

EUGENIO RIBEIRO DE ANDRADE NETO

**EDIÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA DOMINANTE E RECESSIVA CONTRA
BEGOMOVIRUS**

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

Orientador: Eliabeth Pacheco Batista Fontes

Coorientadores: Pedro Augusto B. dos Reis
Virgílio Adriano P. Loriato

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

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

T

A553e
2022

Andrade Neto, Eugenio Ribeiro de, 1997-

Edição de genes de resistência dominante e recessiva contra begomovirus / Eugenio Ribeiro de Andrade Neto. – Viçosa, MG, 2022.

1 dissertação eletrônica (49 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2022.

Referências bibliográficas: f. 42-45.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.323>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Geminiviridae. 2. Begomovirus. 3. Proteínas - Análise. 4. Expressão gênica. 5. Ácidos nucleicos - Transporte fisiológico. 6. *Arabidopsis thaliana* - Resistência a doenças e pragas - Aspectos genéticos. I. Fontes, Elizabeth Pacheco Batista, 1957-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 579.28

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB-6/2552


EUGENIO RIBEIRO DE ANDRADE NETO

**EDIÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA DOMINANTE E RECESSIVA CONTRA
BEGOMOVIRUS**


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

APROVADA: 31 de janeiro de 2022.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 EUGENIO RIBEIRO DE ANDRADE NETO
Data: 26/05/2023 09:48:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Eugenio Ribeiro de Andrade Neto
Autor

Documento assinado digitalmente
 ELIZABETH PACHECO BATISTA FONTES
Data: 26/05/2023 09:29:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Elizabeth Pacheco Batista Fontes
Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado sabedoria, força e saúde durante a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa e aos professores que contribuíram para a minha formação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada (UFV) , por todo o suporte e oportunidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

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

À professora Dr^a Elizabeth Pacheco Batista Fontes, pela disponibilização, dedicando seu tempo para me ajudar no desenvolvimento desse trabalho, e por toda troca de conhecimentos.

A todos os meus companheiros do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, tornando os dias mais leves e divertidos.

Desejo apresentar meu carinhoso agradecimento ao Dr. Marco Aurélio, por toda a ajuda e todo suporte no desenvolvimento do meu trabalho.

Aos meus amigos Flávia Andrade, Gabriel Ito, Kimberly Beira-Mar, Lucas Almeida, Riziane Ferreira, Marcel Arruda, Yan Clevelares que me acolheram dando todo o suporte, me proporcionando momentos incríveis, sempre me auxiliando nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Maricleuda Moreira e Jerônimo Andrade e irmã, Sara Moreira, por todo carinho, suporte e apoio em todos os momentos de dificuldade, bem como toda a minha família.

Agradeço por fim a todas as pessoas que contribuíram positivamente na minha vida, amigos, família, conhecidos e professores, enfim a todos que torcem por mim.

RESUMO

NETO, Eugenio Ribeiro de Andrade, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2022. **Edição de genes de resistência dominante e recessiva contra begomovirus.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Coorientadores: Pedro Augusto Braga dos Reis e Virgilio Adriano Pereira Loriato.

Begomovirus constitui o maior gênero da família *Geminiviridae*, uma das maiores famílias de vírus de plantas, cujas espécies infectam diversas monocotiledôneas e dicotiledôneas cultiváveis e representam severa limitações à produtividade agrícola mundialmente. Esse amplo espectro de gama de hospedeiros resulta de estratégias sofisticadas desenvolvidas por geminivírus para superar o arsenal de defesas antivirais em espécies de plantas tão diversas. Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de estratégias moleculares para obtenção de resistência a begomovírus. Nesta investigação, foram exploradas tanto estratégias para manipulação de resistência dominante quanto silenciamento de genes de resistência recessiva na planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Para garantir resistência dominante, foi utilizado o gene *NIK1* [*Nuclear shuttle protein (NSP)-interacting kinase 1*] que protege plantas contra begomovírus em interações incompatíveis, mas cuja resistência é superada pela proteína de geminivírus NSP em hospedeiros suscetíveis. Plantas Columbia (Col-0) e nocaute *nik1-1* foram transformadas com o mutante simples *NIK1-T469A* e duplo *NIK1-T474D/T469A* sob o controle do promotor 35S. As plantas transformadas foram confirmadas por PCR, obtendo-se cinco linhagens expressando o duplo mutante e duas linhagens, o mutante simples. Com inserção única do gene e em homozigose, as plantas Col-0 transformadas exibiram alta expressão dos transgenes, e os mutantes complementados com o duplo mutante, exibiram baixa expressão do transgene. Foi observado que a expressão dos mutantes *NIK1-T469A* e *NIK1-T474D/T469A* reprimiram acentuadamente a expressão dos genes marcadores da via de imunidade antiviral mediada por *NIK1*, *RPL28*, *S25*, *PSII* e *FD1*. Consistente com esses resultados, as plantas superexpressando *NIK1-T469A* e *NIK1-T474D/T469A* apresentam menor comprimento da raiz. Todas as plantas mutantes demonstraram baixo acúmulo viral, e baixos sintomas da infecção por CabLCV, comparados com as plantas Col-0, *nik1-1* e *NIK1-8* (uma linhagem complementando o gene *NIK1* intacto). Estes resultados indicam que os mutantes

NIK1-T469A e NIK1-T469A/T474D são constitutivamente ativados e conferem resistência contra geminivírus em Arabidopsis. No caso de resistência recessiva, inicialmente foi confirmado o caráter recessivo do gene *NIG*. Para isso, foi demonstrado que plantas *nig-1* submetidos à infecção por begomovírus acumularam menor carga viral e exibiram sintomas atenuados quando comparadas com Col-0. Além disso, foi examinado o efeito do silenciamento dos genes de suscetibilidade *NIG* e *NISP* no desenvolvimento de Arabidopsis. Inativação de *NIG* ou *NISP* não causou efeitos adversos no desenvolvimento e crescimento das linhagens silenciadas *nig-1* ou *nisp-1* comparados com Col-0. Para obter resistência recessiva mais eficaz, foi utilizado a tecnologia CRISPR/Cas para o duplo silenciamento dos genes *NIG* e *NISP*. Foi inicialmente construído o cassete contendo os RNAs guias de *NISP* e então inserido no vetor de transformação de plantas contendo o gene *Cas* pela técnica de Golden Gate. As plantas nocautes *nig-1* foram transformadas com o vetor do CRISPR/Cas *nisp-pHEE-401E*, e as plantas selecionadas foram confirmadas por PCR. Foi possível confirmar plantas editadas em apenas um alelo do gene de *NISP*, demonstrando a funcionabilidade dessa técnica. Experimentos estão em progresso para selecionar os mutantes duplos *nisp/nig* em homozigose e avaliar o efeito do silenciamento duplo dos genes recessivos na resistência contra begomovírus.

Palavras-chave: Geminiviridae. Begomovirus. NIK1. Resistência dominante. *NIG*. *NISP*. Resistência recessiva. Arabidopsis. CRISPR/CAS. Duplo mutante. Duplo nocaute.

ABSTRACT

NETO, Eugenio Ribeiro de Andrade, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, January, 2022. **Editing dominant and recessive resistance genes against begomovirus.** Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-advisers: Pedro Augusto Braga dos Reis and Virgilio Adriano Pereira Loriato.

Begomovirus is the largest genus of the Geminiviridae family, one of the most prominent plant viruses, whose species infect a variety of monocots and dicots and represent severe limitations to agricultural productivity worldwide. This broad spectrum of host ranges results from sophisticated strategies developed by geminiviruses to overcome the arsenal of antiviral defenses in such diverse plant species. Therefore, it is necessary to develop molecular strategies to obtain resistance to begomoviruses. This investigation explored both strategies for manipulating dominant resistance and silencing recessive resistance genes in the *Arabidopsis thaliana* model plant. To ensure dominant resistance, we used the *NIK1* [Nuclear shuttle protein (NSP)-interacting kinase 1] gene, which protects plants against begomoviruses in incompatible interactions, but whose resistance is overcome by the geminivirus protein NSP in susceptible hosts. Columbia (Col-0) and *nik-1* knockout plants were transformed with the NIK1-T469A single mutant and NIK1-T474D/T469A double mutant of *NIK1* under the control of the 35S promoter. The transformed plants were confirmed by PCR, obtaining five lines expressing the double mutant and two lines expressing the single mutant. Homozygous single gene insertion plants in Col-0 exhibited high expression of the transgenes, and *nik1-1* complemented with the double mutant exhibited low transgene expression. NIK1-T469A and NIK1-T474D/T469A severely repressed the expression of the marker genes for the NIK1-mediated antiviral immunity pathway, *RPL28*, *S25*, *PSII*, and *FD1*. Accordingly, NIK1-T469A and NIK1-T474D/T469A plants exhibited shorter roots. All mutant plants showed low viral accumulation and attenuated symptoms of CabLCV infection, compared to Col-0, *nik-1* and NIK1-8 (a line expressing intact NIK1) plants. These results indicate that the T469A and T469A/T474D mutants are constitutively activated and confer resistance to geminiviruses in *Arabidopsis*. In the case of recessive resistance, initially, the recessive character of the *NIG* gene was confirmed. For this, *nig-1* plants infected with begomovirus were demonstrated to accumulate a lower viral load and exhibit

attenuated symptoms compared to Col-0. Furthermore, we examined the effect of silencing *NIG* and *NISP* susceptibility genes on Arabidopsis development. Inactivation of *NIG* or *NISP* did not cause adverse effects on the development and growth of the *nig-1* or *nisp-1* knockout plants compared to Col-0. We used the CRISPR/Cas technology for the double silencing of *NIG* and *NISP* for a more effective recessive resistance. A cassette containing the guide RNAs of *NISP* was first constructed and then inserted in a plant transformation vector containing the Cas gene by the Golden Gate technique. The *nig-1* knockout plants were transformed with the CRISPR/Cas vector nisp-pHEE-401E, and the selected plants were confirmed by PCR. Plants edited in only one allele of *NISP* were confirmed, demonstrating the functionality of this technique. Experiments are in progress to select homozygous *nisp/nig* double mutants to evaluate the effect of double silencing recessive genes on resistance against begomoviruses.

Keywords: Geminiviridae. Begomovirus. NIK1. Dominant resistance. NIG. NISP. Recessive resistance. Arabidopsis. CRISPR/CAS. Double mutant. Double knockout.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
Interação geminivírus-hospedeiro	12
Via de sinalização antiviral mediada por NIK1	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. Clonagem e Extração de DNA plasmidial de NIK-1	16
3.1.1 Construção de plasmídeos recombinantes	16
3.1.2 Extração de DNA plasmidial	16
3.1.3 Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	17
3.1.4 Confirmação da inserção dos transgenes	17
3.1.5 Ensaio de crescimento de raiz e hipocótilo	18
3.1.6 Análise de expressão de transgenes	18
3.1.7 Ensaios de infecção	19
3.1.8 Diagnóstico molecular da infecção viral por PCR convencional	19
3.1.9 Quantificação do DNA viral por PCR quantitativo.	20
3.1.10 Análise de segregação	20
3.2 Análise do gene de suscetibilidade NIG e engenharia genética para a obtenção do duplo mutante	21
3.2.1 Confirmação dos nocautes e ensaios de infecção na linhagem <i>nig</i>	21
3.2.2 Análise de desenvolvimento morfológico dos nocautes	21
3.2.3 Desenho dos gRNAs e construção do vetor CRISP/Cas	22
3.2.4 Confirmação das plantas editadas	22
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES	23
4.1 Mutação simples e dupla nos sítios de fosforilação de NIK1 e obtenção de linhagens transgênicas	23
A mutação dupla NIK1T469A/T474D e simples T469A intensifica a sinalização de defesa e confere resistência a geminivírus	27
A inativação dos genes de suscetibilidade NISP e NIG não afeta crescimento e desenvolvimento de <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
Obtenção e construção de CRIPR_Cas para silenciamento duplo de <i>NIG</i> e <i>NISP</i>	37
Silenciamento por CRIPR/Cas do gene NISP em <i>nig</i>	39
5.0 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	41
REFERÊNCIAS	42
TABELAS	46

1. INTRODUÇÃO

A família *Geminiviridae* constitui umas das maiores famílias de vírus de plantas, sendo representada por vírus de DNA cadeia simples, encapsidado em partículas geminadas (Hanley-Bowdoin et al., 2013). Estes vírus são transmitidos e, mecanicamente introduzidos no citoplasma de células não infectadas, pelo inseto vetor, onde as partículas virais são desempacotadas e o DNA viral ligado à proteína da capa é direcionado para o núcleo por meio de interação com importinas. O DNA cadeia simples é replicado no núcleo de células infectadas via intermediários de DNA fita dupla, utilizando o mecanismo círculo rolante (Hanley-Bowdoin et al., 2013). A família *Geminiviridae* possui espécies patogênicas distribuídas mundialmente, que infectam diversas culturas agrônômicas de relevância econômica, o que impõe severa restrição à produtividade agrícola e, portanto, à segurança alimentar (Silva et al., 2017; Rojas et al., 2018). A incidência e severidade de doenças causadas por geminivírus têm aumentado consideravelmente nas últimas duas décadas, devido à alta taxa de mutações, recombinação e rearranjo dos genomas virais, incrementando a diversidade genômica que dá origem a novas espécies nesta família (Martin et al., 2005; Mansoor et al., 2006; Navas-Castillo et al., 2011; Lima et al., 2017). Esta rápida evolução de genomas virais dá aos geminivirus uma vantagem sobre o sistema de reconhecimento da planta ao patógeno, já que os genomas virais divergentes são capazes de escapar à percepção molecular da planta, não acionando assim o sistema imune do hospedeiro. Além disso, espera-se que as mudanças climáticas previstas modifiquem a distribuição do inseto vetor, o que pode representar uma ameaça adicional à agricultura globalmente. No Brasil, a grande diversidade de begomovírus que infectam tomateiros faz com que o desenvolvimento de estratégias moleculares para resistência de amplo espectro represente um dos maiores desafios para biotecnologia e melhoramento genético de precisão. Portanto, não é surpreendente que várias estratégias moleculares diferentes, derivadas de sequências do vírus, para gerar resistência contra begomovírus não tenham sido bem-sucedidas (Loriato et al., 2020).

Resistência recessiva é conferida por uma mutação em um gene recessivo que codifica um fator do hospedeiro essencial para a infecção viral (Calil & Fontes, 2017). Como característica geneticamente hereditária, a resistência antiviral recessiva é mais durável do que outros mecanismos de resistência contra vírus, como silenciamento

do RNA ou resistência dominante derivada de proteínas de resistência ativada por efetores do vírus (imunidade ativada por efetores) (Gouveia et al., 2017). Muitos genes de resistência recessiva naturalmente identificados têm sido mapeados em *loci* mutados que codificam fatores do hospedeiro cruciais para que o vírus complete seu ciclo de vida (Calil et al., 2017). Os exemplos típicos de genes de resistência recessiva natural são os fatores de iniciação de tradução eIF4E e eIF4G, que são essenciais na infecção de vírus de RNA, como potyvirus, bymovirus, cucumovirus, ipomovirus, etc. Neste caso, a resistência é causada por mutações de perda de função nos genes *eIF4E* e *eIF4G*.

