

SILVANA RODRIGUES PIRES

**EXPRESSÃO ECTÓPICA DO GENE *NIK* EM TOMATEIROS: EFEITOS
NO DESENVOLVIMENTO E NA INFECÇÃO POR GEMINIVÍRUS**

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
2007**

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

T

P667e
2007

Pires, Silvana Rodrigues, 1981-

Expressão ectópica do gene *NIK* em tomateiros :
efeitos no desenvolvimento e na infecção por geminivirus
/ Silvana Rodrigues Pires. – Viçosa, MG, 2007.
xi, 53f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 45-53.

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

CDD 22.ed. 572.8

SILVANA RODRIGUES PIRES

**EXPRESSÃO ECTÓPICA DO GENE *NIK* EM TOMATEIROS: EFEITOS
NO DESENVOLVIMENTO E NA INFECÇÃO POR GEMINIVÍRUS**

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: 28 de setembro de 2007.

**Prof^a Andréa Miyasaka de Almeida
(Co-orientadora)**

**Prof. Francisco Murilo Zerbini Júnior
(Co-orientador)**

Prof. Luciano Gomes Fietto

Prof^a Maria Cristina Baracat Pereira

**Prof^a Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Orientadora)**

*Às pessoas especiais da minha vida:
Meu esposo Gabriel, meus pais, Walter e
Sônia,
e meus irmãos Adriana, Viviane e Rochiel.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela certeza da presença constante, a força nos momentos difíceis, a paciência sempre necessária, e indispensável em muitos momentos.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do Curso. Ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), pela oportunidade da realização deste trabalho.

Ao Departamento de Biologia Vegetal, ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, professor Rolf Puschmann, às secretárias Beth e Cássia. Aos professores do departamento, pelos ensinamentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

À professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes, pela orientação e competência.

Aos professores Andréa Miyasaka de Almeida e Murilo Zerbini Júnior, pela co-orientação e pela colaboração dada ao trabalho.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, pelo apoio e por sempre acreditarem em mim e não medirem esforços para que eu atingisse meus objetivos. Aos meus irmãos, pelo amor, carinho e apoio.

A meu esposo Gabriel, pela confiança e força, por acreditar. Por sempre estar presente na minha vida, mesmo à distância. Por compreender a minha ausência. Por ser o amor da minha vida, meu grande amor.

A minha avó e madrinha Elza, tia Vininha, tia Santuza, tio Maurinho e em especial a grande pessoa que foi tio Tarcísio e tia Aparecida, pela força e imenso apoio nos momentos difíceis, só posso agradecer por tudo...

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas e do Laboratório de Purificação e Expressão de Proteínas, amizade e colaboração para obtenção dos resultados. Em especial, Anete, Ana Paula, amigas de sempre, João Paulo, Rejane pela força, Carol, Gui, Anésia, Max... Galera, valeu pela ajuda e contribuição nos experimentos, mas sobretudo por estarem comigo.

À amiga Daniela, pela ajuda nos experimentos. Confiança em mim, confiança no trabalho, jamais esquecerei de você.

Aos funcionários Serafim, Marlene e Renata, pela presteza.

Aos amigos Alisson, Miguel, Paulo César e em especial Gustavo, pelo excelente convívio e apoio nos experimentos.

Aos colegas do curso de Fisiologia Vegetal. Aos amigos da Bioquímica 2001.

Ao funcionário da estufa, Fizinho, pela presteza.

Ao Laboratório de Cultura de Tecidos, na pessoa do professor Wagner Otoni.

Às eternas companheiras de república, em especial Rachel, irmãs por opção, sempre a me erguer nos momentos difíceis.

Aos amigos da república, em especial Gustavo Gomes, por acreditar em mim, e me fazer prosseguir.

Aos amigos de Ubari, em especial Fernanda, que, mesmo distante, esteve sempre por perto, me apoiando, me segurando, fazendo tudo valer a pena.

À Fernanda e seu esposo Daniel, pela força nos momentos difíceis.

À amiga forte e linda que Deus me deu de presente. Jô valeu demais!

Aos companheiros de sempre Reginaldo, Raianny, em especial **Vanessa e D. Neinha** (saudades eternas), pela força que tanto precisei, quantas vezes me ouvir chorar, me fazer levantar quando tudo parecia sem fim, esta tese é de vocês também. **Um muito obrigada, de coração.**

A todos os amigos e familiares, que de alguma forma, contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal. E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

SILVANA RODRIGUES PIRES, filha de Walter José Pires e Sônia Maria Rodrigues Pires, nasceu no dia primeiro de dezembro de 1981, em Ubá, MG.

Em março de 2001, ingressou no curso de Bioquímica, na Universidade Federal de Viçosa, MG, graduando-se como Bacharel em Bioquímica em janeiro de 2005.

Em agosto de 2005, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, em nível de mestrado, na mesma instituição, concentrando seus estudos na área de Biologia Molecular de Plantas.

Em outubro de 2007, submeteu-se à defesa de sua dissertação.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	4
1 – Família Geminiviridae	4
1.1 – Organização taxonômica e genômica.....	4
1.2 – Mecanismo de replicação viral.....	6
1.3 – Diversidade genética de begomovírus em tomateiro.....	8
1.4 – Movimento célula-a-célula e a longa distância durante a infecção viral.....	9
1.5 – Interações geminivírus-hospedeiro.....	10
2 – Receptores do tipo serina/treonina quinases.....	12
2.1 – Caracterização.....	12
2.2 – Família RLK em plantas.....	14
2.3 – Subfamília LRRII-RLK.....	15
3 – Receptores NIK (NSP-Interacting Protein).....	15
MATERIAL E MÉTODOS.....	18
1. – Construções de DNA.....	18
1.1– Construção do clone pk7AtNIK1-1.....	18
1.2 – Construção do clone pk7ILeNIK-(RNAi).....	19
2 – Material Vegetal.....	23
3 – Procedimentos para transformação de tomateiros.....	24
3.1 – Transformação de agrobactéria LBA4404 com os clones pk7AtNIK1-1 e pk7ILeNIK-(RNAi- LBA4404).....	24
3.2 – Transformação de tomateiros.....	24
3.3 – Diagnóstico Molecular dos transformantes.....	25
3.4 – Expressão do transgene.....	26
3.5 – Aclimação dos transformantes primários.....	26
4 – Análise de desenvolvimento dos transformantes primários em cultura de tecidos e em casa-de-vegetação.....	27
5 – Ensaio de infectividade por biobalística.....	28
5.1 – Extração do DNA viral.....	28

5.2 – Bombardeamento.....	28
5.3 – Diagnóstico molecular da infecção viral.....	29
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
1- Obtenção do clone pk7ILeNIK-(RNAi).....	30
2- Transformação de agrobactéria LBA4404.....	32
2.1- Obtenção do clone pk7AtNIK1- 1-LBA4404).....	32
2.2- Obtenção do clone pk7ILeNIK-(RNAi- LBA4404).....	32
3 – Obtenção e análise das plantas transgênicas.....	33
4 – Superexpressão da proteína <i>NIK</i> retarda o crescimento das plantas.....	35
5 – Superexpressão de <i>AtNIK</i> não altera taxa de infecção por ToYSV-[MG-Bi2], mas interfere no desenvolvimento de sintomas.....	40
CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

RESUMO

PIRES, Silvana Rodrigues, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2007. **Expressão ectópica do gene *NIK* em tomateiros: Efeitos no desenvolvimento e na infecção por geminivírus.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-Orientadores: Andréa Miyasaka de Almeida e Francisco Murilo Zerbini.

Geminivírus são vírus de plantas com partículas semi-icosaédricas geminadas e genoma de DNA circular de fita simples, podendo ser mono ou bissegmentados, sendo, no último caso, os dois componentes genômicos, denominados DNA-A e DNA-B. No DNA-A, encontram-se os genes que codificam as proteínas necessárias para a replicação viral e encapsidação. O DNA-B codifica duas proteínas de movimento, *Movement Protein*, MP e *Nuclear Shuttle Protein*, NSP, ambas requeridas para o estabelecimento de uma infecção sistêmica. NSP transporta o DNA viral entre o núcleo e o citoplasma e atua cooperativamente com MP para transportar o DNA viral de célula-a-célula através da parede celular. Os geminivírus são altamente dependentes de fatores do hospedeiro para sua proliferação. A proteína NSP interage com uma quinase receptora da membrana plasmática, designada NIK (*NSP-Interacting Kinase*) de tomate, soja e *Arabidopsis*. Foi demonstrado, em estudos anteriores, que a inativação do gene *NIK* aumenta a suscetibilidade dos mutantes à infecção viral. Visando elucidar o possível papel de NIK no mecanismo de proteção à infecção por geminivírus, este estudo propôs uma avaliação dos efeitos da superexpressão de NIK na resposta de tomate à infecção por geminivírus. Assim sendo, o gene *NIK* de *Arabidopsis thaliana* foi utilizado para transformar tomateiro. Os transformantes primários foram confirmados por PCR, selecionados por RT-PCR, de acordo com a expressão do transgene, repicados *in vitro* e utilizados em experimentos de análise de desenvolvimento *in vitro* e em casa-de-vegetação. Análises fenotípicas demonstraram que a superexpressão

da proteína promoveu retardo de crescimento dos transformantes, os quais apresentaram baixa estatura, menor comprimento caulinar, menor desenvolvimento de sistema radicular e aéreo, folhas enrugadas/encarquilhadas. O fenótipo observado nas linhagens transgênicas superexpressando NIK é muito similar àquele resultante da inibição da via de biossíntese ou sinalização de brassinosteróides. Os ensaios de infectividade em tomateiro com o vírus ToYSV-[MG-Bi2] revelaram que a superexpressão de NIK causou atenuação dos sintomas uma vez que os transformantes apresentaram menor severidade de sintomas em relação às linhagens não transformadas. Estes resultados são consistentes com o papel protetor de NIK contra a infecção viral e sugere que a sinalização mediada por NIK comunica-se, em algum nível, com a via de sinalização de brassinosteróides.

ABSTRACT

PIRES, Silvana Rodrigues, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, september of 2007. **Ectopic expression of *NIK* gene in tomato plants: effects on development and geminivirus infection.** Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-Advisers: Andréa Miyasaka de Almeida e Francisco Murilo Zerbini.

Geminivirus are plant virus packed as geminate semi-icosahedral particles and single-stranded circular DNA genomes. They can be either mono or bipartite and in the bipartite geminivirus, the genomic components are designated DNA-A and DNA-B. DNA-A encodes the proteins needed for replication, transactivation and encapsidation of the viral genome. DNA-B encodes two movement proteins, Movement Protein, MP, and Nuclear Shuttle Protein, NSP, both required for the establishment of a systemic infection. NSP transports the viral DNA between the nucleus and cytoplasm and acts cooperatively with MP to move the viral DNA cell-to-cell across the wall. The geminivirus are highly dependent on the host factors for proliferation and spread. NSP interacts with a plasma membrane receptor kinase, designated NIK (*NSP-interacting kinase*), from tomato, soybean and *Arabidopsis*. It has been demonstrated previously that inactivation of *NIK* gene enhances the susceptibility of the mutant to geminivirus infection. To elucidate the possible role of NIK in the protection mechanism to geminivirus infection, we investigated here the effects of NIK overexpression in the tomato response to geminivirus infection. The *NIK* gene from *Arabidopsis thaliana* was used to transform tomato. The primary transformants were confirmed by PCR, selected by RT-PCR according to the transgene expression, in vitro replicated and used for developmental analysis in vitro and in green house. NIK overexpression affected the overall developmental performance of transgenic lines which display delayed and stunted growth, with lower stem, less

developed root and shoot systems and a leaf curly phenotype. These transgenic line phenotypes overexpression NIK were similar to that displayed by inhibition of Brassinosteroid synthesis or signaling. Infectivity assays in tomato with ToYSV-[MG-Bi2] revealed that overexpression of NIK caused attenuation of symptom, as the transgenic lines developed less severe symptoms in comparison with the untransformed lines. These results are consistent with a protective role of NIK against viral infection and suggest that the NIK-mediated signaling communicates to some level with the brassinosteroid signaling.

INTRODUÇÃO

Desde a década de 1980, as principais áreas onde o tomateiro é cultivado no mundo têm sido severamente afetadas por begomovírus (família *Geminiviridae*).

A família *Geminiviridae* é constituída por vírus de plantas com partículas semi-icosaédricas geminadas e genoma de DNA circular de fita simples (Van Regenmortel et al., 2000). É dividida em quatro gêneros (*Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus* e *Topocuvirus*), com base no número de componentes do genoma, inseto vetor, gama de hospedeiros e relacionamento filogenético (Fauquet et al., 2003). Os begomovírus incluem os vírus transmitidos por “mosca-branca” (*Bemisia tabaci*, Homoptera: Aleyrodidae) a espécies dicotiledôneas, e que possuem um ou dois componentes genômicos (denominados DNA-A e DNA-B). No DNA-A encontram-se os genes que codificam as proteínas necessárias para a replicação viral e encapsidação. O DNA-B codifica duas proteínas de movimento, “Movement Protein” MP e “Nuclear Shuttle Protein” NSP, ambas requeridas para o estabelecimento de uma infecção sistêmica. NSP transporta o DNA viral entre o núcleo e o citoplasma e então atua cooperativamente com MP para movimentar o DNA viral de célula-a-célula através da parede celular.

O controle das doenças causadas por begomovírus é dificultado pela existência de poucas fontes naturais de resistência e pela diversidade genética do inseto vetor. Sendo assim, o estabelecimento de um mecanismo de resistência que possa ser introduzido em espécies economicamente relevantes, como o tomateiro, representaria enormes ganhos para os produtores.

Dentro desse contexto, a caracterização bioquímica e funcional de proteínas da planta hospedeira que interagem com proteínas virais deve auxiliar na elucidação do mecanismo de infecção viral, bem como na estruturação de um

modelo da interação planta: patógeno, possibilitando o desenvolvimento de estratégias de resistência. Esta caracterização já foi bem utilizada na identificação de proteínas do hospedeiro que interagem com proteínas virais durante o processo de replicação de geminivírus (Alberter et al., 2005; Gutierrez et al., 2004; Malik et al., 2005), e também com a proteína NSP de begomovirus (Florentino et al., 2006; Fontes et al., 2004; Mariano et al., 2004; McGarry et al., 2003). Porém, a maquinaria de transporte do hospedeiro que possibilita a movimentação de geminivírus pela planta, possibilitando a instalação de uma infecção sistêmica, ainda é muito pouco elucidada (Rojas et al., 2001; Zhang et al., 2001). Assim sendo, a proteína NSP (“Nuclear Shuttle Protein”), em cooperação com MP, consiste em um excelente alvo para elucidação molecular das interações geminivírus-hospedeiro.

