	22
6. Ensaio de infectividade por biobalística	22
7. Diagnóstico molecular da infecção viral	23
RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
1. NSP de ToYSV interage com o domínio quinase de NIK	24
2. Transformação de tomateiro com a versão mutante <i>T474D</i> de <i>NIK1</i> de <i>Arabidopsis</i>	26
3. A super expressão da proteína <i>AtNIK1</i> acelera o crescimento das plantas	29
4. Superexpressão de <i>AtNIK</i> altera a taxa de infecção pelo ToYSV	39
CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

RESUMO

CONDORI APFATA, Jorge Alberto, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. **Análise funcional da via de sinalização antiviral mediada por NIK em tomateiro.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Coorientadores: Marcelo Ehlers Loureiro e Francisco Murilo Zerbini Junior.

A proteína NSP de begomovírus facilita o transporte do DNA viral do núcleo para o citoplasma e coopera com a proteína de movimento MP para promover o transporte do DNA viral às células adjacentes não infectadas através dos plasmodesmas. A proteína NSP interage com membros da família LRR-RLK (“leucine-rich repeat receptor like kinase”), designados NIK (“NSP-Interacting Kinase”). A ligação de NSP na alça de ativação de NIK inibe a atividade quinase, e conseqüentemente, a proteína viral inibe a atividade de autofosforilação desses receptores e sua atividade de defesa antiviral. Estudos de mutagênese na alça de ativação de NIK demonstraram que o resíduo Treonina 474 é fosforilado *in vitro* e exerce uma função crucial para atividade de quinase que é requerida para sinalização antiviral. Mutação no resíduo de Thr-474 para aspartato resulta no mutante T474D que exhibe ativação constitutiva, atividade de fosforilação do substrato aumentada e menor efeito inibidor de NSP. Este trabalho teve como objetivo caracterizar o domínio quinase de NIK na resposta de defesa antiviral em tomateiros. Tomateiros foram transformados com a construção que codifica para NIK super ativa (35S-AtNIK-T474D). Os transformantes primários foram selecionados por PCR e a expressão do transgene em linhagens independentes foi confirmada por RT-PCR normal e em tempo real. A super expressão da NIK1 e NIK-T474D super ativa em tomateiros promoveu um alongamento de entrenós, mas afetou negativamente o desenvolvimento do sistema radicular, demonstrando uma possível comunicação cruzada entre a via de sinalização antiviral mediada por NIK e vias de sinalização de desenvolvimento. Experimentos de infectividade foram conduzidos em linhagens transgênicas superexpressando AtNIK ou AtNIK-T474D, utilizando o vírus ToYSV-[MG-Bi2]. Super expressão de NIK super ativa alterou a taxa de infecção por ToYSV e interferiu no desenvolvimento dos sintomas. Comparado com as plantas não transformadas e a linhagem transgênica 35S-AtNIK1-6 superexpressando NIK normal, a taxa de infecção foi inferior e os sintomas mais atenuados em linhagens transgênicas independentes superexpressando AtNIK-T474D. Estes resultados confirmam *in planta* o papel essencial da fosforilação do resíduo de Treonina 474 de NIK e indicam a possibilidade de se desenvolverem estratégias de tolerância a geminivirus mais eficientes.

ABSTRACT

CONDORI APFATA, Jorge Alberto, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2010. **Functional analysis of the NIK-mediated antiviral signaling in tomato.** Advisor: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-advisors: Marcelo Ehlers Loureiro and Francisco Murilo Zerbini Junior.

The begomovirus NSP (nuclear shuttle protein) facilitates the transport of viral DNA from the nucleus to the cytoplasm and cooperates with the movement protein MP to promote the translocation of viral DNA to the adjacent, uninfected cells through plasmodesmata. NSP interacts with members of the LRR-RLK (“leucine-rich repeat receptor like kinase”) family, designated NIKs (“NSP-Interacting Kinase”). Binding of NSP to the activation loop of NIK inhibits kinase activity and hence the viral protein suppresses receptor autophosphorylation and defense responses. Mutagenesis assays in the activation loop of NIK have demonstrated that the threonine 474 residue is phosphorylated *in vitro* and plays a crucial role in the kinase activity that is required for signaling. Replacement of Thr-474 with aspartate produces the T474 mutant, which exhibits constitutive activation, enhanced substrate phosphorylation activity and less inhibitory effect by NSP binding. The goal of this investigation was to analyse the NIK kinase domain in defense responses against begomovirus in tomato. The NIK mutant T474D cDNA was placed under the control of 35S promoter into a binary vector for plant transformation (35S-AtNIK-T474D). Primary transformants were selected by PCR and the expression of the transgene was confirmed by normal and quantitative RT-PCR in independently transformed lines. NIK and NIK-T474D overexpression in tomato plants affected the overall developmental performance of transgenic lines, which display elongated stems and a root system less developed. These phenotypes were consistent with a cross-communication between the NIK-mediated antiviral signaling and developmental signaling pathways. Infectivity assays were carried out in AtNIK- and AtNIK-T474D-overexpressing lines, with the virus ToYSV-[MG-Bi2]. Overexpression of super active AtNIK-T474D altered the infection rate by ToYSV, and interfered in symptom development. As compared to untransformed plants and NIK-overexpressing 35S-AtNIK1-6 transgenic lines, independent transgenic AtNIK-T474D lines displayed lower infection rate and attenuated symptoms. These results confirmed *in planta* the essential role for phosphorylation of the Thr-474 residue for NIK function and underlined the possibility for the development of more efficient tolerance strategies against geminiviruses.

INTRODUÇÃO

As doenças vegetais causadas por vírus causam sérias perdas econômicas em muitas culturas importantes ao reduzir o rendimento e qualidade das colheitas. Ainda que os vírus sejam simples entidades genéticas compostos por um ácido nucléico protegido por um capsídeo protéico, os mecanismos pelo quais muitos sintomas são gerados, e como as plantas resistem esses efeitos ainda são altamente desconhecidos (Kang et al., 2005).

Dentro dos vírus que infectam vegetais, a grande maioria de famílias possui genomas compostos por RNA, e somente poucas famílias possuem genomas compostos de DNA (Rojas et al., 2005). Os geminivírus constituem um grupo grande de vírus que infectam plantas, caracterizados por possuir um DNA circular de fita simples e empacotado em partículas geminadas isométricas, sendo transmitidos por insetos da ordem Hemiptera como cigarrinhas e mosca branca (Rojas et al., 2005; Andrade et al., 2006). A família *Geminiviridae* é constituída por quatro gêneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocovirus* e *Begomovirus*, sendo diferenciados pela planta hospedeira, pelo inseto vetor e pela organização do genoma (Gutierrez et al., 2004).

Os Begomovírus têm dois componentes genômicos designados DNA-A e DNA-B; ambos requeridos para uma infecção sistêmica (Gutierrez, 1999). O DNA-A codifica cinco proteínas requeridas para replicação (Rep e REn), encapsidação (CP), transativação de genes virais (TrAP) e supressão das funções de defesa mediada por RNAi da planta hospedeira (AC4 e TrAP; Gutierrez, 2000; Vanitharani et al., 2005). O DNA-B codifica duas proteínas, a proteína de movimento MP e a proteína NSP ("nuclear subtle protein"), ambas necessárias para o movimento intra e intercelular do DNA viral (Waerd e Lazarowitz, 1999; Gutierrez et al., 2004). A localização nuclear do geminivírus durante a replicação requer duas funções de movimento necessárias para translocar o genoma viral intracelularmente do núcleo ao citoplasma e intercelularmente para as células adjacentes. A proteína NSP facilita o transporte do DNA viral do núcleo para o citoplasma e coopera com a proteína de movimento MP para promover o transporte do DNA viral às células adjacentes não infectadas através dos plasmodesmas (Sanderfoot e Lazarowitz, 1996; Lazarowitz e Beachy, 1999; Gilbertson et al., 2003).

De acordo com a função de NSP no transporte do DNA viral na planta, em cooperação com a proteína MP, pode-se prever que esta proteína associe-se com proteínas do hospedeiro em diversos compartimentos celulares, como nucleoplasma, poro nuclear, citoplasma e membrana plasmática (Gafni and Epel, 2002). Consistente com esta observação, tem sido identificadas proteínas do hospedeiro que interagem com NSP na membrana plasmática, como membros da família LRR-RLK (“leucine-rich repeat receptor like kinase”), designados NIK (“NSP-Interacting Kinase”; Mariano et al., 2004). A ligação de NSP no loop de ativação de NIK inibe a atividade quinase e, conseqüentemente, a proteína viral inibe a atividade de autofosforilação desses receptores (Fontes et al., 2004).

A superexpressão de NIK1 de *Arabidopsis thaliana* em plantas de tomateiro promoveu um retardamento no crescimento dos transformantes primários (Carvalho et al., 2008c). Entretanto, em experimentos de infectividade viral, foi observado que, embora a superexpressão de NIK não altere a taxa de infecção pelo begomovírus *Tomato yellow spot vírus* (ToYSV), interfere significativamente no desenvolvimento dos sintomas, os quais se tornam bem menos severos nas plantas transgênicas (Carvalho et al., 2008c). Recentes estudos de metagênese sítio-dirigida na alça de ativação de NIK demonstraram que o resíduo Thr-474 é fosforilado *in vitro* e exerce uma função crucial para a atividade de quinase que é requerida para sinalização antiviral (Santos et al., 2009). A mutação do resíduo de treonina 474 por ácido aspártico (T474D) não causa impacto acentuado na atividade de autofosforilação, e aumenta 1,5 vezes a atividade de fosforilação do substrato endógeno L10 (Santos et al., 2009). Estes resultados indicam que o mutante T474D comporta-se como uma forma constitutiva e super ativa de NIK. Baseado nestes resultados, a hipótese da presente investigação seria que a função de virulência de NSP não inibiria a proteína mutante NIK super ativa *in vivo* e, como conseqüência, a expressão da NIK super ativa em plantas de tomateiros poderia conferir maior tolerância à infecção pelo geminivírus ToYSV. Assim sendo, a presente dissertação teve como objetivo avaliar o efeito da expressão ectópica do mutante T474D no desenvolvimento do tomateiro e na eficiência de infecção por geminivírus.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Geminivírus

1.1 Características dos Geminivírus

A família *Geminiviridae* inclui um número crescente de vírus que infectam plantas e freqüentemente produzem perdas muito significativas em culturas de importância econômica, tanto monocotiledôneas e dicotiledôneas (Moffat, 1999). Os geminivírus possuem um genoma composto por uma ou mais moléculas de DNA de fita simples circular (ss DNA), cada uma com 2,5 a 3,0 Kb (Harrison, 1985). Uma característica distintiva é a morfologia icosaédrica geminada do virion, com aproximadamente 18 nm de diâmetro e 30 nm de comprimento (Gutierrez et al., 2004). A proteína capsidial (CP) é conservada na sua capacidade para formar esses virions únicos (Harrison, 1985), mais difere em termos de especificidade para sua transmissão pelo inseto vetor (Bridson et al., 1990).

1.2 Taxonomia

Baseados na organização do seu genoma, gama de hospedeiros e tipo de inseto vetor, os geminivírus são classificados em quatro gêneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus* (Figura 1). Os *Mastrevirus*, tendo como membro tipo o *Maize streak virus* (MSV), possuem genoma monossegmentado, infectam na maioria dos casos espécies monocotiledôneas e são transmitidos por diferentes espécies de cigarrinhas. Seu genoma tem duas regiões intergênicas, uma longa (LIR, large intergenic region) e outra pequena (SIR, small intergenic region) localizada em lados opostos do genoma viral (Gutierrez et al., 2004; Rojas et al., 2005).

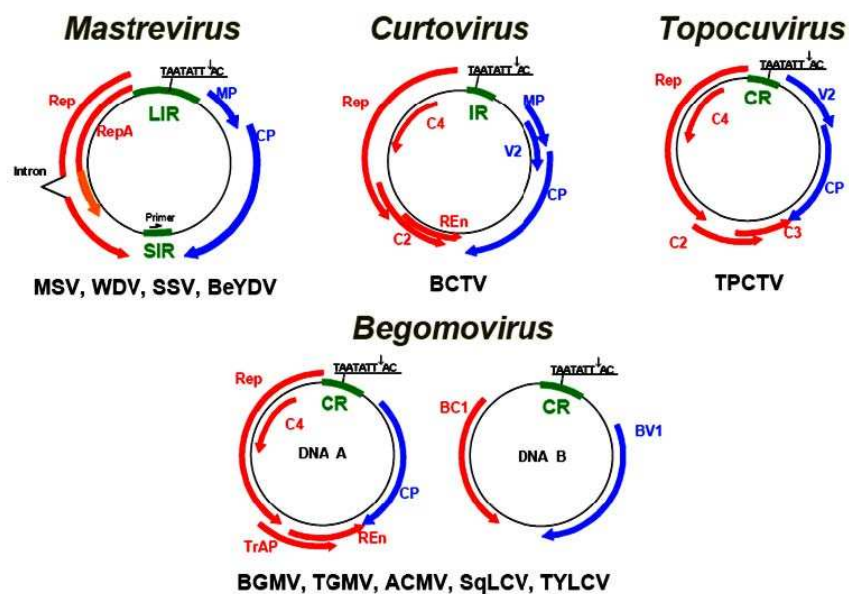
Os *Mastrevirus* têm duas características únicas: (1) a presença de uma seqüência de DNA de aproximadamente 80 nt que anela na região SIR e (2) a ocorrência de um evento de “splicing” do transcrito da fita complementar. O genoma dos mastrevírus codifica quatro proteínas: a proteína de movimento (MP) e a proteína capsidial (CP) no sentido viral, e as proteínas RepA, exclusiva deste gênero, e Rep, na fita complementar (Gutierrez et al., 2004; Rojas et al., 2005).

Os *Curtovirus* têm como membro tipo o *Beet severe curly top virus* (BSCTV), infectam plantas dicotiledôneas e são transmitidas por cigarrinhas; também possuem genoma monossegmentado, embora sua organização genômica difira dos mastrevírus. Além das proteínas MP e CP, seu genoma codifica a proteína V2 no sentido viral. A fita complementar possui 04 ORFs que codificam as proteínas Rep, C2, Ren (replication enhancer) e C4 (Gutierrez, 2000; Gutierrez et al., 2004; Rojas et al., 2005).

O gênero *Topocuvirus* é representado por apenas um membro, *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV), sendo transmitido por cigarrinhas. Possui genoma monossegmentado, com organização genômica similar aos curtovírus (Gutierrez, 2000; Gutierrez et al., 2004; Rojas et al., 2005).

O gênero *Begomovirus* tem como membro tipo o *Bean golden severe mosaic virus* (BGSMV), e inclui espécies com um ou dois componentes genômicos transmitidas por mosca-branca (*Bemisia tabaci*) a espécies dicotiledôneas. Tipicamente, os begomovírus encontrados no Brasil são bissegmentados, sendo os componentes genômicos denominados DNA-A e DNA-B, e não apresentam similaridade na sua seqüência, exceto por uma região comum (RC) altamente conservada (> 90% de identidade) de 200 nt. A região comum contém a origem de replicação de ambos componentes, mantendo-se assim a fidelidade do genoma bissegmentado (Rojas et al., 2005).

O DNA-A codifica a proteína CP no sentido viral e no sentido complementar codifica quatro proteínas: Rep, TraP (ativador transcricional), REn e AC4. O DNA-B codifica proteínas envolvidas diretamente no movimento do DNA viral, a proteína NSP ("nuclear shuttle protein"), conhecida também como BR1 ou BV1, e a proteína MP ("movement protein"), também conhecida como BL1 ou BC1, assim, ambos componentes são essenciais para o estabelecimento de uma infecção sistêmica eficiente (Rojas et al., 2005). No entanto, alguns begomovírus, como *Tomato yellow leaf curl virus*, possuem genoma monossegmentado (Gutierrez et al., 2004).



Gutierrez et al., 2004

Figura 1: Organização genômica dos quatro gêneros da família *Geminiviridae*. *Mastrevirus*: MSV (*Maize streak virus*), WDV (*Wheat dwarf virus*); SSV (*Sugarcane streak virus*), BeYDV (*Bean yellow dwarf virus*). *Curtovirus*: BCTV (*Beet curly top virus*). *Topocuvirus*: TPCTV (*Tomato pseudo-curly top virus*). *Begomovirus*: BGMV (*Bean golden mosaic virus*), TGMV (*Tomato golden mosaic virus*), ACMV (*African cassava mosaic virus*), SqLCV (*Squash leaf curl virus*), TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*). Os códigos para as proteínas virais são: RepA, proteína associada com a replicação que interage com retinoblastoma; Rep, proteína de iniciação da replicação; REh, proteína “enhancer” da replicação; TrAP, proteína de ativação transcricional; MP, proteína de movimento; CP, proteína do capsídeo; BV1/NSP, “nuclear shuttle protein”. Proteínas com funções não definidas estão nomeadas de acordo com sua posição no mapa genético. Regiões não codificadoras (ou parte delas) correspondem à grande região intergênica (LIR) e à pequena região intergênica (SIR) em mastrevírus, a região intergênica em curtovírus (IR) e à região comum (CR) para topocuvírus e begomovírus. A seqüência invariável TAATATTAC, localizada na região intergênica está indicada juntamente com o sítio de iniciação (↓) para a replicação círculo rolante. Setas vermelhas indicam genes localizados na fita complementar e as setas azuis na fita viral.