Como resultado de esforços intensivos no desenvolvimento da área em interações vírus-hospedeiro, diversos fatores do hospedeiro envolvidos em infecção de vírus de plantas, cujos genes são alvos em potencial para resistência recessiva, têm sido identificados (Calil et al., 2013). Sendo assim, na ausência de cultivares exibindo resistência recessiva de ocorrência natural, como para o caso de geminivírus, uma mutação pode ser introduzida em um gene de resistência recessiva em potencial. A tecnologia da edição de genomas, utilizando o sistema CRISPR/Cas, é uma abordagem promissora para introdução de resistência recessiva em praticamente qualquer espécie de plantas cultivadas para a qual tenha sido desenvolvido um sistema eficiente de transformação (Zhu et al., 2020). Trabalhos prévios de nossa equipe de pesquisadores selecionaram dois alelos de suscetibilidade, que tem o potencial de conferirem resistência recessiva em *Arabidopsis* contra espécies bissegmentadas do gênero *Begomovirus*, pertencente à família *Geminiviridae*. Um dos alelos referidos corresponde ao gene *NIG* (*NSP-Interacting GTPase*) que interage *in vitro* e *in vivo* com a proteína de begomovírus NSP (*Nuclear shuttle protein*), sendo capaz de redirecionar o complexo DNA viral-NSP do núcleo para o citoplasma facilitando o movimento nucleocitoplasmático do DNA viral (Carvalho et al., 2008a). Embora estudos de superexpressão de *NIG* em *Arabidopsis* demonstraram que *NIG* contribui positivamente para a infecção viral, estudos de genética reversa demonstrando que silenciamento de *NIG* confere resistência à begomovírus não foram conduzidos, e, portanto, o papel essencial de *NIG* na infecção viral ainda não foi conclusivamente demonstrado.

O segundo alelo suscetível, identificado pelo nosso grupo de pesquisadores, corresponde ao gene *NISP* (*NSP-Interacting syntaxin 6-domain-containing protein*) que codifica uma proteína localizada no endossomo. Foi demonstrado que *NISP*

interage com o complexo NIG-NSP-DNA viral e direciona o movimento intracitoplasmático do DNA viral para os endossomos (Gouveia-Mageste et al., 2020). A proteína SYTA, reguladora de endocitoses, interage com a proteína de movimento do vírus, MP, e a direciona para os endossomos (Lewis & Lazarowitz, 2010). Consequentemente, NISP e SYTA agem em concerto para posicionar as duas proteínas virais, NSP e MP, no mesmo compartimento subcelular para interação direta e formação do complexo nucleoproteico MP-NSP-vDNA. Dos endossomos, o complexo viral deve ser redirecionado para o plasmodesmata para transporte do DNA viral para as células adjacentes. Assim SYTA utiliza a via de reciclagem endocítica para promover a translocação do complexo vDNA-NSP-MP para o plasmodesma, de onde MP aumenta o limite de exclusão do plasmodesmata para transferir o complexo NSP-vDNA para as células adjacentes. Consistente com sua atividade proviral, foi demonstrado que a ruptura da função de *NISP* em *Arabidopsis* compromete o processo de infecção viral conferindo resistência recessiva (Gouveia-Mageste et al., 2020). Um dos objetivos da presente investigação foi utilizar a tecnologia do sistema CRISPR/Cas para inativar ambos os genes de suscetibilidade *NIG* e *NISP* em *Arabidopsis* a fim de se conseguirem linhagens resistentes. Além disso, foi conduzido uma análise fenológica e de desenvolvimento nos mutantes simples *nig-1* e *nisp-1*, a fim de examinar se a perda de função dos referidos genes não conferiria efeitos deletérios no desenvolvimento, crescimento e produtividade, uma propriedade essencial no uso de genes de suscetibilidade para resistência contra vírus. Esta estratégia de silenciar genes de suscetibilidade e assim introduzir resistência recessiva tem vantagens consideráveis. Além de conferir resistência mais duradoura, encerra o potencial de se obter resistência de amplo espectro contra diversas estirpes de begomovírus que podem coexistir em infecções múltiplas, eliminando assim a possibilidade de prevalência de estirpes resistentes.

Além de resistência recessiva, a resistência dominante tem sido utilizada no melhoramento genético para o desenvolvimento de cultivares superiores, resistentes a vírus em plantas cultiváveis. Entretanto, a capacidade do genoma viral de evoluir rapidamente possibilita ao vírus escapar do sistema de reconhecimento do patógeno, superando assim o mecanismo de resistência natural do hospedeiro. Consistente com esta observação, a via de sinalização antiviral mediada pelo coreceptor de membrana NIK1 (*NSP-Interacting Kinase 1*), apesar de transmitir um sinal antiviral contra begomovirus, é inativada pela proteína supressora do vírus, NSP, aumentando assim

a patogenicidade do vírus pelo hospedeiro (Fontes et al., 2004; Carvalho et al., 2008b; Zorzatto et al., 2015). Tem sido previamente demonstrado que a substituição de um resíduo de treonina na posição 474 (Thr-474) de NIK1 por ácido aspártico (T474D) resulta em um mutante NIK1-T474D de ativação constitutiva e fracamente inibido por NSP. A expressão de NIK1-T474D em *Arabidopsis* e tomateiro confere resistência a diferentes espécies de begomovírus (Zorzatto et al., 2015; Brustolini et al., 2015). Foi também demonstrado que a fosforilação de NIK1 no resíduo Thr-469 tem função antagônica e controla negativamente a atividade de NIK1 (Santos et al., 2009). Estas observações prévias levantaram a hipótese de que mutações duplas nas posições Thr-469 e Thr474, resultando em T469A/T474D, poderia conferir resistência mais eficiente contra begomovírus. De fato, tem sido demonstrado que a atividade de fosforilação do mutante duplo NIK1-T469A/T474D é superior a dos mutantes simples NIK1-T474D e NIK1-T469A (Loriato, 2019). Contudo, a amplitude da propagação do sinal antiviral e a robustez da defesa mediada pelo duplo mutante NIK1-T469A/T474D ainda não foram avaliados, o que constitui um dos objetivos desse trabalho.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Interação geminivírus-hospedeiro

A família *Geminiviridae* é uma das maiores famílias de vírus de plantas, cujos vírus apresentam a morfologia do capsídeo em forma geminada icosaédrica, e o genoma de DNA circular de fita simples de tamanho entre 2,5 - 5,2 kb. De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, essa família está constituída pelos gêneros *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Capulavirus*, *Curtovirus*, *Grabovirus*, *Eragrovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus*, sendo que sua divisão é baseada no tipo de inseto vetor, organização do genoma, tipo do hospedeiro e origem filogenética da espécie (Zerbini et al., 2017).

O gênero *Begomovirus* é um dos maiores causadores de doenças em culturas agrícolas economicamente importantes, já que por meio do seu inseto vetor *Bemisia tabaci* (mosca branca) atinge uma ampla gama de variedades de plantas dicotiledôneas, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Espécies de plantas infectadas por begomovírus incluem milho, feijoeiro, algodoeiro, tomateiro, mandioca, pimenta, quiabo, batata, repolho, abóbora e outros. (Brown et al., 2015;

Rojas et al., 2018; Loriato et al., 2020). Os begomovírus se destacam por representarem o maior gênero da família *Geminiviridae*, apresentando cerca de 380 espécies de vírus, podendo ainda ser subclassificados em monossegmentados (contendo apenas um genoma, DNA-A), ou bissegmentados (dois componentes genômicos DNA-A e DNA-B) (Kumar, 2019).

O DNA-A codifica cinco proteínas, a proteína de iniciação à replicação (Rep, AC1/C1), a proteína de ativação da transcrição de genes virais (TrAP, AC2/C2), a proteína intensificadora de replicação (Ren, AC3/C3), proteína de encapsidação do genoma viral (CP, AV1/V1) e de supressão das defesas do hospedeiro (AC4/C4). Já o DNA-B contém os genes que codificam proteínas de movimento intracelular e intercelular, NSP (*nuclear shuttle protein*) e MP (*movement protein*), respectivamente (Krenz et al., 2012; Brown et al., 2015).

A proteína NSP auxilia no transporte do DNA viral do núcleo para citoplasma e age em concerto com a proteína MP para a translocação do DNA viral para as células vizinhas (Gafni & Epel, 2002, Carvalho et al., 2008). Assim sendo, NSP se liga ao DNA do vírus de fita simples, que foi recém replicado no núcleo, e utiliza da maquinaria de exportação nuclear e de transporte nucleocitoplasmático, facilitando assim o transporte do DNA viral para o citoplasma através dos poros nucleares (Noueiry et al., 1994; Pascal et al., 1994; Sanderfoot e Lazarowitz, 1995; Lazarowitz & Beachy, 1999; Hehne et al., 2004).

Na região perinuclear, a proteína NIG (*NSP-Interacting GTPase*) interage com o NSP e facilita o transporte e liberação do complexo DNA-NSP dos poros nucleares para o citoplasma (Carvalho et al., 2008a). NIG interage com NSP *in vivo* e *in vitro*, exibe atividade GTPase intrínseca, sendo uma característica comum de proteínas regulatórias envolvidas no tráfego de proteínas. Além disso, NIG promove o transporte de NSP do núcleo para o citoplasma quando co-expressas em folhas de *Nicotiana benthamiana*.

Foi demonstrado que linhagens transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando o gene *NIG* são mais suscetíveis à infecção por *Cabbage leaf curl virus* (CabLCV), exibindo sintomas mais severos e aumento na taxa de infecção comparado com linhagens não transformadas (Carvalho et al., 2008). Estes experimentos demonstraram que NIG possui atividade pro-viral durante a infecção por begomovirus, caracterizando-a como fator de suscetibilidade.

Recentemente, foi identificada a proteína NISP (*NSP-Interacting syntaxin 6-*

domain-containing protein) pela capacidade de interagir com NSP. Foi demonstrado que a inativação do gene *NISP* aumenta a resistência a begomovirus, sendo definida como gene de suscetibilidade. NISP possui o domínio syntaxin-6 no terminal amino, sendo localizada no citoplasma, especificadamente em vesículas endossomais. NISP liga ao complexo NIG-NSP-vDNA no citoplasma e faz a mediação do transporte desse complexo até os endossomos onde se localiza a proteína viral MP associada a SYTA, um regulador de endocitosis (Lewis & Lazarowitz, 2010; Gouveia-Mageste et al., 2020). MP utiliza a via de recaptura endocítica que é regulada por SYTA para mover o complexo vDNA-NSP para o plasmodesmata e para as células adjacentes.

Ensaio de infecção viral em plantas *knockouts* de NISP demonstraram que a infecção por begomovirus depende da interação de NISP com NSP (Gouveia-Mageste et al., 2019). Plantas de *Arabidopsis* silenciadas para *NISP* apresentam baixa carga viral, bem como a diminuição dos sintomas em comparação com Col-0. Em contraste, plantas superexpressando *NISP* exibem um incremento da eficiência da infecção, aumento da carga viral e a intensificação dos sintomas de infecção por begomovirus em comparação com Col-0 (Gouveia-Mageste et al., 2019). Estes genes de suscetibilidade, *NIG* e *NISP*, são essenciais para o movimento intracelular do genoma de begomovirus.

Via de sinalização antiviral mediada por NIK1

A via de sinalização antiviral mediada pelo receptor imune de membrana NIK1 (*NSP-Interacting Kinase1*) que protege as plantas contra a infecção por begomovirus foi inicialmente identificada pela interação de NIK1 com a proteína viral NSP. No início da infecção, o receptor transmembrana NIK1 é ativado por ácidos nucleicos derivados de begomovirus, que funcionam como PAMPs (*pathogen-associated molecular pattern*; Teixeira et al., 2019). Após a percepção da infecção viral, a proteína NIK1 dimeriza com ela mesmo ou com outro receptor, ativando-se por meio de autofosforilação, especificadamente em um resíduo de treonina na posição 474 na alça de ativação da cinase (Santos et al., 2010). NIK1 ativada intermedeia a fosforilação da proteína ribossomal L10 (RPL10) (Carvalho et al., 2008b) que é translocada para o núcleo, onde interage com LIMYB (*L10-interacting Myb domain-containing protein*). Esse complexo RPL10/LIMYB interage com promotores de genes de proteínas ribossomais, levando à repressão transcricional desses componentes da

maquinaria de tradução (Zorzatto et al., 2015). A repressão prolongada de genes relacionados à maquinaria de tradução promove a diminuição da tradução global de proteínas, incluindo de proteínas virais (Bustrolini et al., 2015). Como consequência, o processo de infecção é comprometido aumentando a resistência a begomovírus.

Em contrapartida, foi demonstrado que a proteína viral NSP liga à alça de ativação do domínio cinase de NIK1 impedindo a fosforilação de seu resíduo de treonina na posição 474, o que inibe a ativação da via de sinalização antiviral e torna a planta mais suscetível à infecção viral (Fontes et al., 2004). Como forma de superar a inibição de NIK1 por NSP, foi promovida a substituição do resíduo de treonina por um aspartato no resíduo chave de ativação 474, o que tornou NIK1 constitutivamente ativada (Santos et al., 2009). As plantas de *Arabidopsis* geneticamente modificadas (GM) pela superexpressão do mutante NIK1-T474 foram mais resistentes ao begomovírus CabLCV. Este evento GM conferiram a de tomateiros resistência aos begomovírus *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) e *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) (Brustolini et al., 2015; Zorzatto et al., 2015). Tanto *Arabidopsis* transgênicas como tomateiros transgênicos, superexpressando NIK1-T474D, exibiram menor acúmulo de DNA viral, menor taxa de infecção e sintomas mais atenuados comparados com as plantas controles, não transformadas. Nestas linhagens geneticamente modificadas, a eficiência de associação de mRNA viral aos polissomos foi inferior comprometendo a tradução dos genes virais, mecanismo este a que se atribuiu a capacidade de T474D de conferir resistência ao vírus.

Tem sido proposto que NIK1 sofre fosforilações sucessivas em diferentes resíduos de aminoácidos na alça de ativação sendo que as mutações nas posições Thr-474 e Thr-469 afeta a atividade de NIK1 antagonicamente (Santos et al., 2009, Machado et al., 2015; 2017). Enquanto a mutação Thr-474 para Ala-474 bloqueia a atividade de NIK1, a atividade de cinase de NIK1 é significativamente aumentada pela mutação Thr469 para Ala-469, indicando que fosforilação na posição 469 age negativamente para controlar a extensão de ativação da via de sinalização antiviral (Santos et al., 2009). Portanto, espera-se que o mutante duplo NIK1-T469A/T474D apresente atividade de autofosforilação aumentada em comparação com NIK1 e NIK1-T474D, o que sugere ser um alvo melhor para estratégias eficientes de resistência ao begomovírus em plantas cultiváveis.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Clonagem e Extração de DNA plasmidial de NIK-1

3.1.1 Construção de plasmídeos recombinantes

O clone pK7F-AtNIK1, contendo o cDNA de NIK1 fusionado a GFP, sob o controle do promotor 35S, e clonado no vetor binário de transformação de plantas pK7FWG2, foi previamente descrito por Fontes et al., 2004. O clone pK7F-NIK1T474D (pUFV632), descrito por Santos et al., 2009, contém o gene de GFP fusionado em frame na região carboxi-terminal do cDNA de NIK1 contendo uma mutação simples pela substituição da treonina 474 por resíduo de aspartado, sob o controle do promotor CaMV 35S. O clone pUFV1627 (pK7F-NIK1-T469A/T474D) foi previamente descrito (Santos et al., 2009) e contém o cDNA de NIK1 com mutação dupla nas posições 469 e 474 fusionado a GFP sob o controle do promotor S35. O clone pUFV710 (pK7-AtNIK1405A) corresponde ao mutante simples T469A, sob o controle do promotor S35. (Santos et al., 2009).