A via fundamental de NSP no movimento viral prediz que esta proteína pode interagir com fatores do hospedeiro em diferentes compartimentos subcelulares. Foi demonstrado que NSP interage com uma acetilase nuclear de *Arabidopsis thaliana*, designada AtNSI (“NSP interactor”) (McGarry et al., 2003), como também com uma quinase receptora da membrana plasmática, designada NIK (“NSP-interacting kinase”), de tomate, soja e *Arabidopsis* (Mariano et al., 2004). Em *Arabidopsis*, NSP interage com três membros da família LRR-RLK, NIK1, NIK2 e NIK3, que são serina/treonina quinases autênticas com propriedades bioquímicas consistentes com a função de receptor sinalizador (Fontes et al., 2004). Evidências sugerem que a interação NIK-NSP pode ser biologicamente relevante. A interação com NIK é altamente específica, não interagindo com nenhuma outra proteína viral, nem com outras proteínas controles. A proteína NIK está localizada na membrana plasmática e exhibe propriedades bioquímicas consistentes com uma função sinalizadora. A oligomerização de NIK precede a autofosforilação de seu domínio quinase e a interação da proteína viral NSP com NIK inibe a autofosforilação deste receptor

suprimindo a resposta antiviral mediada por NIK (Fontes et al., 2004). Esta interação não é vírus-específica, e a inativação do gene *NIK* aumenta a suscetibilidade dos mutantes à infecção viral (Fontes et al., 2004). A efetividade de manipulação dos níveis de NIK no processo de infecção viral ainda não foi avaliada em tomateiros e pode constituir uma alternativa eficaz para controle da doença. Assim sendo, os objetivos primordiais dessa dissertação foram transformar tomateiros com o gene *NIK1* de *Arabidopsis* e avaliar o efeito da manipulação dos níveis de NIK na eficiência de infecção por geminivírus.

REVISÃO DE LITERATURA

1 Família *Geminiviridae*

1.1 Organização taxonômica e genômica

A família *Geminiviridae* é caracterizada pela morfologia de partículas icosaédricas geminadas e genoma composto por DNA circular de fita simples (Hanley-Bowdoin et al., 1999). A família é subdividida em quatro gêneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus* e *Topocuvirus* (Stanley et al., 2005). O gênero *Mastrevirus* inclui os geminivírus com um componente genômico transmitidos por cigarrinhas (Homoptera:Cicadellidae) a plantas monocotiledôneas. Este gênero inclui patógenos importantes de culturas como o milho (*Maize streak virus*, MSV) e o trigo (*Wheat dwarf virus*, WDV). O gênero *Curtovirus* engloba geminivírus com um componente genômico transmitidos por cigarrinhas a espécies dicotiledôneas. O *Beet curly top virus* (BCTV) é a principal espécie de importância econômica. O gênero *Topocuvirus* possui apenas uma espécie (*Tomato pseudo-curly top virus*, TPCTV), com um componente genômico e transmitida por cigarrinhas (Homoptera: Auchenorrhyncha) a espécies dicotiledôneas. O gênero *Begomovirus* inclui espécies com um ou dois componentes genômicos transmitidas pela mosca-branca (*Bemisia tabaci*) a espécies dicotiledôneas. Entre os begomovírus de maior importância econômica pode-se citar o *Bean golden mosaic virus* (BGMV), o *African cassava mosaic virus* (ACMV) e o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (Moriones & Navas-Castillo, 2000; Were et al., 2004). Já se tem relato de mais de 130 espécies de begomovírus, incluindo mais de 40 espécies que podem infectar o tomateiro (Fauquet et al., 2003).

Em sua maioria, os begomovírus possuem genoma dividido em dois

componentes, denominados DNA-A e DNA-B. No DNA-A encontram-se os genes que codificam as proteínas necessárias para a replicação viral e encapsidação. O DNA-B possui genes que codificam proteínas responsáveis pelo movimento do vírus na planta (Hanley-Bowdoin et al., 1999), (Figura 1). Dentro de uma mesma espécie viral, os componentes genômicos não possuem identidade de seqüência, exceto por uma região intergênica com aproximadamente 200 nucleotídeos denominada região comum (RC), que é altamente conservada (acima de 90% de identidade para o DNA-A e DNA-B de uma determinada espécie). A partir da região intergênica divergem os genes virais, nos sentidos viral e complementar (Howarth et al., 1985; Stanley, 1983) (Figura 1).

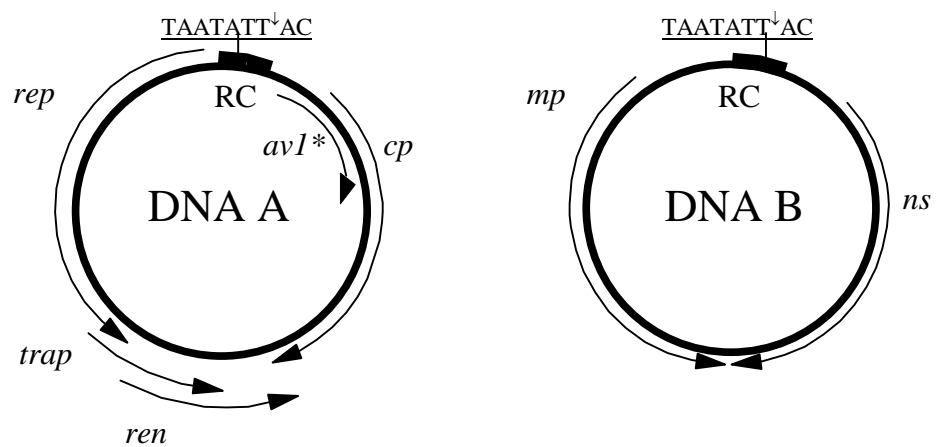


Figura 1- Representação esquemática do genoma de um begomovírus. As linhas grossas representam o genoma viral, dividido em dois componentes, cada um com aproximadamente 2.600 nucleotídeos. As setas indicam os genes virais e a direção em que ocorre a transcrição. A região comum (RC) também está indicada. A seqüência sublinhada, conservada em todos os membros da família *Geminiviridae*, constitui a origem de replicação do genoma viral. * Gene presente apenas nos begomovírus originários da Europa, Ásia e África (“Velho Mundo”). O DNA A, codifica as proteínas: Rep, Replication-Associated Protein; TrAP, Trans-Activating Protein; Ren, Replication-Enhancer Protein e a proteína capsidial CP, Coat Protein. O DNA B codifica as proteínas: MP, Movement Protein e NSP Nuclear Shuttle Protein.

O DNA-A dos begomovírus tem o potencial de codificar de quatro a seis proteínas: uma proteína associada à replicação (Rep, Replication-Associated Protein, também denominada AC1 ou AL1); uma proteína transativadora (TrAP, Trans-Activating Protein, anteriormente AC2 ou AL2) que ativa a transcrição dos genes *CP* e *NS* e está envolvida na supressão do silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) (Voinnet et al., 1999; Wang et al., 2005); a proteína Ren (Replication-Enhancer Protein, anteriormente AC3 ou AL3), fator de amplificação da replicação viral; e a proteína capsial (CP, Coat Protein, anteriormente AV1 ou AR1), essencial para a transmissão do vírus pelo inseto vetor (Bridson et al., 1990; Hanley-Bowdoin et al., 1999; Hofer et al., 1997a). O DNA-B codifica as proteínas MP (Movement Protein, anteriormente BC1 ou BL1) e NSP (Nuclear Shuttle Protein, anteriormente BV1 ou BR1), a primeira envolvida no movimento célula-a-célula do vírus por meio do aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas (Noueiry et al., 1994), e a segunda responsável pelo transporte do DNA através do envelope nuclear (Sanderfoot et al., 1996; Sanderfoot & Lazarowitz, 1995).

1.2 Mecanismo de replicação viral

O sítio de replicação dos geminivírus localiza-se no núcleo das células infectadas. A replicação viral e transcrição dos genes virais são dependentes da maquinaria do hospedeiro, o que faz dos geminivírus modelos ideais para o estudo da replicação e expressão gênica em plantas.

Geminivírus replicam o seu genoma por meio de um intermediário de fita dupla (conhecido como forma replicativa, RF), utilizando o mecanismo de círculo rolante semelhante ao utilizado pelos bacteriófagos ϕ X174 e M13 (Saunders et al., 1991; Stanley, 1995). Na replicação dos geminivírus, a fita complementar serve de molde para a síntese de várias cópias do DNA genômico, que formam uma longa fita simples de DNA linear contendo vários genomas unitários

(multímero ou concatâmero). O multímero é clivado gerando monômeros (os DNAs genômicos), que serão religados gerando moléculas circulares de ssDNA correspondentes ao genoma viral, as quais por sua vez serão encapsuladas formando os vírions (Laufs et al., 1995; Lazarowitz, 1992; Timmermans et al., 1994). A origem de replicação (ori) está localizada na região intergênica comum entre os dois componentes genômicos. A ori possui uma organização modular, com pelo menos três módulos funcionais (Fontes et al., 1994b). A seqüência da ori é conservada entre componentes de um mesmo vírus, porém variável entre espécies, com exceção de uma região (módulo do início da replicação) de aproximadamente 30 nucleotídeos que é essencial para a replicação (Davies et al., 1987; Lazarowitz, 1992). Nesta região, localiza-se uma seqüência repetida e invertida composta predominantemente por guanina e citosina, formando uma estrutura conservada (“structurally-conserved element”, SCE) em forma de grampo, com uma seqüência invariável (5'-TAATATTAC-3') encontrada em todos os geminivírus (Lazarowitz, 1992) que constitui o domínio funcional da origem de replicação (Orozco et al., 1998). É neste nonanucleotídeo que ocorre a clivagem (TAATATT↓AC) para início do processo de replicação por círculo rolante (Gutierrez, 1999; Hanley-Bowdoin et al., 1999). Esta clivagem é realizada pela proteína Rep, que atua como uma endonuclease sítio-específica com requerimento de estrutura e de seqüência (Laufs et al., 1995; Orozco & Hanley-Bowdoin, 1998). Na RC encontram-se também seqüências específicas para a ligação da proteína Rep (Fontes et al., 1992; Fontes et al., 1994b) e regiões promotoras da RNA polimerase tipo II, responsável pela transcrição dos genes virais (Hanley-Bowdoin et al., 1999).

O sítio de ligação de Rep ao DNA está localizado entre a caixa TATA do gene rep e a SCE (Orozco et al., 1998), e é constituído por duas seqüências idênticas repetidas (denominados “iterons”). A ligação de Rep aos iterons é essencial para o início da replicação. Após a ligação de Rep ao DNA viral e

estabilização do complexo formado por Rep, Ren e fatores do hospedeiro, a proteína Rep cliva o nonanucleotídeo localizado na SCE, dando início à replicação por círculo rolante (Gutierrez, 1999). O reconhecimento dos iterons por Rep é considerado vírus-específico (Argüello-Astorga et al., 1994a; Harrison, 1999), de modo que Rep preferencialmente inicia a replicação de seu DNA cognato.

1.3 Diversidade genética de begomovírus em tomateiro

O tomateiro é, dentre as culturas economicamente mais importantes, uma das mais afetadas pelo aumento na incidência de begomovírus (Morales & Anderson, 2001; Moriones & Navas-Castillo, 2000; Polston & Anderson, 1997; Ribeiro et al., 2003). A diagnose é realizada em geral por "polymerase chain reaction" (PCR) ou por hibridização com sondas radioativas, embora novos métodos estejam sendo testados (Santana et al., 2007). Em grande parte, o aumento da incidência de begomovírus está associado ao aumento populacional do biótipo B do inseto vetor, a mosca-branca *Bemisia tabaci* (Morales & Jones, 2004; Naranjo & Ellsworth, 2001). As fêmeas do biótipo B apresentam maiores taxas de oviposição, alta capacidade reprodutiva, baixa mortalidade em hospedeiros e uma gama de hospedeiros muito mais ampla que o biótipo A, incluindo solanáceas como o tomateiro e outras plantas silvestres e/ou daninhas, além de possuir maior um grau de adaptação e dispersão (Bedford et al., 1994). Com estas características, o inseto provavelmente transfere para o tomateiro espécies de begomovírus nativos presentes nas plantas daninhas. Diversas espécies de begomovírus infectando plantas daninhas como *Sida rhombifolia* e *Ageratum conizoides* já foram isoladas e caracterizadas (Frischmuth et al., 1997b; Tan et al., 1995). Um exemplo é o *Sida golden mosaic virus* (SiGMV), isolado de *S. rhombifolia*, que é capaz de infectar também plantas de tomateiro e feijoeiro (Frischmuth et al., 1997a).

No Brasil, uma década após o relato da presença do biótipo B de mosca-branca, levantamento realizado por meio do seqüenciamento parcial do genoma de begomovírus infectando tomateiros nas regiões Sudeste e Nordeste indicou a presença de pelo menos sete novas espécies associadas à cultura (Ribeiro et al., 2003). No estado de Minas Gerais foram caracterizadas três novas espécies. A espécie predominante no Triângulo Mineiro foi denominada *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) (Fernandes et al., 2000). Na Zona Metalúrgica, foi descrito o *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) (Ambrozevicius et al., 1999; Andrade et al., 2002; Ribeiro et al., 2003). Isolados de ToCMoV também foram identificados no Rio de Janeiro, Espírito Santo e em estados do nordeste como Bahia e Pernambuco (Ribeiro et al., 2003). Uma terceira espécie denominada *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) foi recentemente caracterizada (Calegario et al., 2007). Além dessas três espécies, cujos genomas encontram-se clonados e foram totalmente seqüenciados, relatos de possíveis novas espécies infectando o tomateiro continuam ocorrendo (Albuquerque et al., 2004; Andrade et al., 2006; Cotrim et al., 2007; Fernandes et al., 2006; Pires et al., 2004), sugerindo que o processo de transferência de vírus nativos para o tomateiro, com a conseqüente evolução de novas espécies, ainda se encontra em andamento.

1.4 Movimento célula-a-célula e a longa distância durante a infecção viral

O sucesso da infecção sistêmica depende do transporte do vírus a longa distância e de sua entrada no floema. Este movimento no interior do hospedeiro pode ser dividido em dois processos: movimento célula-a-célula, via plasmodesmas, e movimento a longa distância, no qual o vírus é transportado sistemicamente para toda a planta hospedeira após atingir o sistema vascular. Qualquer bloqueio neste processo acarreta o aparecimento de sintomas atenuados, ou mesmo a resistência do hospedeiro à infecção sistêmica

(Gilbertson & Lucas, 1996).

Para mediar o movimento do vírus no hospedeiro, os begomovírus codificam uma proteína não estrutural denominada MP. Essa proteína associa-se à membrana celular e possivelmente altera a arquitetura dos plasmodesmas, facilitando o transporte do genoma viral (Noueiry et al., 1994). Como os begomovírus se multiplicam no núcleo da célula infectada, é necessária uma etapa adicional de transporte do núcleo para o citoplasma, que é realizada por uma segunda proteína de movimento denominada NSP. Estas duas proteínas de movimento, atuando de maneira cooperativa (Sanderfoot & Lazarowitz, 1995), permitem ao vírus infectar sistemicamente o hospedeiro.

Nos begomovírus, a proteína capsial é dispensável para o estabelecimento de infecção sistêmica na maioria dos casos já estudados (Rojas et al., 2005). Tanto MP quanto NSP reconhecem o DNA viral de maneira específica em relação à forma e comprimento (Gilbertson et al., 2003; Rojas et al., 1998), o que eliminaria a necessidade da presença da proteína capsial para o movimento a longa distância.