1.3 Replicação dos Geminivírus

O ciclo de replicação dos geminivírus pode ser subdividido em vários estágios funcionalmente diferentes, caracterizados por eventos específicos. Durante a fase inicial da infecção, as partículas virais são injetadas pelo inseto vetor, e o genoma viral é transportado ao núcleo da célula hospedeira por mecanismos cujos detalhes moleculares ainda são desconhecidos. Uma vez no núcleo, a amplificação do genoma viral ocorre em três estágios diferentes; o primeiro estágio envolve a conversão do DNA circular de fita simples (ssDNA) numa forma intermediária ou forma replicativa I (RFI), que consiste de um DNA circular de fita dupla (dsDNA); no segundo estágio ocorre a amplificação do dsDNA intermediário pelo mecanismo de círculo rolante; o terceiro estágio corresponde à produção e encapsidação do ssDNA maduro em partículas virais (Gutierrez, 2002).

Os geminivírus codificam a proteína requerida para o início da replicação e recrutam os componentes da maquinaria de replicação da célula hospedeira. Os begomovírus, curtovírus e topocuvírus codificam duas proteínas necessárias para uma replicação viral eficiente. A proteína AL1 (também conhecido como AC1, C1 ou Rep) é o fator de iniciação que media o reconhecimento da origem de replicação do DNA e cliva/liga ao início e término da replicação por círculo rolante (Fontes et al., 1994). A proteína AL3 (também conhecida como AC3, C3 ou Ren) promove o acúmulo de altos níveis do DNA viral, possivelmente por modificar a atividade de AL1 ou auxiliar no recrutamento de enzimas da replicação do hospedeiro (Castillo et al., 2003).

1.4 Movimento intra e intercelular dos geminivírus

Dentro da célula, a forma infecciosa do vírus deve ser transportada através de uma rede complexa de microtúbulos, microfilamentos e provavelmente elementos do citoesqueleto. A natureza do citoplasma restringe a livre difusão de complexos macromoleculares maiores que 500 kDa (Aaziz et al., 2001). Os virions dos geminivírus e seu genoma são muito maiores do que este limite. Os modelos comuns de movimento viral célula a célula argumentam que a translocação dos vírus vegetais às células adjacentes não infectadas ocorre via plasmodesmas ou túbulos derivados do retículo endoplasmático induzidos pelo vírus (Noueiry et al., 1994; Lazarowitz e Beachy, 1999; Gafni e Epel, 2002).

O modelo fundamentado na translocação do genoma viral através dos plasmodesmas preconiza que a proteína NSP facilita o movimento intracelular do genoma viral do núcleo ao citoplasma, onde é substituída pela proteína MP, que transporta o DNA viral às células adjacentes via plasmodesmas (Noueiry et al., 1994). Com relação ao segundo modelo de translocação do genoma viral célula a célula, a proteína MP facilitaria o transporte intracelular do DNA viral mediado pela proteína NSP, do núcleo ao citoplasma e, posteriormente, mediaría o transporte do complexo NSP-DNA para as células adjacentes via túbulos derivados do retículo endoplasmático, induzidos pela infecção viral (Lazarowitz e Beachy, 1999). Os dois mecanismos baseiam-se na observação de que a proteína NSP funciona como uma lançadeira do DNA viral entre o núcleo e citoplasma e atua em cooperação com a proteína MP para promover a dispersão do DNA viral célula a célula (Lazarowitz e Beachy, 1999).

2. Interação geminivírus – hospedeiro

2.1 Interações da proteína NSP com proteínas do hospedeiro

De acordo com a função da proteína NSP no transporte do DNA viral na planta, em cooperação com a proteína MP, pode-se prever que esta proteína se associe com proteínas do hospedeiro em diversos compartimentos celulares como nucleoplasma, poro nuclear, citoplasma e membrana plasmática (Gafni e Epel, 2002). Consistente com esta observação foi demonstrado que NSP interage com a acetil transferase nuclear de *Arabidopsis*, denominada AtNSI (“Nuclear shuttle protein interactor”: McGarry et al., 2003). AtNSI não acetila a proteína NSP, mas acetila especificamente a proteína CP (McGarry et al., 2003). Foi demonstrado que NSP liga-se ao sítio de oligomerização do AtNSI, e interfere o montagem do complexo enzimático multimérico altamente ativo (Carvalho et al., 2006). Estes resultados sugerem um mecanismo pelo qual a interação NSP-NSI regula a exportação nuclear do genoma viral. NSP ao recrutar NSI forma um complexo ternário com o genoma viral ligado à proteína CP. Acetilação da proteína CP por NSI poderia diminuir sua afinidade pelo ssDNA e permitir que a proteína NSP desloque a proteína CP e exporte o ssDNA do núcleo ao citoplasma (Lazarowitz e Carvalho, 2004; Lazarowitz et al., 2006).

No citoplasma, uma proteína citosólica, denominada NIG (NSP-interacting GTPase), liga-se à proteína viral NSP e promove sua realocação do núcleo para o citoplasma. Baseado nesta capacidade de movimentar o complexo NSP-DNA do

núcleo ao citoplasma e sua localização subcelular, foi proposto que NIG funciona como um cofator de NSP, e facilita o transporte intracelular do complexo NSP-DNA viral do envelope nuclear à periferia citoplasmática onde poderia ser substituída pela proteína MP (Carvalho et al., 2008a; 2008b).

Na membrana plasmática foi identificado que a proteína NSP interage com membros da família “PERK-like kinase”, designada NsAK (“NSP-Associated kinase”; Florentino et al., 2006) e com membros da família LRR-RLK (“leucine-rich repeat receptor like kinase”), designados NIK (“NSP-Interacting Kinase”; Mariano et al., 2004). A interação de NSP com membros da família LRR-RLK inibe sua atividade quinase e a resposta de defesa antiviral, atuando como um fator de virulência (Fontes et al., 2004). No entanto, a interação de NSP com NsAK resulta numa interação tipo substrato-enzima, que poderia regular a função de NSP por fosforilação (Florentino et al., 2006).

3. Receptores quinase em plantas

3.1 Características

Os receptores do tipo proteína quinase (RPKs) são um grupo diverso de proteínas que se localizam na membrana celular e permitem à célula reconhecer e responder a diversos sinais e estímulos do ambiente extracelular (Becraft, 2002). Estes receptores apresentam uma estrutura característica geral. São proteínas integrais de membrana, com um domínio amino terminal na parte extracelular, uma região transmembrana e um domínio quinase intracelular na região carboxi terminal (Walker, 1994).

São reconhecidas duas classes principais de RPKs, diferenciadas pela especificidade de seu substrato do domínio quinase: os receptores tirosina quinase que fosforilam resíduos de tirosina, e os receptores serina/treonina quinase, que fosforilam resíduos de serina e treonina. O genoma vegetal codifica um número grande de proteínas quinases transmembranas, similarmente aos receptores dos fatores de crescimento animal do tipo receptores tirosina quinase. Estes receptores quinases nas plantas são denominados coletivamente RLK (“Receptor-Like Kinases”; Shiu e Bleecker, 2001; Becraft, 2002).

O dogma para a função dos RPKs é que estes receptores existem na membrana como monômeros inativos, sendo que a ligação do receptor à molécula ligante induz dimerização dos monômeros, o que aproxima os domínios quinase intracelularmente, permitindo transfosforilar e ativar um ao outro (Becraft, 2002).

3.2 Família RLKs em plantas

A primeira família de genes que codificam RLKs foi descoberta em milho (Walker e Zang, 1990). Desde então, milhares de genes RLKs foram identificados em diferentes espécies vegetais. Em *Arabidopsis thaliana*, a família de genes RLKs tem mais de 610 membros, constituem 60% de todas as quinases presentes e podem ser classificadas em 45 subfamílias (Shiu e Bleecker, 2001).

A função das RLKs em plantas pode ser dividida em duas principais categorias. A primeira consiste de quinases envolvidas no crescimento e desenvolvimento celular. Por exemplo, em *A. thaliana*, HAESA está envolvida na abscisão de órgãos florais (Jim et al., 2000), BRI1, na regulação do crescimento celular (Li e Chory, 1997), e CLAVATA 1 no desenvolvimento do meristema (Clark et al., 1997).

A segunda categoria funcional inclui proteínas RLKs envolvidas na interação planta-patógeno e respostas de defesa, tal como o produto de gene XA21, que confere resistência à mancha bacteriana em arroz (Song et al., 1995) e a percepção da flagelina pelo produto do gene FLS2 em *A. thaliana* (Gomez-Gomez e Boller, 2000).

Proteínas RLKs que não se enquadram nas duas principais classes incluem proteínas implicadas em simbiose como NURK/SYMRK e HAR1 (Krusell et al., 2002), receptor quinase S (SRK) que contribui para autoincompatibilidade (Kachroo et al., 2001) e SRHS, uma proteína envolvida no controle da fixação do N atmosférico (Vinagre et al., 2006).

A família de RLKs em *A. thaliana* é dividida em 45 subfamílias, baseado na presença e identidade entre os domínios extracelulares e no relacionamento filogenético deduzido pelo domínio quinase (Shiu et al., 2004). Os domínios extracelulares são classificados em 15 tipos. A maioria contém o domínio LRR ("leucine rich repeat"), sendo que os demais grupos possuem os domínios lectin tipo C, CRINKLY4-like, RLK1-like, DUF26, extensina, legume lectin (L-lectin), LRK-10-like,

Lys M, URK1, PERK-like, RKF3-like, domínio-S, thaumatina ou WAK-like (Haffani et al., 2004).

RLKs contendo o domínio extracelular LRR representam o maior grupo desses receptores em *A. thaliana*, sendo dividido em 13 subfamílias (LRR I a LRR XIII), baseadas na organização do domínio, número de cópias e arranjo do LRR no motivo extracelular (Dievart e Clark, 2004), e no número de introns e exons nos genes RLKs (Zhang et al., 2006). Os domínios LRRs são motivos comuns nas proteínas envolvidas na transdução de sinais e acredita-se que mediam as interações proteína-proteína (Shiu e Bleecker, 2001).

O modelo que explica o funcionamento do receptor RLK sustenta que o receptor percebe sinais mediante seu domínio extracelular e propaga a sinal através do domínio quinase intracelular (Shiu e Bleecker, 2001). Em alguns casos conhecidos, os receptores RLKs estão na membrana como monômero inativo (Becraft, 1998). A interação com o ligante induz uma mudança na conformação no domínio extracelular que resulta na dimerização, levando assim os domínios quinases intracelulares a se aproximarem. A proximidade dos domínios conduz à transfosforilação, sugerindo que a oligomerização exerce papel na ativação da proteína (Horn e Walker, 1994).

3.3 Receptores quinase na sinalização de Brassinosteróides

Os Brassinosteróides (BRs) são hormônios vegetais tipo esteróide que regulam a expansão, diferenciação e proliferação celular. Os BRs estão envolvidos em diversos processos como a alongação do caule, diferenciação vascular, fertilidade masculina, tempo de florescimento e senescência, desenvolvimento foliar e resistência a estresses bióticos e abióticos (Li e Chory, 1997).

Os BRs são percebidos por receptores transmembranas quinases que iniciam a transdução da sinalização em cascata mediante eventos de fosforilação. Os BRs ligam-se a um subdomínio extracelular LRR do receptor quinase BRI1 (BRASSINOSTEROID-insensitive 1) na membrana plasmática (Li e Chory, 1997; Kinoshita et al., 2005). Um segundo receptor LRR-RLK, denominado BAK1 (BRI1-ASSOCIATED KINASE 1), interage com BRI1 mas não pusei o domínio de ligação a BRs, não ligando a BRs por si mesmo (Li et al., 2002).

Uma propriedade comum associada a receptores quinases é a homo ou heterodimerização dependente do ligante, seguido pela ativação da quinase e subsequente fosforilação do substrato citoplasmático envolvido na via de sinalização específica (Becraft, 2002). Assim sendo, para a ligação do BRs com BRI1 e posterior ativação, é necessário sua homo-dimerização, promovendo posteriormente a hetero-oligomerização com BAK1, que resulta num receptor complexo tetramérico (Wang et al., 2005).

A ativação de BRI1 e BAK1 pelos BRs inicia a via de sinalização em cascata, que permite a expressão de genes controlados por BRs. Os componentes “downstream” desta cascata incluem a quinase BIN2 (BR INSENSITIVE 2), a fosfatase nuclear BSU1 (BRI1 SUPPRESSOR PROTEIN 1) e os fatores de transcrição BZR1 (BRASSINAZOLE RESISTANT 1) e BES1 (BRI1 EMS SUPPRESSOR 1). A quinase BIN2 é um regulador negativo da sinalização por BRs, que fosforila e inativa as proteínas BZR1 e BES1. A fosforilação destas proteínas as endereça para sua degradação pelo proteossomo (He et al., 2002).

BZR1 é uma proteína nuclear que se liga especificamente a seqüências CGTG(T/C)G, conhecidos como elementos responsivos a BRs (BRRE), encontrados em promotores dos genes CPD e DWF4 que suprimem a expressão de dois genes envolvidos na biossíntese do BR (He et al., 2005). A proteína BES1 liga-se a seqüências CANNTG em promotores de genes ativados por BR (Yin et al., 2005).

Na ausência de BRs, nem BRI1 nem BAK1 são ativados, uma vez que BIN2 é uma quinase constitutivamente ativa que fosforila BES1 e BZR1, promovendo sua degradação no citossol e inibição de sua atividade de ligação a DNA no núcleo. Em resposta a BRs, os receptores BRI1 e BAK1 são ativados e BIN2 é inibido. Como resultado, BES1 e BZR1 não fosforilados no citosol são translocados ao núcleo. As proteínas BES1 e BZR1 fosforiladas no núcleo são de-fosforiladas provavelmente pela fosfatase nuclear BSU1 e são acumuladas no núcleo onde regulam a expressão de genes responsivos a BRs (Li e Jin, 2006).

Com a demonstração da interação direta de BRs com BRI1 e BAK1, e entre BIN2, BZR1/BES1 e promotores de genes de resposta a BRs, permanece ainda uma lacuna no entendimento da transdução do sinal mediada pelos BRs entre a percepção de BRs na membrana celular e a subsequente inativação de BIN2 no citoplasma.

Assim sendo, torna-se prioritária a identificação de substratos de BRI1 e BAK1 para completar o entendimento da sinalização por BRs.

Foi identificada em *A. thaliana* a proteína transthyretin (TLL) como um substrato potencial de BRI1. O domínio quinase de BRI1 fosforila TLL *in vitro* e as evidências genéticas sugerem que TLL é um regulador negativo das respostas de desenvolvimento mediadas por BRs (Nam e Li, 2004). Adicionalmente, TRIP1, uma proteína com seqüência similar ao substrato do receptor tipo II TGF- β , é fosforilada *in vitro* por BRI1 e se associa diretamente com BRI1 *in vivo*, sugerindo que TRIP1 também é um potencial substrato de BRI1 (Ehsan et al., 2005).

O sítio ativo do domínio quinase de NIK, o receptor quinase que interage com a proteína viral NSP de geminivírus, tem alta similaridade com o domínio quinase de BRI1 e AtSERK1 (Fontes et al., 2004). Recentemente, foram identificadas duas proteínas que interagem com este receptor NIK, as proteínas ribossomais L10 e L18. NIK é capaz de interagir e fosforilar a proteína L10, mas não a proteína L18 (Carvalho et al., 2008c). Entretanto, BRI1 é capaz de interagir e fosforilar a proteína L18 com alta eficiência, mais não fosforila a proteína L10, o que sugere que a proteína ribossomal L18 poderia ser um substrato de BRI1 (Rocha, 2007). Estes resultados indicam que pode haver uma comunicação cruzada entre a via de resposta a BR mediada por BRI1 e a via de sinalização anti-viral mediada pela proteína NIK.

4. Receptores NIK (“NSP-Interacting Kinase”)

A proteína NIK está estruturalmente relacionada com a superfamília de RLKs do tipo serina/treonina quinase. Apresenta um domínio N-terminal composto por uma região LRR (“leucine rich repeats”), seguido por um segmento que corresponde ao domínio transmembrana hidrofóbico, e na região C-terminal, um domínio catalítico de serina/treonina quinase (Fontes et al., 2004). Os homólogos da proteína NIK de tomateiro, LeNIK (*Licopersicum esculentum* NSP-interacting kinase), de soja, GmNIK (Glycine max NIK) e três homólogos de *Arabidopsis thaliana* (AtNIK) interagem com NSP de diferente geminivírus (Fontes et al., 2004; Mariano et al., 2004). Assim, a interação NSP-NIK é conservada entre as diferentes NSPs dos geminivírus e homólogos de NIK de diferentes hospedeiros.

A ligação de NSP na alça de ativação de NIK inibe a atividade quinase e, conseqüentemente, a proteína viral inibe a atividade de autofosforilação desses

receptores. Além disso, a perda da função de NIK em *Arabidopsis thaliana* aumenta sua susceptibilidade à infecção viral, sugerindo que NIK está envolvida na resposta de defesa antiviral (Fontes et al., 2004).

Foi demonstrado que a superexpressão de NIK1 de *Arabidopsis thaliana* em tomateiros promove um retardamento no crescimento dos transformantes primários, os quais apresentam baixa estatura, menor comprimento caulinar, menor desenvolvimento do sistema radicular e aéreo, folhas enrugadas e encarquilhadas, diferentemente da anatomia regular das plantas controle. Em experimentos de infectividade viral, foi observado que a super expressão de NIK não altera a taxa de infecção pelo ToYSV, mas interfere significativamente no desenvolvimento dos sintomas, os quais se tornam menos severos nas plantas transgênicas (Carvalho et al., 2008c). Coletivamente, estes experimentos de perda e ganho de função confirmam a função de defesa contra vírus do receptor NIK.