3.1.2 Extração de DNA plasmidial

Para a extração de DNA plasmidial de *Escherichia coli*, colônias isoladas crescidas em placas com LB sólido/seletivo foram inoculadas em 5 mL de LB líquido seletivo e incubadas a 37° C por 12 h, com rotação constante a 180 rpm. Após crescimento, as células foram centrifugadas a 5000 x g por 3 min, e ressuspensas em 200 µL de Tris HCl 150 mM, pH 8, contendo EDTA 10 mM, e incubadas por 10 min à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 200 µL do tampão de lise NaOH, 200 mM SDS 1% (p/v), e a mistura foi incubada por 5 min em gelo, seguido da adição de 200 µL da solução de neutralização, acetato de potássio 3M, pH 5,5 ajustado com ácido acético e incubada novamente por 5 min em gelo. O lisado celular foi centrifugado a 16000 x g por 10 min para remoção de restos celulares. Após a centrifugação, aproximadamente 500 µL do sobrenadante foram transferidos para microtubo, adicionados 600 µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico, na proporção de 25:24:1, respectivamente. Após agitação rápida em vórtex por 30 segundos, a mistura foi centrifugada por 2 min a 16000 x g. O sobrenadante foi re-extraído com

clorofórmio, e o DNA plasmidial precipitado com etanol 100% (v/v), lavado com etanol 70% (v/v) e resuspenso em água milli-q autoclavada contendo RNase a 1 mg/ml e incubado por 15 min a 37° C. Para avaliar a integridade do DNA extraído, 3 µL da amostra foram corridos em gel de agarose 1% (p/v) com brometo de etídeo 0,1 µg.mL⁻¹

3.1.3 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

Células eletrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens*, estirpe GV 3101, foram transformadas com o clone pK7F-AtNIK1-T469A/T474D e pK7-AtNIK1405A, por eletroporação (2000mv, 3-4ms) e incubadas em 1 mL de meio LB (Luria Bertani) por 2 horas, para recuperação da parede celular. Após o período de incubação, as células transformadas foram centrifugadas por 2 minutos a 6.000 rpm e plaqueadas em meio LB sólido, contendo o antibiótico gentamicina (50 mgL⁻¹) para seleção da estirpe de agrobactéria e o antibiótico de seleção do vetor, canamicina (100mgL⁻¹), a 28°C por 48h.

Os transformantes selecionados foram inoculados em 250 mL de meio de cultura LB acrescido dos antibióticos de seleção e cultivadas em um agitador do tipo orbital durante 16 horas, a uma frequência de agitação de 180-200 rpm e temperatura de 25-28°C até atingir a fase exponencial de crescimento (A600 entre 0,7 e 1,0). A transformação das plantas foi feita utilizando o método de mergulhia floral, descrito em Bent (2006).

3.1.4 Confirmação da inserção dos transgenes

A confirmação do transgene foi realizada por PCR do DNA genômico extraído das linhagens transformadas. Foram utilizados os oligonucleotídeos descritos na Tabela 1 para a confirmação da inserção de pK7F-AtNIK1-T474D/T469A-GFP e pK7-AtNIK 1405A no genoma de *Arabidopsis*, de acordo com a construção que contém o vetor e o gene de interesse.

Após a obtenção das plantas, foram coletadas amostras foliares individualmente para purificação de DNA genômico (Dellaporta et al., 1983). O DNA foi usado como molde na reação de PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos para AtNIK1-T474D/T469A-GFP (AtNIK1FG-3773 e AtNIK1RGst-4204) e para pK7-

AtNIK1405A (AtNIK1-3774 e MC 36), conforme descrito na Tabela 1.

3.1.5 Ensaio de crescimento de raiz e hipocótilo

Nestes ensaios, foram utilizados os genótipos Columbia (Col-0), *nik1*, *nik1/NIK1-T474D*, Col0/NIK1-T469-L1, Col0/NIK1-T469A-L3, Col0/NIK1-T74D-T469A-L1, Col0/NIK1-T474D-T469A-L4, Col0/NIK1-T474D-T469A-L5, *nik1/NIK1-T474D-T469A-L2*, *nik1/NIK1-T474D-T469A-L4*, *nik1/T474D-T469A-L5*. As sementes foram desinfestadas com solução contendo etanol 75% (V/V) e hipoclorito de sódio 10% (V/V), durante 15 minutos, e posteriormente lavadas duas vezes com etanol 100%. Após a desinfestação, as sementes foram colocadas em placas de petri contendo meio MS 1/2 força (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com 1% de sacarose. As placas contendo as sementes foram armazenadas a 4 °C por 72 h para quebra de dormência, e, posteriormente, as placas ficaram expostas verticalmente, sob um fotoperíodo de 16 horas luz / 8 horas escuro a 22 °C. As medições do comprimento do hipocótilo e da raiz foram feitas com o uso de paquímetro digital, após 7 dias de crescimento em câmara de crescimento. Para todos os genótipos e condições, foram tomadas as medidas da raiz e do hipocótilo de pelo menos 20 plantas.

3.1.6 Análise de expressão de transgenes

RNA total de folhas das linhagens de Arabidopsis Columbia (Col-0), *nik1*, *nik1/T474D*, Col0/T469A-L1, Col0/T469A-L3, Col0/T74D-T469A-L1, Col0/T474D-T469-L4, Col0/T474D-T469A-L5, *nik1/T474D-T469A-L2*, *nik1/T474D-T469A-L4*, *nik1/T474D-T469A-L5* foi extraído utilizando o tampão de extração Lise SDS 2% (p/v), ácido cítrico 132 mM, citrato de sódio 68 mM, EDTA 1 mM, e solução de precipitação, NaCl 4M, ácido cítrico 32 mM, citrato de sódio 16 mM, seguido por precipitação com isopropanol. A integridade do RNA total isolado foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) em TBE 1X (Tris Base 0,089 M, ácido bórico 0,089 M e EDTA 0,05 M, pH 8,0), corado com brometo de etídeo 0,1 µg.mL⁻¹. O RNA total foi quantificado no espectrofotômetro e a concentração foi expressa em µg.µL⁻¹, e a integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) corado com brometo di etídeo 0,1 µg.mL⁻¹. O RNA total isolado (4 µg) foi tratado com DNase livre de RNase (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante e utilizados

para obtenção do cDNA, usando a enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen), de acordo com determinação do fabricante.

A quantificação absoluta dos níveis do transcrito de AtNIK1 das plantas que foram utilizadas no ensaio de infecção viral foi determinada por SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) em um sistema de PCR em tempo real 7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems), com oligonucleotídeos específicos para os genes de interesse, conforme a Tabela 2. Três réplicas técnicas de cada amostra foram utilizadas. As condições de amplificação foram 95 °C por 10 min e 40 ciclos de 94 °C por 15 s e 60 °C por 1 min. Foi utilizado o método comparativo de Ct: $2^{-\Delta Ct}$, com objetivo de quantificar a expressão gênica e o gene de actina como controle endógeno.

3.1.7 Ensaio de infecção

O ensaio de infecção nas linhagens mutantes de *Arabidopsis thaliana* foi realizado, utilizando-se os clones infecciosos do begomovírus cabbage leaf curl vírus (CabLCV) por meio de biobalística (Fontes et al., 2004). O DNA plasmidial foi isolado e quantificado por espectrofotometria a 260 nm e sua qualidade verificada por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v). Foram preparadas soluções com 10 µg de DNA de cada componente viral, precipitados em micropartículas de tungstênio na presença de espermidina 15 mM, e de CaCl₂ 1M, e lavados com etanol absoluto. As partículas de tungstênio foram espalhadas em membranas, as quais foram secas a temperatura ambiente e posteriormente colocadas no acelerador de partículas, e o alvo foi o meristema foliar das plantas transgênicas crescidas em vasos individualizados.

As plantas foram mantidas em câmara de crescimento a 22°C, onde foi realizada a análise visual de sintomas e a coleta de amostras foliares para extração de DNA total, feita a cada 7 dias, por um período de 28 dias após o bombardeamento, com objetivo de monitorar o progresso da infecção por meio de PCR em tempo real. Para o bombardeamento do DNA viral, foram usadas 10 plantas por linhagem independente (WT, NIK1, mutante simples, duplo mutante) e 5 plantas como controle, no estágio de desenvolvimento correspondente a 2 folhas verdadeiras.

3.1.8 Diagnóstico molecular da infecção viral por PCR convencional.

Para confirmação molecular da presença do vírus em plantas sintomáticas, o DNA total das plantas foi extraído (Dellaporta et. al., 1983) e usado como molde em reações de PCR, utilizando oligonucleotídeos universais, que amplificam um fragmento específico do componente viral A (Rojas et al., 1993). Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1% (p/v), corado com brometo de etídeo $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os oligonucleotídeos universais utilizados são descritos na Tabela 3.

3.1.9 Quantificação do DNA viral por PCR quantitativo.

A acumulação de DNA viral foi medida por PCR quantitativa (qPCR). As reações foram preparadas em um volume final de 10 μl usando o Fast SYBR Green Master Mix (Bio-Rad) de acordo com as instruções do fabricante e analisadas em um sistema 7500 Real Time PCR (Life Technology). Os primers específicos (Tabela 3) do vírus foram projetados usando Primer Express 3.0 (Life Technology) e testados por PCR convencional usando plasmídeos contendo o DNA-B completo de cada vírus (106 cópias por reação). Para a quantificação do DNA viral, curvas padrão foram preparadas usando diluições seriadas desses clones (100 a 106 cópias do genoma viral por reação). A unidade genômica refere-se a uma cópia do DNA-B de CabLCV. As curvas padrão foram obtidas por análise de regressão dos valores de Ct de cada uma das três réplicas de uma determinada diluição em relação ao logaritmo da quantidade de DNA em cada diluição. Para a quantificação absoluta do número de moléculas de DNA viral nos diferentes tratamentos, 100 ng de DNA total das plantas infectadas foram utilizados nas reações de qPCR contendo primers específicos para vírus. Para cada amostra, foram feitos três réplicas de plantas com uma réplica biológica para cada linhagem.

3.1.10 Análise de segregação

As sementes das plantas transformadas com o duplo mutante e o mutante simples de NIK1, na primeira geração (T1), foram desinfestadas com solução contendo etanol 75% (v/v) e hipoclorito de sódio 10% (v/v), durante 15 minutos, e posteriormente lavadas duas vezes com etanol 100%. Após a desinfestação, as sementes foram germinadas em placas de petri contendo meio MS, e o antibiótico canamicina (100 mg/L) para a contagem de quantas plantulas se desenvolveram, e

morreram no período de 10 dias. A contagem foi tabelada em Excel, e feito a distribuição χ^2 (qui-quadrado) (Tabela 4).

3.2 Análise do gene de suscetibilidade NIG e engenharia genética para a obtenção do duplo mutante.

3.2.1 Confirmação dos nocautes e ensaios de infecção na linhagem *nig*

A confirmação do nocaute de NIG foi realizada por PCR do DNA genômico extraído pelo método Dellaporta et al. (1983), e utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene de NIG e para o T-DNA. Para confirmação das pantas *nisp*, foi realizado RT-PCR, a extração do RNA utilizando o tampão de extração CTAB (Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide) 2% (w/v), PVP 2%, (w/v), 100 mM Tris-HCL, 25 mM EDTA, 20mM NaCl, e 2% de mercaptoethanol), preparado com água DEPC, seguido por precipitação com isopropanol. A integridade do RNA total isolado foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,5% em TBE 1X (Tris Base 0,089 M, ácido bórico 0,089 M e EDTA 0,05 M, pH 8,0), corado com brometo de etídeo 0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O cDNA foi utilizado como molde para amplificação dos genes expressos de NISP com oligonucleotídeos específicos do gene (Tabela 5).

Para o ensaio de infecção dos nocautes de NIG de *Arabidopsis thaliana* foi realizado, utilizando-se os clones infecciosos do begomovírus *Cabbage leaf curl vírus* (CabLCV) por meio de biobalística (Fontes et al., 2004), como já citado anteriormente.

3.2.2 Análise de desenvolvimento morfológico dos nocautes

Sementes dos nocautes NIG e NISP foram desinfestadas com solução contendo etanol 75% (v/v) e hipoclorito de sódio 10% (v/v), durante 15 minutos, e posteriormente lavadas duas vezes com etanol 100%. Após a desinfestação, as sementes foram colocadas em placas de petri contendo meio MS, sem a adição de antibiótico. As placas contendo as sementes foram armazenadas a 4 °C por 72 h para quebra de dormência.

Depois de 7 dias, 24 plantulas de cada genótipo (*nig*, *nisp* e Col-0), foram transplantadas em vasos contendo 110g de substrato, e, subsequentemente, submetidos em câmaras de crescimento com fotoperíodos para dias longos (16 h luz)

e para dias curtos (10 h luz). A irrigação foi controlada com a adição de 600 mL de água por bandeja uma vez por semana, chegando a um total de 7 avaliações com 56 dias após a germinação. Os parâmetros avaliados foram diâmetro da roseta, número de folhas e comprimento do pendão floral, medido por paquímetro digital.

3.2.3 Desenho dos gRNAs e construção do vetor CRISP/Cas

Os sítios alvos para a enzima Cas9 (*CRISPR-associated protein 9*) foram identificados no gene a ser silenciado, por meio de escaneamento nos éxons de DNA genômico para sequências de 23-pb com a configuração 5'-N19NGG-3'. As sequências alvos identificadas foram avaliadas por especificidade na página web do software *CRISPR-P 2.0V* (<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/>). Foi avaliado também a porcentagem de guaninas e citosinas, bem como, sítios de enzimas de restrição para a confirmação das plantas editadas.

A sequência alvo- gRNA- foi fusionada a sequência universal (*Scaffold*) por PCR do molde pCBC-DT1T2, utilizando quatro oligonucleotídeos (Tabela 7). O fragmento amplificado de 626 pb, apresenta extremidades cegas, contendo sítios de restrição para a enzima *BsaI* em cada extremidade. Posteriormente o fragmento foi purificado utilizando o KIT Quiagen.

O fragmento foi inserido no vetor binário de transformação de plantas (pEE-401E) contendo o gene da Cas9 pela reação de Golden Gate com a enzima de restrição *BsaI* e T4 DNA ligase. Subsequentemente, *E. coli* supercompetentes foram transformadas por choque térmico com o produto da reação e selecionadas em meio contendo Canamicina (100mg/L).

3.2.4 Confirmação das plantas editadas

Plantas de *Arabidopsis thaliana*, nocautes para o gene *NIG*, foram transformadas pelo método mergulhia floral, e as sementes foram plaqueadas em placas de petri contendo meio MS e adição de higromicina (20mg/L) para a seleção dos transformantes. Após a seleção dos transformantes, foi coletado o material vegetal das plantas crescidas em meio seletivo para a extração de DNA pelo método Dellaporta et al., 1983. A integridade do DNA total foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v), corado com brometo de etídeo (0,1 µg.mL⁻¹). O DNA total foi

tratado com RNase livre de DNase.

O DNA total, serviu como molde para a amplificação do gene de NISP com oligonucleotídeos específicos para o gene descritos da Tabela 6, gerando um fragmento de 700 pb. Os fragmentos foram purificados por Kit Quiagen e submetidos a clivagem pela enzima *Eco*NI a 37° C por 1 h. Os fragmentos gerados a partir da clivagem foram verificados por eletroforese em gel de agarose 1 % (p/v).

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Mutação simples e dupla nos sítios de fosforilação de NIK1 e obtenção de linhagens transgênicas

A proteína NIK1 está estruturalmente organizada como os receptores do tipo cinase (RLKs), contendo um domínio de 23 resíduos de aminoácidos extracelular, com repetições de leucina (LRR), seguido de um segmento transmembrana hidrofóbico, e um domínio serina/treonina cinase voltado para o citossol, apresentando 11 subdomínios típicos de proteínas cinases eucarióticas (Fontes et al., 2004, Sakamoto et al., 2012). NIK1 foi descrito como um receptor de sinalização que medeia uma resposta de defesa antiviral, tendo sido demonstrado *in vitro* que sua atividade cinase pode ser inibido pela proteína NSP de geminivírus, e que seu nocaute aumenta a suscetibilidade à infecção por CabLCV (Fontes et al, 2004). A Figura 1 esquematiza as regiões características das proteínas LRR-RLKs, incluindo as regiões ricas em leucina (LRR), o domínio transmembrana (TM) e o domínio cinase. É indicado também, os sítios que foram mutados e as mudanças dos resíduos de aminoácidos.