1.5 Interações geminivírus-hospedeiro

Diferentes grupos de pesquisadores demonstraram grande número de interações entre os geminivírus e seus hospedeiros. Essas interações incluem modificações na estrutura e função de plasmodesmas (Gilbertson et al., 2003; Noueiry et al., 1994), respostas a diferentes mecanismos de defesa da planta (Fontes et al., 2004; Trinks et al., 2005; Vanitharani et al., 2004; Wang et al., 2005), interação com proteínas envolvidas na regulação do desenvolvimento celular (Latham et al., 1997; Xie et al., 1999), e modificações no padrão de expressão gênica do hospedeiro, principalmente no sentido de ativar genes envolvidos na síntese de DNA e na divisão celular (Arguello-Astorga et al., 2004; Luque et al., 2002; Settlege et al., 2001; revisado por Hanley-Bowdoin et al.,

2004).

Além da capacidade de ativação de proteínas do hospedeiro, as proteínas de replicação dos geminivírus são capazes também de interagir com proteínas do hospedeiro envolvidas na replicação de DNA, como a PCNA (Castillo et al., 2003) e o fator de replicação C (Luque et al., 2002). Estes fatores envolvidos na replicação não estão presentes em células diferenciadas normalmente infectadas por geminivírus, de modo que o primeiro passo no processo de infecção é interferir com o controle do ciclo celular para induzir a síntese destas proteínas.

Outro fator de grande importância para o sucesso da infecção viral é a capacidade do vírus em suprimir os mecanismos de defesa da planta. Os geminivírus interferem em diferentes respostas de defesa (Trinks et al., 2005; Vanitharani et al., 2004; Wang et al., 2003). Isto se deve, provavelmente, como uma forma de maximizar a replicação viral em termos quantitativos, permitindo o acúmulo de maiores quantidades de partículas virais na célula infectada, e em termos temporais, diminuindo o intervalo necessário para o estabelecimento da infecção sistêmica. Algumas dessas interações já foram identificadas, embora os mecanismos moleculares ainda não tenham sido totalmente elucidados.

De acordo com a função de NSP no transporte do vírus na planta, acredita-se que essa proteína interaja com proteínas do hospedeiro nos diversos compartimentos celulares. Foi isolado um receptor transmembrana serina/treonina quinase, designado LeNIK (*Lycopersicon esculentum*, atualmente *Solanum lycopersicum*, NSP-Interacting Kinase). Também foi comprovado que os homólogos de NIK em soja (GmNIK) e *Arabidopsis thaliana* (AtNIK) interagem com NSP (Fontes et al., 2004). A proteína NSP inibe a atividade de autofosforilação desses receptores de membrana e inativação dos genes NIKs em *Arabidopsis* aumenta a suscetibilidade à infecção viral.

Outra proteína caracterizada por interagir com NSP de geminivírus é uma

acetiltransferase nuclear pertencente a uma família de acetiltransferase de histonas nucleares, designada AtNSI (“Nuclear shuttle protein interactor”), altamente conservada entre as plantas (McGarry et al., 2003). NSP não é substrato para a enzima acetiltransferase. A proteína AtNSI acetila a proteína capsidial, auxiliando a interação do ssDNA com a proteína NSP durante a replicação por círculo rolante (McGarry et al., 2003). Em experimentos de superexpressão de AtNSI foi demonstrado que a infecção do CaLCuV é potencializada e vírus mutantes, cuja NSP é incapaz de interagir com AtNSI, possuem uma infecção deficiente (Carvalho & Lazarowitz, 2004; McGarry et al., 2003).

Além desta, foi identificada outra proteína, através de um *screening* de duplo híbrido de levedura, também com capacidade de interagir com NSP: a proteína *PERK-like*, também designada de NsAK (*NSP-associated Kinase*). A proteína NsAK é estruturalmente organizada em um domínio N-terminal rico em prolina, seguido por um domínio transmembrana e um domínio quinase do tipo serina/treonina no C-terminal. Ensaio de tradução *in vitro* de NsAK, na presença de NSP, mostrou aumento nos níveis de fosforilação de NSP, indicando que NSP age como substrato para NsAK (Florentino et al., 2006). Foi demonstrado que a perda de função de NsAK, *in vivo*, diminui a suscetibilidade à infecção por CaLCuV, sugerindo uma possível regulação da função de NSP.

2 Receptores do tipo serina/treonina quinases

2.1 Caracterização

Proteínas quinases, PK, possuem um papel fundamental em uma grande variedade de processos celulares, atuando no crescimento e desenvolvimento em plantas e animais. Atuam catalisando a fosforilação de um ou mais

substratos através da transferência do grupamento γ -fosfato do ATP para um grupamento hidroxila no substrato. Em muitos casos, esta função é realizada por receptores quinases, RPK, os quais são divididos em duas grandes classes apresentando diferentes especificidades em seus domínios quinases: receptores tirosina-quinases, RTK, que fosforilam proteínas em específicos resíduos de tirosina, enquanto que receptores serina/treonina-quinases, STKR, fosforilam serina ou treoninas ou, em alguns casos, ambos resíduos de aminoácidos (Lin et al., 1992). Células vegetais e animais utilizam receptores quinases para interagir entre si e com o meio extracelular, porém ocorre a dominância de RTKs em animais enquanto em plantas STKRs são predominantes. Estas duas grandes famílias apresentam uma origem comum anterior à diversificação dos organismos vivos em animais e plantas (Shiu e Bleecker, 2001a).

Com o seqüenciamento do genoma de *Arabidopsis*, um grande número de seqüências codificando proteínas com topologia predita de receptores do tipo quinase foram obtidas, porém, com função ainda não demonstrada e, portanto, denominadas RLKs, Receptor-Like Kinases. Esses receptores existem na membrana como monômeros (Becraft, 1998). A ligação do receptor à molécula ligante induz oligomerização dos monômeros, o que as torna capazes de transfosforilação e subsequente ativação. Entretanto, diferentes RLK's de plantas são multímeros em sua forma inativa (Trotochaud et al. 1999); e existem proteínas RLKs que possuem domínios quinase inativos (Barre et al., 2002)

As plantas, assim como os animais, utilizam extensivamente receptores de superfície. Nos animais, os receptores são, em sua grande maioria, associados às proteínas G, enquanto nas plantas a maioria, encontrada até agora está associada a enzimas. Além disto, nos animais o maior grupo de receptores associado a enzimas é da família RTKs, que é rara em plantas. Estas contam com uma grande diversidade de STKRs que, à semelhança a RLKs

encontradas em animais, possuem um domínio quinase citoplasmático típico e um domínio extracitoplasmático de interação com ligantes.

2.2 Família RLK em plantas

Em *Arabidopsis*, existem mais de 21 classes diferentes de ectodomínios de proteínas RLKs. Com base na análise de filogenia molecular das seqüências do domínio quinase das RLKs são encontrado mais de 610 membros desta família, podendo estes serem classificados em 44 subfamílias (Shiu e Bleeker, 2001 a;b). Levando em consideração a organização das repetições ricas em leucina (leucine-rich repeats-LRR), que variam de 3 a 26 no domínio extracitoplasmático, as proteínas RLK contendo LRR são classificadas em 13 subfamílias (LRR-RLK I-XIII) (Dievart e Clark, 2003; Shiu e Bleeker, 2001). Cerca de 235 das RLK's de *Arabidopsis* são classificadas como LRR-RLKs.

RLK são receptores transmembrana que possuem uma organização estrutural conservada, caracterizada por uma porção amino-terminal extracitoplasmático seguida de uma região transmembrana, um sítio de ligação a nucleotídeo (NBS) e um domínio citoplasmático serina/treonina quinase relacionado com sinalização celular (Belkhadir et al., 2004). O domínio LRR dos receptores quinases tem sido relacionado à capacidade de interação com proteínas derivadas de patógenos, incitando resposta de defesa no hospedeiro (Innes, 2004), peptídeos (Trotochaud et. al., 2000) e esteróides (Wang et al., 2001).

A subfamília LRR-RLK também está envolvida na regulação de vários processos de desenvolvimento e percepção de fitormônios, incluindo as proteínas ERECTA e CLAVATA, que estão envolvidos na determinação da forma e tamanho do órgão floral (Clark et al., 1997), SERK1 envolvida na embiogênese

(Hecht et al., 2001), BRI1 e BAK1, atuantes na sinalização e percepção de brassinosteróides (Li & Chory, 1997).

2.3 Subfamília LRRII-RLK

A subfamília LRRII-RLK é constituída por 14 proteínas caracterizadas por possuir no domínio extracelular cinco repetições ricas em leucina arranjadas em um único bloco contínuo, das quais quatro são ditas completas possuindo 24 resíduos de aminoácidos, e a repetição 5 apresentando 16 resíduos de aminoácidos (Zhang et al., 2006). Estas repetições apresentam seqüência consenso LRR em que L e I presentes nas posições 1, 4, 6, 11, 15, 19 e 22 são muitas vezes substituídas uma pela outra ou por aminoácidos alifático (A, V, F ou M), enquanto os aminoácidos glicina na posição 13 e prolina na posição 16 da LRR são invariáveis. Ainda, em comum, as proteínas LRRII-RLK possuem o número de íntrons similares, com exceção da proteína AtNIK1 e do gene At5g10290 que perderam íntrons e do gene At5g63637, que além da perda do íntron 4 possui um íntron adicional na região N-terminal.

Os representantes da subfamília LRRII-RLK são filogeneticamente classificados em três grupos que também apresentam analogia funcional. O grupo I categoriza os genes de defesa, grupo II de desenvolvimento e grupo III de funções desconhecida (Zhang et al., 2006). A proteína AtNIK1 (At5g16000), de acordo com estas análises filogenéticas, está inserida no grupo I da subfamília LRRII-RLK, apresentando uma perda dos íntrons 9 e 10 que, em outros membros da mesma subfamília, localizam-se no domínio quinase da proteína.

3 Receptores NIK (NSP-Interacting Protein)

A proteína NIK1 é uma serina/treonina quinase pertencente à subfamília LRRII-RLK (receptores do tipo quinase contendo repetições ricas em leucina) e

exibe propriedades bioquímicas consistentes com a função de sinalização. NIK foi inicialmente identificada pela sua capacidade de interagir com a proteína NSP de geminivirus, através de uma região que compreende o sítio ativo e a alça de ativação de NIK. Além do fato de NSP inibir a atividade de quinase de NIK, inativação dos genes NIKs em *Arabidopsis* aumenta a suscetibilidade à infecção por CaLCuV, sugerindo que NIK está envolvida em respostas de defesa anti-viral mediada pelo receptor (Fontes et al., 2004).

Foram isolados, por meio do sistema duplo híbrido e utilizando a proteína NSP como isca, cinco cDNAs de tomateiros capazes de interagir com a proteína viral (Mariano et al., 2004). A análise de seqüências revelou que quatro cDNAs são idênticos e codificam um possível receptor transmembrana serina/treonina quinase, designado LeNIK (*Lycopersicum esculatum* NSP-Interacting Kinase). Também foi comprovado que os homólogos de NIK em soja (GmNIK) e *Arabidopsis thaliana* (AtNIK) interagem com NSP (Fontes et al., 2004).

Em *Arabidopsis*, NIK atua como receptor de sinalização. NSP interage com NIK1, NIK2 ou NIK3 através do domínio quinase (Fontes et al., 2004). Ensaio de interação *in vitro* mapearam o domínio da interação em um motivo de 80 aminoácidos que correspondem ao KD VIb (HrDvKssNxLLD) e alça de ativação (A) ou KD VII (DFG Ak/rx) plus KD VIII (GtxGyiaPEY) da proteína AtNIK1 (At5g16000). A alça-A exerce um papel fundamental no controle da atividade dessas quinases por meio da fosforilação de resíduos de treonina conservados nesse domínio (Ellis et al., 1986). A proteína NIK possui domínios característicos de proteínas receptoras de membranas, que muitas vezes estão envolvidas no desenvolvimento da planta ou na resistência a patógenos. Os três homólogos de *Arabidopsis thaliana* desses receptores quinases contêm 3-5 LRRs. Evidências sugerem que a interação NIK-NSP é biologicamente relevante. A funcionalidade das proteínas NIK como receptores envolvidos na sinalização celular foi comprovada por meio de experimentos de reversa genética

demonstrando que a perda da função de NIK aumenta a suscetibilidade de nocautes à infecção por geminivírus. A proteína NIK1 se oligomeriza provocando a transfosforilação de seu domínio citoplasmático de quinase que, ativado, é capaz de fosforilar substrato(s) endógeno(s) e ativar mecanismos de defesa do hospedeiro. Conseqüentemente, a ativação dessa via de sinalização pode culminar em interferência na replicação viral ou no movimento do vírus impedindo o estabelecimento da infecção sistêmica. A proteína viral NSP interage com o domínio quinase inibindo a fosforilação de resíduos de treoninas na alça de ativação essencial para a ativação da quinase e impedindo assim a cascata de sinalização celular que culminaria em resposta de defesa antiviral (Santos, 2007).

A análise do papel biológico e funcional dos genes homólogos de NIK que interagem com a proteína NSP no processo de infecção viral fornecerá conhecimentos básicos e moleculares para o entendimento das interações geminivírus-hospedeiro, que poderão culminar na elaboração de estratégias de resistência engenheirada. Neste contexto, a manipulação dos níveis de NIK no processo de infecção viral em tomateiros pode constituir uma alternativa eficaz para controle da doença. Assim sendo, os objetivos da presente investigação foram transformar tomateiros com o gene *NIK1* de *Arabidopsis* e analisar o efeito da superexpressão de NIK no desenvolvimento global das plantas transgênicas e na eficiência de infecção pelo begomovírus *Tomato yellow spot virus* (ToYSV).

MATERIAL E MÉTODOS

1 Construções de DNA

1.1 Construção do clone pk7AtNIK1-1

O clone pk7AtNIK1-1, contendo o cDNA de NIK1-1 (*Arabidopsis thaliana* *NSP-Interacting Kinase*), sob o controle do promotor 35S e no vetor binário de transformação de plantas pK7WG2, descrito por Fontes et al., 2004 (**Figura 2**). O referido clone foi utilizado nos experimentos de transformação de tomateiro. Os transformantes primários foram selecionados com base em sua resistência à kanamicina e os transformantes que enraizaram foram testados quanto à presença do gene *NIK1* via PCR. Na reação, foram utilizados oligonucleotídeos específicos para *NIK1* e o vetor pK7WG2.

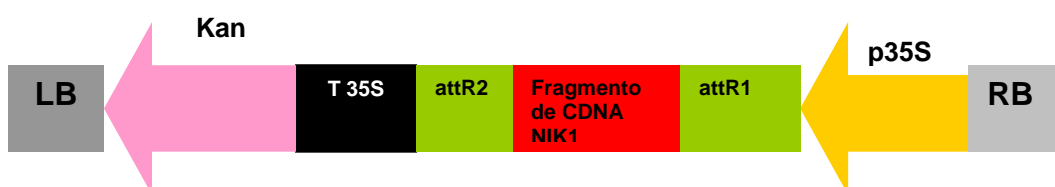


Figura 2 - Diagrama esquemático da construção pk7AtNIK1-1 contendo o cDNA de NIK1 de *Arabidopsis thaliana* sob controle do promotor 35S (p35S) e sinais de terminação de transcrição do transcrito 35S de CaMV (T35S). Kan denota o gene *nptII* que confere resistência a kanamicina, attR2 e attR1 são as regiões de recombinação homóloga.