5. Modelo da via de sinalização antiviral mediada por NIK

O modelo para a via de sinalização de defesa antiviral mediada por NIK sugere que, diante de um estímulo de natureza desconhecida, o domínio LRR extracelular da NIK promove a oligomerização da proteína, aproximando os domínios quinase intracelulares dos monômeros. Isto permite que um monômero transfosforile a alça de ativação do outro, promovendo a ativação da quinase. A quinase ativada recruta e fosforila o substrato endógeno, a proteína L10. Esta fosforilação, por sua vez, redireciona a proteína L10 para o núcleo, levando à ativação de uma resposta adaptativa que causaria impacto negativo na replicação ou no movimento do vírus. A ligação da proteína viral NSP ao domínio intracelular da NIK inibe a ativação da quinase e, conseqüentemente a via de sinalização antiviral mediada por NIK (Fontes et al., 2004; Carvalho et al., 2008c).

O sítio de interação com NSP em NIK foi mapeado e consiste de um segmento de 80 resíduos de aminoácidos que sobrepõe o sítio ativo da quinase e a alça de ativação. O alinhamento da alça de ativação de NIK1 com os integrantes da família LRR-II-RLK revelam que os resíduos de treonina nas posições 474, 469 e 468 em NIK1 são conservados (Fontes et al., 2004). Estudos recentes de mutagênese da alça de ativação de NIK demonstraram que o resíduo Treonina-474 é fosforilado *in vitro* e exerce uma função crucial para atividade de quinase, que é requerida para sinalização antiviral (Santos et al., 2009).

A mutação do resíduo de glicina 473 por valina em conjunto com a mutação da treonina 474 por alanina (G473V/T474A) abole totalmente a capacidade de autofosforilação *in vitro*, constituindo uma forma inativa da NIK1, levando à perda de função *in vivo*. Em contraste, a mutação do resíduo de treonina 474 por ácido aspártico (T474D) não causa impacto acentuado na atividade de autofosforilação, e aumenta 1,5 vezes a atividade de fosforilação do substrato endógeno L10 (Santos et al., 2009). Estes resultados indicam que o mutante T474D comporta-se como uma forma super ativa de NIK. Provavelmente, a introdução do grupo carboxilado na posição 474 mimetiza a carga negativa do grupo fosfato e promove ativação constitutiva de NIK. Além disso, foi demonstrado que a ligação de NSP a NIK-T474D não inibe a atividade de quinase da proteína mutante *in vitro*.

As propriedades bioquímicas alteradas da proteína NIK-T474D (atividade aumentada de fosforilação do substrato, ativação constitutiva da quinase e menor efeito inibidor da proteína NSP), implicam que a forma mutante da proteína deve ser mais eficiente em conferir proteção contra geminivírus. Esta hipótese constitui o objetivo da presente investigação.

MATERIAL E METODOS

1. Construções de DNA

1.1 Plasmídios do sistema duplo-híbrido de leveduras

A região que codifica a proteína NSP do DNA-B do geminivírus *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) foi amplificada por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos (Tabela 1), com extensões adaptadoras apropriadas para inserção no vetor de entrada pDONR201 por meio de recombinação, utilizando o sistema GATEWAY (Invitrogen). O clone resultante pDON-NSP ToYSV foi denominado pUFV1323. Em seguida, o fragmento clonado foi transferido para o vetor pDEST22, por meio de recombinação, produzindo o clone pAD-NSP-ToYSV denominado pUFV1370. O clone resultante permite a expressão, em leveduras, da proteína NSP fusionada ao domínio de ativação da proteína transativadora GAL4. O diagnóstico do clone foi conduzido por PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos que amplificam a seqüência que codifica a proteína NSP do ToYSV. O clone pBD-KDNIK foi previamente descrito (Fontes et al., 2004) e permite a expressão, em leveduras, do domínio quinase da proteína NIK fusionado ao domínio de ligação ao DNA da proteína transativadora GAL4.

1.2 Construção do clone pK7FNIK1-T474D

O clone pK7FNIK1-T474D (pUFV632), que contém o cDNA de AtNIK (*Arabidopsis thaliana* NSP-Interacting Kinase), sob o controle do promotor 35S, onde o resíduo de treonina na posição 474 foi substituído por ácido aspártico, foi descrito previamente (Carvalho et al., 2008c; Santos et al., 2009; Figura 2). O referido clone foi utilizado para transformação de tomateiros. Os transformantes primários foram selecionados com base na sua resistência ao antibiótico kanamicina e, posteriormente, foram testados quanto à incorporação do gene NIK1-T474D via PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos para NIK1 e o vetor pK7FWG2.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados nas ampliações por PCR.

Oligonucleotídeo	Seqüência	Região de anelamento
LRA \dagger NIK1RG (3774)	5'-AGAAAGCTGGGTGCGAGTCATAAGAGATTTTCGATG-3'	Nucleotídeo 1096 de AtNIK1
KDA \dagger NIK1RG (3315)	5'-GAAAGCTGGGTCTCATCTAGGACCAGAGAGCTC-3'	Região terminal de NIK1 com stop codon
KDA \dagger NIK1FG (3314)	5'-AAAAAGCAGGCTTCACAATGGGAGCTGCAAGAGGG-3'	Nucleotídeo 1243 de NIK1
ATNIK1 FW	5' – ACCGCGATGTCAAAGCAGCG –3'	Anela na seqüência do mRNA de NIK1
ATNIK1 RV	5' - ATGTGACCCACCGTGCCTCT –3'	Anela na seqüência do mRNA de NIK1
ACTINA FW	5'-CGGTGACCACTTTCCGATCT-3'	Anela na seqüência do mRNA de actina
ACTINA RV	5'-TCCTCACCGTCAGCCATTTT-3'	Anela na seqüência do mRNA de actina
MC36 (3408)	5' - TCCTTCGCAAGACCCTTCCTC – 3'	Anela no promotor 35S
LeNIKRvs	5'-GAAAGCTGGGTCCAAACTACAACATTGTCTAAA-3'	Região C-terminal de LeNIK
486LeNIKFwd	5'-AAAAAGCAGGCTTCACAATGCTTGAAGGTGATGG-3'	Região C-terminal de LeNIK
PCRc1	5' – CTAGCTGCAGCATATTTACRARWATGCCA – 3'	Anela na região comum do componente B de geminivírus (Rojas <i>et al.</i> , 1993)
PBL1v2040	5' – GCCTCTGCAGCARTGRTCKATCTTCATACA – 3'	Anela no nucleotídeo 2040 do componente B de geminivírus (Rojas <i>et al.</i> , 1993)
AttB1Fwd	5' –GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3'	Complemento da região de recombinação
AttB2 Rvs	5' – GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3'	Complemento da região de recombinação
ToYNSP Fwd	5'- AAAAAGCAGGCTTCACAATGTATCAAGCCAAGTA-3'	Anela na seqüência de NSP do ToYSV
ToYNSP Rvs	5'-AGAAAGCTGGGTCTTAACCAATATAATCAAGATC-3'	Anela na seqüência de NSP do ToYSV



Figura 2. Diagrama esquemático da construção pk7FNIK1-T474D sob controle do promotor 35S (p35S) e sinais de terminação do transcrito 35S de CaMV (T35S). Kan denota o gene nptII que confere resistência à kanamicina, attR2 e attR1 são as regiões de recombinação homóloga.

2. Ensaio de interação proteína-proteína pelo sistema de Duplo Híbrido

O ensaio do Duplo-Híbrido foi realizado de acordo com o protocolo do kit ProQuest™ Two-Hybrid System (Invitroge), segundo as recomendações do fabricante. A estirpe de levedura AH109 (MATa, Trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, MEL1 GAL2_{UAS}-GAL_{TATA}::MEL_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ,) que é deficiente na produção de leucina, triptofano e uracila (Trp-, Leu-, Ura-) e que contém os genes repórteres *LacZ* e *HIS*, foi seqüencialmente co-transformada com os plasmídeos pBD-KDNIK e pAD-NSP-ToYSV. A interação foi monitorada pela habilidade adquirida de AH109 de crescer em meio sem leucina, triptofano e histidina (prototrofia à histidina).

3. Material Vegetal

Nos experimentos de transformação foram utilizadas plantas de tomateiro da cultivar Moneymaker.

As linhagens transgênicas 35S-NIK1-4 e 35S-NIK1-6, utilizadas em ensaios de infectividade, foram obtidas previamente (Carvalho et al., 2008c).

4. Transformação de tomateiros

4.1 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 com o clone pk7FNIK1-T474D

A estirpe de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 foi transformada por meio de eletroporação (2500 mV, 3-4 ms) com o clone pk7FNIK1-T474D. As colônias crescidas em placas, contendo 100 mg.L⁻¹ de estreptomicina e 100 mg.L⁻¹ de espectinomicina, foram inoculadas em meio líquido para posterior extração de DNA plasmidial. A confirmação das colônias positivas foi feita por meio de PCR, utilizando os oligonucleotídeos específicos MC36 e 3774 (Tabela 1). Os resultados obtidos foram avaliados em gel de agarose 1% (p/v) corado com brometo de etídeo 0,1 µg.mL⁻¹ (Figura 3). Colônias positivas foram novamente inoculadas em meio líquido, para armazenamento a -80°C em estoque de glicerol. Este clone (pk7FNIK1-T474D em LBA 4404) denominado pUFV1191, foi utilizado para transformação de tomateiro.

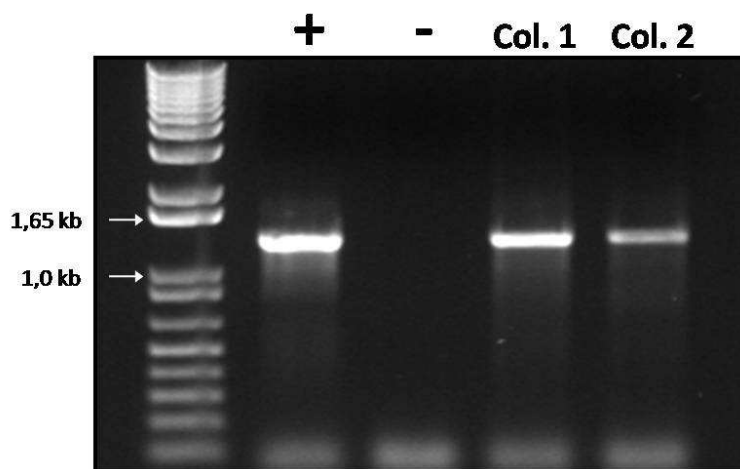


Figura 3. Diagnóstico de transformação de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Amplificação por PCR de um fragmento do clone pk7FNIK1-T474D com oligonucleotídeos específicos para o vetor (MC36) e para a seqüência de AtNIK (3774), amplificando um fragmento de aproximadamente 1,2 kb. **(M)** marcador de peso molecular. **(+)** controle positivo da reação utilizando o plasmídeo pk7FNIK1-T474D como molde na reação de PCR, **(-)** controle negativo da reação utilizando água como molde na reação de PCR. **(Col. 1, Col. 2)** DNA plasmidial extraído da colônia 1 e 2 de *A. tumefaciens*

4.2 Transformação de tomateiro

Os experimentos de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* foram realizados conforme o protocolo desenvolvido por Frary (1995) com algumas modificações. As sementes de tomateiro, cultivar Moneymaker, foram desinfetadas com álcool 70% por 1 minuto, água sanitária 10% (v/v) por 20 minutos, água sanitária 1% (v/v) por 12 horas, seguido de 3 lavagens em água estéril. Em seguida foram colocadas em frascos contendo meio MS ½ força (adaptado de Murashige e Skoog, 1962) por uma semana em sala de crescimento. Após este período de germinação, foi realizada a excisão dos explantes foliares a partir de folhas cotiledonares.

A colônia de *Agrobacterium tumefaciens*, transformada com o clone pk7FN1K1-T474D foi inoculada em 50 mL de meio Rhizo com 100 mg.L⁻¹ de estreptomicina e 100 mg.L⁻¹ de espectinomicina, mantidas a 28°C e 220 rpm, por 12 horas. A cultura foi centrifugada a 6500 rpm por 10 minutos, a 14°C. O “pellet” foi ressuscitado em meio líquido MS 0,2% (Murashige & Skoog, 1962). A concentração foi ajustada para OD₆₀₀= 0,4.

Os explantes de tomateiro foram co-cultivados com as células de *Agrobacterium* durante 5 minutos, sob agitação. Após lavagem com água estéril e secagem em papel de filtro, os explantes foram mantidos em placas de Petri contendo meio 1/2MS sólido (Tabela 2), sem antibiótico, por 2 dias, com a face adaxial em contato com o meio. Posteriormente foram transferidos para meio de regeneração I (Tabela 2), contendo 300 mg.L⁻¹ de timentina, com a face adaxial voltada para cima. As placas foram mantidas na sala de crescimento de plantas por duas semanas com temperatura e luminosidade controladas. Posteriormente os explantes foram transferidos para o meio de regeneração II (Tabela 2) contendo 100 mg.L⁻¹ de canamicina e 300 mg.L⁻¹ de timentina, mantidas por três semanas. Cada regenerante representa um transformante independente. Os regenerantes foram transferidos para frascos contendo meio de enraizamento (Tabela 2) até o desenvolvimento completo das raízes.

4.3 Diagnóstico molecular dos transformantes

Após a regeneração das plantas foram coletadas amostras foliares de cada planta regenerada, para obtenção de DNA genômico (Dellaporta et al., 1983). O DNA foi usado como molde na amplificação por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para *AtNIK1* e o vetor pK7FWG2 (MC36 e 3774; Tabela 1).

Tabela 2. Meios nutritivos utilizados na transformação de tomateiro.

Para volumen final 500 mL	Concentração inicial	Germinação (1/2 MS)	Regeneração I	Regeneração II	Enraizamento	Concentração final
Sais MS (Murashige & Skoog)		1,075 g	2,15 g	2,15 g	2,15 g	
Sacarose		5 g	10 g	10 g	10 g	
Vitamina MS (Murashige & Skoog)	100x	2,5 mL			5 mL	
Vitamina Nitsch (Nitsch & Nitsch)	100x		500 µL	500 µL		
Mio-inositol		25 mg	50 mg	50 mg	50 mg	
Glicina	2 mg/mL				500 µL	2 mg/L
Tiamina	0,4 mg/mL					1,3 mg/L
Zeatina	2 mg/mL		500 µL	250µL		2,0 mg/L
pH		5,8	6	6	5,8	
Agar		3,0 g	3,0 g	3,0 g	3,0 g	

AIA	1 mg/mL				100 µL	0,2 mg/L
Canamicina	100 mg/mL			500 µL	500 µL	50 mg/L
Timentina	300 mg/mL		500 µL	500 µL		300 mg/L

4.4 Aclimação dos transformantes primários

Após o processo de enraizamento das plantas transformadas, estas foram retiradas dos frascos e as raízes foram lavadas. Em seguida, foram acondicionadas em copos de plástico contendo substrato orgânico, umedecidas e cobertas com sacos de plástico. Pequenos cortes foram feitos nos sacos de plástico durante três dias para sua aclimação. As plantas foram transferidas para vasos e permaneceram na casa-de-vegetação até frutificação e obtenção de sementes.

4.5 Expressão do transgene

4.5.1 RT-PCR

O RNA total foi extraído a partir de folhas de plantas transformadas pelo método Trizol (Invitrogen). A qualidade e a integridade do RNA foram monitoradas por espectrofotômetro e por eletroforese em gel de agarose. Cerca de 4 µg de RNA foram tratados com DNAase e utilizadas para obtenção do cDNA, usando a enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen) e oligo-dT, de acordo com recomendações do fabricante. Uma vez obtido o cDNA, foi realizada a reação de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para *AtNIK1* (3314 e 3315, Tabela 1).

4.5.2 RT-PCR em Tempo Real (qRT-PCR)

As reações de PCR em tempo real foram conduzidas utilizando o aparelho 7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems), oligonucleotídeos específicos (Tabela 1), cDNAs dos transformantes e SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). As condições de amplificação foram: 95° C por 10 min, e 40 ciclos de 94° C por 15 segundos e 60° C por 1 min. Para a quantificação da expressão gênica, foram utilizados os métodos comparativos de Ct: $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Como controle endógeno para normalização dos dados do qRT-PCR foi utilizado o oligonucleotídeo específico para RNA da actina de tomate, que apresentou baixa variação de expressão entre os tratamentos.

5. Análise de desenvolvimento da progênie dos transformantes primários em casa-de-vegetação

Sementes de tomateiros não transformados e de plantas transformadas expressando AtNIK1-T474D e AtNIK1-4 foram germinadas em casa-de-vegetação. As plantas foram transplantadas para vasos contendo substrato orgânico e solo agrícola, sendo avaliada a altura das plantas a cada 7 dias. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC). As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, adotando-se o nível de 5% de probabilidade.

A incorporação e expressão do transgene foram confirmadas em plantas individuais utilizadas nos experimentos de análise de desenvolvimento. Assim, procedeu-se à extração de DNA genômico a partir de amostras foliares (Dellaporta et al., 1983) e foi realizada a reação de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene *AtNIK1* e o vetor pK7WG2 (MC36 e 3774, Tabela 1).

6. Ensaio de infectividade por biobalística

A inoculação viral foi realizada via biobalística (Schaffer et al., 1995), utilizando-se clones infecciosos correspondentes a cópia e meia do DNA-A e DNA-B do isolado ToYSV-[MG-Bi2] (Calegario et al., 2007). O DNA plasmidial dos clones infecciosos foi isolado e sua qualidade e integridade foram analisadas em gel de agarose 1% (p/v) e a concentração avaliada por espectrofotometria a 260 nm.