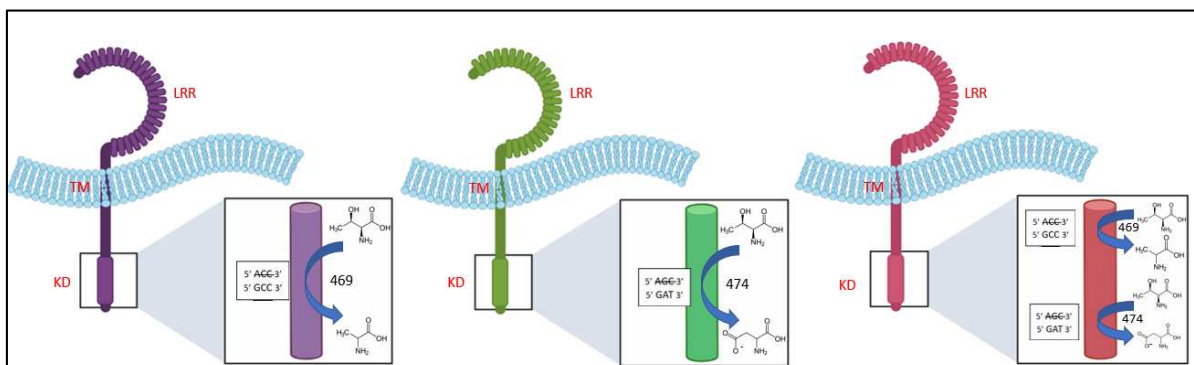


Figura 1. Esquema das mutações dos sítios de fosforilação de NIK1. LRR - regiões ricas em leucina; TM - domínio transmembrana; KD – domínio cinase.

Já foi demonstrado que os mutantes, NIK1-T474D e NIK1-T469A possuem atividade de fosforilação do substrato superior à NIK1 normal (Santos et al., 2010). A substituição do resíduo Thr-474 (sítio importante para ativação de NIK1), por um resíduo de aspartato (que mimetiza fosforilação) promove ativação constitutiva do receptor, condicionando uma alta atividade cinase (Brustolini et al., 2015; Santos et al., 2010; Zorzatto et al., 2015). O mutante simples NIK1-T469A apresenta a substituição do resíduo de Treonina, e acredita-se que a fosforilação nesse sítio reduza a sua atividade de cinase, e que, portanto, a substituição nesse sítio por um resíduo de alanina, reverta essa repressão da fosforilação.

Como já foi descrito, é esperado que o mutante duplo NIK1-T469A/T474D apresente atividade de autofosforilação aumentada em comparação com NIK1 e NIK1-T474D. Para validar essa hipótese, primeiramente os clones foram purificados e transformados em *Agrobacterium tumefaciens*. Sementes de *Arabidopsis thaliana nik1* e Col-0, foram germinadas em solo, após o transplante para vasos individuais, e, posteriormente ao surgimento do pendão floral, foram utilizadas para a produção das linhagens transgênicas independentes. As linhagens obtidas foram, COL0-NIK1T469A-L1, COL0-NIK1T469A-L3 (expressando o mutante simples), COL0-NIK1T474D-T469A-L1, COL0-NIK1T474D-T469A-L4, COL0-NIK1T474D-T469A-L5 (superexpressando o mutante duplo), NIK1T474D-T469A-L2, NIK1T474D-T469A-L4, NIK1T474D-T469A-L5 (expressando o mutante duplo). As demais linhagens transgênicas, NIK1-8 (expressando AtNIK1-GFP), *nik1*-T474D-6 (expressando o mutante simples, constitutivamente ativo de NIK1) e *nik1* (nocaute) foram obtidas previamente (Carvalho et al., 2008; Brustolini et al., 2015).

A incorporação dos transgenes foi inicialmente identificada pela germinação em meio seletivo contendo canamicina (100 mg/L). Em seguida, monitorada por PCR, utilizando o DNA genômico como molde e oligonucleotídeos específicos para NIK1 (Tabela 1). Após a seleção dos transformantes, foi avançado as gerações, para assim, obter plantas em homozigose e com inserção simples do gene. Levantando o total de sementes germinadas, germinadas vivas e germinadas mortas, foi realizado teste de χ^2 (qui-quadrado (5% p 3,81), onde foi possível selecionar três linhagens com inserção única para os genótipos superexpressando e complementadas para o duplo mutante,

e duas linhagens superexpressando o mutante simples (Tabela 4).

Os níveis de expressão dos mutantes e suas linhagens de NIK1 foram examinados por RT-PCR convencional (Figure 2A e 2B) e quantificados por RT-PCR em tempo real utilizando como molde cDNA sintetizado a partir de RNA total (Figura 2C), e utilizando oligonucleotídeos específicos para AtNIK1 (Tabela 2).

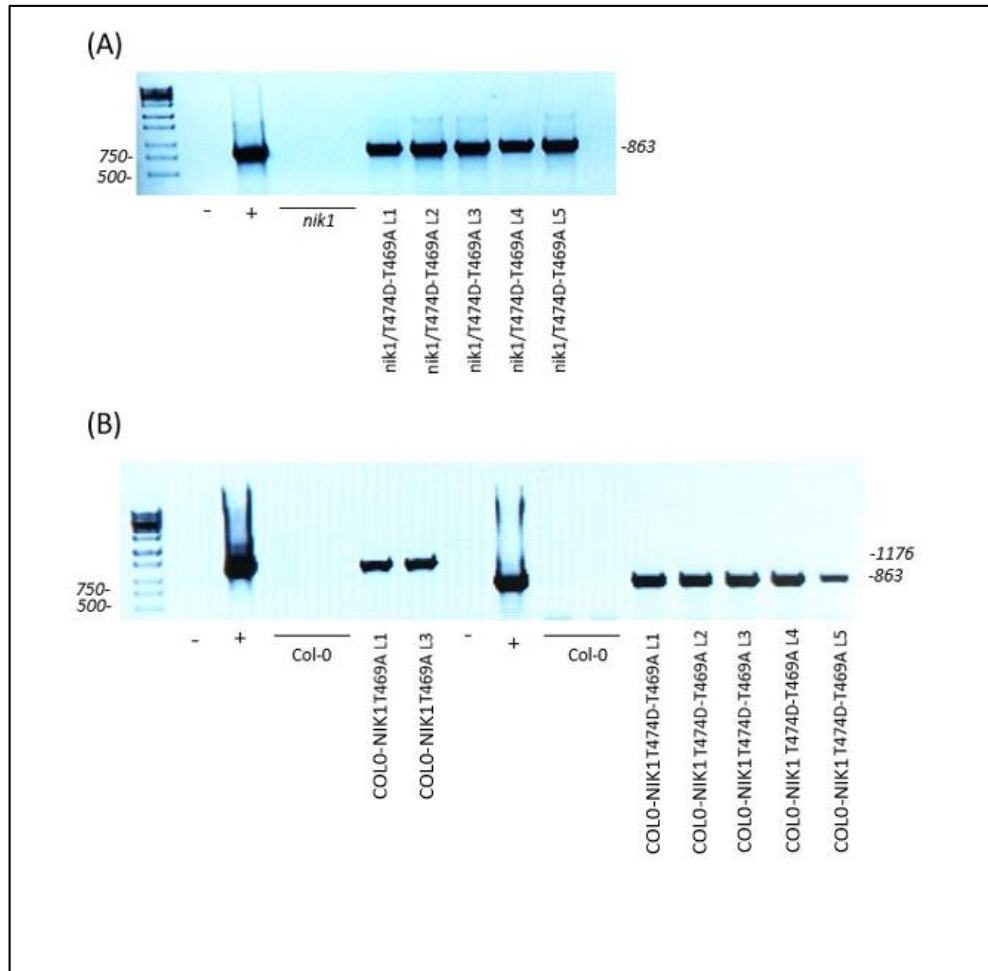


Figura 2. Diagnóstico molecular dos mutantes de NIK1. (A) Gel de confirmação das linhagens transformadas em *nik1*. PCR diagnóstico da incorporação dos transgenes das cinco linhagens *nik1*-T469A/T474D. (B) Gel de confirmação das linhagens transformadas em Columbia. PCR diagnóstico da incorporação dos transgenes das cinco linhagens T469A/T474D e duas linhagens T469A.

A expressão do transgene NIK1 foi muito superior nas linhagens superexpressando o mutante simples, COL0-NIK1T469A-L1, COL0-NIK1T469A-L3, e os mutantes duplo COL0-NIK1T474D-T469A-L1, COL0-NIK1T474D/T469A-L4, COL0-NIK1T474D/T469A-L5, sob controle do promotor 35S. As linhagens transgênicas expressando o mutante duplo, *nik1*/T474D-T469A-L2, *nik1*/T474D-T469A-L4, *nik1*/T474D-T469A-L5, exibiram acúmulo de NIK1 ligeiramente superior a

nik1 nocaute e muito inferior àquele das demais linhagens transgênicas (Figura 3C). Esta variação na expressão dos transgenes pode constituir um fator limitante para se avaliar a eficiência do mutante duplo na infecção em comparação com NIK1 e com o mutante simples.

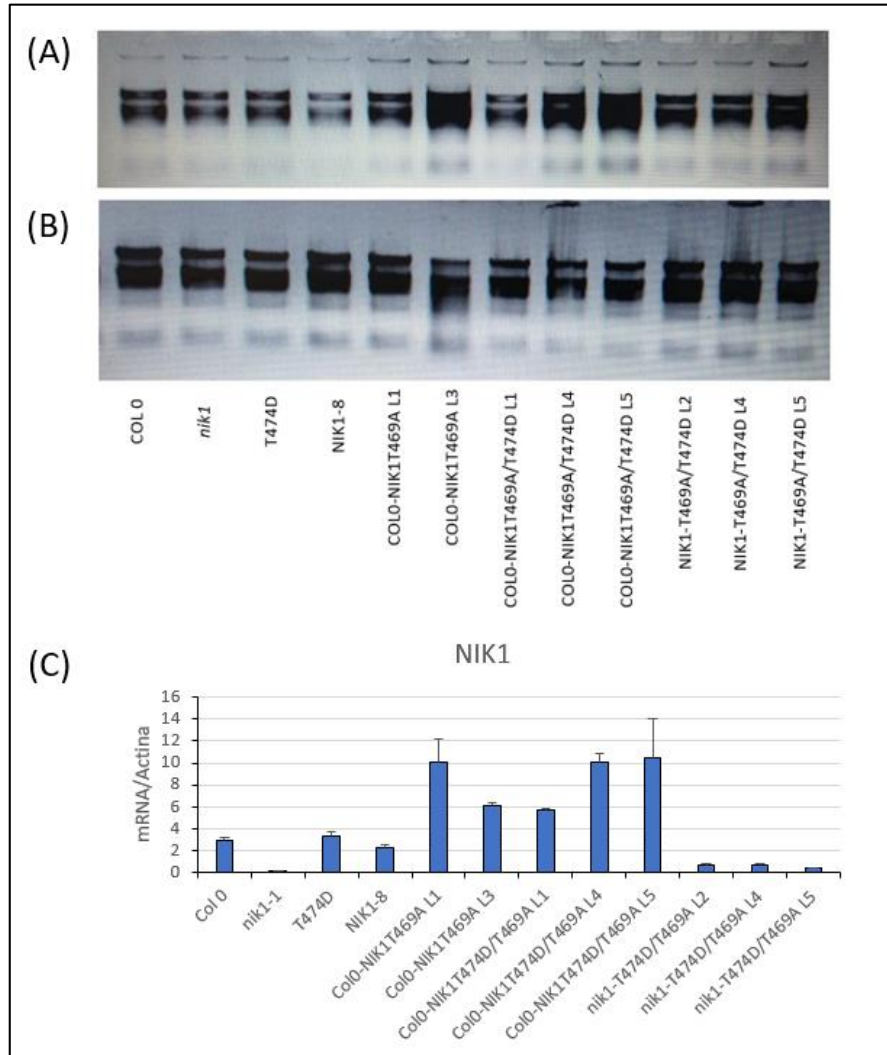


Figura 3. Análise da expressão dos transgenes. (A) Extração de RNA das linhagens transgênicas T469A, T474D/T469A, *nik-1*/T474D/T469A e controles, Columbia, *nik-1*, T474D e NIK1-8 não tratado com DNase (B) RNA total das linhagens transgênicas T469A, T474D/T469A, *nik-1*/T474D/T469A e controles, Columbia, *nik-1*, T474D e NIK1-8 após tratamento com DNase. (C) Determinação quantitativa do acúmulo dos transcritos de NIK1 nas linhagens indicadas na figura. Níveis de transcritos de NIK1 foram determinados por RT-qPCR em plantas Col-0, *nik-1*, T474D, NIK1-8, T469A L1, T469A L3, T474D/T469A L1, T474D/T469A L4, *nik-1*/T474D/T469A L4 e *nik-1*/T474D/T469A L5. Expressão gênica foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta Ct}$, e Actina foi utilizada como controle endógeno. As barras indicam o desvio padrão da média, baseado em replicatas técnicas.

A mutacao dupla NIK1T469AT474D e simples T469A intensifica a sinalizacao de defesa e confere resistencia a geminivures

Pela complementação e superexpressão dos genes de NIK1 com mutações simples e duplas, é esperado que as plantas transgênicas, apresentassem características bioquímicas e fisiológicas diferentes em comparação com plantas controle. Os mutantes de *nik1* e as linhagens transgênicas expressando COL0-NIK1T469A-L1, COL0-NIK1T469A-L3, COL0-NIK1T474D-T469A-L1, COL0-NIK1T474D-T469A-L4, COL0-NIK1T474D-T469A-L5, *nik1*/T474D-T469A-L2, *nik1*/T474D-T469A-L4, *nik1*/T474D-T469A-L5 foram crescidas em meio MS puro e como parametro de desenvolvimento, foi avaliado o crescimento da raiz (Figura 4). Linhagens Col-0, *nik1* e T474D foram incluídas no ensaio como controles positivo e negativo.

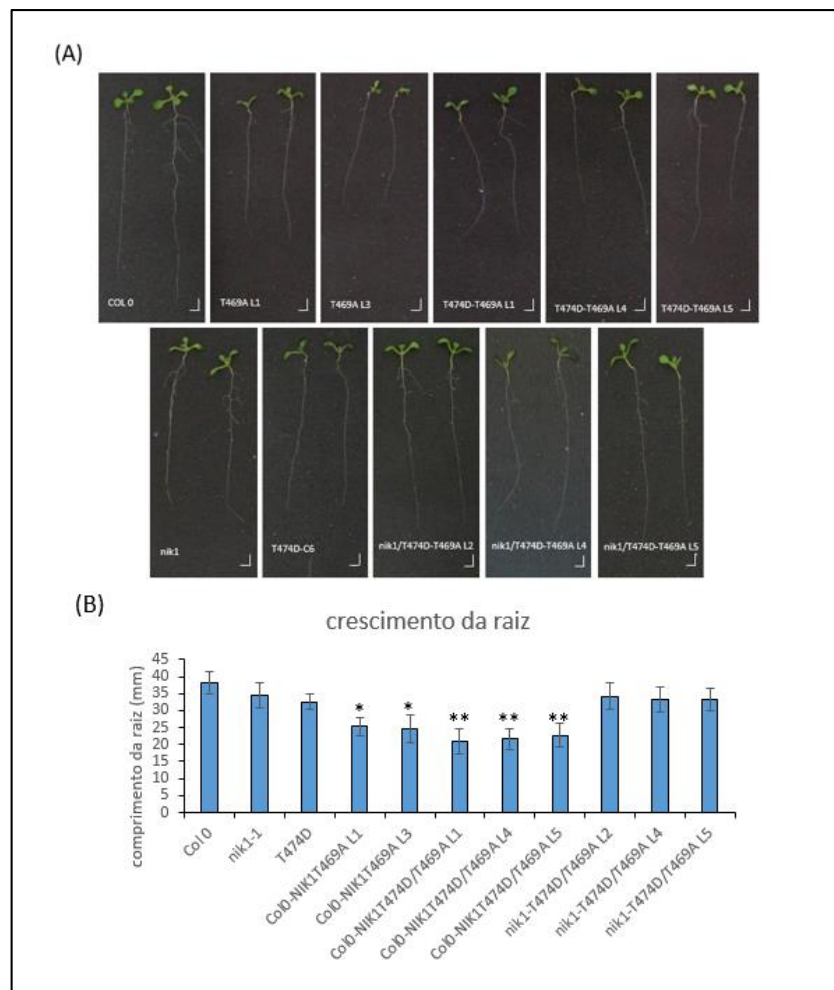


Figura 4. Superexpressão dos mutantes duplo (T474D/T469A) e simples (T469A) afetam o

crescimento da raiz. (A) Crescimento de raiz em dias longos (16h luz) em meio MS puro. (B) Barras de crescimento de raiz em dias longos (16h luz) em meio MS puro. Barras seguidas de *, ** ou *** diferem significativamente de Columbia pelo teste T não paramétrico ao nível de significância de $p < 0.05$.