1.2 Construção do clone pk7ILeNIK-(RNAi)

O clone pUFV410 foi previamente descrito (Mariano et al., 2004) e contém um fragmento de 909 pb da região C-terminal da proteína LeNIK (*Lycopersicon sculentum* NSP- Interacting Kinase), capturada em uma biblioteca de cDNA de tomate, através do sistema duplo híbrido, utilizando NSP como isca. Este clone, foi utilizado como molde para amplificação de uma região de 375 pb do cDNA LeNIK (**Figura 3**) com oligonucleotídeos especificamente desenhados (LeNIKRvs e 486LeNIK-Fwd) (Tabela 1) . Este fragmento de LeNIK foi clonado no vetor pK7GW1WG2 (**Figura 4**), que induz silenciamento gênico por possibilitar a inserção de duas cópias do fragmento em repetição invertida (**Figura 5**). Para a clonagem, foi utilizado o sistema GATEWAY (Invitrogen Life Technologies, Inc.), segundo instruções do fabricante.

>LeNIK

GAATTCGGCACGAGTTTTTCACGAACAATGTGATCCAAAGATAATTCAT
AGAGATGTTAAAGCAGCAAATATATTGCTCGATGACTTTTGTGAGGCGGTTG
TGGGAGATTTTGGGCTGGCAAAGCTTTTAGATCACCAGGATTCACATGTCAC
AACAGCTGTGCGTGGTACAGTAGGGCATATAGCCCCTGAATACTTATCAACA
GGCCAATCATCTGAGAAAACAGACGTGTTTGGATTTGGGATCCTTCTACTTG
AACTGATCACAGGGATGAGAGCTATAGAATTTGGAAAAGCAGCTAACCAAAA
GGGAGTAATGCTTGATTGGGTTAGGAAAATTCACCAAGAGAAGAACTTGAT
GTCCTTGTTGATAAAGATTTGAGAATCAATTATGATCGAATCGAGCTAGAGG
AAATGGTTCAAGTTGCTCTGCTTTGCACACAATATCTTCCAGGCCACAGACC
AAAAATGTCTGAAATCGTTCGT**ATGCTTGAAGGTGATGG**ACTTGCAGAGAG
ATGGGAAGCATCCCAAAAATTTGATGGTAGTAACAAGTACAAACTAAAGAG
CTATCCTCATCCGAGAGATTTTCAGATCTCACCGATGATTCTTTATTACTTGT
ACAAGCCATGGAGCTGTCTGGTCTAGGTGAGCAAGTTAAAATTACACATAA
TTATAACGTAAAATTTCACACTTAGAGAGGTAATTTATTAAGCTATGTGGTAA
TGTATAGTAATGAACCATCAAAGATTCGAAGAGCTTTGATGTGTTCTGTTATT
TTTTTGTTTCTTTATTGTATATGTTTCATCTTTTAATTTTTTTTCCTCGTACCTGTA
TTTGTAG**TTTAGACAATGTTGTAGTTTG**AAAAATCTGAAATGAACTTTTAAG
CATTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figura 3 - Seqüência do fragmento de 909 pb da região C-terminal da proteína LeNIK utilizada como molde para amplificação de uma região de 375 pb do cDNA LeNIK. Em azul, destacada a região de anelamento dos oligonucleotídeos LeNIKRs e 486LeNIK-Fwd.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados em ampliações específicas

Oligonucleotídeo	Seqüência	Região de anelamento
LRA _t NIK1RG (3774)	5'-AGAAAGCTGGGTCTCGAGTCATAAGAGATTTTCGATG-3'	Nucleotídeo 1096 de AtNIK1
KDA _t NIK1RG (3315)	5'-AGAAAGCTGGGTCTCATCTAGGACCAGAGAGCTC-3'	Região terminal de AtNIK1 contendo stop codon
KDA _t NIK1FG (3314)	5'-AAAAAGCAGGCTTCACAATGGGAGCTGCAAGAGGG-3'	Nucleotídeo 1242 de AtNIK1
496	5'- AAT ACT GCA GGG CTT YCT RTA CAT RGG -3'	Componente A de geminivírus
1978	5'- GCA TCT GCA GGC CCA CAT YGT CTT YCC NGT -3'	Componente A de geminivírus
MC36 (3408)	5'-TCCTTCGCGCAAGACCCTTCCTC-3'	Promotor 35S
LeNIK _{Rvs}	5'-GAAAGCTGGGTCCAAACTACAACATTGTCTAAA-3'	Região C-terminal de LeNIK
486LeNIK-Fwd	5'- AAAAAGCAGGCTTCACAATGCTTGAAGGTGATGG-3'	Região C-terminal de LeNIK

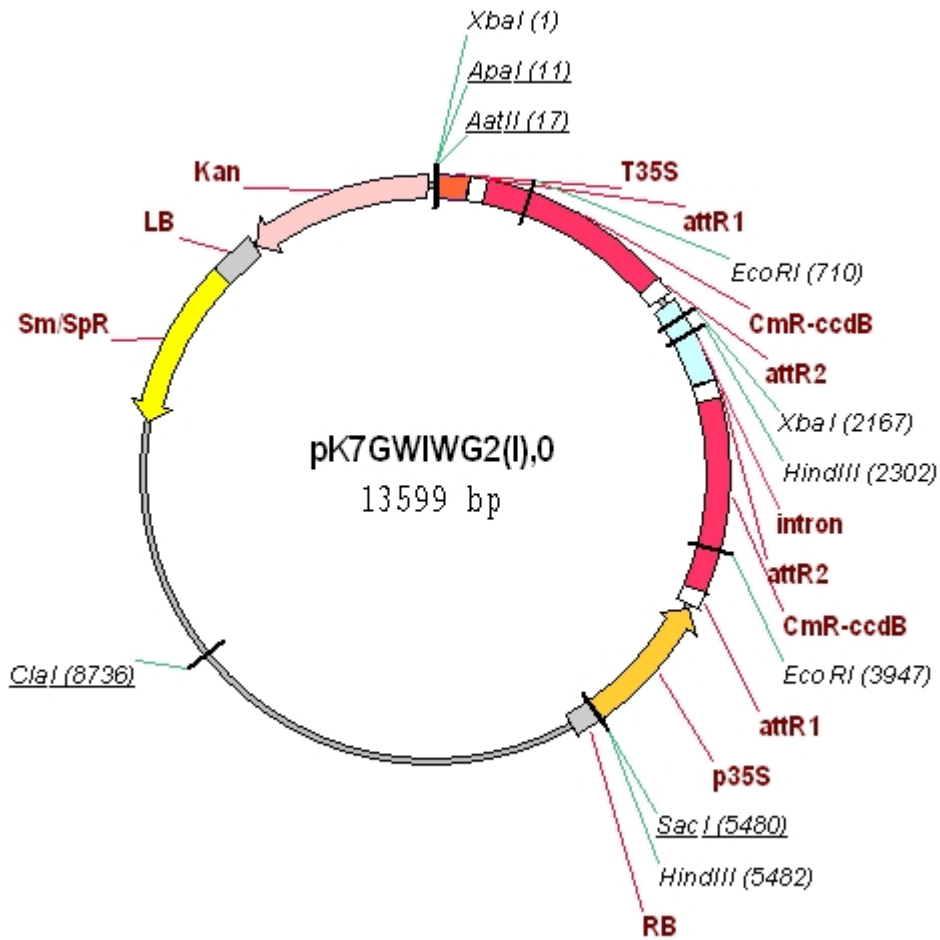


Figura 4 - Vetor pK7GW1WG2(I), utilizado por apresentar dois sítios attR1 e attR2 entre os quais foram inseridas duas cópias do fragmento de interesse em repetição invertida, sob controle do promotor 35S.

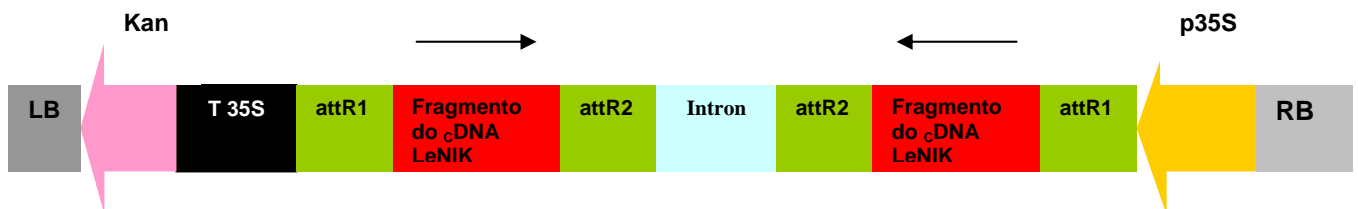


Figura 5 - Diagrama esquemático da construção contendo o cDNA de LeNIK, sob controle do promotor 35S. A inserção do fragmento de cDNA em repetição invertida é representada por setas em direções opostas.

Os plasmídeos recombinantes contendo o fragmento de LeNIK clonado em vetor que induz silenciamento gênico, foram utilizados na transformação de células competentes de *Escherichia coli* da estirpe DH5 α , pelo método de choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989). Os transformantes foram confirmados por PCR (Sambrook *et al.*, 1989). Para tal, foram utilizados dois conjuntos de primers: os oligonucleotídeos LeNIKRvs e 486LeNIK-Fwd, utilizados para a clonagem (Conjunto A) e os oligonucleotídeos LeNIKRvs e MC36 (Conjunto B) (**Tabela 1**). A confirmação da inserção em repetição invertida das duas cópias do gene de interesse foi realizada por meio de hidrólise enzimática com a enzima de restrição *Bgl*I, utilizada por apresentar um sítio de restrição em LeNIK na posição 591 e não apresentar sítio de restrição no vetor pK7GW1WG2. Desta forma, foi obtido o clone pk71LeNIK-(RNAi) (pUFV719), que foi posteriormente estocado em glicerol e armazenamento a -80°C e também utilizado nos experimentos de transformação de tomateiro, visando avaliar efeitos do silenciamento da proteína NIK 1.

2 Material Vegetal

Em todos os experimentos que envolveram material vegetal foram utilizadas plantas de *Solanum lycopersicum* cultivar Moneymaker. As sementes foram desinfestadas através do tratamento com álcool 70% por 1 min, hipoclorito de sódio 10% por 20 min, hipoclorito de sódio 1% por aproximadamente 12h, seguidos de 3 lavagens em água estéril. Em seguida foram mantidas a 22°C em frascos contendo meio MS ½ força (adaptado de Murashige e Skoog, 1962) por uma semana. Após este período de germinação, foi realizada a excisão dos explantes foliares a partir das folhas cotiledonares.

3 Procedimentos para transformação de tomateiros.

3.1 Transformação de agrobactéria LBA4404 com os clones pk7AtNIK1-1 e pk7ILeNIK-(RNAi-LBA4404)

A estirpe de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 foi transformada por meio do método de eletroporação (2500 mV, 3-4ms), com o clone pk7AtNIK1-1 (gene *NIK1* clonado no vetor pK7WG2). Colônias crescidas em placas contendo 100 mg.L⁻¹ de estreptomicina e 100 mg.L⁻¹ de espectomicina foram inoculadas em meio líquido, para posterior extração de DNA plasmidial utilizando o “Plasmid Midi Kit” (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. A confirmação das colônias positivas foi feita via PCR, testando-se a incorporação do gene. Para tanto, foram utilizados dois conjuntos de primers: os oligonucleotídeos MC36 e 3315 (Conjunto A) e os oligonucleotídeos MC36 e 3774 (Conjunto B). Os resultados obtidos foram avaliados em gel de agarose 1% (p/v) e corado com brometo de etídeo 0,1 µg.mL⁻¹. Colônias positivas foram novamente inoculadas em meio líquido, para posterior estoque em glicerol e armazenamento a -80°C. Este clone (pk7AtNIK1-1-LBA4404) denominado pUFV701, foi posteriormente utilizado para transformação de tomateiro.

À semelhança, foi obtido, o clone pk7ILeNIK-(RNAi-LBA4404), sendo também utilizado para transformação de tomateiro em cultura de tecidos.

3.2 Transformação de tomateiros

O clone pk7AtNIK1-1-LBA4404 foi utilizado para a transformação de plantas de *Solanum lycopersicum*, cultivar Moneymaker. A transformação foi realizada conforme protocolo desenvolvido por Frary (1995) com modificações. A colônia de *Agrobacterium tumefaciens* contendo o clone pk7AtNIK1-1-LBA4404 (utilizado para superexpressão do transgene NIK) foi inoculada em 50 mL de meio Rhizo com 100 mg.L⁻¹ de estreptomicina e 100 mg.L⁻¹ de

espectiomicina, a 28°C e permaneceu sob agitação a 220 rpm por 12 horas. A cultura foi centrifugada a 6500 rpm (no rotor F0650, da Beckman) por 10 minutos, a 14°C. O “pellet” foi ressuspendido em meio líquido MS 0,2% (Murashige & Skoog, 1962). A concentração foi ajustada para $DO_{600} = 0.4$. Explantes foliares de tomateiro foram co-cultivados com as células bacterianas durante 15 minutos, sob agitação. Após secagem em papel de filtro, os explantes foram mantidos em placas de Petri contendo meio MS sólido, sem antibiótico, por 2 dias, com a face adaxial em contato com o meio. Em seguida, foram transferidos para meio MS sólido contendo 50 mg.L⁻¹ de kanamicina e 300 mg.L⁻¹ de timentim, com a face adaxial voltada para cima. As placas foram mantidas em câmara de crescimento, com temperatura e luminosidade controladas. Os explantes foram transferidos para um meio novo a cada 2 semanas. A concentração de kanamicina e de timentim nas placas permaneceu constante. Cada regenerante em uma placa representou um transformante independente. Os regenerantes transformados, bem como os regenerantes não transformados (controle) foram transferidos para frascos contendo meio nutritivo sólido, segundo o protocolo de transformação, para regenerar uma nova planta, sendo mantidos *in vitro* e repicados freqüentemente.

3.3 Diagnóstico molecular dos transformantes

Após a regeneração das plantas, foram coletadas amostras foliares de cada transformante e de plantas não transformadas, utilizadas como controle, para obtenção de DNA genômico (Dellaporta et al., 1983). O DNA foi usado como molde na reação de PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos para *AtNIK1* (oligonucleotídeos 3314 e 3315), como também para *AtNIK1* e o vetor pK7WG2 (oligonucleotídeos MC36 e 3315).

3.4 Expressão do transgene

RNA total foi extraído a partir de folhas de plantas transformadas pelo método Trizol (Invitrogen Life Technologies, Inc.). A qualidade e a integridade do RNA foram monitoradas, respectivamente, por espectrofotômetro e por eletroforese em gel de agarose. Cerca de 3 µg de RNA foram tratados com DNase (Promega, Madison, WI) e utilizados para obtenção do cDNA, usando a enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen) e oligo-dT(18), de acordo com recomendações do fabricante. Uma vez obtido o cDNA, foi realizada reação de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para *AtNIK1* (3314 e 3315).