Aproximadamente 10 µg de cada componente de DNA do vírus foram precipitados em micropartículas de tungstênio na presença de CaCl₂ 1M e espermidina 15 mM e lavados com etanol absoluto. As membranas preparadas foram encaixadas no acelerador de partículas e lançadas contra os meristemas foliares sob vácuo. Como controle, as plantas foram inoculadas apenas com partículas de tungstênio sem DNA viral.

Após o bombardeamento, as plantas foram transferidas para casa-de-vegetação e observadas quanto ao aparecimento de sintomas até 30 dias após a inoculação. Para os ensaios de infecção viral, foram utilizadas plantas no estágio de desenvolvimento correspondente a quatro folhas verdadeiras, utilizando 12 plantas de cada linhagem.

As plantas inoculadas foram observadas em intervalos de dois dias e fotodocumentadas. Foram levados em consideração o aparecimento de manchas amarelas, clorose foliar, enrolamento e enrugamento.

7. Diagnóstico molecular da infecção viral

Para confirmar a presença do genoma viral, foram coletadas amostras foliares das plantas inoculadas e o DNA total foi extraído de folhas sistêmicas de acordo com Dellaporta et al. (1983) a cada 7 dias durante 40 dias após a inoculação. O DNA extraído foi usado como molde em reações de PCR utilizando oligonucleotídeos degenerados que amplificam fragmentos específicos do componente B de begomovírus (Rojas et al., 1993). Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1% (p/v), corado com brometo de etideo 0,1 µg/mL.

A porcentagem de plantas infectadas foi avaliada a cada sete dias, observando a presença de DNA viral em folhas sistêmicas e a sintomatologia. Os dados foram plotados em um gráfico na forma de porcentagem de plantas infetadas x dias pós-infecção.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. NSP de ToYSV interage com o domínio quinase de NIK

Previamente foi demonstrado que a proteína NSP dos geminivírus *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), *Tomato crinkle leaf yellows virus* (TCrLYV) e *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) interage com o domínio quinase do receptor NIK1 de *Arabidopsis* e LeNIK de tomateiro (Fontes et al., 2004; Mariano et al., 2004). A inibição de NIK por NSP depende da estequiometria da interação e, portanto, foi postulado que um excesso molar de NIK deva conferir tolerância a geminivírus. Consistente com esta hipótese foi demonstrado que a superexpressão de AtNIK1 em tomateiro atenua o processo de infecção do geminivírus ToYSV (Carvalho et al., 2008c). Entretanto, interação entre NSP de ToYSV e AtNIK1 ainda não foi demonstrada e o modelo estequiométrico de inibição de NIK por NSP permanece por ser validado. Com a finalidade de identificar se NIK de *Arabidopsis* interage com NSP do ToYSV, foram conduzidos ensaios no sistema duplo-híbrido usando o domínio quinase de NIK1 fusionado ao domínio de ligação de GAL4 (BD-KDNIK1) e NSP fusionado ao domínio de ativação de GAL4 (AD-NSP-ToYSV). A interação de NSP do ToYSV com o domínio quinase do receptor NIK1 foi confirmada por meio desses ensaios de duplo-híbrido, conforme julgado pela habilidade da estirpe AH 109 de levedura co-transformada com AD-NSP e BD-KDNIK1 de crescer em meio sem leucina, triptofano, histidina e suplementado com 3-aminotriazol (3-AT) 10 mM, durante 3 dias a 28 °C (Figura 4). Adição de 3-AT ao meio seletivo não inibiu o crescimento da cultura de células de levedura contendo as construções pBD-KD NIK e pAD-NSP, sugerindo que a interação entre as duas proteínas ocorre com alta afinidade, consistente com a atuação de NSP como inibidor da quinase. Além disso, estes resultados confirmam a conservação da interação da proteína NIK com a proteína viral NSP dos geminivírus. De fato, foi demonstrado que o domínio quinase da proteína AtNIK1 interage com a proteína viral NSP dos vírus que infectam tomateiros TGMV, TCrLYV (Mariano et al., 2004), e ToYSV (esta investigação) e com NSP do vírus CaLCuV que infecta *Arabidopsis* (Fontes et al., 2004). Também foi demonstrado que a proteína viral NSP de TGMV e ToCrLYV interage com LeNIK, GmNIK e AtNIK1, indicando que a interação NSP-NIK não é vírus-específica nem hospedeiro-específica (Mariano et al., 2004; Fontes et al., 2004).

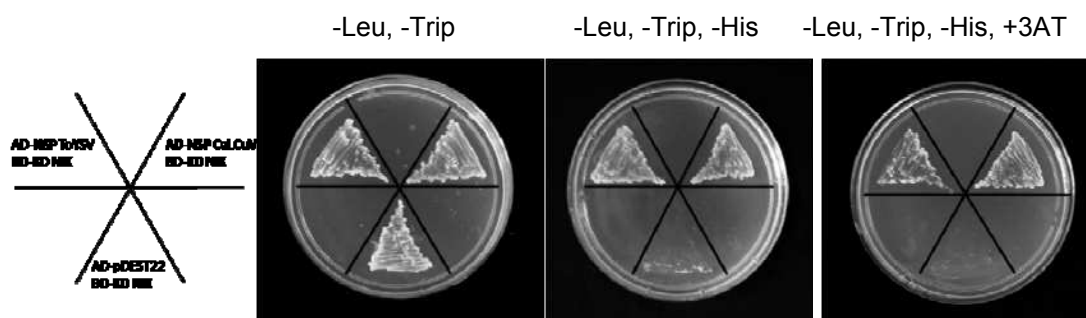


Figura 4. Interação da proteína NSP do ToYSV com o domínio quinase do receptor NIK de *A. thaliana*. As células de levedura co-transformadas com BD-KDNIK1 e AD-NSP foram estriadas em meio seletivo deficiente em leucina, triptofano e histidina, suplementado com 3-aminotriazol (3-AT) 10 mM e crescidas a 28° C durante três dias. Como controle positivo a levedura foi co-transformada com AD-NSP de CaLCuV e BD-KDNIK, e como controle negativo, a levedura foi co-transformada com BD-KDNIK e o vetor pDEST22 vazio.

2. Transformação de tomateiro com a versão mutante *T474D* de *NIK1* de *Arabidopsis*

A proteína mutante NIK1-T474D possui atividade de fosforilação do substrato pelo menos 1.5 vezes superior à proteína NIK normal (Santos et al., 2009) e, portanto, é aqui designada NIK superativa. Sendo assim, espera-se que o mutante T474D seja mais efetivo em desencadear uma resposta de defesa contra o vírus. Para avaliar esta hipótese, tomateiros transgênicos expressando o gene mutado NIK1-T474D foram obtidos. Transformantes primários (T0) foram selecionados em cultura de tecidos com base em resistência a canamicina. Explantes cotiledonares começaram a regenerar aos 15 dias após a transformação. Brotos com aproximadamente 40 dias foram isolados do explante original e transferidos para meio de enraizamento e posterior aclimação. A transformação das plantas foi confirmada por PCR com oligonucleotídeos específicos para *AtNIK1* e para o vetor pK7FWG2, amplificando um fragmento de aproximadamente 1,2 kb (Figura 5).

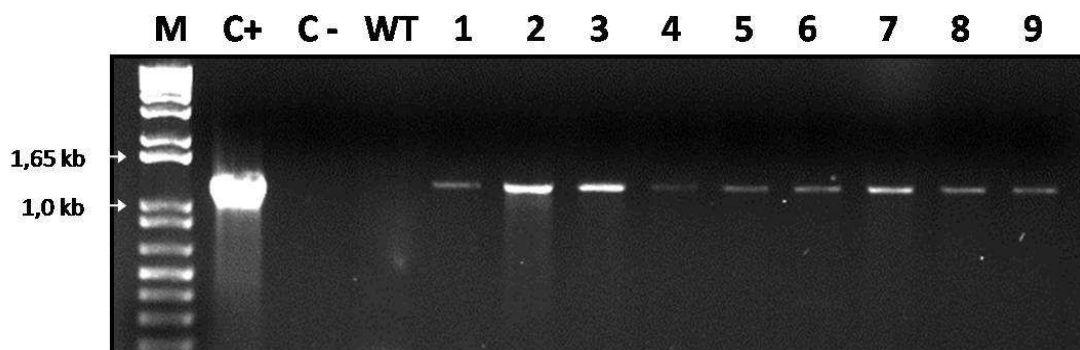


Figura 5. Diagnóstico molecular da transformação genética de tomateiros com o gene *AtNIK1*- T474D. O DNA total das plantas transformadas foi utilizado como molde para amplificar um fragmento de aproximadamente 1,2 kb com oligonucleotídeos específicos para o vetor pK7FWG2 e para a seqüência de *AtNIK* (MC36 e 3774). **(M)** marcador de peso molecular, **(C+)** controle positivo da reação utilizando o plasmídeo pK7FNIK1-T474D como molde na reação de PCR, **(C-)** controle negativo da reação utilizando água como molde na reação de PCR, **(WT)** DNA da planta selvagem não transformada do cultivar MoneyMaker, **(1 – 9)** DNA dos regenerantes primários transformados (T0). A posição de alguns marcadores moleculares é indicada à esquerda no gel em kb

A expressão do transgene sob condições normais de crescimento em cada transformante foi confirmada por RT-PCR (Figura 6) e por PCR quantitativo (Figura 7). Estes resultados demonstram um nível variado de expressão do transgene nos diferentes transformantes, destacando a total ausência de expressão na planta tipo selvagem não transformada (WT).

Na obtenção de plantas transgênicas é comumente observada variação na expressão do transgene entre os transformantes individuais. É considerado que esta variação seja causada pela posição aleatória onde o gene exógeno é introduzido no genoma da planta por *Agrobacterium* (Dean et al., 1988). De uma maneira geral, inserção de um gene exógeno na região ativa da cromatina (eucromatina) leva a uma alta expressão do transgene. Em contraste, se o gene exógeno é introduzido numa região inativa, altamente condensada (heterocromatina), a expressão do transgene pode ser suprimida ou silenciada. A variabilidade na expressão de um transgene também pode ser correlacionada com a inserção de múltiplas cópias do DNA exógeno (Mannerlöf e Tenning, 1997). Experimentos de “Southern blot” ou análise de segregação do transgene serão necessários para avaliar estas possibilidades.

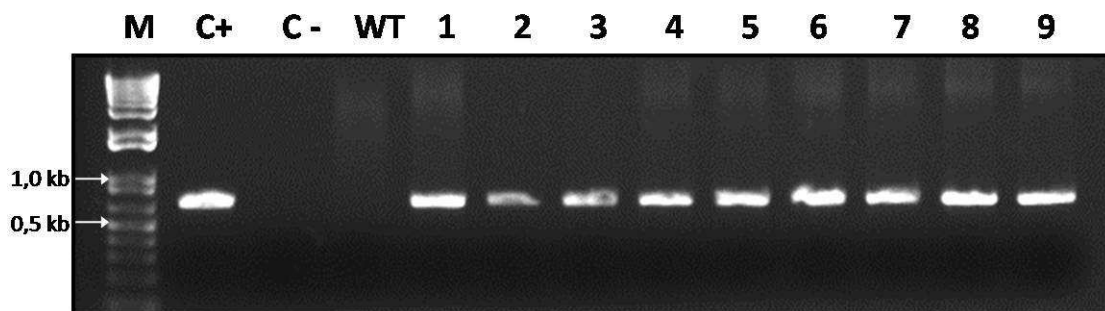


Figura 6. Expressão do gene AtNIK-T474D em plantas de tomateiro transformadas. O acúmulo de transcrito foi analisado por RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para a proteína NIK1 (3314 e 3315), amplificando um fragmento de aproximadamente 0,7 Kb. **(M)** marcador de peso molecular, **(C+)** controle positivo da reação utilizando o plasmídeo pk7FNIK1-T474D como molde na reação de PCR, **(C-)** controle negativo da reação, utilizando água como molde na reação de PCR, **(WT)** cDNA da planta tipo selvagem não transformada, **(1 – 9)** cDNA dos regenerantes primários transformados (T0). A posição de alguns marcadores moleculares é indicada no lado esquerdo da figura em Kb.

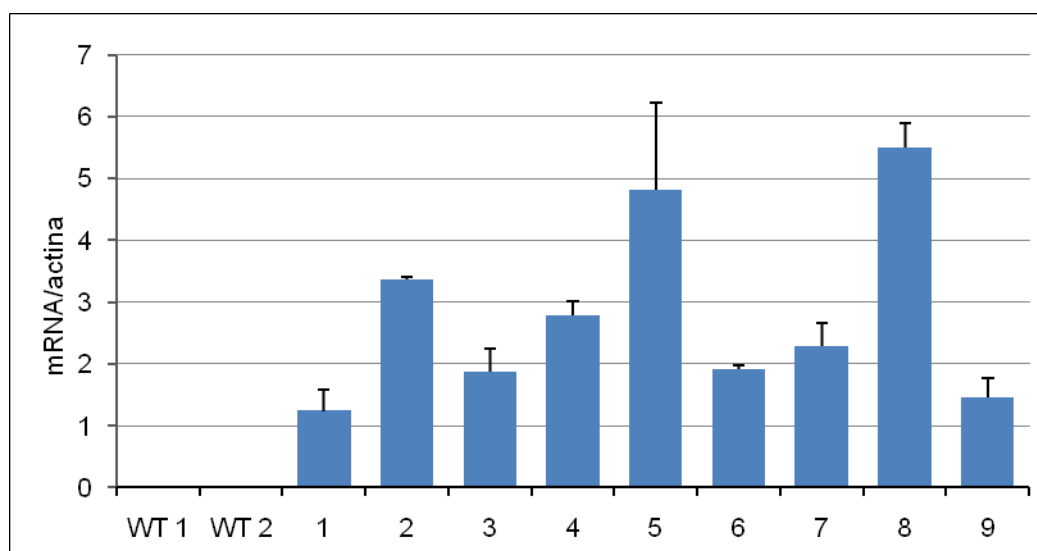


Figura 7. Padrão de expressão do gene *AtNIK-T474D* em plantas de tomateiro transformadas, sob condições normais de crescimento. O acúmulo de transcrito foi analisado por RT-PCR em tempo real com oligonucleotídeos específicos para a proteína *AtNIK1*, utilizando como controle endógeno actina (+DP, n= 2 réplicas biológicas). (**WT1, WT2**) plantas tipo selvagem não transformada, (**1 – 9**) regenerantes primários transformados (T0).

3. A super expressão da proteína *AtNIK1* acelera o crescimento das plantas

O crescimento da progênie das plantas transformadas, quando germinadas na presença do agente de seleção canamicina, é fortemente afetado, apresentando um retardo no desenvolvimento comparado com o desenvolvimento normal das plantas tipo selvagem que germinaram em meio sem canamicina (Figura 8). Este atraso no desenvolvimento ocorre tanto nas plantas que superexpressam o gene *AtNIK* normal (Figura 8; Carvalho et al., 2008c) como nas plantas com *AtNIK* superativa crescidas em meio seletivo com canamicina (Figuras 8B, 8C and 8D). Esse efeito negativo é devido ao agente de seleção canamicina, e não à expressão do transgene. De fato, o desenvolvimento das linhagens 35S-*AtNIK1-4*, 35S-*AtNIK-T474D-1*, 35S-*AtNIK-T474D-6* e 35S-*AtNIK-T474D-9* não foi afetado quanto as sementes foram germinadas sem canamicina (dados não mostrados e exemplos representativos na Figura 9). Devido à segregação do transgene na geração T1, a presença do transgene foi monitorada e confirmada em plantas transgênicas individuais submetidas a análises adicionais de desenvolvimento (Figura 10).

As linhagens transgênicas que superexpressam tanto o gene *AtNIK1* como *AtNIK1-T474D* superativa apresentaram um alongamento dos entrenós maior do que as plantas tipo selvagem, cultivadas nas mesmas condições (dados não mostrados) o que refletiu na altura das linhagens transgênicas. Aos sete dias após o transplante, a altura das plantas das linhagens transgênicas foi significativamente superior à altura das plantas tipo selvagem (Figura 11). Esta diferença se tornou mais acentuada aos 14 e 21 dias após o transplante nas linhagens 35S-*AtNIK1-4* e 35S-*AtNIK-T474D-1*. No entanto, na linhagem 35S-*AtNIK T474D-5* a diferença na altura de planta não foi significativa comparada com as plantas tipo selvagem a partir dos 14 dias após o transplante (Figura 11). Estas diferenças na altura das plantas refletem as diferenças observadas no peso fresco da parte aérea entre as linhagens transgênicas e tipo selvagem, ainda que em menores intensidades (Figura 12). Entretanto, as plantas transgênicas e não transformadas não diferiram estatisticamente no que se refere ao peso seco e % de matéria seca aos 21 dias. Em contraste, o peso fresco da parte radicular foi significativamente maior nas plantas tipo selvagem do que nas linhagens transgênicas que superexpressam *AtNIK1* normal e *AtNIK1* superativa (35S-*AtNIK1-4*, 35S-*AtNIK-T474D-1* e 35S-*AtNIK-T474D-5*). Estas diferenças são corroboradas pelo acúmulo de matéria seca nas raízes de plantas do tipo selvagem e nas plantas transformadas, já que a superexpressão de gene *AtNIK* e *AtNIK-T474D* superativa diminuiu a porcentagem de matéria seca na parte radicular.