As linhagens complementadas com o duplo mutante *nik1/T474D-T469A*, apresentaram o crescimento da raiz levemente menor do que o dos controles *nik1*, T474D, e Col-0, enquanto as linhagens superexpressando o duplo mutante e o mutante simples, apresentaram diferenças maiores no crescimento da sua raiz comparadas com Col-0.

O crescimento da raiz comprometido e a baixa germinação das linhagens superexpressando NIK1 constitutivamente ativado em T469A e T469A/T4874D pode ser devido à supressão da tradução e fotossíntese, já que ativação da sinalização mediada por NIK1 leva à repressão de genes envolvidos na tradução e fotossíntese, fatores estes ligados ao desenvolvimento de plantas (Zorzatto et al., 2015; Teixeira, 2022). Para confirmar a essa hipótese, a expressão de genes marcadores da via de NIK1, como o de fotossíntese (*PSII* e *FD1*) e ribossomal (*RPL28* e *S25*), foram quantificados por RT-qPCR nas linhagens transgênicas expressando versões mutadas de NIK1 constitutivamente (Figura 5). A expressão de mutantes de NIK1 constitutivamente ativados, T474D e Col0-NIK1T469A/T474D promove repressão do genes marcadores da via de sinalização de NIK1, *RPL28*, *S25*, envolvidos em tradução e *FD1*, *PSII*, envolvidos no processo de fotossíntese. Resultados similares foram demonstrados para as linhagens expressando o duplo mutante em *nik1*, embora a expressão dos transgenes tenha sido muito inferior em *nik1* do que em Col-0 (Figura 3). Estes resultados indicam que a ativação constitutiva de NIK1 é efetiva em manter o nível de repressão mais acentuado dos genes marcadores da via de sinalização mediada por NIK1.

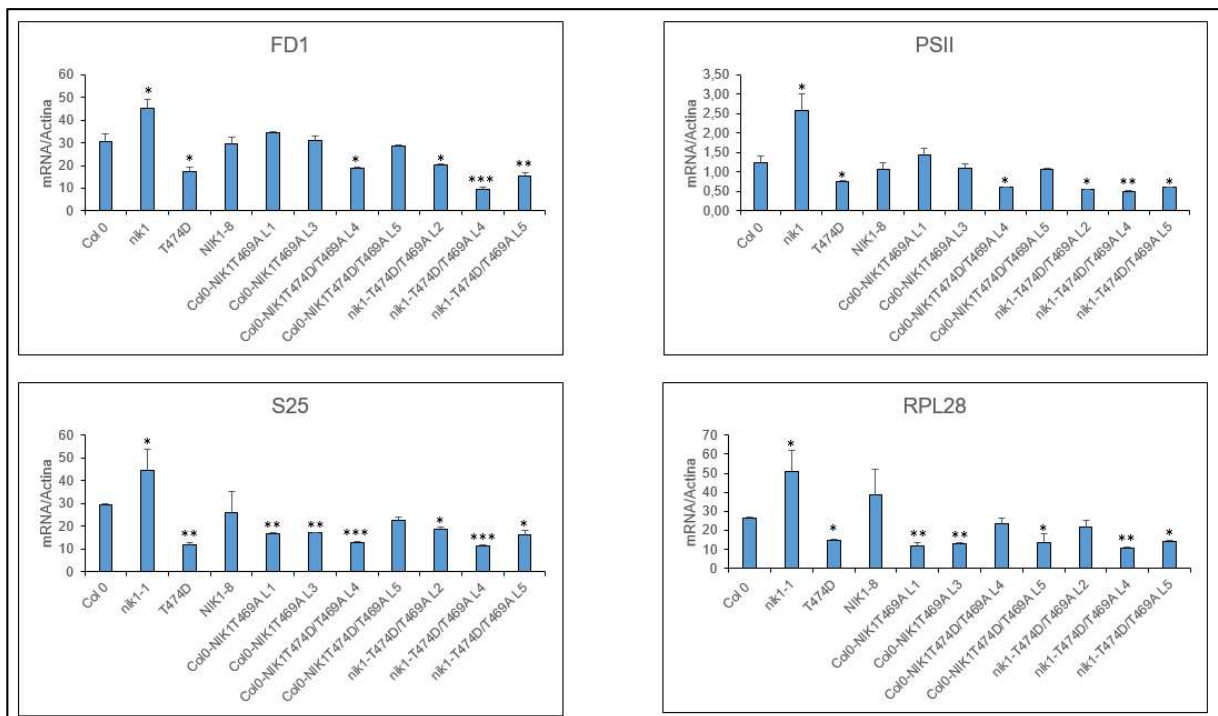


Figura 5. RT-qPCR de genes marcadores da via de sinalização de NIK1 em Col-0 e nas linhagens transformadas. Análise de expressão dos genes marcadores da via de NIK1, fotossíntese (FD1 e PSII) e controle de tradução (RPL28 e S25) com os mutantes Col-0, *nik-1*, T474D, NIK1-8, Col0-NIK1T469A L1, Col0-NIK1T469A L3, Col0-NIK1T474D/T469A L4, Col0-NIK1T474D/T469A L5, *nik-1*/T474D/T469A L2, *nik-1*/T474D/T469A L4 e *nik-1*/T474D/T469A L5. Barras seguidas de *, ** ou *** diferem significativamente de Columbia pelo teste T não paramétrico ao nível de significância de $p < 0.05$.

Para avaliar a suscetibilidade à infecção por begomovírus, os mutantes de NIK1 e os controles foram infectados com os vetores infecciosos do begomovírus CabLCV por biobalística. As plantas controles Col-0, *nik-1*, T474D e NIK1-8 desenvolveram os sintomas típicos de infecção por CabLCV, porém com diferentes intensidades. Os sintomas da infecção dos controles, variaram na severidade, desde a redução no crescimento, como sintomas de clorose, e necrose sistêmica em Col 0, *nik-1* e NIK1-8. A planta expressando T474D, apresentou retardo no crescimento, e a incidência de clorose e necrose foi observado com baixa intensidade (Figura 6A). A superexpressão do mutante simples (T469A) e do duplo mutante (T474D/T469A) apresentaram um leve retardo em seu crescimento, foram observados os sintomas de infecção por CabLCV, porém, menores que comparados com os controles. Para as linhagens *nik1*/T474D-T469A foi possível observar pouca incidência de necrose e clorose.

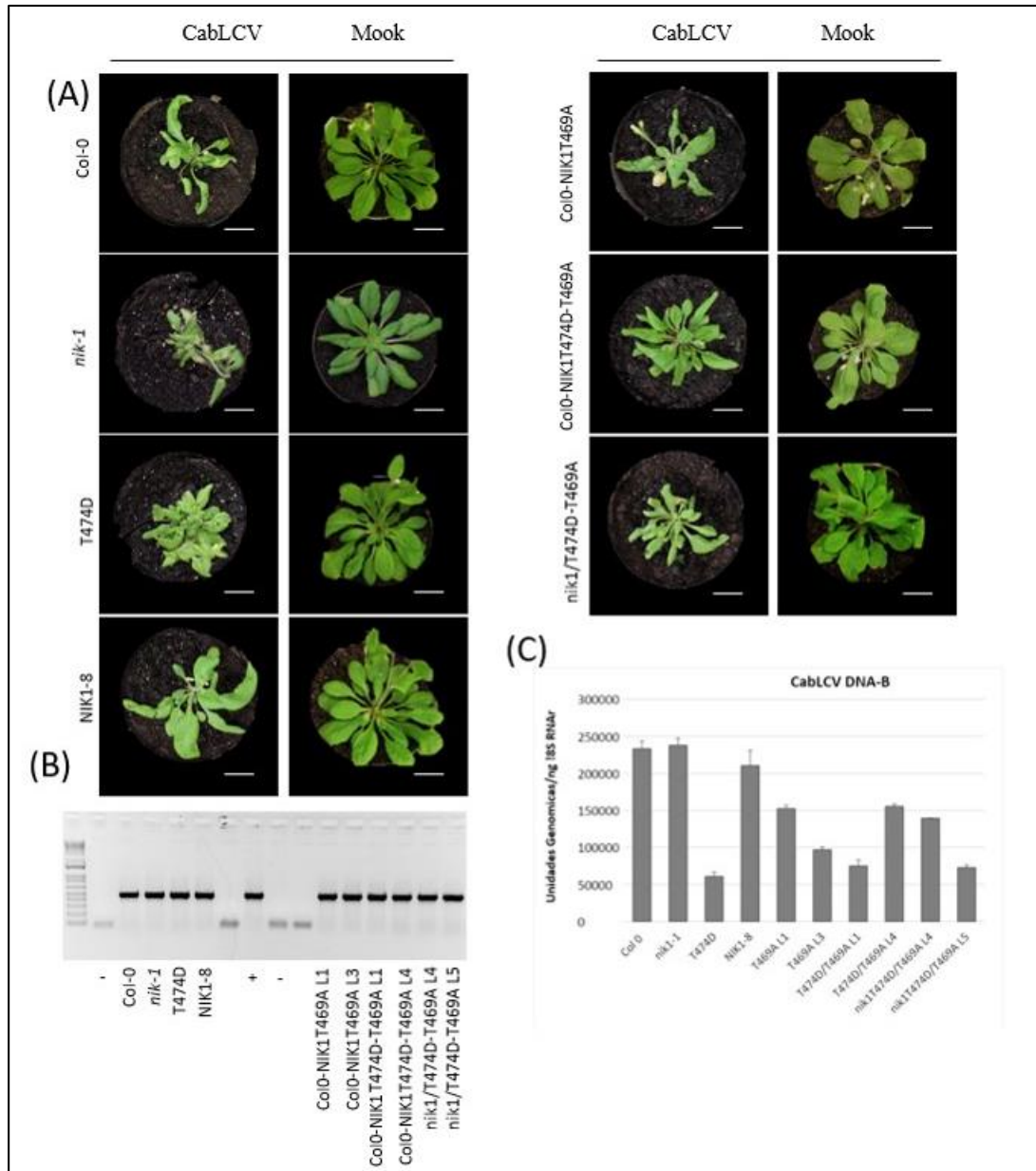


Figura 6. Ensaio de infecção viral em mutantes de NIK1. (A) Sintomas associados à infecção por CabLCV em mutantes duplo (T474D/T469A) e mutante simples (T469A) de *Arabidopsis thaliana* aos 21 dias pós-inoculação. (B) Confirmação das plantas da infecção em plantas mutantes e controles com os oligonucleotídeos, específicos para o DNA A (PBL1v 2040 e PCRC1). (C) RT-qPCR da carga viral em em mutantes de NIK1. DNA total das plantas foi extrsído aos 21 dias após inoculação, e para a quantificação do DNA viral foi, utilizado os oligonucleotídeos, específicos para o componente B de CabLCV. Actina foi utilizada como controle endógeno. As barras indicam o desvio padrão da média, baseado em repetições técnicas.

Para a confirmação da infecção, o acúmulo do DNA viral foi detectado em

plantas sintomáticas por RT-PCR com oligonucleotídeos para o DNA A (PBL1v 2040 e PCRC1) de begomovírus (Figura 6B). Os resultados da quantificação da carga viral demonstraram que as plantas nocautes *nik-1* apresentou maior acúmulo do vírus em comparação as plantas Col-0. O menor acúmulo da carga viral, foi demonstrado pelo mutante T474D (Figura 6C). Esse resultado também foi demonstrado por Zorzatto et al., (2015), sendo que o T474D é constitutivamente ativado e não é inibida pela proteína viral NSP (Santos et al., 2009).

As linhagens superexpressando os mutantes simples e duplo, apresentaram baixo acúmulo viral em comparação a Col-0, com a maior carga viral, sendo que nas linhagens T474D-T469A L1 e T469A L3 o acúmulo do DNA viral foi ligeiramente maior comparado ao mutante T474D, sugerindo que a substituição de Thr-469 por alanina alivia a repressão da fosforilação e acarreta no aumento da atividade da cinase. Mesmo com a baixa expressão das três linhagens mutantes expressando *nik-1/T474D-T469*, o acúmulo do DNA viral foi baixo, ou seja, o mutante duplo T469A/T474D é eficiente em proteger as plantas contra begomovírus mesmo em níveis muito baixos de expressão.

A inativação dos genes de suscetibilidade NISP e NIG não afeta crescimento e desenvolvimento de *Arabidopsis thaliana*

Baseado em estudos das interações entre as proteínas virais e as proteínas do hospedeiro, foram identificados possíveis genes de suscetibilidade, *NIG* e *NISP*, com o potencial de gerar resistência recessiva a begomovírus. Uma vez que esses vírus estão em constante mutações, podendo contornar o sistema de defesa do hospedeiro, (Zorzatto et al., 2015), a resistência recessiva tem o potencial de ser mais duradoura, já que as mutações de genes do hospedeiro são mais recalcitrantes a mutações evolutivas.

Recentemente, foi demonstrado que o gene de susceptibilidade *NISP* (*NSP-Interacting syntaxin 6-domain-containing protein*), conforme descrito por Gouveia-Mageste et al. (2021), auxilia no processo de infecção viral e funciona fundamentalmente como gene de resistência recessiva. O gene *NIG*, que auxilia o complexo NSP-DNAv no transporte nucleocitoplasmático, também tem sido caracterizado como gene de

suscetibilidade (Carvalho et al., 2008). Entretanto, o caráter de suscetibilidade de *NIG* foi apenas demonstrado em estudos de superexpressão, observando sintomas intensificados da infecção e alta concentração do DNA viral em plantas superexpressando *NIG*. Estudos de genética reversa pelo silenciamento de *NIG* não foram conduzidos e, portanto, o caráter de resistência recessiva do referido gene não foi conclusivamente determinado.

Ensaio de infecção em plantas *nig-1*, nocautes para o gene *NIG*, e Col-0 como controle, foram realizadas, com o vírus CabLCV. (Figura 7).