Foi realizada também reação de PCR utilizando os cDNA obtidos da planta controle não transformada e das plantas superexpressando *NIK1* com objetivo de avaliar a expressão de *NIK* endógeno de tomate com oligonucleotídeos específicos para LeNIK (LeNIK_{Rvs} e 486LeNIK-Fwd). Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1% (p/v) e corado com brometo de etídeo 0,1 µg.mL⁻¹. As plantas nas quais a expressão do transgene foi confirmada foram repicadas para os ensaios de infectividade.

3.5 Aclimação dos transformantes primários

Após o processo de enraizamento das plantas repicadas (plantas controle, WT, e plantas transgênicas superexpressando *NIK1*), estas foram retiradas dos frascos e as raízes foram lavadas com água deionizada. Em seguida, foram acondicionadas em copos plásticos contendo substrato orgânico (PlantmaxI) umedecido e mantidas sob condições de ambiente. Pequenos cortes foram feitos nos sacos plásticos, durante uma semana, período em que as plantas foram conduzidas em casa de vegetação, onde permaneceram por dois dias, para realização dos ensaios de infectividade.

4 Análise de desenvolvimento dos transformantes primários em cultura de tecidos e em casa-de-vegetação

Plantas controle não transformadas e plantas transgênicas superexpressando *NIK1* foram mantidas em câmara de crescimento com temperatura e luminosidade controladas por um período de dez dias, durante as fases iniciais de desenvolvimento. As plantas foram observadas quanto às características físicas (desenvolvimento do caule e altura) após 10 dias de crescimento. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 5 plantas avaliadas e realizadas três repetições. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, adotando-se o nível de 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando procedimentos do programa SAS - Statistical Analysis System, versão 9.1, licenciado para a UFV/2006.

A incorporação e expressão do transgene foram confirmadas em plantas transgênicas 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 reação de PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene *AtNIK1* e o vetor pK7WG2 (oligonucleotídeos MC36 e 3315). Simultaneamente, foi realizada extração do RNA pelo método Trizol (Invitrogen Life Technologies, Inc.). Produzido o cDNA, procedeu-se à reação de PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos para *AtNIK1* (3314 e 3315).

Plantas controle não transformadas e plantas transgênicas superexpressando *AtNIK1* foram mantidas em casa-de-vegetação, à temperatura ambiente, também por um período de dez dias. As plantas foram observadas quanto às características físicas (desenvolvimento do caule e altura).

5 Ensaios de infectividade por biobalística

Foi realizado experimento de infecção viral via biobalística (Schaffer et al. 1995), utilizando clones infecciosos correspondentes a repetições em série do DNA-A e DNA-B do isolado ToYSV-[MG-Bi2] (Calegario et al., 2006), mantidos a -80°C, na forma de estoque em glicerol.

5.1 Extração do DNA viral

Os clones infecciosos foram extraídos a partir de *E. coli*, utilizando-se o “Plasmid Midi Kit” (QIAGEN), segundo as recomendações do fabricante. A qualidade e a integridade do DNA foram analisadas em gel de agarose 1% (p/v) e a concentração foi avaliada por espectrofotometria a A_{260} .

5.2 Bombardeamento

Aproximadamente 10 µg de cada componente de DNA foram precipitados em micropartículas de tungstênio, na presença de CaCl_2 1 M e espermidina 15 mM, e lavados com etanol absoluto. As membranas preparadas foram devidamente encaixadas no acelerador de partículas e lançadas contra os meristemas foliares sob vácuo e com uma aceleração de 160 psi, de acordo com Schaffer et al. (1995). Como controle, as plantas não transformadas e transgênicas foram inoculadas apenas com micropartículas de tungstênio, sem DNA viral.

Logo após o bombardeamento, as plantas foram transferidas para câmara de crescimento a 22° C, com 16 horas de fotoperíodo e observadas quanto ao aparecimento de sintomas até 30 dias após a inoculação. Para os experimentos de análise de infecção, foram utilizadas plantas no estágio de desenvolvimento correspondente a sete folhas. Foram utilizadas 15 plantas de cada linhagem.

Durante a análise dos sintomas, as plantas inoculadas foram observadas

em intervalos de dois dias e fotodocumentadas. Foram levados em consideração sintomas como manchas amarelas, clorose, enrolamento e enrugamento foliar.

5.3 Diagnóstico molecular da infecção viral

Para confirmar a presença do vírus em plantas sintomáticas, o DNA total dos tomateiros foi extraído (Dellaporta et al., 1983) de cada planta inoculada com vírus, a cada sete dias após a inoculação, até 40 dias após a inoculação. O DNA extraído foi usado como molde em reações de PCR utilizando oligonucleotídeos universais, que amplificam um fragmento específico do componente A de begomovírus (Rojas et al., 1993). Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1% (p/v), corado com brometo de etídeo $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

A percentagem de plantas infectadas foi avaliada a cada dois dias quanto à sintomatologia e a cada sete dias quanto ao acúmulo de DNA viral.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 Obtenção do clone pk71LeNIK-(RNAi)

Os plasmídeos recombinantes contendo o fragmento de LeNIK clonado em vetor que induz silenciamento gênico, foram utilizados na transformação de células competentes de *Escherichia coli*. Foram obtidos um total de 21 transformantes que foram confirmados por PCR sendo utilizados dois conjuntos de primers: os oligonucleotídeos LeNIKRvs e 486LeNIK-Fwd, utilizados para a clonagem (Conjunto A) e os oligonucleotídeos LeNIKRvs e MC36 (Conjunto B) (**Tabela 1**), gerando um produto de aproximadamente 512 pb (**Figura 6**). Foi realizada também análise enzimática para a confirmação da inserção em repetição invertida das duas cópias do gene de interesse, sendo utilizada a enzima de restrição *BglI*, liberando um fragmento de aproximadamente 12,0 kb e outro de aproximadamente 1,5 kb (**Figura 7**).

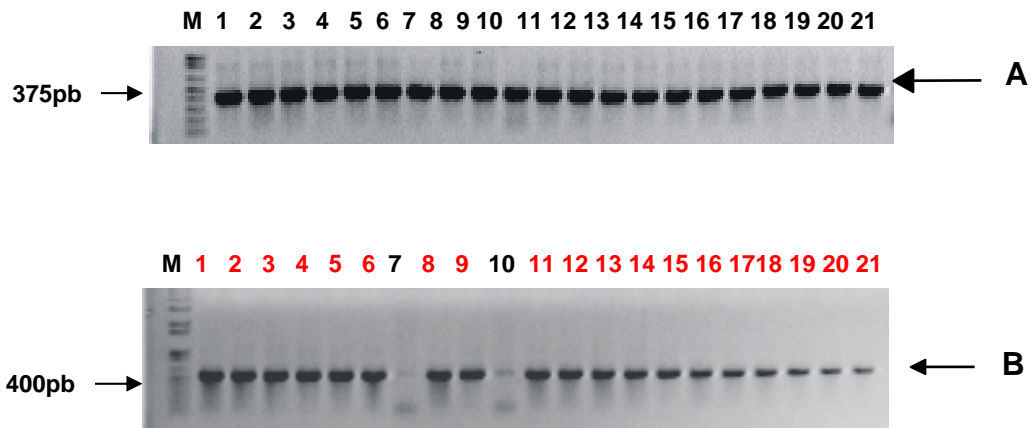


Figura 6 - Diagnóstico dos plasmídeos recombinantes de *E. coli* transformada por PCR. M-Marcador de peso molecular em pb, 1-21-transformantes obtidos. (A) pk7ILeNIK-(RNAi) amplificado com oligonucleotídeos específicos para a proteína (LeNIKRvs e 486LeNIK-Fwd), produzindo um fragmento de aproximadamente 375pb. (B) pk7ILeNIK-(RNAi) amplificado com oligonucleotídeos específicos para o vetor pK7GW1WG2 e para a proteína (MC36 e LeNIKRvs respectivamente) produzindo um fragmento de aproximadamente 512pb. Em vermelho, destacadas, as colônias positivas.

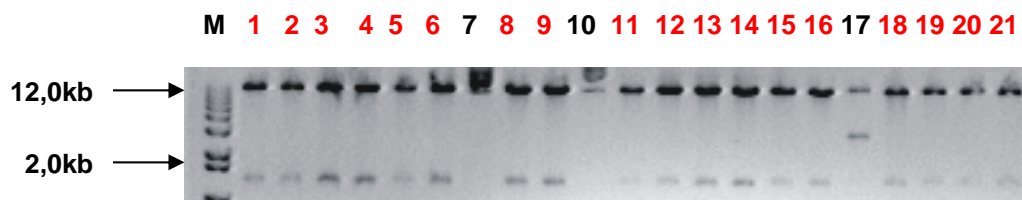


Figura 7 - Análise dos padrões de digestão enzimática dos plasmídeos positivos pk7ILeNIK-(RNAi), com a enzima de restrição *BglI* liberando um fragmento de aproximadamente 12,0 kb e outro de aproximadamente 1,5 kb. M-Marcador de peso molecular em kb, 1-21-transformantes obtidos. Em vermelho, são destacadas as colônias positivas (1-6, 8-9, 11-16, e 18-21).

2 Transformação de agrobactéria LBA4404

2.1 Obtenção do clone pk7AtNIK1-1- LBA4404

A estirpe de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 foi transformada com o clone pk7AtNIK1-1 (gene *NIK1* clonado no vetor pK7WG2). A confirmação das colônias positivas foi feita via PCR, sendo utilizados dois conjuntos de primers: os oligonucleotídeos MC36 e 3315 (Conjunto A) gerando um produto de cerca de 2,1 kb e os oligonucleotídeos MC36 e 3774 (Conjunto B) gerando um produto de cerca de 1,2 kb. Os resultados obtidos foram avaliados em gel de agarose 1% (p/v) e corado com brometo de etídeo 0,1 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ (**Figura 8**).

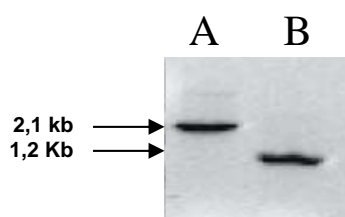


Figura 8-Reação de PCR diagnóstico de agrobactéria transformada. (A) pk7AtNIK1-1-LBA4404 amplificado com oligonucleotídeos específicos para o vetor e para a proteína, MC36 e 3315, respectivamente. (B) pk7AtNIK1-1-LBA4404 amplificado com oligonucleotídeos específicos para o vetor e para a proteína, MC36 e 3774, respectivamente.

2.2 Obtenção do clone pk7ILeNIK-(RNAi- LBA4404)

À semelhança, foi obtido, o clone pk7ILeNIK-(RNAi-LBA4404), sendo também utilizado para transformação de tomateiro em cultura de tecidos. Como os resultados não foram bem sucedidos (não obtenção de tomateiros transformados), optamos por não apresentá-los.

3 Obtenção e análise das plantas transgênicas:

Plantas de tomateiro foram transformadas com sucesso, via *Agrobacterium tumefaciens* (estirpe LBA4404), com o clone pk7AtNIK1-1. Os transformantes foram confirmados por PCR com oligonucleotídeos específicos para *NIK1* e o vetor pK7WG2, amplificando um fragmento de aproximadamente 2,1 kb (**Figura 9**). Foram obtidos seis transformantes, dos quais dois (NIK1-4 e NIK1-6) foram selecionados para as análises posteriores.

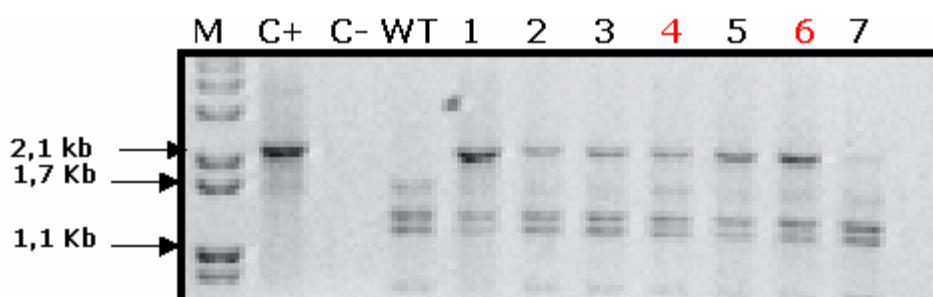


Figura 9 - Diagnóstico de tomateiros transformados com o gene quimérico AtNIK1(*Arabidopsis thaliana* NSP-Interacting Kinase). DNA total de plantas transformadas foi amplificado com primers específicos para o vetor pK7WG2 e para a sequência de AtNIK1(MC36 e 3315) amplificando um fragmento de aproximadamente 2,1 kb. **M** (marcador de peso molecular em kb). **C+** (controle positivo da reação), **C-** (controle negativo da reação), **WT** (planta não-transformada), **1-7** (regenerantes, designados NIK1-1-7, testados para a incorporação do gene). **Em vermelho**, destacados os regenerantes transformantes (designados NIK1-4 e NIK1-6), utilizados nos experimentos posteriores.

A expressão do transgene foi confirmada por RT-PCR semi-quantitativo (**Figura 10**). Os resultados indicaram nível similar de expressão entre os regenerantes transformantes (NIK1-4 e NIK1-6) e bastante superior destes quando analisados comparativamente às plantas não transformadas (WT), confirmando assim, a superexpressão do gene *NIK1* nos regenerantes transformantes.

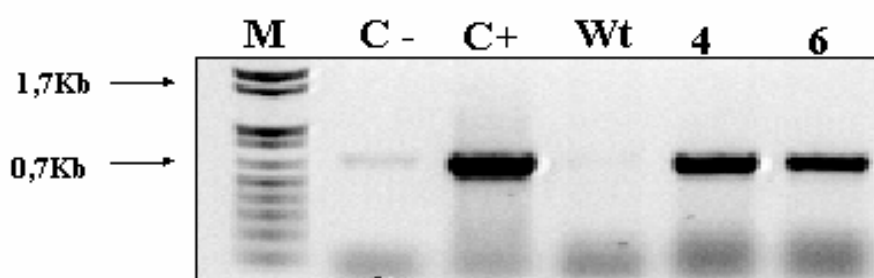


Figura 10 – Ativação da expressão do gene *AtNIK1* em plantas de tomate. O acúmulo de transcrito foi analisado por RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para a proteína *NIK1* (oligonucleotídeos 3314 e 3315), amplificando um fragmento de aproximadamente 700 pb. **M** (marcador de peso molecular em kb), **C+** (controle positivo da reação), **C-** (controle negativo da reação), **WT** (planta não-transformada), **4 e 6** (regenerantes NIK1-4 e NIK1-6), testados para a expressão da proteína.

A expressão de NIK endógeno de tomate (LeNIK) foi também avaliada por meio de RT-PCR, com oligonucleotídeos específicos para LeNIK (**Figura 11**). Os resultados demonstraram que o acúmulo de *AtNIK* nas linhagens transformadas NIK1-4 e NIK1-6 não interferiu na expressão de LeNIK endógeno que se manteve no nível similar àquele observado na planta não-transformada (WT).