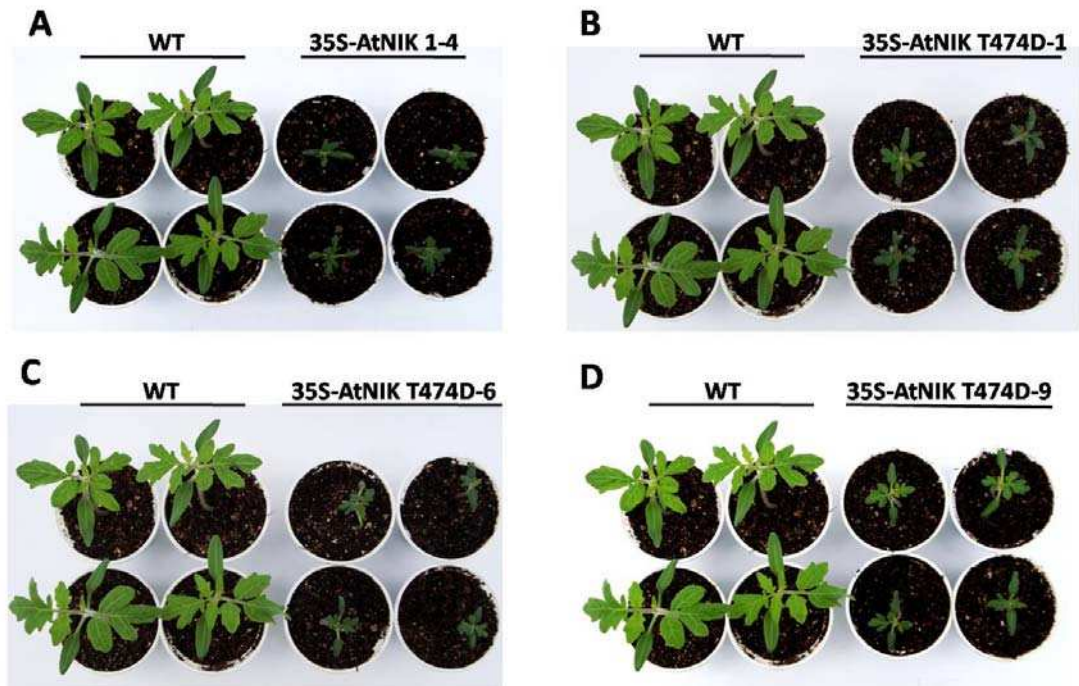


Figura 8. O agente de seleção canamicina impacta negativamente o desenvolvimento de linhagens transgênicas expressando AtNIK e AtNIK superativa. A) Diferenças no desenvolvimento entre uma linhagem de plantas superexpressando 35S-AtNIK1 e plantas não transformadas (WT). **B), C) e D)** Diferenças no desenvolvimento entre três linhagens independentes de plantas superexpressando 35S-AtNIK T474D e plantas não transformadas (WT). As sementes das plantas que superexpressam AtNIK e AtNIK superativa foram germinadas em meio de germinação com o agente de seleção canamicina. As sementes das plantas não transformadas foram germinadas em meio sem agente de seleção canamicina.

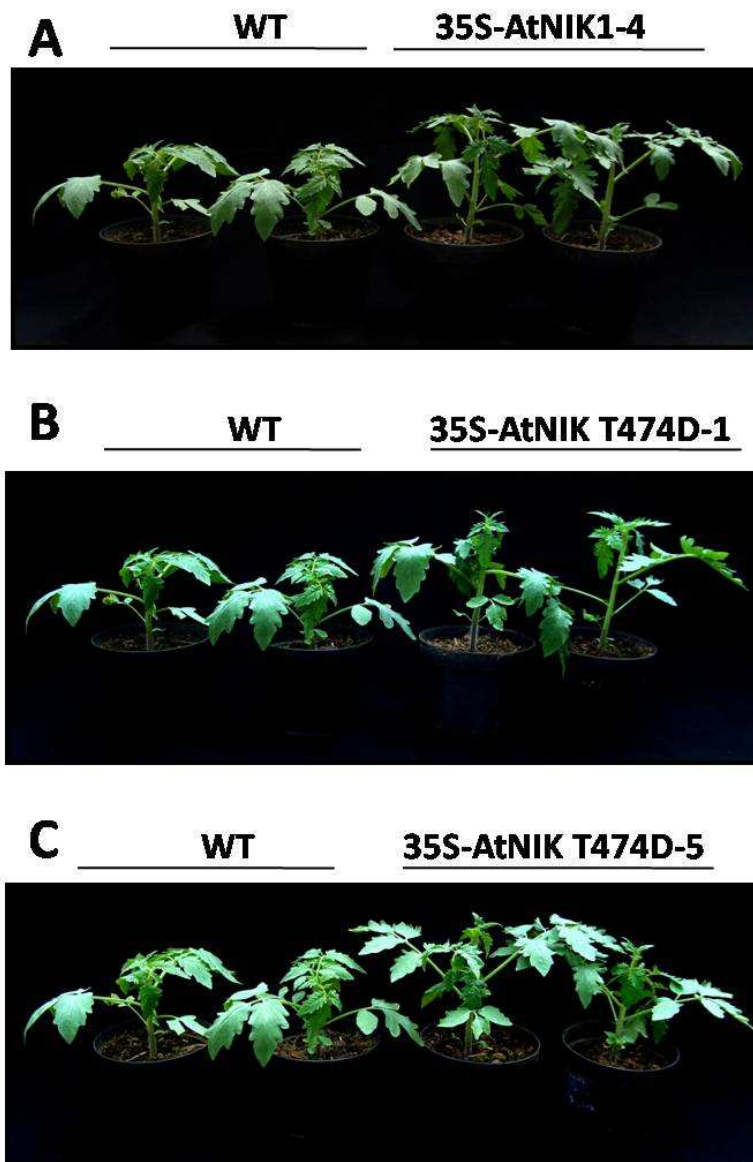


Figura 9. A superexpressão de AtNIK acelera o desenvolvimento. **A)** Diferenças no desenvolvimento entre plantas superexpressando 35S-AtNIK1 e plantas não transformadas (WT) aos 7 dias pós-transplante. **B) e C)** Diferenças no desenvolvimento entre duas linhagens independentes superexpressando 35S AtNIK-T474D e plantas não transformadas (WT) aos 7 dias pós-transplante. As sementes de todas as plantas foram germinadas em substrato orgânico sem agente de seleção.

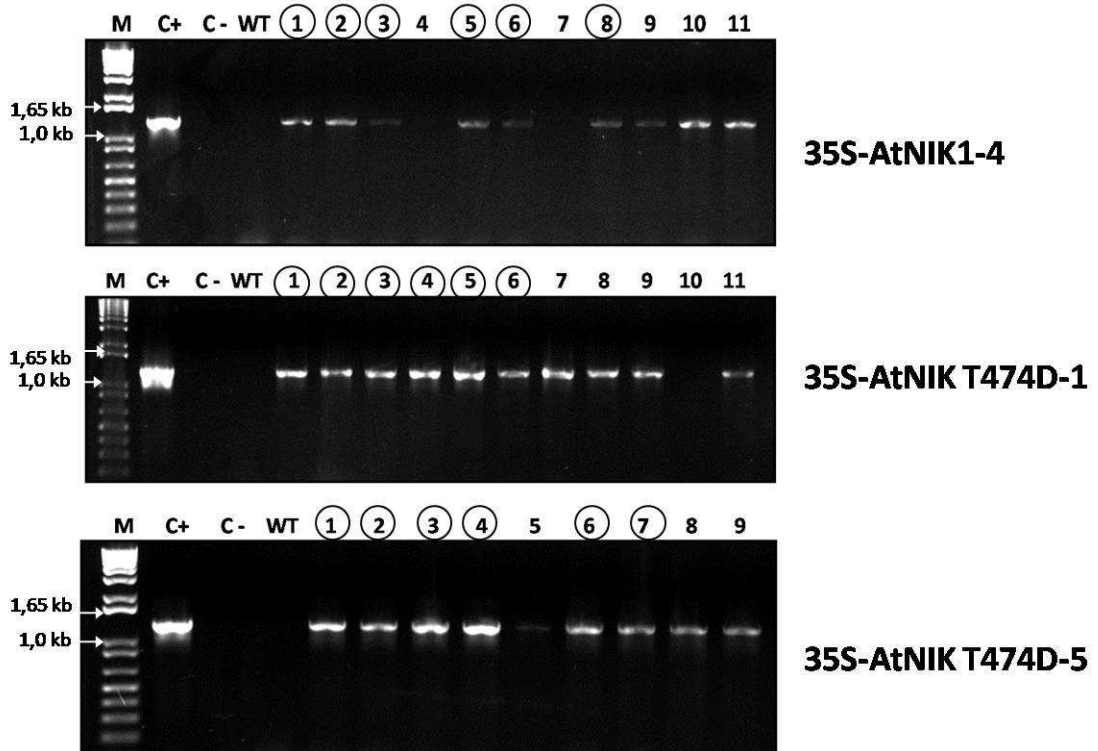


Figura 10. Diagnóstico molecular de tomateiros transformados com o gene *AtNIK1* e *AtNIK-T474D* para avaliar o desenvolvimento. O DNA total das plantas transformadas foi utilizado como molde para amplificar um fragmento de aproximadamente 1,2 kb com oligonucleotídeos específicos para o vetor pK7WG2 e para a seqüência de *AtNIK* (MC36 e 3774). **(M)** marcador de peso molecular em Kb, **(C+)** controle positivo da reação utilizando o plasmídeo pk7FNIK1-T474D como molde na reação de PCR, **(C-)** controle negativo da reação, utilizando água como molde na reação de PCR, **(WT)** DNA da planta tipo selvagem não transformada, **(1 – 11)** DNA das plantas transformadas (T1). **Em Circulo**, são destacadas as plantas utilizadas para avaliar desenvolvimento. A posição de alguns marcadores moleculares é indicada no lado esquerdo da figura em Kb.

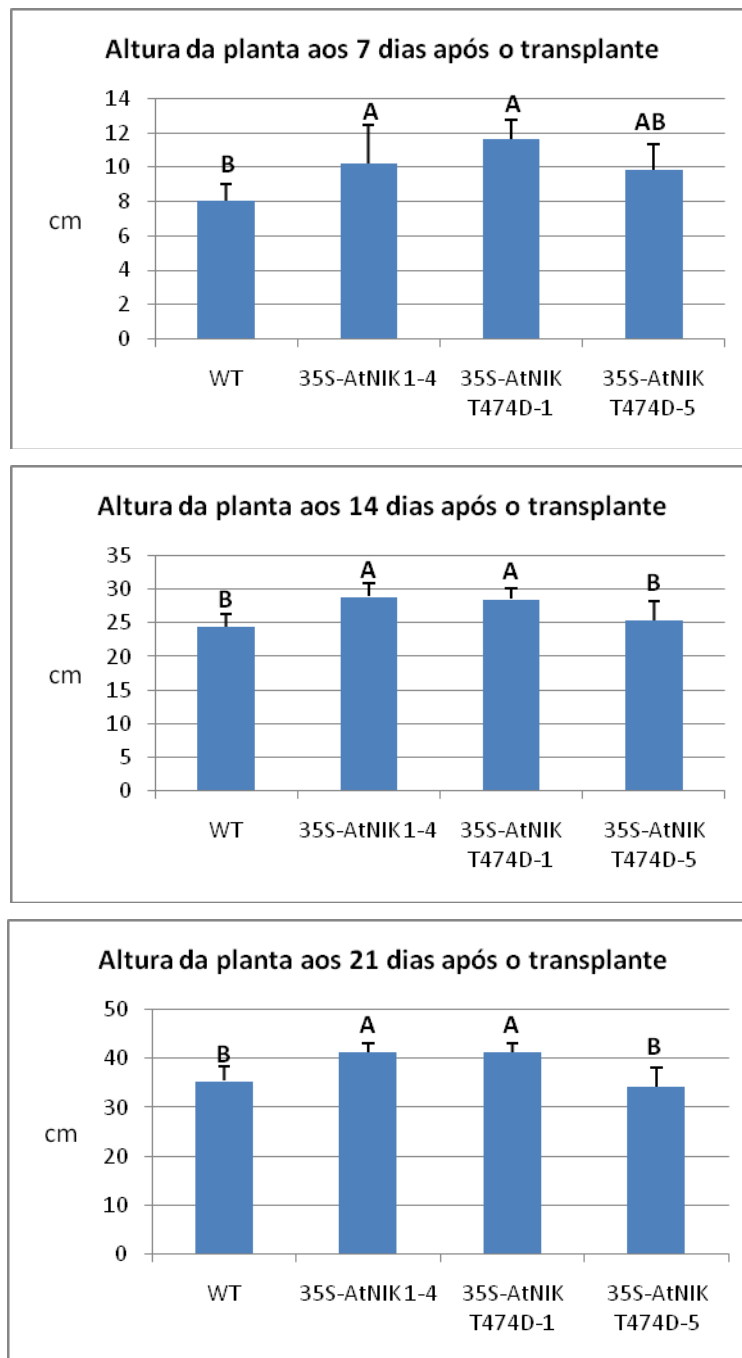


Figura 11. Efeito da superexpressão de AtNIK e AtNIK-T474D na altura das plantas. Altura de plantas de linhagens transgênicas superexpressando AtNIK1e AtNIK-T474D aos 7, 14 e 21 dias após o transplante. n=6. Barras com a mesma letra as médias não diferem entre si, a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

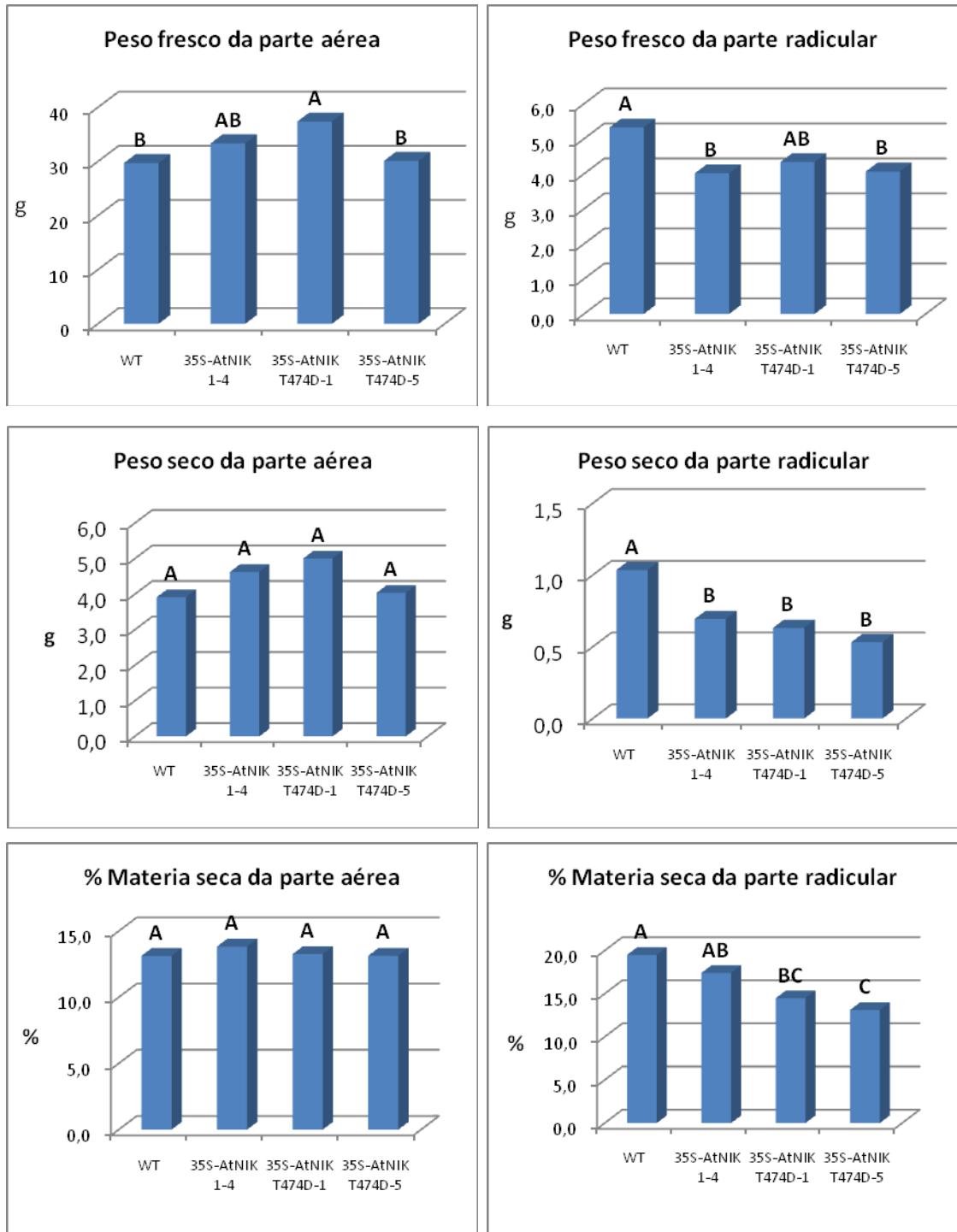


Figura 12. Peso fresco, peso seco e % de matéria seca das linhagens transgênicas. Avaliação do peso seco, peso fresco e % de matéria seca da parte aérea e da parte radicular entre plantas de uma linhagem superexpressando AtNIK1 (35S-AtNIK1-4), plantas (T1) de duas linhagens independentes superexpressando AtNIK T474D (35S-AtNIK-T474D-1 e 35S-AtNIK-T474D-5) e plantas não transformadas (WT). O peso foi avaliado aos 21 dias pós transplante. Barras com a mesma letra as médias não diferem entre si, a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

Coletivamente, os resultados apresentados indicam que a expressão ectópica de *AtNIK1* normal e superativa (T474D) afeta o desenvolvimento radicular e da parte aérea das linhagens transgênicas. Por analogia a BRI1 (“Brassinosteróide insensitive-1”) que compartilha com NIK1 alta conservação de sequência e pertence à mesma sub-família de LRR-RLKs, é razoável supor que NIK poderia também estar envolvida no controle da via de sinalização por brassinosteróides. O fenótipo de desenvolvimento observado nas plantas que superexpressam *AtNIK* e *AtNIK-T474D* (melhor desempenho no desenvolvimento do sistema aéreo, maior comprimento de caule e inibição do sistema radicular) pode ser explicado caso alterações na via de sinalização por brassinosteróides tenham ocorrido nas linhagens transgênicas (Altmann, 1999). Evidências de que a via de sinalização mediada por NIK inibe até certo nível a via de sinalização de brassinosteróides foram demonstradas em *Arabidopsis*. A inativação dos genes NIK e L10 em linhagens nocautes potencializou a expressão de genes controlados pela via de sinalização mediada por BRI1 em resposta a brassinosteróides (Robson Ferreira e Elizabeth P. B. Fontes, comunicação pessoal).