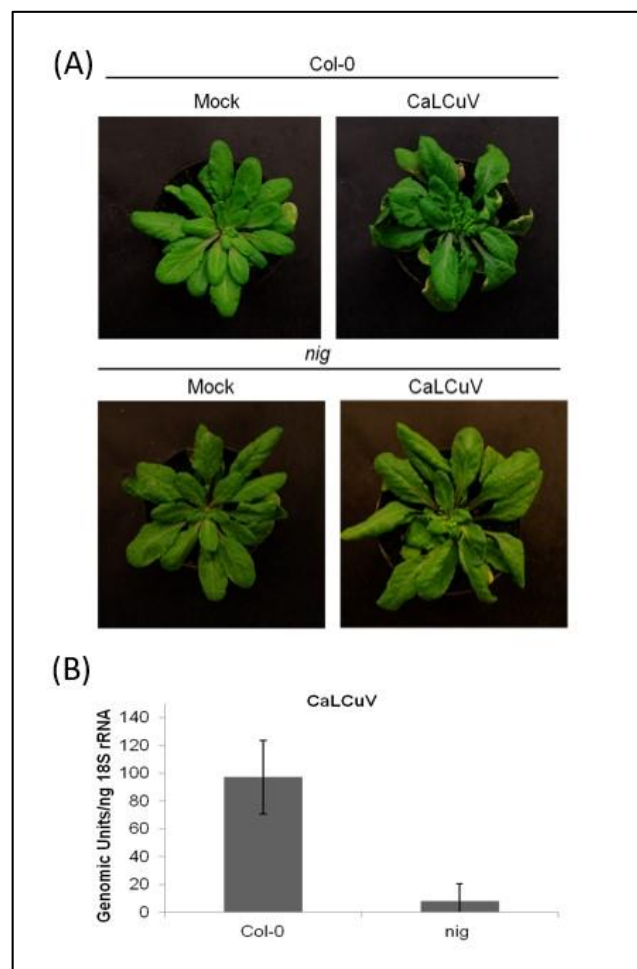


Figura 7. *NIG* exibe função pró-viral (A). Silenciamento do gene *nig* confere resistência a begomovírus. Plantas inoculadas *nig-1* de forma simulada e infectadas com CabLCV apresentam sintomas da infecção viral. (B). Quantificação absoluta de unidades genômicas CabLCV em linhagens infectadas. As barras indicam o desvio padrão da média, baseado em replicatas técnicas.

Nestes ensaios, as plantas controle Col-0 acumularam maiores concentrações do DNA viral em comparação às plantas nocautes *nig-1*, que apresentaram sintomas atenuados comparados com os sintomas desenvolvidos em Col-0 (Figura 7). Estes resultados confirmaram o caráter de resistência recessiva conferido pelo gene de suscetibilidade NIG e os ensaios posteriores foram realizados com os nocautes *nig-1* e *nisp-1*. Todas as plantas nocautes (*nig-1*, *nisp-1*), utilizadas neste trabalho, foram confirmadas por PCR e RT-PCR (Figura 8).

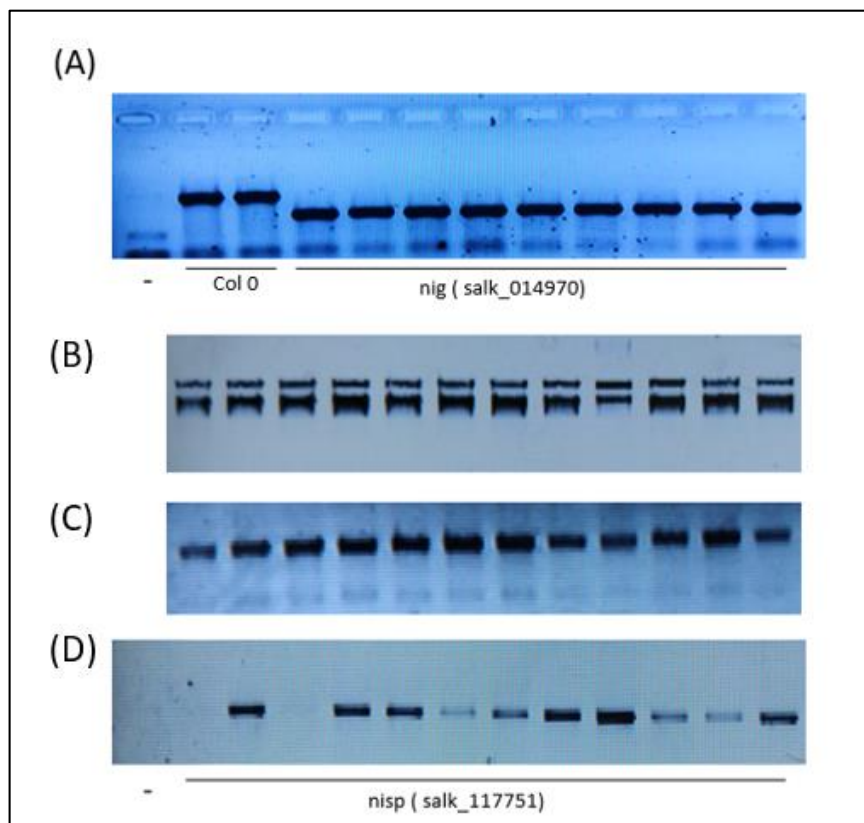


Figura 8. Diagnóstico molecular dos nocautes *nig-1* e *nisp-1*. (A) Confirmação do nocaute de NIG realizada por PCR do DNA genômico e utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene de NIG e para o T-DNA. (B) RNA total dos nocautes de *nisp* e Columbia após tratamento com DNase. (C) Análise da integridade do cDNA utilizando primers de actina (D) Expressão de NISP por RT-PCR.

Uma característica relevante a ser considerada em estudos de resistência recessiva é que o gene recessivo deve ser silenciado ou modificado para conferir o caráter de resistência ao vírus. Sendo assim, o rompimento da função do referido gene não pode causar efeitos adversos no crescimento, desenvolvimento e produtividade das plantas cultiváveis. O silenciamento de diversos genes pode resultar em custos de adaptação para o crescimento e desenvolvimento normais de plantas, o que

eliminar a possibilidade de utilizar o referido gene de suscetibilidade para resistência contra vírus. Estas observações impeliram as análises de desenvolvimento dos nocautes *nig-1* e *nisp-1* juntamente com o controle Col-0 em fotoperíodos de dia longo (16h luz) e dia curto (10h luz) (Figuras 9 e 10). Foram realizadas 7 avaliações, de diâmetro da roseta, número de folhas e comprimento da inflorescência, totalizando 56 dias após a germinação, com 24 plantas para cada genótipo.

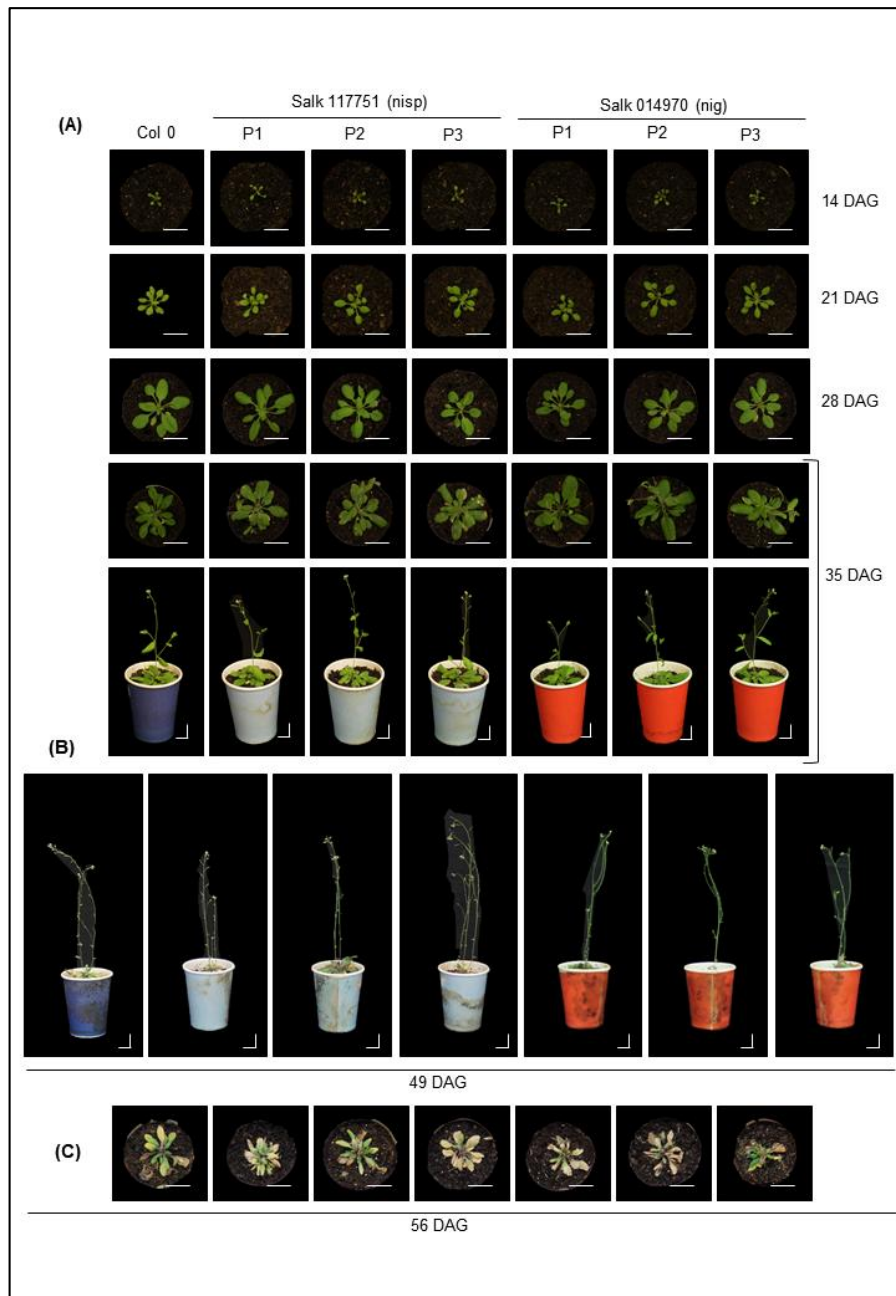


Figura 9. Silenciamento de *NIG* e *NISP* não afeta desenvolvimento de plantas em dias curtos (A) Caracterização fenotípica de plantas (P1, P2 e P3) dos nocautes *nig-1* e *nisp-1* durante a fase vegetativa e início da fase reprodutiva. As plantas foram analisadas até 28 dias após a germinação (DAG) na fase

vegetativa e até 49 DAG na fase reprodutiva. O 35 DAG inicia o estágio reprodutivo, marcado pela emergência da inflorescência. (B) Caracterização fenotípica dos nocautes na fase reprodutiva. (C) Caracterização fenotípica dos nocautes de *Arabidopsis* durante a senescência. O experimento foi realizado com plantas em desenvolvimento normal, cultivadas em meio MS e crescidas em câmara de crescimento em fotoperíodo longo (16h luz). Barras de escala = 0,5 cm.

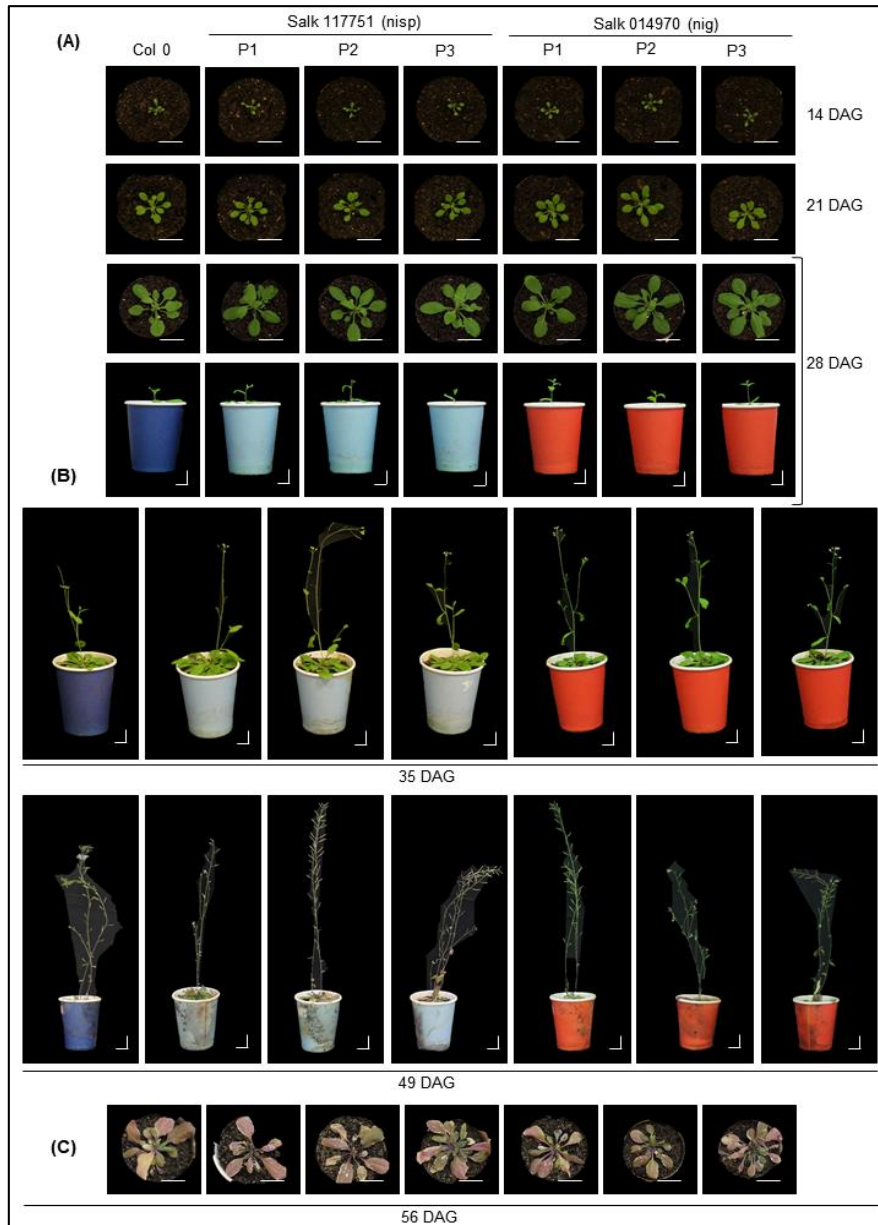


Figura 10. Silenciamento de *NIG* e *NISP* não afeta desenvolvimento de plantas em dias Longos (A) Caracterização fenotípica de plantas (P1,P2 e P3) dos nocautes *nig-1* e *nisp-1* durante a fase vegetativa e início da fase reprodutiva. As plantas foram analisadas até 21 dias após a germinação (DAG) na fase vegetativa e até 49 DAG na fase reprodutiva. O 28 DAG inicia o estágio reprodutivo, marcado pela emergência da inflorescência. (B) Caracterização fenotípica dos nocautes na fase reprodutiva. (C) Caracterização fenotípica dos nocautes de *Arabidopsis* durante a senescência. O

experimento foi realizado com plantas em desenvolvimento normal, cultivadas em meio MS e crescidas em câmara de crescimento em fotoperíodo curto (8h luz). Barras de escala = 0,5 cm.

Foi observado que não houve diferença significativa em relação ao diâmetro da roseta, número de folhas e comprimento da inflorescência entre os genótipos durante todo o período de avaliação, porém houve diferenças das plantas submetidos aos fotoperíodos distintos. Em relação ao tamanho máximo da roseta (mm), plantas WT, *nig-1* e *nisp-1* apresentaram diâmetros maiores em dias longo, comparado a dias curtos, no 42º dia (Figura 11A). O número de folhas também foi maior em dias longos, em comparação a dias curtos (Tabela 6).