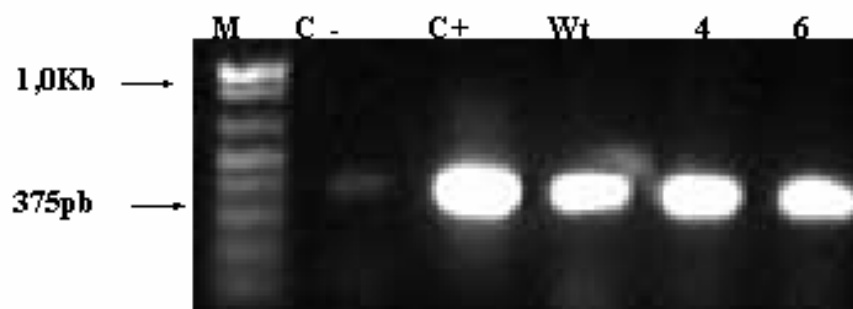


Figura 11 - Expressão de NIK endógeno de tomate em linhagens transgênicas avaliada por RT-PCR. **M** (marcador de peso molecular, em kb), **C+** (controle positivo da reação), **C-** (controle negativo da reação), **WT** (planta não-transformada), **4 e 6** regenerantes NIK1-4 e NIK1-6, respectivamente.

As plantas confirmadas foram repicadas para os ensaios de desenvolvimento e de infectividade dos transformantes primários.

4 Superexpressão da proteína *NIK* retarda o crescimento das plantas

Foram observadas diferenças fenotípicas evidentes entre as plantas transgênicas superexpressando *NIK* e as plantas não-transformadas, durante as fases iniciais de desenvolvimento, quando mantidas em câmara de crescimento por um período de dez dias. Analisando a diferença de altura atingida pelas plantas durante o período, verifica-se um atraso no desenvolvimento das plantas transgênicas que apresentaram menor estatura e taxa de crescimento inferior com um acréscimo de altura, ao longo de 10 dias de desenvolvimento, significativamente menor do que aquele das plantas não transformadas. Após dez dias de desenvolvimento *in vitro*, os transformantes alcançaram cerca de metade de acréscimo em altura em relação às plantas não-transformadas, apesar da semelhante altura inicial das plantas (**Figura 12**).

As plantas foram observadas também quanto às características físicas durante o período de análise tanto em câmara de crescimento (**Figura 13A**), quanto em casa-de-vegetação (**Figura 13B e 13C**). Foram observadas notáveis diferenças no desenvolvimento, tanto em relação à altura da parte aérea quanto ao sistema radicular e desenvolvimento foliar. As plantas transgênicas NIK1-4 e NIK1-6 demonstraram menor comprimento caulinar, menor desenvolvimento de sistema radicular e aéreo, possuindo assim, menor estatura. Além disso, perceberam-se diferenças anatômicas e morfológicas entre os ramos (**Figura 13C**). As folhas das plantas transgênicas apresentaram-se enrugadas/encarquilhadas, diferentemente da anatomia regular apresentada pelas plantas não-transformadas. Estas características reforçam a hipótese de que as plantas transgênicas superexpressando NIK possuem certo nível de inibição da via de síntese de brassinosteróides, por apresentarem fenótipo semelhante aos mutantes Br-insensíveis em tomate (Koka et al., 2000). Outros mutantes em tomateiros, também apresentam características fenotípicas semelhantes, como os Curl 3 (mutante insensível aos BRs, não se desenvolvendo bem em meio com ou sem brassinólido) e o Abs 1 (mutante que possui alterada a sensibilidade ao brassinólido, possuindo um fenótipo menos drástico que o mutante Curl 3). Tal fenótipo deve-se a provável inibição em algum ponto da via de biossíntese ou sinalização de brassinosteróides (Nomura and Montoya, 2002).

O retardamento no desenvolvimento observado nas plantas transgênicas pode se dever à influência da superexpressão de NIK na síntese de determinados hormônios ou ativadores do crescimento ou em vias de sinalização envolvidos em crescimento e desenvolvimento, como no caso da via de brassinosteróides (Yokota and Fujioka, 2003). Entretanto, os efeitos da superexpressão de NIK na expressão dos componentes dessa via não foram

avaliados e, portanto, a possível comunicação entre estas duas vias de sinalização permanece para ser determinada.

Recentemente, foi demonstrado que ativação do receptor AtNIK1 leva à fosforilação da proteína ribossomal L10, resultando na sua translocação do citoplasma para o núcleo (Rocha, 2007). O gene *rpL10* (At1g14320) é altamente homólogo ao gene *QM* inicialmente identificado como um candidato a supressor de tumor de Wilms (Dowdy et al., 1991) e tem sido demonstrado que regula o protooncogene *c-Yes* (Oh et al., 2002). O homólogo de *QM* de galinha, designado Jif-1 (Jun interactor factor-1), foi identificado pela sua capacidade de interagir com o transativador Jun e inibir a formação do homodímero Jun-Jun, prevenindo interação com o DNA (Montecarlo and Vogt, 1993). Como uma proteína ribossomal, *QM*/Jif-1 é localizada no citoplasma, mas, assim como *rpL10* de *Arabidopsis*, transloca para o núcleo para influenciar transcrição de genes mediada por cJun, além de afetar apoptose (Imafuku et al., 1999). Os genes de leveduras homólogos de *QM*, como *GRC5* e *QSR1*, participam no controle traducional da expressão gênica (Karl et al., 1999), e um homólogo de *QM* de *Entamoeba histolytica* exibe funções extraribossomais associadas com supressão da proliferação celular (Chavez-Rios et al., 2003). Estas funções hipotéticas de *rpL10* (controle traducional e supressão da proliferação celular) podem justificar o efeito de ativação da via mediada por NIK tanto em desenvolvimento, observada neste trabalho, quanto em estratégias de defesa contra vírus (Fontes et al., 2004). A identificação de genes alvos de *rpL10* será crucial para decifrar o mecanismo pelo qual esta via de sinalização antiviral interfere como eventos de desenvolvimento e proliferação celular.

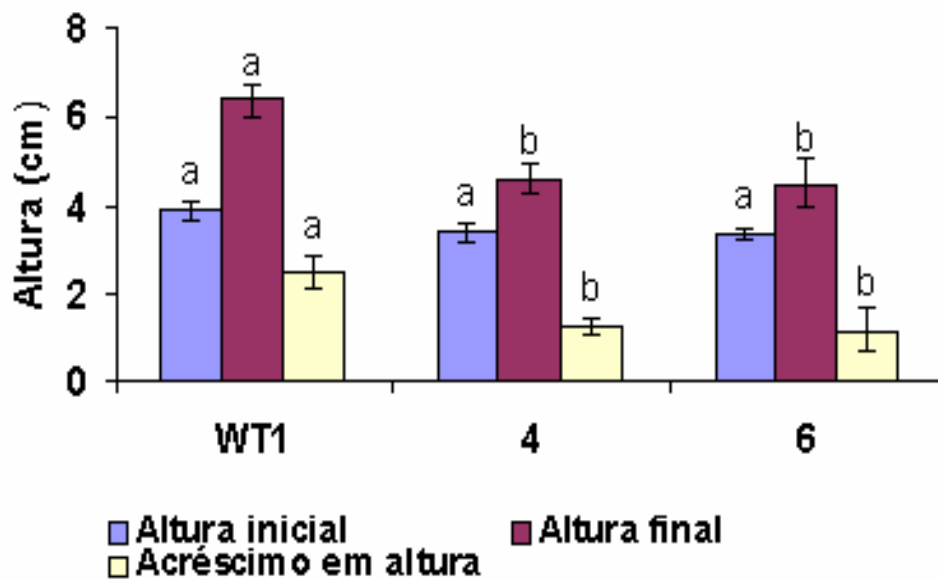


Figura 12 – Diferenças de desenvolvimento entre as plantas transgênicas superexpressando *NIK* (plantas 35S-AtNIK1-4 e 35S-AtNIK1-6) e as plantas não-transformadas (WT). Avaliação tendo como parâmetro a altura do caule das mesmas, após 10 dias de crescimento, *in vitro*. Os valores correspondem às médias das alturas, com os respectivos desvios padrão. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, a 5 % de probabilidade pelo teste de Duncan.

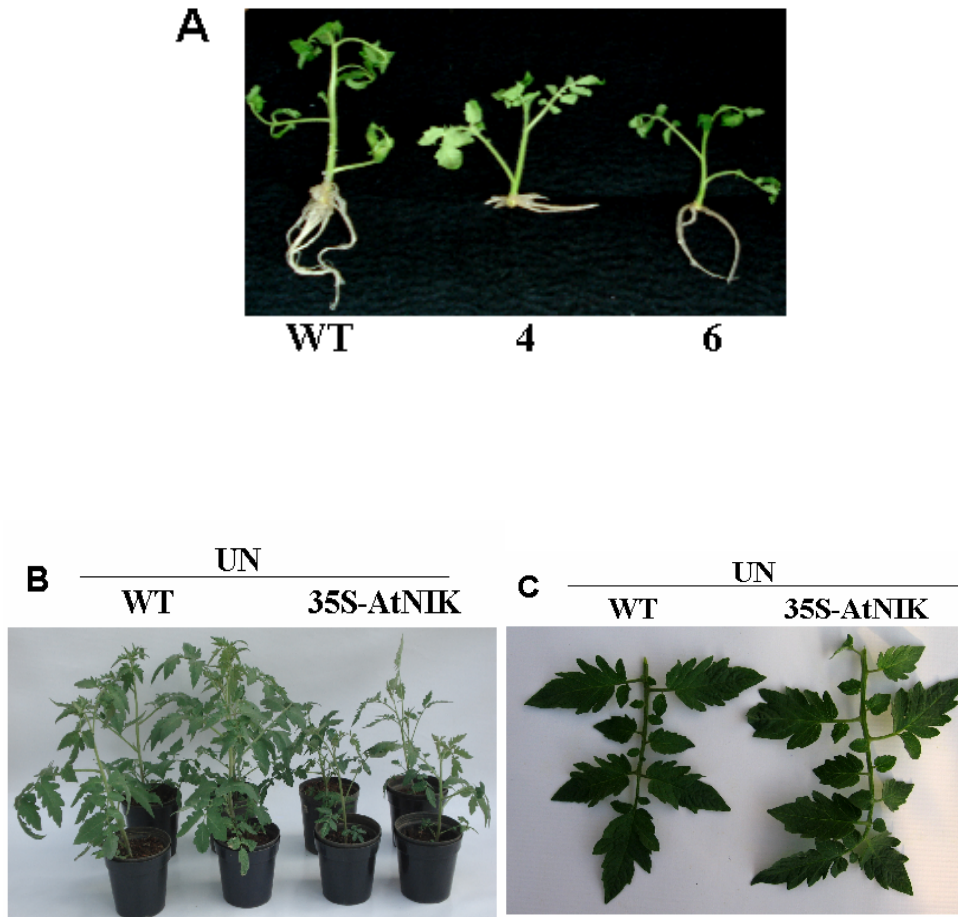


Figura 13-Diferenças de desenvolvimento entre as plantas transgênicas superexpressando *NIK* (plantas 35S-AtNIK1-4 e 35S-AtNIK1-6) e as plantas não-transformadas (WT). **A)** Avaliação em Laboratório de Cultura de Tecidos. **B)** Avaliação em casa-de-vegetação. Retardo no crescimento das plantas transgênicas que não conseguiram se desenvolver normalmente, obtendo menor comprimento caulinar, menor desenvolvimento de sistema radicular e aéreo em relação às plantas não-transformadas. **C)** Avaliação em casa-de-vegetação. Em detalhe, as diferenças anatômicas entre os ramos. As folhas das plantas transgênicas apresentaram-se enrugadas/encarquilhadas, contrastando com a anatomia regular apresentada pelas plantas não-transformadas. **UN** refere-se às plantas inoculadas somente com tungstênio.

5 Superexpressão de *AtNIK* não altera a taxa de infecção por ToYSV-[MG-Bi2], mas interfere no desenvolvimento de sintomas

Visando avaliar a suscetibilidade das linhagens transformadas 35S-*AtNIK*-4 e 35S-*AtNIK*-6 à infecção por geminívirus, as plantas não transformadas e plantas transgênicas foram inoculadas por biobalística com 1 e ½ cópia do DNA-A e DNA-B do isolado ToYSV-[MG-Bi2] (Calegario et al., 2006). Por meio da análise dos sintomas das plantas e do acúmulo do DNA viral, foi avaliada a porcentagem de plantas infectadas ao longo do tempo (**Figura 14**). Plantas inoculadas somente com tungstênio foram usadas como controle negativo. Tanto plantas não transformadas (WT) quanto plantas transgênicas NIK1-4 desenvolveram os sintomas típicos de infecção por ToYSV-[MG-Bi2], porém com intensidade distinta. Foram observadas manchas amarelas características da infecção, clorose e enrugamento de folhas. Plantas transgênicas NIK1-4 apresentaram menor severidade de sintomas (**Figura 15**). O acúmulo do DNA viral foi detectado em plantas sintomáticas por PCR (**Figura 16**). Os resultados obtidos são consistentes com observações anteriores realizadas em *Arabidopsis thaliana* em que a inativação do gene NIK aumentou a suscetibilidade dos mutantes diante da infecção viral (Fontes et al., 2004). Entretanto, a taxa de infecção monitorada pelo acúmulo de DNA viral e o tempo de desenvolvimento de sintomas foi similar nas plantas não transformadas e transgênicas.