Recentemente, foram identificadas duas proteínas ribossomais, L10 e L18, que se associam com o domínio quinase de NIK. Entretanto, apenas a proteína L10 é substrato de NIK, sendo fosforilada especificamente e translocada ao núcleo onde deve ativar respostas de defesa antiviral (Carvalho et al., 2008c; Rocha et al., 2007). Por outro lado, a proteína L18 não é fosforilada por NIK, mas constitui substrato de BRI1 pelo menos *in vitro*. BRI1 é um receptor essencial da via de sinalização de brassinosteróides localizado na membrana plasmática, e associa-se com BAK1 para ativação da via (Li et al., 2002). Foi demonstrado em reações de fosforilação que L18 é fosforilada por BRI1 com alta eficiência (Rocha, 2007). Estes resultados podem sugerir que a proteína ribossomal L18 atua como um substrato específico do receptor quinase BRI1 na via de sinalização mediada por brassinosteróides. Neste caso, a interação de L18 com NIK forneceria mais um nível de controle da via através do recrutamento da proteína ribossomal em complexos não funcionais, impedindo sua interação com BRI1 e conseqüente ativação por fosforilação. A superexpressão de NIK aumentaria a eficiência de interferência do regulador NIK na sinalização pelo receptor BRI1 devido ao excesso molar de domínios de interação com L18 nas plantas transgênicas.

Estudos fisiológicos têm demonstrado efeitos sinérgicos de brassinosteróides com auxinas na alongação de tecidos tanto em monocotiledôneas como em

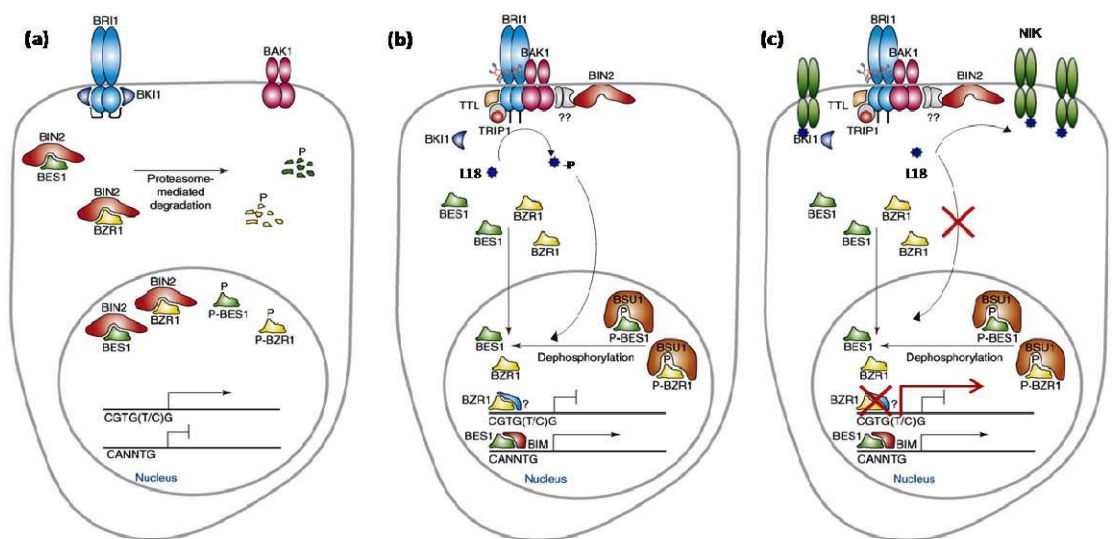
dicotiledôneas; além disso, certos genes relacionados a auxinas são regulados por brassinosteróides (Yin et al., 2002). As plantas superexpressando AtNIK e AtNIK-T474D super ativa apresentam um maior alongamento do entrenós mostrando um maior comprimento do caule, o que parece ter afetado negativamente o desenvolvimento da parte radicular comparado com as plantas tipo selvagem. Uma possível explicação para esta resposta no desenvolvimento seria que a superexpressão de *NIK* influencia a sinalização ou biossíntese de brassinosteróides, regulando positivamente a síntese de auxinas. As auxinas por sua vez estimulam a biossíntese de etileno ao ativar a enzima ACC sintase, e níveis elevados de etileno inibem o desenvolvimento do sistema radicular (Müssig et al., 2003).

No modelo que explica a sinalização dos brassinosteróides (Figura 13 A), na ausência de brassinosteróides, o receptor BRI1 permanece como um dímero inativo na membrana plasmática (Li e Chory, 1997). BIN2, uma quinase constitutivamente ativa, fosforila os fatores de transcrição BES1 e BZR1 e promove sua degradação no citoplasma, inibindo sua capacidade de ligação ao DNA no núcleo (He et al., 2002). BZR1 liga-se especificamente a seqüências CGTG(T/C)G conhecido como elementos de resposta a brassinosteróides (BRRE) (He et al., 2005). Os elementos BRRE são encontrados em promotores de genes que reprimem a síntese de brasinosteróides, incluindo *CDP* e *DWF4* (He et al., 2005). BES1, por sua vez, liga-se aos elementos E-boxes (CANNTG) do promotor *SAUR-AC1* ativando a expressão de genes induzidos por brassinosteróides (Yin et al., 2005).

A ligação de brassinosteróides com o domínio extracelular de receptor BRI1 causa uma mudança conformacional, ativando seu domínio quinase, acompanhado pela associação de BRI1 com BAK1 e transfosforilação das proteínas (Li et al., 2002). Como resultado, a atividade quinase de BIN2 é inibida, os fatores BZR1 e BES1 não fosforilados são translocados ao núcleo, associando-se com a desfosforilação destes fatores no núcleo pela fosfatase nuclear BSU1, então estes fatores de transcrição ligam-se ao DNA (He et al., 2002; Yin et al., 2005). BZR1 atua como um repressor da biossíntese de brassinosteróides, regulando sua biossíntese em presença de brassinosteróides, enquanto que BES1 atua como um fator de transcrição de genes induzidos por brassinosteróides.

A interação da proteína L18 com o domínio quinase do receptor BRI1 e sua posterior fosforilação indica que a proteína L18 poderia estar envolvida na via de sinalização de brassinosteróides, entre a formação do complexo tetramérico e a

resposta do fator BZR1 como repressor da biossíntese de brassinosteróides. Em resposta a brassinosteróide, a super expressão do receptor *AtNIK* poderia alterar esta via ao competir pela proteína L18, potencial substrato do receptor BRI1. Na falta do substrato fosforilado, a via de sinalização seria afetada de alguma forma.



Adaptado de Li and Jin, 2006.

Figura 13. Modelo comum da sinalização dos brassinosteróides. (a) Em ausência de brassinosteróides BRI1 permanece como um dímero inativo na membrana plasmática. BIN2, uma quinase constitutivamente ativa fosforila os fatores de transcrição BES1 e BZR1 e promove sua degradação no citoplasma e inibe sua capacidade de ligação ao DNA no núcleo. (b) Em presença de brassinosteróides, o domínio extracelular de receptor BRI1 ativa uma mudança conformacional, ativando seu domínio quinase, acompanhado pela associação de BRI1 com BAK1. Como resultado, a atividade quinase de BIN2 é inibida, os fatores BZR1 e BES1 não fosforilados, translocados ao núcleo, associando-se com a desfosforilação destes fatores no núcleo pela fosfatase nuclear BSU1, então estes fatores de transcrição ligam-se ao DNA, a interação da proteína L18 com o domínio quinase do receptor BRI1 e sua posterior fosforilação indica que a proteína L18 poderia estar envolvida na via de sinalização de brassinosteróides (c) A superexpressão de NIK, poderia alterar esta via ao competir pela proteína L18, substrato do receptor BRI1.

4. Superexpressão de *AtNIK* altera a taxa de infecção pelo ToYSV

A fim de avaliar a suscetibilidade das plantas superexpressando 35S-*AtNIK*-T474D à infecção por geminivírus, linhagens independentes foram inoculadas por biobalística com o DNA-A e DNA-B do isolado ToYSV-[MG-Bi2] (Calegario et al., 2006). Plantas não transformadas e plantas transgênicas que superexpressam *AtNIK1* (linhagem 35S-*AtNIK1*-6) foram utilizados como controle. Tanto plantas não transformadas (WT) quanto plantas que superexpressam *AtNIK* e *AtNIK*-T474D desenvolveram sintomas típicos da infecção pelo ToYSV (Figura 14). Nas plantas não transformadas infectadas foram observados redução no crescimento, manchas amarelas características da infecção por ToYSV, manchas cloróticas e enrugamento de folhas. Plantas transgênicas das linhagens 35S-*AtNIK1*-6 e 35S-*AtNIK*-T474D-9 apresentaram menor severidade de sintomas (Figura 15).

Por meio de análise dos sintomas nas plantas e do acúmulo de DNA viral (Figura 16), foi avaliada a porcentagem de plantas infectadas ao longo do tempo após a inoculação com o vírus (Figura 17). Plantas inoculadas somente com micropartículas de tungstênio foram usadas como controle negativo. Durante o progresso da infecção, plantas não transformadas (WT) e plantas da linhagem 35S-*AtNIK1*-6 apresentaram uma curva de infecção similar alcançando o máximo de 90% de plantas infectadas aos 28 e 21 dias após a inoculação, respectivamente (Figura 17A). Em contraste, o progresso da infecção na linhagem 35S-*AtNIK*-T474D-9 foi mais retardado, alcançando o máximo de 90% de plantas infectadas aos 28 dias após a inoculação. Estes resultados foram confirmados expressando a eficiência de infecção viral como número de dias necessários para alcançar 50% das plantas infectadas (DPI⁵⁰). A taxa de infecção em 35S-*AtNIK1*-T474D-9 foi significativamente inferior do que em WT e 35S-*AtNIK1*-6 (Figura 17B).

Os resultados obtidos são consistentes com as observações anteriores em que a superexpressão de *AtNIK1* em tomateiro atenua a severidade dos sintomas mas não altera consideravelmente a taxa de infecção pelo ToYSV (Carvalho et al., 2008c). No entanto, a expressão de 35S-*AtNIK* T474D causou uma diminuição na taxa de infecção, além de promover atenuação dos sintomas. Estas respostas são consistentes com a atividade de fosforilação aumentada de *AtNIK*-T474D em relação à proteína NIK normal. O resíduo de treonina na posição 474 é absolutamente essencial para atividade da quinase, sendo o alvo de autofosforilação que promove a ativação da quinase (Santos et al., 2009). A introdução de um grupo carboxila na posição 474

mimetiza a carga negativa do grupo fosfato e provavelmente promove ativação constitutiva de NIK sem o requerimento de dimerização prévia. Como resultado, ocorre um aumento de 50% na sua atividade de fosforilar o substrato endógeno L10, e NIK1-T474D perde a capacidade de ser inibida por NSP *in vitro*, mas não de se ligar a proteína viral (Santos et al., 2009).

Estas propriedades do receptor mutante AtNIK-T474D substanciam a hipótese de que a maior eficiência de defesa anti-viral elicitada pela proteína mutante em relação à NIK normal se deve à atuação do receptor T474D em três níveis. Em primeiro lugar, a provável atividade constitutiva de T474D preconiza que a ativação da via de sinalização precede a infecção viral e, portanto, a síntese da proteína NSP em células infectadas. Em segundo lugar, NIK-T474D perde a capacidade de ser inibida pela proteína viral NSP e, portanto, a defesa contra geminivírus por si só seria mais eficiente. Finalmente, em terceiro lugar, a capacidade de T474D de se ligar a NSP, mesmo não sendo inibida pela proteína, garante domínios de ligação a NSP que poderiam recrutar a proteína viral, prevenindo sua interação com NIK endógeno e consequente inibição pela NIK de tomateiro.

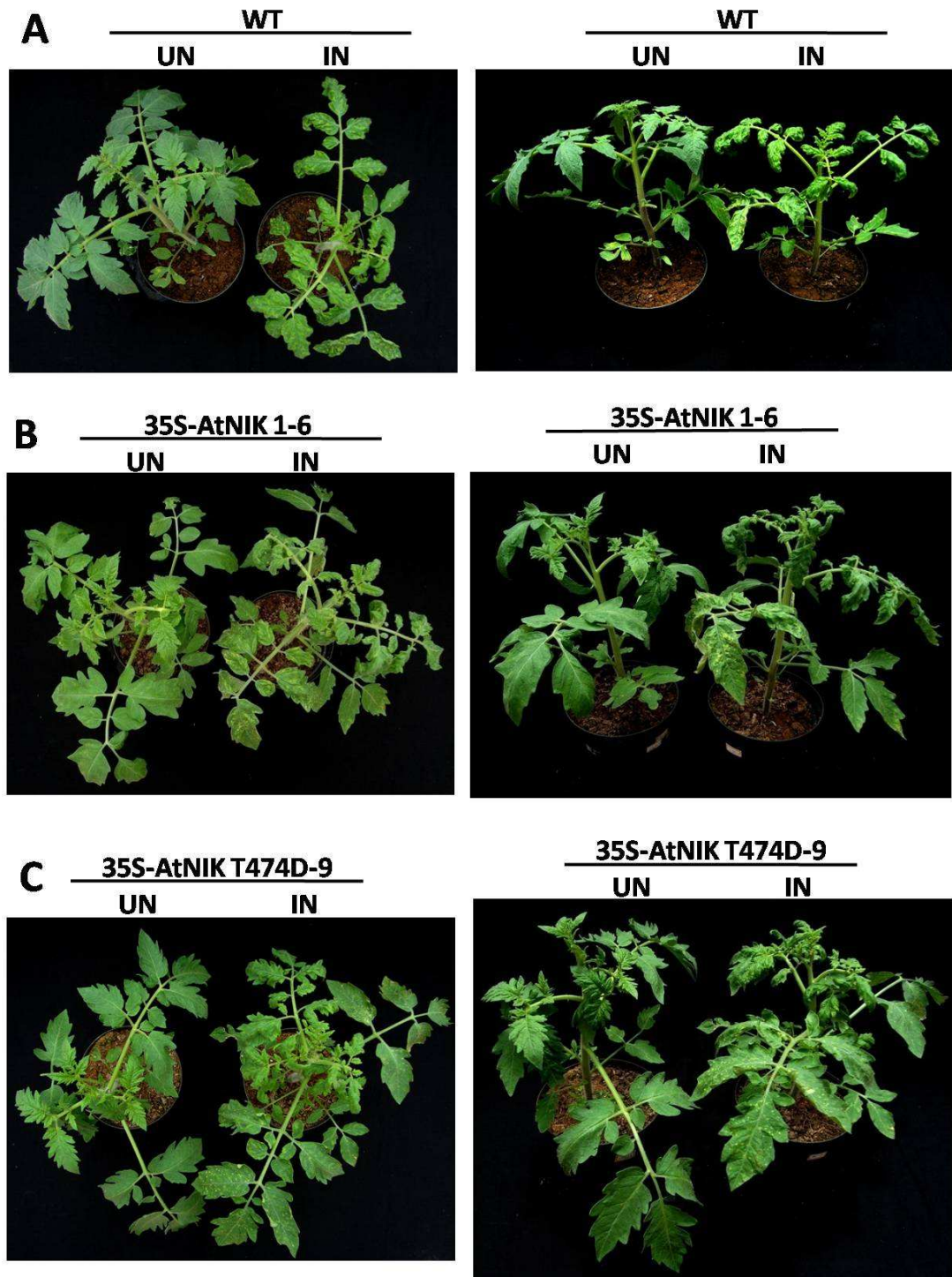


Figura 14. Sintomas associados à infecção pelo ToYSV. **(A)** Plantas não transformadas (WT). **(B)** Plantas da linhagem 35S-AtNIK1-6. **(C)** Plantas (T1) da linhagem 35S AtNIK-T474D-9. **IN** refere-se a plantas inoculadas com DNA viral e **UN** refere-se a plantas inoculadas somente com partículas de tungstênio.