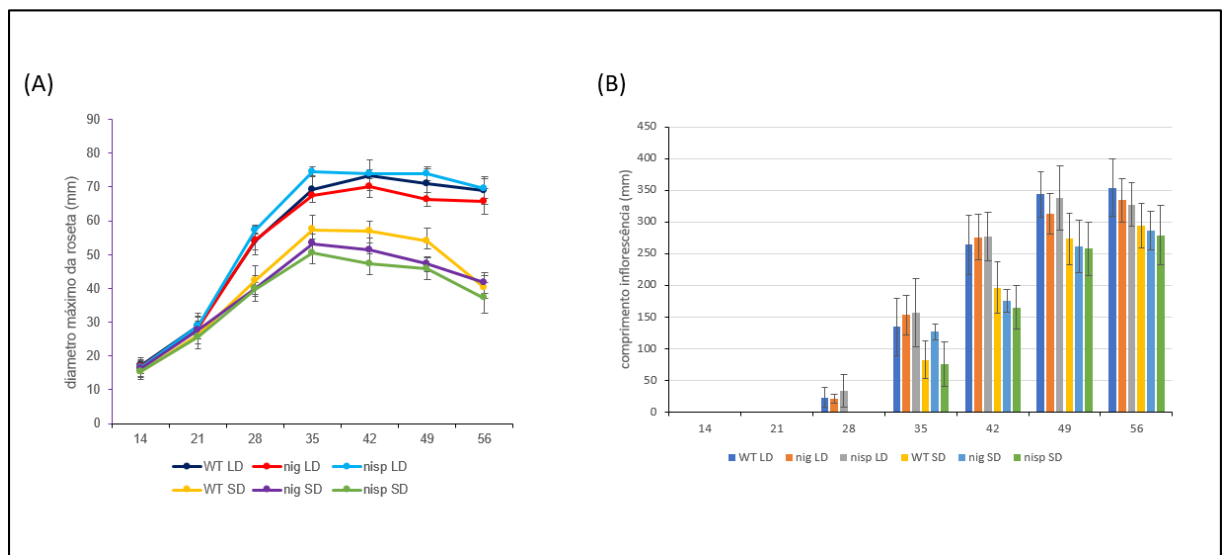


Figura 11. Caracterização fenotípica dos genótipos *nig-1* e *nisp-1* em relação ao diâmetro da roseta e comprimento da inflorescência. (A) diâmetro máximo da roseta (mm) em dia longo e em dia curto. (B) Comprimento da inflorescência (mm). LD = dias longos (16h luz) SD = dias curtos (8h luz).

Em relação ao comprimento da inflorescência (mm), o pendão floral em dias longos surgiu no 28º dia, enquanto em dias curtos, no 35º dia (Figura 11B). Com esses dados, é possível demonstrar que o silenciamento dos genes de susceptibilidade *NIG* e *NISP* não interferiu no desenvolvimento da planta, o que torna estes genes excelentes alvos para desenvolvimento de resistência recessiva contra begomovírus.

Os produtos da PCR foram purificados e inseridos no vetor binário de transformação de plantas contendo a Cas (pHEE-401E) pela reação de Golden Gate, com a ação das enzimas BsaI e T4 DNA Ligase simultaneamente durante 6 horas de reação. No produto da reação o gene de resistência espectinomomicina contido no vetor é removido pela enzima de restrição, e posterior uso da ligase (Figura 13A e 13B). Após a construção células de *E. Coli* ultracompetentes foram transformadas por choque térmico e selecionadas em meio LB, contendo Canamicina (100mg/L). Além da marca de seleção, foi possível confirmar colônias transformadas com o vetor pEE401E por sequenciamento e PCR (Figura 13C e 13D) gerando os clones pUFV3377 e pUFV3378 (nisp-pEE401E).

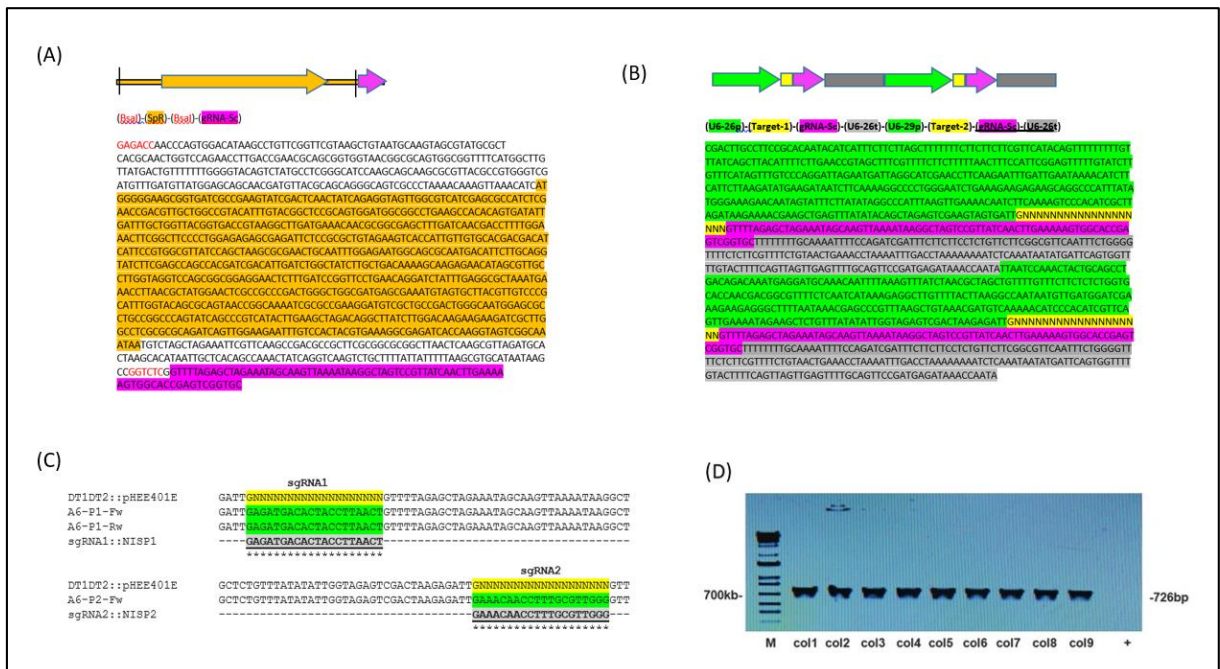


Figura 13. Construção do vetor CRISPR/Cas (A) sequência da resistência no vetor pEE-401E a ser restrita pela enzima BsaI. (B) Sequência do vetor pEE-401E com a inserção do cassete a partir da reação Golden Gate. (C) Seleção dos transformantes de *E. Coli* com o vetor já montado nisp-pEE-401E (pUFV 3337 e pUFV 3338). (D) Confirmação das colônias transformantes com oligonucleotídeos específicos do vetor.

Plantas nocautes *nig-1* foram transformadas com o vetor nisp-pEE401E e as plantas transformadas foram selecionadas por higromicina (20mg/L).

Silenciamento por CRIPR/Cas do gene NISP em nig

Após a seleção dos transformates por higromicina (20mg/L), em placas de petri contendo meio MS, as plantas foram transferidas para solo e posteriormente, seu material vegetal foi coletado para o diagnóstico molecular da inserção do DNA contendo o gene do clone nisp-pEE401E, com oligonucleotídeos específicos para o vetor pEE401E. Foi possível selecionar 20 plantas com dois diagnósticos molecular por PCR utilizando os primers U6-26p F+U6-29p R e U6-29p F+U6-29p R (Tabela 7) gerando dois fragmentos com o tamanho de 726 e 423 pares de bases respectivamente (Figura 14A).

Após a clivagem do gene de *NISP* pela Cas (*CRISPR-associated protein*), é possível a ocorrência de deleção ou adição de alguns nucleotídeos no sítio alvo pelo próprio sistema de reparo do DNA da planta. Com isso, para selecionar as plantas editadas, oligonucleotídeos específicos para *NISP* foram utilizados para amplificar um fragmento de 677 pares de base flanqueando a região alvo de clivagem. Os fragmentos foram amplificados confirmando a amplificação do fragmento em 10 plantas transformadas (Figura 14B).

A região alvo de *NISP* a ser clivada pela Cas contém um sítio de restrição para a enzima *EcoNI*. Assim, plantas editadas podem perder essa região consenso da enzima. Os fragmentos purificados foram submetidos ao tratamento com a enzima de restrição. Uma fração do fragmento amplificado pelo DNA das plantas 1, 8, 11, 12 e 15 foi resistente à digestão com a enzima, conforme observado pela presença do fragmento de 677 bp após a digestão. Observa-se também a presença de alelos não mutados de *NISP* devido à presença de mais duas bandas correspondentes a clivagem do alelo selvagem (Figura 14C). Este resultado demonstrou que houve a edição de apenas um alelo do gene *NISP* sendo mantido um alelo selvagem. Entretanto, a presença de um alelo mutado nas plantas T1 demonstrou a funcionalidade da técnica. O sequenciamento do fragmento resistente à digestão com a enzima *EcoNI* confirmará o tipo de mutação ocorrida em cada uma das plantas com alelo *NISP* mutado.

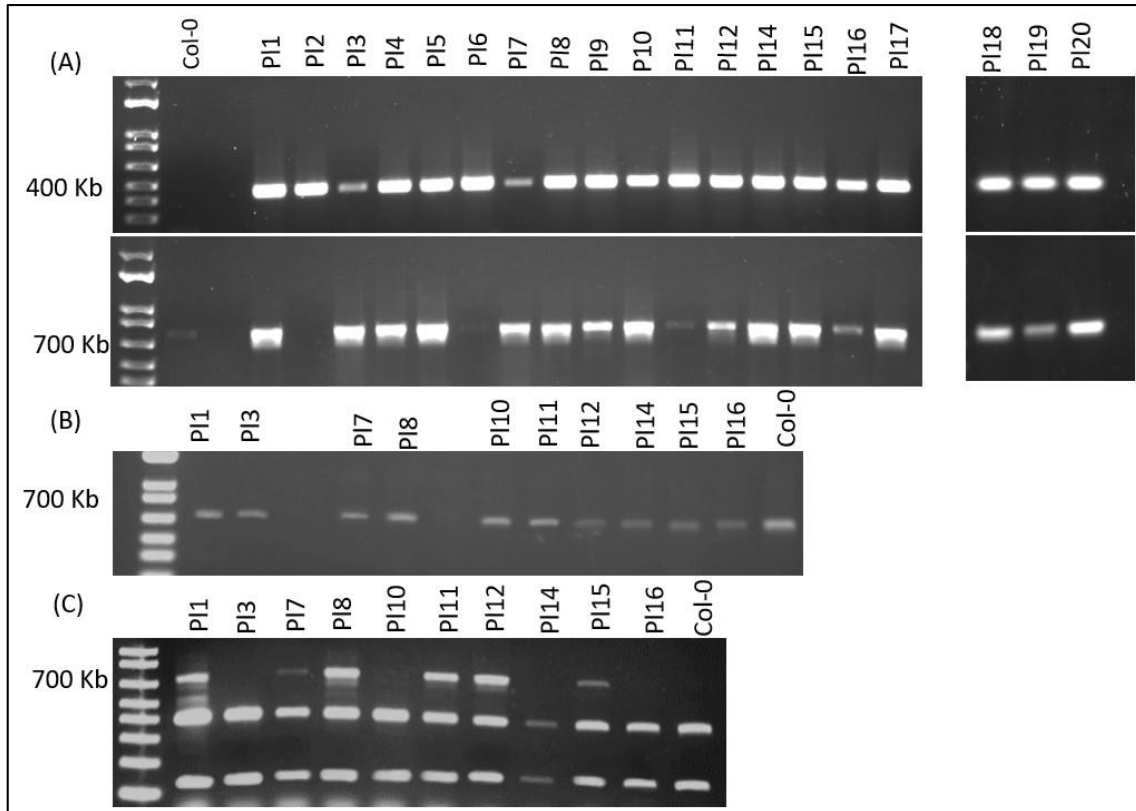


Figure 14 - Gel de comprovaçao da transformaçao de plantas e da edicaõ do gene *NISP* (A) plantas confirmadas com o gene do vetor nisp-pEE401E utilizando os primers U6-26p F+U6-29p R e U6-29p F+U6-29p R gerando dois fragmentos com o tamanho de 726 e 423 pares de bases (B) purificaçãõ da amplificaçãõ de 677 parares de base flanqueando a regiãõ alvo de clivagem (C) clivagem parcial das plantas PL1, PL7, PL8, PL11, PL12 e PL15 do fragmento purificado pela enzima de restriçãõ *EcoNI*.

5.0 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados presentes desse trabalho fornecem evidências de o sítio de fosforilação Thr-469 controla negativamente a atividade do coreceptor transmembrana NIK. Substituição do resíduo Thr-469 por alanina, gerando o mutante o simples T469A, aumentou a resistência contra begomovírus em linhagens de *Arabidopsis thaliana*. A dupla mutação T464A/T474D, transformadas em nocautes de *nik-1* e Col-0, também conferiu características de resistência ao vírus, promovendo acúmulo de DNA viral e sintomas de infecção inferiores do que Col-0. Além disso, as mutações T469A e T464A/T474D causaram ativação constitutiva de NIK1, e causaram níveis acentuados de repressão dos genes marcadores da via de sinalização de imunidade antiviral mediada por NIK1, como os genes relacionados ao controle de tradução *RPL28*, *S25* e a de fotossíntese *FD1* e *PSII*. Foi possível levantar a relação da repressão desses genes marcadores com as análises de crescimento de raiz, onde as plantas superexpressando o mutante duplo e simples interferiu no crescimento.

Quanto aos mecanismos de resistência recessiva, foi possível demonstrar que o silenciamento do gene de susceptibilidade *NIG* confere resistência ao vírus, diminuindo o acúmulo do DNA viral e atenuando os sintomas da infecção por CabLCV. Os fenótipos de desenvolvimento e crescimento dos nocautes *nig-1* e *nisp-1* foram indistinguíveis de Col-0, indicando que o silenciamento desses genes não causou efeitos adversos fenológicos e não afetou produtividade e, portanto, podem ser considerados excelentes alvos para resistência recessiva em plantas cultiváveis. Para uma resistência recessiva mais eficaz, foi utilizada o sistema de CRISPR/Cas para o silenciamento dos genes de susceptibilidade *nig-1* e *nisp-1*, gerando assim um duplo nocaute. Foi construído um cassete de transformação em plantas contendo o gene da proteína Cas, sob o controle do promotor S35, o gRNA direcionado para o gene *NISP*, sob o controle U6. Aproximadamente 50% das plantas transformadas T1 exibiram um alelo mutado para o gene *NISP*, demonstrando a eficiência da técnica de silenciamento. Experimentos em progresso determinarão as mutações em *NISP* em homozigose para ensaios de infecção viral no mutante duplo *nig-1nisp*. Estes experimentos serão cruciais para determinar a efetividade do silenciamento duplo de genes de resistência recessiva contra begomovírus.

REFERENCIAS

Bent, A. (2006) *Arabidopsis thaliana* floral dip transformation method. *Agrobacterium Protocols*, Humana Press. 87 - 104.

Brown JK, Zerbini FM, Navas-Castillo J, Moriones E, Ramos-Sobrinho R, Silva JC, Fiallo-Olivé E, Briddon RW, Hernández-Zepeda C, Idris A, and Malathi VG (2015) Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. **Archives of Virology**. 160(6):1593–619. Doi: 10.1007/s00705-015-2398-y

Brustolini OJB, Machado JPB, Condori-Apfata JA, Coco D, Deguchi M, Loriato VAP, Pereira WA, Alfenas-Zerbini P, Zerbini FM, Inoue-Nagata AK, Santos AA, Chory J, Silva FF, and Fontes EPB (2015) Sustained NIK-Mediated Antiviral Signalling Confers Broad-Spectrum Tolerance to Begomoviruses in Cultivated Plants. **Plant Biotechnology Journal**. 13 (9):1300–1311. <https://doi.org/10.1111/pbi.12349>

Calil IP, and Fontes EPB (2017) Plant immunity against viruses: antiviral immune receptors in focus. **Annals of Botany**. 118: 200-213. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw200>.