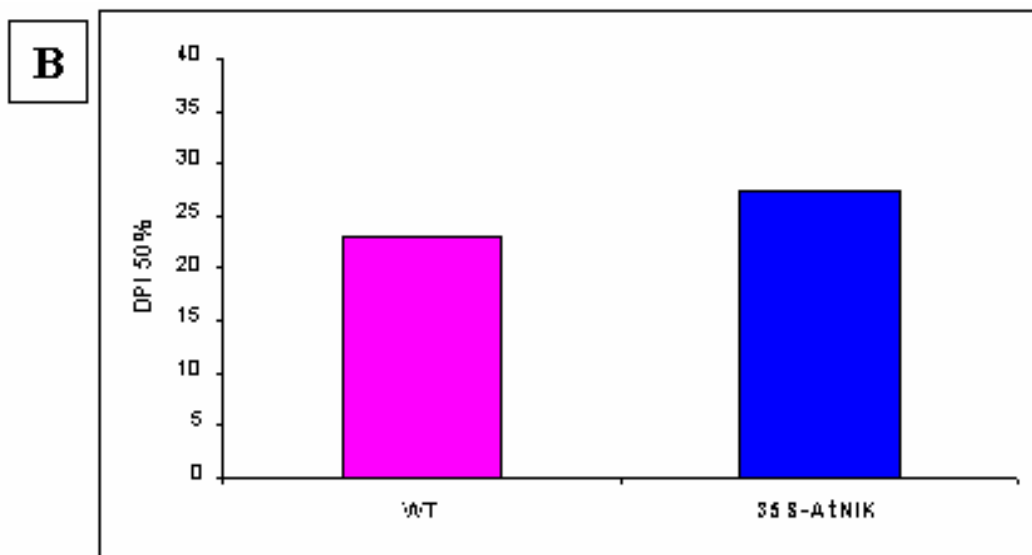
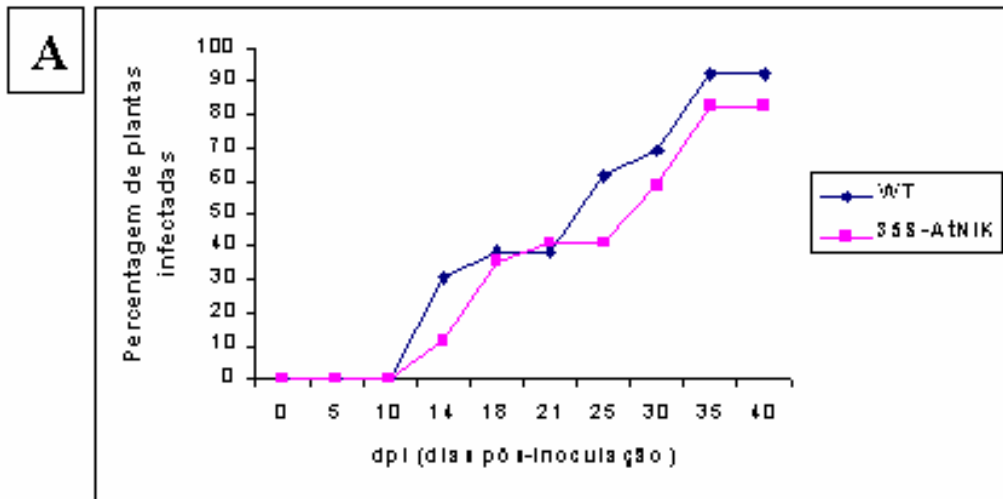


Figura 14- A superexpressão de AtNIK não altera a taxa de infecção viral. O processo de infecção é relativamente similar em plantas selvagens WT e plantas transgênicas NIK1-4. **A)** Percentagem de plantas sistematicamente infectadas em diferentes dias pós-inoculação (DPI). **B)** Taxa de infecção em plantas selvagens WT e plantas transgênicas NIK1-4. A taxa de infecção foi expressa como número de DPI requerido para que 50% das plantas estivessem infectadas (DPI 50).

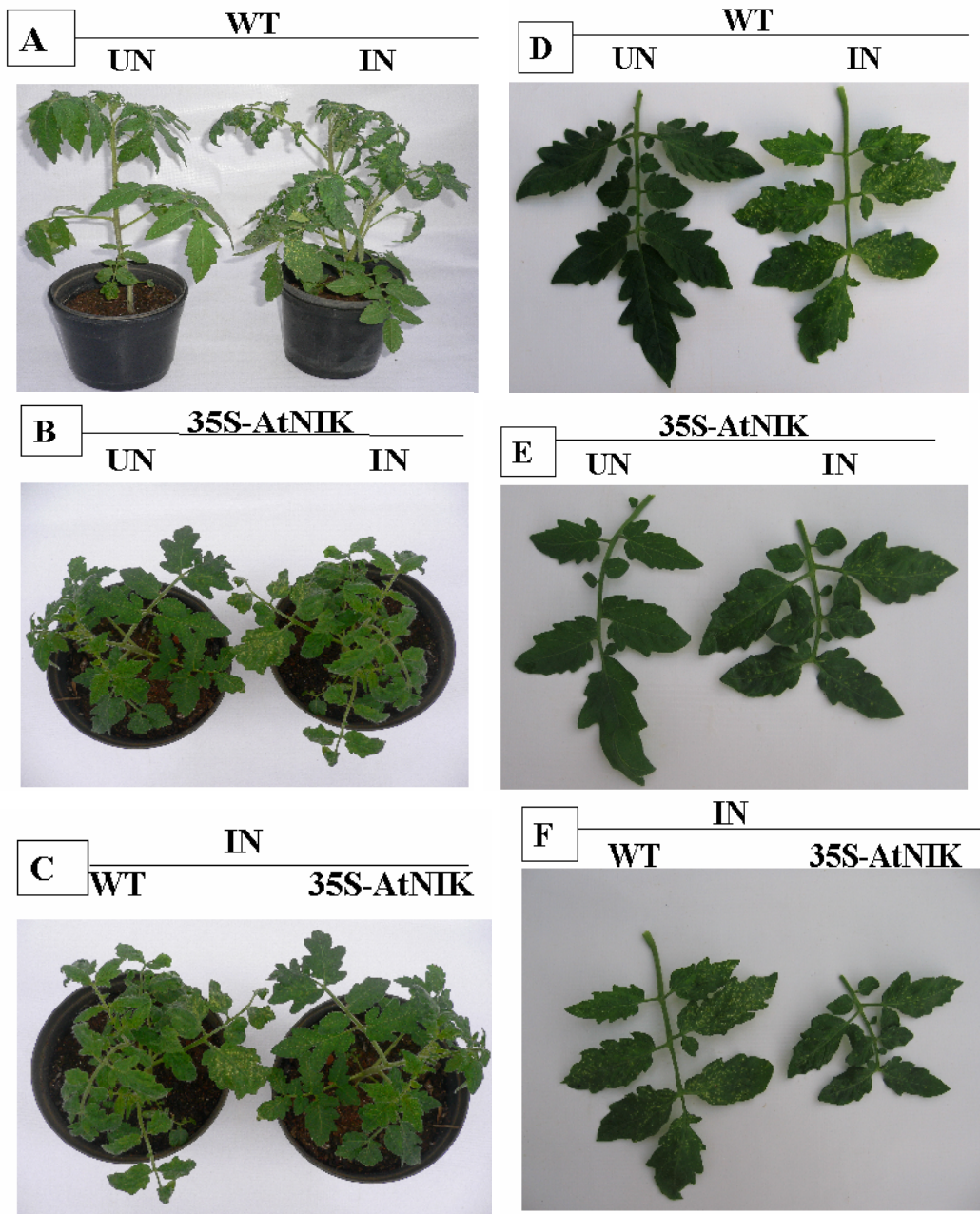


Figura 15 – Plantas transformadas NIK1-4 exibem um aumento na tolerância à infecção por geminivírus. **A) e D)** (Ramos, em detalhe) Sintomas associados com a infecção por ToYSV-[MG-Bi2] em plantas selvagens. **B) e E)** (Ramos, em detalhe) Sintomas associados com a infecção por ToYSV-[MG-Bi2] em plantas transformadas 35S-AtNIK. **C) e F)** (Ramos, em detalhe) Sintomas associados com a infecção por ToYSV-[MG-Bi2] em plantas transformadas 35S-AtNIK (à direita) e plantas selvagens (à esquerda). O DNA-A e DNA-B virais foram introduzidos nas plantas por inoculação via biobalística. **IN** refere-se às plantas inoculadas com DNA viral e **UN** refere-se às plantas inoculadas somente com tungstênio.

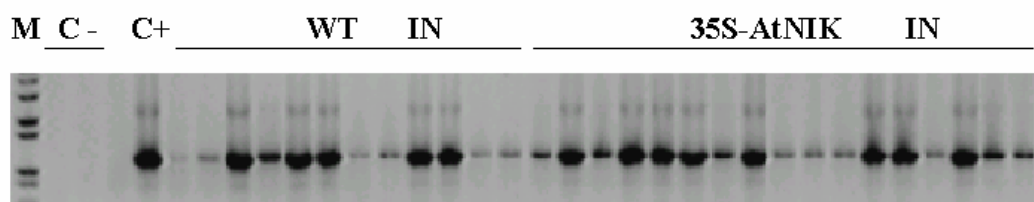


Figura 16-PCR confirmando o acúmulo de DNA viral nas plantas bombardeadas com o vírus ToYSV-[MG-Bi2]. **M** (marcador de peso molecular, em kb), **C+** (DNA inoculado, usado como controle positivo da reação), **C-** (plantas inoculadas somente com tungstênio, utilizadas como controle negativo da reação), **WT** (plantas não-transformadas), **35S-AtNIK** (plantas transformadas). **IN** refere-se às plantas inoculadas com DNA viral.

CONCLUSÕES

Os resultados dessa investigação forneceram evidências de que o receptor transmembrana NIK atua em vias de crescimento e desenvolvimento de plantas, provavelmente por meio de interação com vias de biossíntese ou sinalização de determinados hormônios vegetais, como os brassinosteróides. Análises fenotípicas do desenvolvimento dos transformantes primários demonstraram que a superexpressão da proteína promoveu retardo do crescimento e visíveis diferenças anatômicas e morfológicas nos transformantes (baixa estatura, menor comprimento caulinar, menor desenvolvimento de sistema radicular e aéreo, folhas enrugadas/encarquilhadas). Nos experimentos de infectividade viral, os resultados obtidos confirmaram o papel essencial da proteína de potencial protetora contra a infecção viral. A superexpressão da proteína não alterou a taxa de infecção por ToYSV-[MG-Bi2], mas interferiu significativamente no desenvolvimento de sintomas, os quais foram bem menos severos nas plantas transgênicas. Coletivamente, os resultados dessa investigação reforçam o papel fundamental de NIK tanto no desenvolvimento, como na proteção contra patógeno. Estudos posteriores deverão ser conduzidos para avaliar os possíveis efeitos da superexpressão e/ou da repressão de NIK na via de sinalização de brassinosteróides e as bases moleculares de integração entre as duas vias de sinalização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTER, B., ALI REZAIAN, M., JESKE, H. Replicative intermediates of Tomato leaf curl virus and its satellite DNAs. **Virology**, v. 331, p. 441– 448, 2005.
- ALBUQUERQUE, L.C.; CARRIJO, F.R.F.; GIORDANO, L.B.; BOITEUX, L.S.; ÁVILA, A.C.; FONSECA, M.E.N.; NAGATA, T.; INOUE-NAGATA, A.K. A new begomovirus species in tomato crop in Central Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. S218-S219, 2004.
- AMBROZEVICIUS, L.P.; ANDRADE, E.C.; ZAMBOLIM, E.M.; FONTES, E.P.B.; ZERBINI, F.M. Incidence and host range of TGV-Ig, a bipartite Begomovirus from the "Zona Metalúrgica" of Minas Gerais, Brazil. **Virus Reviews and Research**, v. 4, p. 155, 1999.
- ANDRADE, E. C., MANHANI, G. G., ALFENAS, P. F., CALEGARIO, R. F., FONTES, E. P. B. AND 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*. **Jornal of General Virology**, v. 87, p. 3687-3696, 2006.
- ANDRADE, E.C.; AMBROZEVICIUS, L.P.; CALEGARIO, R.F.; FONTES, E.P.B.; ZERBINI, F.M. Molecular cloning and characterization of Tomato chlorotic mottle virus (TCMV), a new tomato-infecting begomovirus. **Virus Reviews and Research**, v. 7, p. 153, 2002.
- ARGÜELLO-ASTORGA, G.; HERRERA-ESTRELLA, L.; RIVERA-BUSTAMANTE, R. Experimental and theoretical definition of geminivirus origin of replication. **Plant Molecular Biology**, v. 26, p. 553-556, 1994.
- ARGUELLO-ASTORGA, G.; LOPEZ-OCHOA, L.; KONG, L.J.; OROZCO, B.M.; SETTLAGE, S.B.; HANLEY-BOWDOIN, L. A novel motif in geminivirus replication proteins interacts with the plant retinoblastoma-related protein. **Journal of Virology**, v. 78, p. 4817-4826, 2004.
- BARRE, A., HERVÉ, C., LESCURE, B., ROUGÉ, P. Lectin receptor kinases in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 2, p. 379-399, 2002.
- BECRAFT, P. W. Receptor kinases in plant development. **Trends in Plant Science**, v. 3, p. 384-388, 1998.
- BEDFORD, I.D.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; ROSELL, R.C.; MARKHAM, P.G. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographical regions. **Annals of Applied Biology**, v. 125, p. 311-325, 1994.
- BELKHADIR, Y, RAJAGOPAL, S. DANGL, J. Plant disease resistance protein signaling:NBS-LRR proteins and their partners. **Current Opinion Plant Biology**, v. 7, p. 391-399, 2004.

- BRIDDON, R.W.; PINNER, M.S.; STANLEY, J.; MARKHAM, P.G. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. **Virology**, v. 177, p. 85-94, 1990.
- CALEGARIO, R.F.; FERREIRA, S.S.; ANDRADE, E.C.; ZERBINI, F.M. Characterization of *Tomato yellow spot virus*, a novel tomato-infecting begomovirus in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p.1335-1343, 2007.
- 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.
- 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.
- CHÁVEZ-RIOS, R.; ARIAS-ROMERO, L.H.; ALMARAZ-BARRERA, M.J.; HERNÁNDEZ-RIVAS, R.; GUILLÉN, N. AND VARGAS, M. L10 ribosomal protein from *Entamoeba histolytica* share structural and functional homologies with QM/Jif-1: proteins with extraribosomal functions. **Molecular Biochemistry Parasitology**, v. 127, p. 151–160, 2003.
- 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.
- COTRIM, M. A. A.; KRAUSE-SAKATE, R.; NARITA, N.; ZERBINI, F. M.; PAVAN, M. A. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato from São Paulo Midle-Wes. **Summa Phytopathology**, v. 33, p. 300-303, 2007
- DAVIES, J.W.; STANLEY, J.; DONSON, J.; MULLINEAUX, P.M.; BOULTON, M.I. Structure and replication of geminivirus genomes. **Journal of Cell Science**, v. 7, p. 95-107, 1987.
- DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant DNA miniprep: Version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 1, p. 19-21, 1983.
- DIÉVART A. AND CLARK, S.E. Using mutant alleles to determine the structure and function of leucine-rich repeat receptor-like kinases. **Current Opinion Plant Biology**, v. 6(5), p. 507-16, 2003.
- DOWDY, S.F., LAI, K.M., WEISSMAN, B.E., MATSUI, Y., HOGAN, B.L.M. AND STANBRIDGE, E.J. The isolation and characterization of a novel cDNA demonstrating an altered mRNA level in non-tumorigenic Wilms' microcell hybrid cells. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 5763–5769, 1991.
- ELLIS, L., CLAUSER, E., MORGAN, D.O., EDERY, M., ROTH, R.A., AND RUTTER, W.J. Replacement of insulin-receptor tyrosine residues 1162 and 1163 compromises insulin-stimulated kinase-activity and uptake of 2-deoxyglucose. **Cell**, v. 45, p. 721-732, 1986.