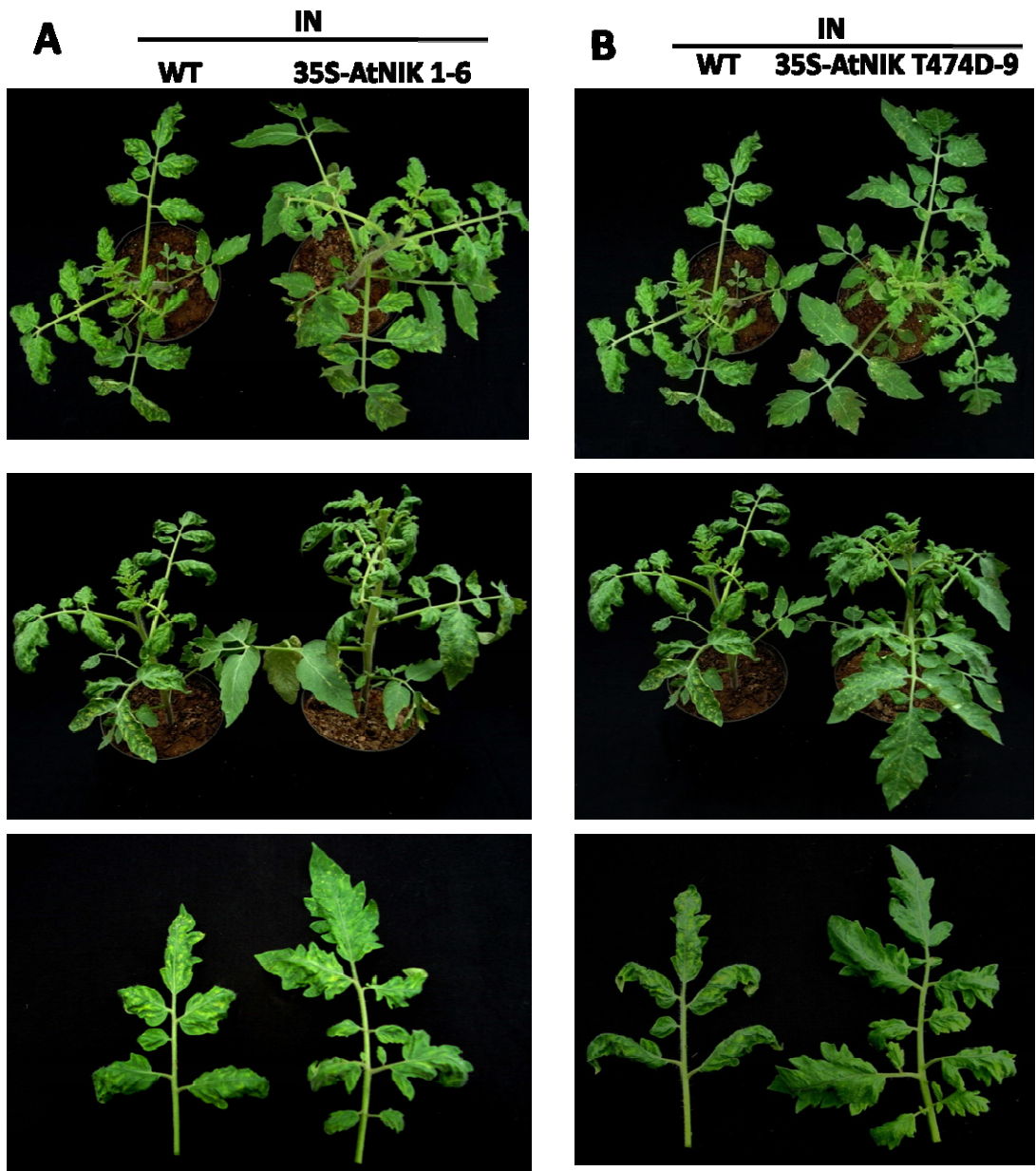


Figura 15. Plantas transformadas com AtNIK 1 e AtNIK-T474D exibem uma menor severidade dos sintomas ocasionados pelo ToYSV. (A) Sintomas em plantas não transformadas e em plantas da linhagem 35S-AtNIK1-6. **(B)** Sintomas em plantas não transformadas e em plantas de linhagem 35S AtNIK-T474D-9. IN refere-se às plantas inoculadas com DNA viral.

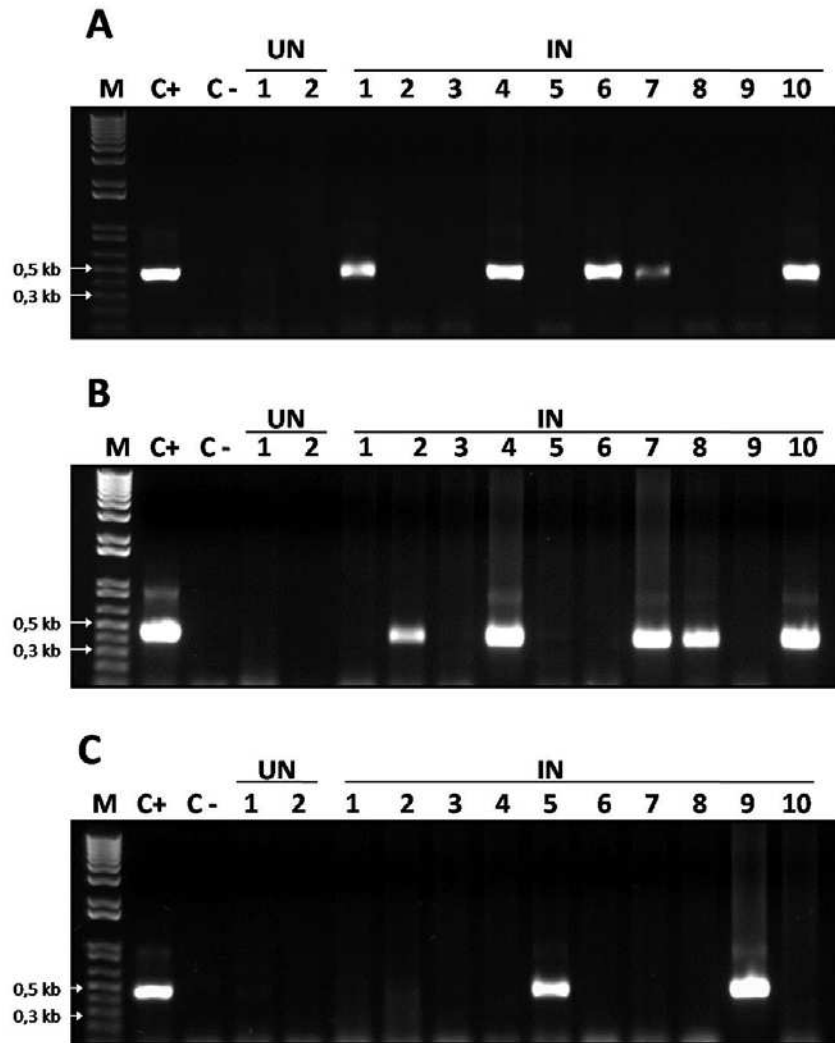


Figura 16. Diagnóstico do acúmulo de DNA viral por PCR, sete dias pós inoculação de plantas das linhagens transgênicas superexpressando AtNIK e AtNIK-T474D. O DNA total das plantas inoculadas foi amplificado com oligonucleotídeos degenerados que amplificam um fragmento específico do componente B de begomovírus (Rojas et al., 1993). **(A)** Planta não transformada (WT). **(B)** Plantas da linhagem 35S-AtNIK1-6. **(C)** Plantas da linhagem 35S-AtNIK-T474D-9. **(M)** marcador de peso molecular em Kb, **(C+)** controle positivo da reação utilizando o plasmídeo que contém a cópia e meia do DNA-B do ToYSV como molde na reação do PCR, **(C-)** controle negativo da reação utilizando água como molde na reação de PCR.

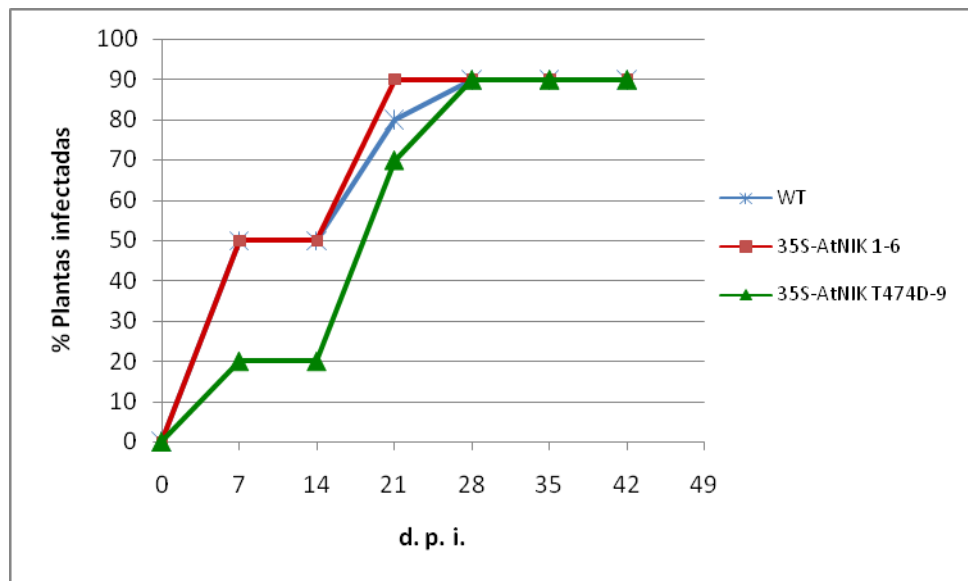
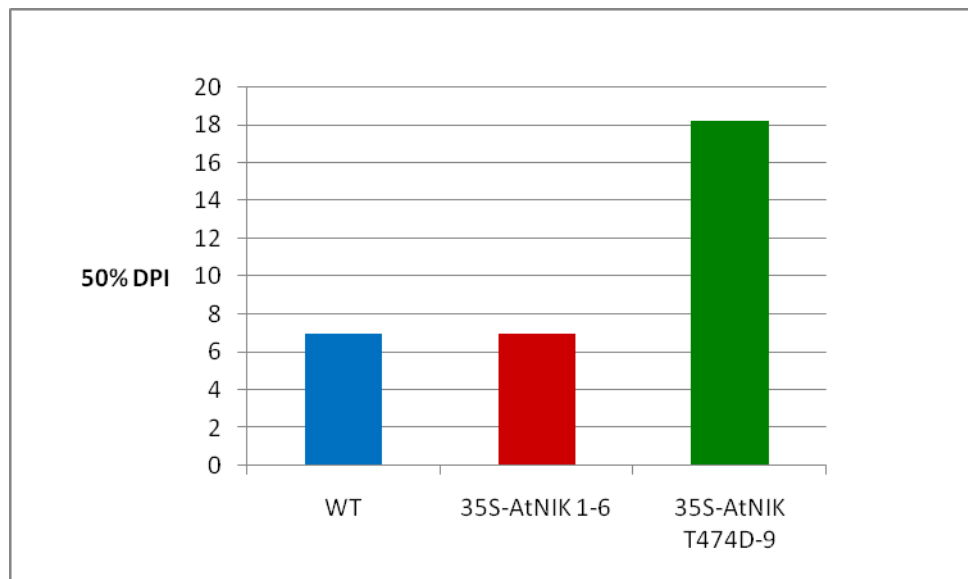
A**B**

Figura 17. A expressão de 35S-AtNIK T474D altera a taxa de infecção viral. A) Porcentagem de plantas infectadas sistemicamente, monitorado pelo acúmulo de DNA viral. **B)** Taxa de infecção em plantas não transformadas (WT), linhagem 35S-AtNIK1-6 e linhagem 35S-AtNIK T474D-9. A taxa de infecção foi expressa como número de dias pós-inoculação requerido para que o 50% das plantas estivessem infectadas (DPI 50%). **DPI** denota dias pós-inoculação.

Para determinar se o nível de expressão de AtNIK1-T474D influencia no desenvolvimento de sintomas, três linhagens independentes de plantas que superexpressam 35S-AtNIK-T474D em níveis variáveis (Figura 18) foram inoculadas por biobalística com o DNA-A e DNA-B do isolado ToYSV-[MG-Bi2]. A severidade dos sintomas observados entre estes três linhagens independentes foi muito variável, sendo que a linhagem identificada como 35S-AtNIK-T474D-6 desenvolveu sintomas mais atenuados comparado com as outras duas linhagens, 35S-AtNIK-T474D-1 e 35S-AtNIK-T474D-9 (Figura 19). Os resultados de sintomatologia parecem mostrar uma correlação com o nível de expressão gênica do transgene 35S-AtNIK-T474D. Comparando as três linhagens do experimento, a expressão do transgene foi superior na linhagem 35S-AtNIK-T474D-6 (Figura 18) que apresentou sintomas mais atenuados e taxa de infecção menor. Estes resultados indicam que o excesso molar do mutante T474D também influencia na eficiência e robustez da defesa antiviral, provavelmente devido a sua atuação na competição com o NIK endógeno pela interação com NSP. Experimentos adicionais serão necessários para confirmar esta hipótese.

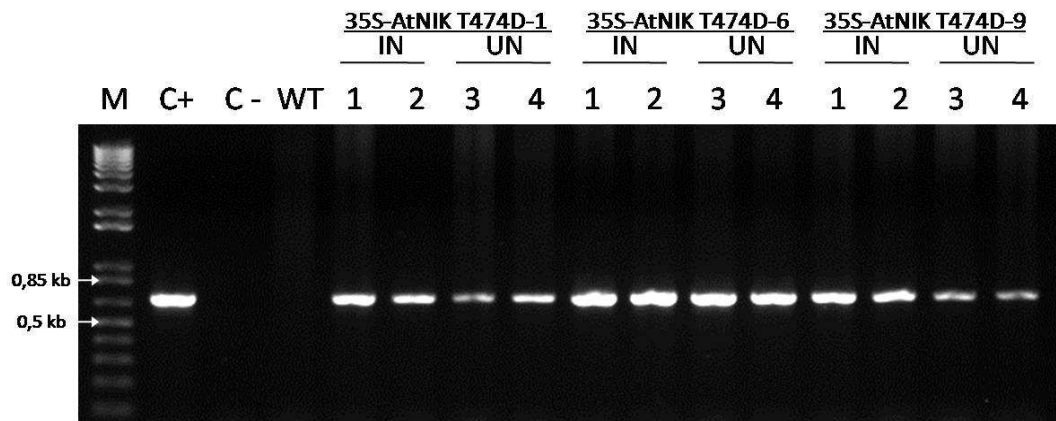


Figura 18. Expressão do gene AtNIK T474D em três linhagens transgênicas de tomateiro. O acúmulo do transcrito foi analisado por RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para a proteína NIK1 (3314 e 3315), amplificando um fragmento de aproximadamente 0,7 Kb. **(M)** marcador de peso molecular, **(C+)** controle positivo da reação utilizando o plasmídeo pk7FNIK1-T474D como molde na reação de PCR, **(C-)** controle negativo da reação utilizando água como molde na reação de PCR, **(WT)** cDNA da planta tipo selvagem não transformada. **IN** refere-se a plantas inoculadas com DNA viral, e **UN** refere-se a plantas inoculadas somente com partículas de tungstênio.

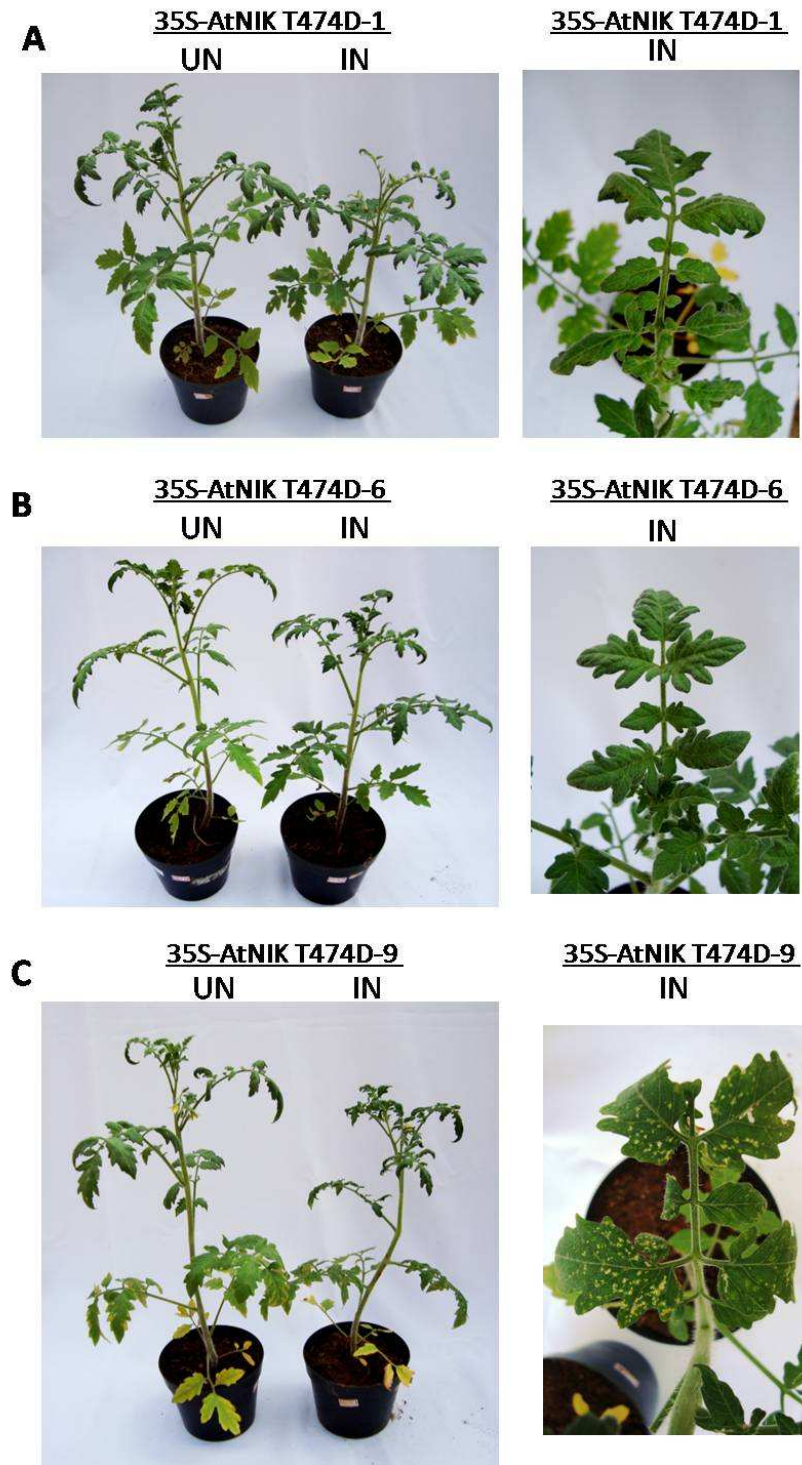


Figura 19. Sintomas associados à infecção por ToYSV em plantas (T1) de três linhagens independentes superexpressando AtNIK T474D aos 20 dias pós inoculação. **(A)** Linhagem 35S-AtNIK T474D-1. **(B)** Linhagem 35S-AtNIK-T474D-6. **(C)** Linhagem 35S-AtNIK-T474D-9. **IN** refere-se a plantas inoculadas com DNA viral e **UN** refere-se a plantas inoculadas somente com partículas de tungstênio.