Carvalho CM, Fontenelle MR, Florentino LH, Santos AA, Zerbini FM, and Fontes EPB (2008a) A novel nucleocytoplasmic traffic GTPase identified as a functional target of the bipartite geminivirus nuclear shuttle protein. **The Plant Journal**. 5: 869-880. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03556.x>

Carvalho CM, Santos AA, Pires SR, Rocha CS, Saraiva DI, Machado JPB, Mattos EC, Fietto LG, and Fontes EPB (2008b) Regulated Nuclear Trafficking of RpL10A Mediated by NIK1 Represents a Defense Strategy of Plant Cells against Virus. *PLoS Pathogen*. 4(12): e1000247. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000247>

Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1, 19–21.

Fontes EPB, Santos AA., Luz DF, Waclawovsky AJ, and Chory J (2004) The Geminivirus Nuclear Shuttle Protein Is a Virulence Factor That Suppresses Transmembrane Receptor Kinase Activity. **Genes and Development**. 18 (20): 2545–2556. doi: 10.1101/gad.1245904

Gafni Y, and Epelb LB (2002) The role of host and viral proteins in intra- and inter-cellular trafficking of geminiviruses. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 60 (5): 231-241. <https://doi.org/10.1006/pmpp.2002.0402>

Gouveia BC, Calil IP, Machado JPB, Santos AA, and Fontes EPB (2017) Immune Receptors and Co-receptors in Antiviral Innate Immunity in Plants. **Frontiers in Microbiology**. 7: 2139. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02139>

Gouveia-Mageste BC, Martins LGC, Dal-Bianco M, Machado JPB, Silva JCF, Santos AA, Ecker JR, and Fontes EPB. (2020). A new plant-specific syntaxin-6 protein may define an intracytoplasmic route for begomoviruses. **BioRxiv**.

<https://doi.org/10.1101/2020.01.10.901496>

Hanley-Bowdoin L, Bejarano ER, Robertson D, Mansoor S (2013) Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. **Nature Reviews Microbiology**. 11:777–788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3117>

Hehnl S, Wege C, and Jeske H (2004) Interaction of DNA with the movement proteins of geminiviruses revisited. **Journal of Virology**. 78: 7698-7706. Doi: 10.1128/JVI.78.14.7698-7706.2004

Krenz B, Jeske H, and Kleinow T (2012) The induction of stomata formation by a plant DNA-virus in epidermal leaf tissues suggests a novel intra- and intercellular macromolecular trafficking route. **Frontiers in Plant Science**. 3:291. Doi: 10.3389/fpls.2012.00291

Kumar RV (2019) Plant Antiviral Immunity Against Geminiviruses and Viral Counter-Defense for Survival. **Frontiers in Microbiology**. 10: 1460. doi:10.3389/fmicb.2019.01460

Lazarowitz SG, and Beachy RN (1999) Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. **The Plant Cell**. 11: 535-548. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.4.535>

Lewis JD, and Lazarowitz, SG. (2010). Arabidopsis synaptotagmin SYTA regulates endocytosis and virus movement protein cell-to-cell transport. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 107(6): 2491–2496. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909080107>

Lima ATM, Silva JCF, Silva FN, Castillo-Urquiza GP, Silva FF, Seah YM, Mizubuti ESG, Duffy S, and Zerbini FM (2017) The diversification of begomovirus populations is predominantly driven by mutational dynamics, *Virus Evolution*. 3(1):vex005. Doi: 10.1093/ve/vex005

Loriato APV, Martins, LGC, Euclides NC, Reis PAB, Duarte CEM, and Fontes, EPB. (2020). Engineering resistance against geminiviruses: A review of suppressed natural defenses and the use of RNAi and the CRISPR/Cas system. **Plant Science**. 292: 110410. Doi: 10.1016/j.plantsci.2020.110410

Machado JPB, Brustolini OJB, Mendes GC, Santos AA, and Fontes EPB. (2015). NIK1, a host factor specialized in antiviral defense or a novel general regulator of plant immunity? **Bioessays**. 37: 1236–1242. Doi: 10.1002/bies.201500066

Machado JPB, Calil IP, Santos AA, and Fontes EPB. (2017) Translational control in plant antiviral immunity. **Genetics and Molecular Biology**. 40: 292-304. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2016-0092>

Mansoor S, Zafar Y, and Briddon RW. (2006). Geminivirus disease complexes: the threat is spreading, **Trends in Plant Science**. 11: 209–212. doi:10.1016/j.tplants.2006.03.003.

Martin DP, Der Van Walt E., Posada D, and Rybicki EP. (2005) The evolutionary value of recombination is constrained by genome modularity, **PLoS Genetics**. 1: 0475–0479. doi:10.1371/journal.pgen.0010051.

Murashige, T.; Skoog F. A. (1962) A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Plant Physiol.* 15: 473-479.

Navas-Castillo J, Fiallo-Olivé ES, and Sánchez-Campos S (2011) Emerging Virus Diseases Transmitted by Whiteflies. **Annual Review of Phytopathology**. 49:219-248 doi:10.1146/annurev-phyto-072910-095235.

Noueiry AO, Lucas WJ, and Gilbertson RL (1994) Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmatal transport. **Cell**. 76: 925-932. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90366-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90366-2)

Pascal E, Sanderfoot AA, Ward BM, Medville R, Turgeon R, and Lazarowitz SG (1994) The geminivirus BR1 movement protein binds single-stranded DNA and localizes to the cell nucleus. **The Plant Cell**. 6: 995-1006. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.7.995>

Rybicki EP (2015) A Top Ten list for economically important plant viruses. **Archives of Virology**. 160:17–20. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2295-9>

Rojas, M.R.; Gilbertson, R.L.; Russell, D.R.; Maxwell, D.P. (1993) Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly- transmitted geminiviruses. **Plant Disease**, v. 77, p. 340-347.

Rojas MR, Macedo MA, Maliano MR, Soto-Aguilar M, Souza JO, Briddon RW, et al. (2018). World management of geminiviruses. **Annual. Review of Phytopathology**. 56: 637–677. Doi: 10.1146/annurev-phyto-080615-100327

Sanderfoot AA, and Lazarowitz SG (1995) Cooperation in viral movement: the geminivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the cell periphery. **The Plant Cell**. 7: 1185-1194. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.8.1185>

Santos AA, Carvalho CM, Florentino LH, Ramos HJO, and Fontes EP. (2009) Conserved threonine residues within the A-loop of the receptor NIK differentially regulate the kinase function required for antiviral signaling. **PLoS One**. 4: e5781. Doi: 10.1371/journal.pone.0005781

Santos AA., Lopes KVG, Apfata JAC, and Fontes EPB (2010) NSP-Interacting Kinase, NIK: A Transducer of Plant Defence Signalling. **Journal of Experimental Botany**. 61(14): 3839-3845. Doi: 10.1093/jxb/erq219

Teixeira, RM., Ferreira MA, Raimundo GAS, Loriato VAP, Reis PAB, and Fontes EPB (2019) Virus Perception at the Cell Surface: Revisiting the Roles of Receptor-like Kinases as Viral Pattern Recognition Receptors. **Molecular Plant Pathology**. 20(9): 1196–1202. Doi: 10.1111/mpp.12816

Zerbini FM, Briddon RW, Idris A, Martin DP, Moriones E, Navas-Castillo J, Rivera-

Bustamante R, Roumagnac P, and Varsani A. (2017) and ICTV Report Consortium. 2017 ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae. **Journal of General Virology**. 98:131–133. Doi: 10.1099/jgv.0.000738

Zhu H, Li C, and Gao C (2020) Applications of CRISPR–Cas in agriculture and plant biotechnology. **Nature Review Molecular Cell Biology** 21: 661–677. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00288-9>

Zorzatto C, Machado JPB, Lopes KVG, Nascimento KJT, Pereira WA, Brustolini OJB, Reis PAB, et al. (2015). NIK1-Mediated Translation Suppression Functions as a Plant Antiviral Immunity Mechanism. **Nature** 520 (7549): 679–82. <https://doi.org/10.1038/nature14171>.

TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para confirmação das plantas mutantes de NIK1 e Columbia.

Oligonucleotídeo iniciador	Sequência 5'- 3'	Gene alvo
MC 36-Fwd	5'- TCCTTCGCAAGACCCTTCCTC-3'	T469A
AtNIK1-Rvs (3774)	5'- GAAAGCTGGGTCTCATCTAGGACCAGAGAGCTC -3'	T469A
AtNIK1G-Rvs (3773)	5'- AAAAAGCAGGCTTCACAATGGAGAGTACTATTGTT-3'	nik1/T474D-T469A e T474D/T469A
Kd-NIK-Fwd	5'- TTTGATCAAGTCTCA -3'	nik1/T474D-T469A e T474D/T469A

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados em reação de qRT-PCR, para genes marcadores da via de NIK1 e dos mutantes de NIK1.

Oligonucleotídeo iniciador	Sequência 5'- 3'	Gene alvo
PRPL28ETGW-Fwd	5'- AAGCACTCTGGTCTTGCAAACA -3'	<i>RPL28</i>
PRPL28ETGW-Rvs	5'- GTGGTGGCGAGCACAACAG -3'	<i>RPL28</i>
EIF2-Fwd	5'- GTGGTACGATTCTGTTGCT -3'	<i>EIF2-alfa</i>
EIF2-Rvs	5'- CAGTATGTGGATGAGCTTCAG -3'	<i>EIF2-alfa</i>
FD10-Fwd	5'- CAATCTCTCTTCGGCCTC -3'	<i>FD1</i>
FD10-Rvs	5'- GTCGAGGACGTAGACATCT -3'	<i>FD1</i>
AtNIK-Fwd	5'- TTTGATCAAGTCTCA -3'	<i>NIK1</i>
AtNIK-Rvs	5'- CGCCCTTCGCCCTCGCCGGACAC -3'	<i>NIK1</i>

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados em reação de RT-PCR e RT-qPCR no ensaio

de infecção viral.

Oligonucleotídeo iniciador	Sequência 5'- 3'	Gene alvo
PCRC1	5' – CTAGCTGCAGCATATTTACRARWATGCCA – 3'	CabLCV DNA-B
PBL1v2040	5' – GCCTCTGCAGCARTGRTCKATCTTCATACA – 3'	CabLCV DNA-B
qRT_CalCuv-CompB-Fwd	5' – TTCATGGACACCAGGAGA – 3'	CabLCV DNA-B
qRT_CalCuv-CompB-Rev	5' – TACACGTGTCCTATGGAGTC – 3'	CabLCV DNA-B
RT-qPCR Actina-Fwd	5'- ATGTCGTGAGCCATCCTGTC -3'	Actina
RT-qPCR Actina-Rvs	5'- ACACCGGATTCGTGCGGCAT -3'	Actina

Tabela 4. Análise de segregação com os genótipos controle; Col0, nik-1; e mutantes Col0+T469A, Col0+T469A/T474D e nik-1+T469A/T474D.

Amostra	Genótipos	Sementes Totais	Total Germinadas	Germinadas Vivas	Germinadas Mortas	x2	Teste L.
1	Col 0	72	59	59	0	x	x
2	nik 1	94	77	77	0	x	x
2	Col 0 + T469A Planta 1	139	76	55	21	0,283254	1
3	Col 0 + T469A Planta 3	158	58	42	16	0,208744	1
4	Col 0 + T474D/T469A Planta 1	96	50	43	7	3,123488	1
5	Col 0 + T474D/T469A Planta 2	109	43	39	4	5,406641	0
6	Col 0 + T474D/T469A Planta 3	117	78	52	26	2,979167	1
7	Col 0 + T474D/T469A Planta 4	119	47	31	16	2,119895	1
8	Col 0 + T474D/T469A Planta 5	87	49	35	14	0,3375	1
9	nik1/T474D/T469A Planta 1	127	96	56	40	15,2381	0
10	nik1 + T474D/T469A Planta 2	105	69	51	18	0,043638	1
11	nik1 + T474D/T469A Planta 3	63	50	44	6	4,340227	0
12	nik1 + T474D/T469A Planta 4	136	111	77	34	1,914963	1
13	nik1 + T474D/T469A Planta 5	103	80	62	18	0,264516	1

Tabela 5. Oligonucleotídeos utilizados na confirmação dos nocates nig-1 e nisp-1 e ensaio de infecção de nig.

Oligonucleotídeo iniciador	Sequência 5'- 3'	Nome do gene
014974LP	5'- AGC ACC ACT ATC GAC CAC ATC -3'	NIG
014974RP	5' – TGC CAA GTA GCT ATT TCG CTC – 3'	NIG
LBB1.3	5' – ATT TTG CCG AAG GAA C – 3'	T-DNA
AT4G30240-FWD	5'- AAAAAGCAGGCTTCACAA TGATGGTAGCGAATAG -3'	NISP
AT4G30240-RVS	5'- AGAAAGCTGGGTCAGTTCTCAAGATGAATAATAG - 3'	NISP
qRT_18SRNA-Fwd	5'- TTTGCGCGCCTGCTGCC -3'	<i>Arabidopsis thaliana</i> 18SRNA
qRT_18SRNA-Rvs	5'- TGTGCTGGCGACGCATCATT -3'	<i>Arabidopsis thaliana</i> 18SRNA

Tabela 6. Média do número de folhas dos genótipos nig e nisp em dia longo e curto.

DAG	Leaves					
	Long Day			Short Day		
	WT	nig	nisp	WT	nig	nisp
14	6 ± 0.7	5.7 ± 0.8	6.3 ± 0.8	5.8 ± 0.6	4.8 ± 0.6	6 ± 0.7
21	8.1 ± 1.0	8.5 ± 1.0	8.8 ± 1.0	8.5 ± 0.9	7.9 ± 1.4	7.8 ± 1.4
28	11.6 ± 1.9	11.9 ± 1.4	12.3 ± 1.3	10.6 ± 0.9	10.4 ± 1.0	9.9 ± 1.4
35	26.5 ± 4.0	24.4 ± 3.2	26 ± 3.6	21.1 ± 3.4	20.6 ± 3.2	20.3 ± 3.3
42	31.5 ± 3.7	28 ± 4.1	30.6 ± 4.5	22.4 ± 2.4	21.8 ± 2.3	20.9 ± 1.8
49	28.4 ± 4.8	23.5 ± 6.5	29.6 ± 5.3	23.8 ± 2.6	22.2 ± 3.4	20.6 ± 2.1
56	26 ± 3.8	23.9 ± 4.3	25.6 ± 4.4	20.5 ± 3.1	19.6 ± 2.9	18.7 ± 3.2

Tabela 7. Oligonucleotídeos utilizados na montagem do cassete, construção do vetor pEE-401E do gene NISP.

Oligonucleotídeo iniciador	Sequência 5' - 3'	Gene alvo
GT1-NISP-DT1-BsF	5'- ATATATGGTCTCGATTGAGATGACACTACCTTAACTG TT -3'	RNA guia nisp
GT1-NISP-DT1-F0	5'- TGAGATGACACTACCTTAACTGTTTTAGAGCTAGAAA TAGC -3'	RNA guia nisp
GT2-NISP-DT2-R0	5'- AACCCCAACGCAAAGGTTGTTTCAATCTCTTAGTCG ACTCTAC -3'	RNA guia nisp
GT2-NISP-DT2-BsR	5'- ATTATTGGTCTCGAAACCCCAACGCAAAGGTTGTT TCAA -3'	RNA guia nisp
U6-26p-F	5'- TGTCCCAGGATTAGAATGATTAGGC -3'	pEE-401E
U6-26t-R	5'- CCCAGAAATTGAACGCCGAAGAAC -3'	pCBC- DT1T2
U6-29p-F	5'- TTAATCCAACTACTGCAGCCTGAC -3'	pCBC- DT1T2
U6-29p-R	5'- AGCCCTCTTCTTTTCGATCCATCAAC -3'	pCBC- DT1T2
4g30240 (1-107) GW-FWD	5' – AAAAAGCAGGCTTCACAA- TGATGGTAGCGAATAG – 3'	NISP
4g30240 (1-107) GW-RVS	5' – AGAAAGCTGGGTCTTACC-ACCCAACGCAAAG – 3'	NISP