- FAUQUET, C.M.; BISARO, D.M.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; HARRISON, B.D.; RYBICKI, E.P.; STENGER, D.C.; STANLEY, J. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family Geminiviridae, and an updated list of begomovirus species. **Archives of Virology**, v. 148, p. 405-421, 2003.
- FERNANDES, J. J., CARVALHO, M. G., ANDRADE, E. C., BROMMONSCHENKEL, S. H., FONTES, E. P. B., ZERBINI, F. M. Biological and molecular properties of Tomato rugose mosaic virus (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. **Plant Pathology**, v. 55 (4), p. 513–522, 2006.
- FERNANDES, J.J.; FONTES, E.P.B.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F.M. Molecular cloning and sequencing of Tomato rugose mosaic virus, a geminivirus isolated from tomatoes at "Triângulo Mineiro", Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 440, 2000.
- FLORENTINO, L. H.; SANTOS, A. A.; FONTENELLE, M. R.; PINHEIRO, G. L.; ZERBINI, F. M.; PEREIRA, M. C. B.; 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, p. 6648–6656, 2006.
- 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. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 8459–8465, 1994a.
- FONTES, E. P. B.; GLADFELTER, H. J.; SCHAFFER, R. L.; PETTY, I. T. D.; HANLEY-BOWDOIN, L. Geminivirus replication origins have a modular organization. **The Plant Cell**, v. 6, p. 405–416, 1994b.
- FONTES, E.P.B.; LUCKOW, V.A.; HANLEY-BOWDOIN, L. A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. **The Plant Cell**, v. 4, p. 597-608, 1992.
- FRARY, A. The use of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in the map-based cloning of tomato genes and an analysis of factor affecting transformation efficiency. Ithaca, NY: Cornell University, 1995. 165p. **Thesis (Ph.D.)- Cornell University**, 1995.
- FRISCHMUTH, T.; ENGEL, M.; JESKE, H. Beet curly top virus DI DNA-mediated resistance is linked to its size. **Molecular Breeding**, v. 3, p. 213-217, 1997a.
- FRISCHMUTH, T.; ENGEL, M.; LAUSTER, S.; JESKE, H. Nucleotide sequence evidence for the occurrence of three distinct whitefly-transmitted, Sida-infecting bipartite geminiviruses in Central America. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 2675-2682, 1997b.
- 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.

GILBERTSON, R.L. E LUCAS, W.J. How do viruses traffic on the “vascular highway” ? **Trends in Plant Sciences**, v.1, p.260-268. 1996.

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.

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

HANLEY-BOWDOIN, L.; SETTLAGA, S.B.; OROZCO, B.M.; NAGAR S.; ROBERTSON, D. Geminoviruses models for plant DNA replication trascription, and cell cycle regulation. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 1, p. 71–106, 1999.

HANLEY-BOWDOIN, L.; SETTLAGE, S.B.; ROBERTSON, D. Reprogramming plant gene expression: a prerequisite to geminivirus DNA replication. **Molecular Plant Pathology**, v. 5, p. 149-156, 2004.

HARRISON, B.D.; ROBINSON, D.J. Natural genomic and antigenic variation in white-fly transmitted geminiviruses (begomoviruses). **Annual Review of Phytopathology**, v. 39, p. 369-398, 1999.

HECHT, V.; VIELLE-CALZADA, J.P.; HARTOG, M.V.; SCHMIDT, E.D.; BOUTILIER, K.; GROSSNIKLAUS, U.; VRIES, S.C. The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. **Plant Physiology**, v. 127, p. 803–816, 2001.

HOFER, P.; BEDFORD, I.D.; MARKHAM, P.G.; JESKE, H.; FRISCHMUTH, T. Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. **Virology**, v. 236, p. 288-295, 1997a.

HOWARTH, A.J.; CATON, J.; BOSSERT, M.; GOODMAN, R.M. Nucleotide sequence of bean golden mosaic virus and a model for gene regulation in geminiviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, p. 3572-3576, 1985.

IMAFUKU, I., MASAKI, T., WARAGAI, M., TAKEUCHI, S., KAWABATA, M., HIRAI, S., OHNO, S., NEE, L.E., LIPPA, C.F., KANAZAWA, I., IMAGAWA, M. AND OKAZAWA, H. Presenilin 1 suppresses the function of c-Jun homodimers via interaction with QM/Jif-1. **Journal Cell Biology**, v. 4, p. 121-134, 1999.

INNES, R.W. Guarding the Goods. New insights into the central alarm system of plants. **Plant Physiology**, v. 135(2), p. 695-701. Review, 2004.

KARL, T., ONDER, K., KODZIUS, R., PICHOVA, A., WIMMER, H., HUNDSBERGER, H., LOFFLER, M., KLADE, T., BEYER, A., BREITENBACH, M. AND KOLLER, L. GRC5 and NMD3 function in translational control of gene expression and interact genetically. **Current Genetic**, v. 34, p. 419-429, 1999.

- KOKA C.V., CERNY R.E., GARDNER R.G., NOGUCHI T., FUJIOKA S. A putative role for the tomato genes DUMPY and CURL-3 in brassinosteroid biosynthesis and response. **Plant Physiology**, v. 122, p. 85–98, 2000.
- LATHAM, J.R.; SAUNDERS, K.; PINNER, M.S.; STANLEY, J. Induction of plant cell division by beet curly top virus gene C4. **Plant Journal**, v. 11, p. 1273-1283, 1997.
- LAUFS, J.; SCHUMACHER, S.; GEISLER, N.; JUPIN, I.; GRONENBORN, B. Identification of the nicking tyrosine of geminivirus Rep protein. **FEBS Letters**, v. 377, p. 258-262, 1995.
- LAZAROWITZ, S. G. Geminivirus: Genome structure and gene function. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 11, p. 327–349, 1992.
- LI, J.; CHORY, J. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. **Cell**, v. 90, p. 929–938, 1997.
- LIN, H.Y.; WANG, X.F.; NG-EATON, E.; WEINBERG, R.A. AND LODISH, H.F. Expression cloning of the TGF- β type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. **Cell**, v. 68, p. 775-785, 1992.
- LUQUE, A.; SANZ-BURGOS, A.P.; RAMIREZ-PARRA, E.; CASTELLANO, M.M.; GUTIERREZ, C. Interaction of geminivirus Rep protein with replication factor C and its potential role during geminivirus DNA replication. **Virology**, v. 302, p. 83-94, 2002.
- MALIK, P. S., KUMAR, V., BAGEWADI, B., MUKHERJEE, S. K. Interaction between coat protein and replication initiation protein of Mung Bean Yellow Mosaic India Virus might lead to control of viral DNA replication. **Virology**, v.337, p. 273–283, 2005.
- 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. **The Plant Cell**, v. 15, p. 1605–1618, 2003.
- MONTECLARO, F.S. AND VOGT, P.K. A jun-binding protein related to a putative tumor suppressor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 6726–6730, 1993.
- MORALES, F.J.; ANDERSON, P.K. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. **Archives of Virology**, v. 146, p. 415-441, 2001.
- MORALES, F.J.; JONES, P.G. The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. **Virus Research**, v. 100, p. 57-65, 2004.

- MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J. Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. **Virus Research**, v. 71, p. 123-134, 2000.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NARANJO, S.E.; ELLSWORTH, P.C. Challenges and opportunities for pest management of *Bemisia tabaci* in the new century. **Crop Protection**, v. 20, p. 707, 2001.
- NOMURA T., MONTOYA T., FARRAR K., KANETA T., YOKOTA T. Cloning the tomato Curl3 gene highlights the putative dual role of the leucine-rich repeat receptor kinase tBR11/SR160 in plant steroid hormone and peptide hormone signaling. **Plant Cell**, v. 14, p. 3163–76, 2002.
- NOUEIRY, A. O.; W. J. LUCAS; R. L. GILBERTSON. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. **Cell**, v. 76, p. 925–932, 1994.
- OH, H.S., KWON, H., SUN, S.K. AND YANG, C.-H. QM, a putative tumor suppressor, regulates proto-oncogene c-Yes. **Journal of Biology Chemistry**, v. 277, p. 36489–36498, 2002.
- OROZCO, B.M.; GLADFELTER, H.J.; SETTLAGE, S.B.; EAGLE, P.A.; GENTRY, R.N.; HANLEY-BOWDOIN, L. Multiple cis elements contribute to geminivirus origin function. **Virology**, v. 242, p. 346-356, 1998.
- OROZCO, B.M.; HANLEY-BOWDOIN, L. Conserved sequence and structural motifs contribute to the DNA binding and cleavage activities of a geminivirus replication protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 24448-24456, 1998.
- PIRES, S.R.; ANDRADE, E.C.; ZERBINI, F.M. Detection of a possible new begomovirus species infecting tomato in Minas Gerais state. **Virus Reviews and Research**, v. 9, p. 122, 2004.
- POLSTON, J.E.; ANDERSON, P.K. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. **Plant Disease**, v. 81, p. 1358-1369, 1997.
- RIBEIRO, S. G.; AMBROZEVICIUS, L. P.; AVILA, A. C.; BEZERRA, I. C.; CALEGARIO, R. F.; FERNANDES, J. J.; LIMA, M. F.; DE MELLO, R. N.; ROCHA, H.; ZERBINI, F. M. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. **Archives of Virology**, v. 148, p. 281–95, 2003.
- ROJAS, M. R.; HAGEN, C.; 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.
- ROJAS, M.R.; NOUEIRY, A.O.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. Bean dwarf mosaic geminivirus movement proteins recognize DNA in a form- and size-specific manner. **Cell**, v. 95, p. 105-113, 1998.

- ROJAS, M. R., JIANG, H., SALATI, R., ZARES, B. X, SUDARSHANA, M. R., LUCAS, W. J., GILBERTSON, R. L. Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, Tomato yellow leaf curl virus. **Virology**, v. 291, p.110-125, 2001.
- ROJAS, M.R.; GILBERTSON, R.L.; RUSSELL, D.R.; MAXWELL, D.P. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. **Plant Disease**, v. 77, p. 340-347, 1993.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning - **A Laboratory Manual** (2^a ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- SANDERFOOT, A. A.; INGHAM, D. J.; LAZAROWITZ, S. G. PLANT-MICROBE AND PLANT-INSECT INTERACTIONS: A viral movement protein as a nuclear shuttle (The geminivirus BR1 movement protein contains domains essential for interaction with BL1 and nuclear localization). **Plant Physiology**, v. 110, p. 23, 1996.
- SANTANA, F. M.; INOUE-NAGATA, A. K.; NAGATA, T.; RIBEIRO, S. G.; ÁVILA, A. C.; GIORDANO, L. B. Detection of a begomovirus in tomato leaf samples using non-radioactive probes. **Ciência Rural**, v. 37, p. 269-272, 2007.
- SAUNDERS, K.; LUCY, A.; STANLEY, J. DNA forms of the geminivirus African cassava mosaic virus consistent with a rolling circle mechanism of replication. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 2325-2330, 1991.
- SANDERFOOT, A.A.; LAZAROWITZ, S.G. Cooperation in viral movement: The geminivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the cell periphery. **Plant Cell**, v. 7, p. 1185-1194, 1995.
- SAS, STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, versão 9.1. **The SAS Institute**, Cary, N.C.; 1999.
- SCHAFFER, R. L., MILLER, C.G. E PETTY, I.T.D. Virus and host-specific adaptations in the BL1 and BR1 genes of bipartite geminiviruses. **Virology**, v.214, p.330-338. 1995.
- SETTLAGE, S. B.; MILLER, A. B.; GRUISSEM, W.; HANLEY-BOWDOIN, L. Dual interaction of a geminivirus replication accessory factor with a viral replication protein and a plant cell cycle regulator. **Virology**, v. 279, p. 570–576, 2001.
- STANLEY, J. Infectivity of the cloned geminivirus genome requires sequences from both DNAs. **Nature**, v. 305, p. 643-645, 1983.
- STANLEY, J. Analysis of African cassava mosaic virus recombinants suggest strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. **Virology**, v. 206, p. 707-712, 1995.
- STANLEY, J.; BISARO, D.M.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; FAUQUET, C.M.; HARRISON, B.D.; RYBICKI, E.P.; STENGER, D.C. Family Geminiviridae. pp.301-326 In: FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. (Eds.) **Virus Taxonomy**. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press. 2005.

- 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**, v. 98, p. 10763–1076, 2001.
- SHIU, S. H.; BLEECKER A. B. Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. **Science stike, Review**, 2001.
- TAN, P.H.; WONG, S.M.; WU, M.; BEDFORD, I.D.; SAUNDERS, K.; STANLEY, J. Genome organization of ageratum yellow vein virus, a monopartite whitefly-transmitted geminivirus isolated from a common weed. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 2915-2922, 1995.
- TIMMERMANS, M.C.P.; DAS, O.P.; Messing, J. Geminiviruses and their uses as extrachromosomal replicons. **Annual Review of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 45, p. 79–112, 1994.
- TRINKS, D.; RAJESWARAN, R.; SHIVAPRASAD, P.V.; AKBERGENOV, R.; OAKELEY, E.J.; VELUTHAMBI, K.; HOHN, T.; POOGGIN, M.A. Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. **Journal of Virology**, v. 79, p. 2517-2527, 2005.
- TROTOCHAUD, A. E., JEONG, S., CLARK, S. E. CLAVATA3, a multimeric ligand for the CLAVATA1 receptor-kinase. **Science**, v. 289. (5479), p. 613 - 617, 2000.
- TROTOCHAUD, A.E.; HAO, T.; WU, G.; YANG, Z. AND CLARK, S.E. The Arabidopsis CLV1 receptor-like kinase requires CLV3 for its assembly into a signalling complex that includes KAPP and Rho GTPase. **Plant Cell**, v. 11, p. 393-405, 1999.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARSTENS, E.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; MCGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R.B. (Eds.) Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press. **Virus Taxonomy**, p. 1162, 2000.
- VANITHARANI, R.; CHELLAPPAN, P.; PITA, J.S.; FAUQUET, C.M. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. **Journal of Virology**, v. 78, p. 9487-9498, 2004.
- VOINNET, O.; PINTO, Y.M.; BAULCOMBE, D.C. Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 14147-14152, 1999.
- WANG Z. W., SETO H, FUJIOKA S, YOSHIDA S, CHORY J. BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. **Nature**, v. 411(6834), p. 219, 2001.
- WANG, H., HAO, L., SHUNG, C. Y., SUNTERAND, G., BISARO, D. M. Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. **The Plant Cell**, v.15, p. 3020–3032, 2003.
- WANG, H., BUCKLEY, K. J., YANG, X., BUCHMANN, R. C., BISARO, D. M.

- Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. **Journal of Virology**, v. 79, p. 7410–7418, 2005.
- WERE, H.K.; WINTER, S.; MAISS, E. Viruses infecting cassava in Kenya. **Plant Disease**, v. 88, p. 17-22, 2004.
- XIE, Q.; SANZ-BURGOS, A.P.; GUO, H.; GARCIA, J.A.; GUTIERREZ, C. GRAB proteins, novel members of the NAC domain family, isolated by their interaction with a geminivirus protein. **Plant Molecular Biology**, v. 39, p. 647-656, 1999.
- YOKOTA T., FUJIOKA S. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p.137–64, 2003.
- 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 kinases (LRR RLK) genes. **Journal Molecular Evolution**, v. 63, p. 612–621, 2006.
- ZHANG, S. C., WEGE, C., JESKE, H. Movement proteins (BC1 and BV1) of Abutilon Mosaic geminivirus are co-transported in and between cells of sink but not of source leaves as detected by green fluorescent protein tagging. **Virology**, v. 290, p.249-260, 2001a.
- ZHANG, W., OLSON, N. H., BAKER, T. S., FAULKNER, L., AGBANDJE-MCKENNA, M., BOULTON, M. I., DAVIES, J. W., MCKENNA, R. Structure of the maize streak virus geminate particle. **Virology**, v. 279, p.471–477, 2001b.