CONCLUSÕES

Os resultados desta investigação forneceram evidências de uma possível comunicação cruzada entre a via de resposta a brassinosteróides mediada por BRI1 e a via de sinalização anti-viral mediada pela proteína NIK. As análises fenotípicas da progênie dos transformantes primários demonstraram que a superexpressão do receptor AtNIK promoveu um alongamento de entrenós, resultando em maior estatura do sistema aéreo, mas afetou negativamente o desenvolvimento radicular. De acordo com estas respostas fenotípicas, associadas com resultados anteriores relacionados à possível função da proteína L18 como substrato de BRI1 e sua interação estável com NIK, bem como a repressão por NIK de genes controlados por brassinosteróides, é razoável supor que a superexpressão de *NIK* de alguma forma altera a sinalização de brassinosteróides. Nos ensaios de infectividade viral, os resultados obtidos confirmam o papel essencial da fosforilação do resíduo de treonina 474 para a ativação induzida do receptor NIK. A superexpressão de AtNIK-T474D constitutivamente ativa diminuiu a taxa de infecção pelo geminivírus ToYSV e interferiu no desenvolvimento de sintomas, os quais foram menos severos nas linhagens 35S-AtNIK-T474D, quando comparadas com plantas não transformadas e linhagens superexpressando NIK normal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAZIZ, R.; DINANT, S. E EPEL, B. L. Plasmodesmata and plant cytoskeleton. *Trends in Plant Science*, v. 6, p. 326-330, 2001.
- ALTMANN, T. Molecular physiology of brassinosteroids revealed by the analysis of mutants. *Planta*, v. 208, p. 1-11, 1999.
- ANDRADE, E. C.; MANHANI, G. G.; ALFENAS, P. F.; CALEGARIO, R. F.; FONTES, E. P. B.; ZERBINI, F. M. Tomato yellow spot virus, a tomato-infecting begomovirus from Brazil with a closer relationship to viruses from *Sida* sp., forms pseudorecombinants with begomoviruses from tomato but not from *Sida*. *Journal of General Virology*, v. 87, p. 3687–3696, 2006.
- BECRAFT, P. W. Receptor kinase signaling plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 18, p. 163-192, 2002.
- BECRAFT, P. W. Receptor kinases in plant development. *Trends in Plant Science*, v. 3, p. 384-488, 1998.
- BRIDDON, R.W.; PINNER, M. S.; STANLEY, J.; MARKHAM, P. G. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect vector specificity. *Virology*, v. 177, p. 85–94, 1990.
- CASTILLO, A. G.; COLLINET, D.; DERET, S; KASHOGGI, A.; BEJARANO, E. R. Dual interaction of plant PCNA with geminivirus replication accessory protein (Ren) and viral replication protein (Rep). *Virology*, v.312, p. 381-394, 2003.
- CALEGARIO, R. F. ; FERREIRA, S. S.; ANDRADE, E. C.; ZERBINI, F. M. Characterization of Tomato yellow spot vírus, a novel tomato-infecting bogomovirus in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 42, p. 1335 – 1343, 2007.
- CARVALHO, C.,M.; FONTENELLE, M. R.; FLORENTINO, L. H.; SANTOS, A. A.; ZERBINI, F. M.; FONTES, E. P. B. A novel nucleocytoplasmic traffic GTPase identified as a functional target of the bipoartite geminivirus nuclear shuttle protein. *Plant Journal*, v. 55, p. 869-880, 2008a.
- CARVALHO, C., M.; MACHADO, J. P.; ZERBINI, F. M.; FONTES, E. P. B. A cytosolic protein as cofactor for nuclear shuttle proteins. *Plant Signaling and Behavior*, v. 3, p. 752-754. 2008b.
- CARVALHO, M. C.; SANTOS, A. A.; PIRES, S. R., ROCHA C.S.; SARAIVA, D. I.; MACHADO, J. P. B.; MATTOS, E. C., FIETTO, L. G.; FONTES, E. P. B. Regulated nuclear trafficking of rpL10A mediated by NIK1 represents a defense strategy of plant cells against virus. *PLoS Pathogens*, v. 4, p e1000247, 2008c.
- CARVALHO, M. F.; LAZAROWITZ, S. G. Interaction of the movement protein NSP and the *Arabidopsis* acetyltransferase AtNSI is necessary for *Cabbage leaf curl geminivirus* infection and pathogenicity. *Journal of Virology*, v. 78, p. 11161–11171, 2004.
- CLARK, S. E., WILLIAMS, R. W.; MEYEROWITZ, E. M. The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell*, v. 89, p. 575-585, 1997.

DEAN, C.; JONES, J.; FAVREAU, M.; DUNSMUIR, P.; BEDBROOK, J. Influence of flanking sequences on variability in expression levels of an introduced gene in transgenic tobacco plants. *Nucleic Acids Research*, v. 16, p. 9267-9283, 1988.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant DNA minipreparation: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 1, p. 19-21, 1983.

DIEVART, A.; CLARK, S. E. LRR-containing receptors regulating plant development and defense. *Development*, v. 131, p. 251-261, 2004.

EHSAN, H.; RAY, W. K.; PHINNEY, B.; WANG, X.; HUBER, S. C.; CLOUSE, S. D. Interaction of Arabidopsis BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1 receptor kinase with a homolog of mammalian TGF- β receptor interacting protein. *Plant Journal*, v. 43, p. 251-261, 2005.

FLORENTINO, L. H.; SANTOS, A. A.; FONTENELLE, M. R.; PINHEIRO, G. L.; ZERBINI, F. M.; BARACAT-PEREIRA, M. C.; FONTES, E. P. B. A PERK-like receptor kinase interacts with the geminivirus nuclear shuttle protein and potentiates viral infection. *Journal of Virology*, v. 80, n. 13, p. 6648 - 6656, 2006.

FONTES, E. P. B.; ROCHA, C. S.; SANTOS, A. A.; MACHADO, J. P. B. The ribosomal protein L10/QM-like protein is a component of the NIK-mediated antiviral signaling. *Virology*, v. 380, p. 165 – 169, 2008.

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*, v 18, p. 2545 –2556, 2004.

FONTES, E.P.B.; EAGLE, P.A.; SIPE, P.S.; LUCKOW, V.A.; HANLEY-BOWDOIN, L. Geminivirus replication origins have a modular organization. *Plant Cell*, v. 6, p. 405-416, 1994.

FRARY, A. The use of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in the map-based cloning of tomato genes and an analysis of factors affecting transformation efficiency. Ithaca, NY: Cornell University. 165p. Thesis (Ph.D.), Cornell University. 1995.

GAFNI, Y.; EPEL, B. L.. The role of host and viral proteins in intra- and inter-cellular trafficking of geminiviruses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 60, p. 231-241, 2002.

GILBERTSON, R. L.; SUDARSHANA, M.; JIANG, H.; ROJAS, M. R.; LUCAS, W. J. Limitations on geminivirus genome size imposed by plasmodesmata and virus-encoded movement protein: Insights into DNA trafficking. *Plant Cell*, v. 15, p. 2578 – 2591, 2003.

GOMEZ-GOMEZ, L.; BOLLER, T. *FLS2*: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell*, v. 5, p. 1003-1011, 2000.

GUTIERREZ, C. DNA replication and cell cycle in plants: learning from geminiviruses. *EMBO Journal*, v. 19, n. 5, p. 792-799, 2000.

GUTIERREZ, C. Geminivirus DNA replication. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 56, p. 313–329, 1999.

GUTIERREZ, C.; RAMIREZ-PARRA, E.; CASTELLANO, M.; SANZ-BURGOS, A. P.; LUQUE, A.; MISSICH, R. Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. *Veterinary Microbiology*, v. 98, p. 111-119, 2004.

HAFFANI, Y. Z.; SILVA, N. F.; GORING, D. R. Receptor kinase signalling in plants. *Canadian Journal of Botany*, v. 82, p. 1-15, 2004.

HARRISON, B. D. Advances in geminivirus research. *Annual Review of Phytopathology*, v. 23, p: 83–96, 1985.

HE, J. X.; GENDRON, J. M.; SUN, Y.; GAMPALA, S. S. L.; GENDRON, N.; SUN, C. K.; WANG, Z. Y. BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. *Science*, v. 307, p. 1634 – 1638. 2005.

HE, J. X.; GENDRON, J. M.; YANG, Y.; LI, J.; WANG, Z. Y. The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, p. 10185-10190, 2002.

HORN, M. A.; WALKER, J. C. Biochemical properties of the autophosphorylation of RLK5, a receptor-like protein kinase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1208, p. 65-74, 1994.

JINN, T. L.; STONE, J. M.; WALKER, J. C. HAESA, an *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. *Genes Development*, v. 14, p. 108-117, 2000.

KACHROO, A.; SCHOPFER, C. R.; NASRALLAH, M. E.; NASRALLAH, J. B. Allele-specific receptor-ligand interactions in *Brassica* self-incompatibility. *Science*, v. 293, p. 1824-1886, 2001.

KANG, B.; Y.; YEAM, I.; JAHN, M. M. Genetics of plant virus resistance. *Annual Review of Phytopathology*, v. 43, p. 581–621, 2005.

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

KRUSELL, L.; MADSEN, L. H.; SATO, S.; AUBERT, G.; GENUA, A.; SZCZYGLOWSKI, K.; DUC, G.; KANEKO, T.; TABATA, S.; DE BRUIJN, F.; PAJUELO, E.; SANDAL, N.; STOUGAARD, J. Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. *Nature*, v. 420, p. 422-426, 2002.

LAZAROWITZ, S. G.; BEACHY, R. N. Viral movement proteins as probes or intracellular and intercellular trafficking in plants. *Plant Cell*, v. 11, p. 535-548, 1999.

LAZAROWITZ, S. G.; CARVALHO, M. F.; TURGEON, R. The geminivirus nuclear shuttle protein NSP inhibits activity of AtNSI, a vascular-expressed *Arabidopsis* acetyltransferase regulated with the sink-to-source transition. *Plant Physiology*, v. 140, p. 1317-1330, 2006.

- LAZAROWITZ, S. G.; BECHY, R. N. Viral movement proteins as probes for intracellular trafficking in plants. *Plant Cell*, v. 11, p. 535-548, 1999.
- LI, J. E JIN, H. Regulation of brassinosteroid signaling. *Trends in Plant Science*, v. 12, p. 37-41, 2006.
- LI, J.; CHORY, J. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell*. v. 90, p. 929-938, 1997.
- LI, J.; WEN, J.; LEASE, K. A.; DOKE, J. T.; TAX, F. E.; WALKER, J. C. BAK1, an Arabidopsis LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell*, v. 110, p. 213–222, 2002.
- MANNERLÖF, M.; TENNING, M. P. Variability of gene expression in transgenic tobacco. *Euphytica*, v. 98, p. 133–139, 1997.
- MARIANO, A. C.; ANDRADE, M. O.; SANTOS, A. A.; CAROLINO, S. M. B.; OLIVEIRA, M. L.; BARACAT-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*, v. 318, p. 24-31, 2004.
- MCGARRY, R. C.; BARRON, Y. D.; CARVALHO, M. F.; HILL, J. E.; GOLD, D.; CHEUNG, E.; KRAUS, W. L.; LAZAROWITZ, S. G. A novel Arabidopsis acetyltransferase interacts with the geminivirus movement protein NSP. *Plant Cell*, v. 15, p. 1605–1618, 2003.
- MOFFAT, A.S. Geminiviruses emerge as serious crop threats. *Science* 286: 1835. 1999.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v. 15, p. 473-497, 1962.
- MÜSSIG, C.; SHIN, G. H.; ALTMANN, T. Brassinosteroids promote root growth in Arabidopsis. *Plant Physiology*, v. 133, p. 1261–1271, 2003
- NAM, K. H.; LI, J. The Arabidopsis transthyretin-like protein is a potential substrate of BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1. *Plant Cell*, v. 16, p. 2406-2417. 2004.
- NOUEIRY, A.O.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell*, v. 76, p. 965-932, 1994.
- ROCHA, C. S. Identificação de componentes da via de sinalização mediada pela protein NIK, um receptor que interage com a protein NSP de geminivirus. Tese do programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento. Universidade Federal de Viçosa. 2007.
- ROJAS, M. R.; HAGEN, CH.; LUCAS, W. J.; GILBERTSON. R. L. Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology*, v. 43, p. 361–394, 2005.
- SANDERFOOT, A. A.; LAZAROWITZ, S. G. Getting it together in plant virus movement: cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. *Trends in Cell Biology*, v. 6, p. 353 – 358, 1996.

- SANTOS, A. A.; CARVALHO, C. M.; FLORENTINO, L. H.; RAMOS, H. J. O.; FONTES, E. P. B. Conserved threonine residues within the A-loop of the receptor NIK differentially regulate the kinase function required for antiviral signaling. *PLoS ONE*. 4(6): e5781. Doi:10.1371/journal.pone.0005781. 2009.
- SHIU, S. H.; KARLOWSKI, W. M.; PAN, R.; TZENG, Y. H.; MAYER, K. F.; LI, W. H. Comparative analysis of the receptor-like kinase family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Cell*, v. 16, p. 1220-1234, 2004.
- SHIU, S.H.; BLEECKER, A. B. Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, p. 10763-10768, 2001.
- SONG, W. Y.; WANG, G. L.; CHEN, L. L.; KIM, H. S.; PI, L. Y.; HOLSTEN, T.; GARDNER, J.; WANG, B.; ZHAI, W. X.; ZHU, L. H. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science*, v. 270, p. 1804-1806, 1995.
- VANITHARANI, R.; FAUQUET, C. M.; CHELLAPPAN, P. Geminiviruses and RNA silencing. *Trends in Plant Science*, v. 10, n. 3, p. 144-151, 2005.
- VINAGRE, F.; VARGAS C.; SCHWARCZ, K.; CAVALCANTE, J.; NOGUEIRA, E. M.; BALDANI, J. I.; FERREIRA, P. C.; HEMERLY, A. S. SHR5: A novel plant receptor kinase involved in plant-N₂-fixing endophytic bacteria association. *Journal of Experimental Botany*, v. 57, p. 559-569, 2006.
- WAERD, B. M.; LAZAROWITZ, S. G. Nuclear export in plants: use of geminivirus movement proteins for a cell-based export assay. *Plant Cell*, v. 11, p. 1267–1276, 1999.
- WALKER, J. C. Structure and function of the receptor-like protein kinases of higher plants. *Plant Molecular Biology*, v. 26, p. 1599-1609. 1994.
- WALKER, J. C.; ZHANG, R. Relationship of a putative receptor protein kinase from maize to the S-locus glycoproteins of *Brassica*. *Nature*. v.345, p. 743–746, 1990.
- WANG, X., LI, X.; MEISENHELDER, J.; HUNTER, T.; YOSHIDA, S.; ASAMI, T.; CHORY, J. Autoregulation and homodimerization are involved in the activation of the plant steroid receptor BRI1. *Developmental Cell*, v. 8, p. 855–865, 2005.
- YIN, Y.; VAFEADOS, D.; TAO, Y.; YOSHIDA, S.; ASAMI, T.; CHORY, J. A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *Cell*, v. 120, p. 249–259, 2005.
- YIN, Y.; WANG, Z.Y.; MORA-GARCIA, S.; LI, J.; YOSHIDA, S.; ASAMI, T.; CHORY, J. A. BES1 Accumulates in the Nucleus in Response to Brassinosteroids to Regulate Gene Expression and Promote Stem Elongation. *Cell*, v. 109, p. 181-191, 2002
- ZHANG, X. S.; CHOI, J. H.; HEINZ, J.; CHETTY, C. S. Domain-specific positive selection contributes to the evolution of *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor-like kinase LRR RLK genes. *Journal of Molecular Evolution*, v. 63, p. 612-6