

LARISSA GABRIELA MORAIS DE ÁVILA

**RECONSTITUIÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO ANTIVIRAL
MEDIADA POR NIK1 DE ARABIDOPSIS EM TOMATEIROS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

A958r
2017
Morais de Ávila, Larissa Gabriela, 1991-
Reconstituição da via de sinalização antiviral
mediada por NIK1 de Arabidopsis em tomateiros /
Larissa Gabriela Morais de Ávila. - Viçosa, MG, 2017.
42f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

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

Referências bibliográficas: f.39-42.

1. Vírus de planta. 2. *Arabidopsis thaliana*.
3. Geminivírus. 4. . I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.
Mestrado em Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22. ed. 571.9928

LARISSA GABRIELA MORAIS DE ÁVILA


**RECONSTITUIÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO ANTIVIRAL
MEDIADA POR NIK1 DE ARABIDOPSIS EM TOMATEIROS**

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: 21 de julho de 2017.


Lara Pinheiro Calil


Anésia Aparecida dos Santos
(Coorientadora)


Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Orientadora)

Dedicatória

Aos meus pais, Santos e Marlene,

Meus irmãos

Meus amigos

Que me apoiaram durante todo esse processo.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelas oportunidades de vida que me deu e me levaram a chegar até aqui e pela força que me deu durante todo esse processo, me mantendo perseverante, durante erros e acertos.

Agradeço aos meus pais, base de todos os ensinamentos e exemplos de ética e perseverança. Pelo incentivo e apoio, pela preocupação e horas de sono perdidas. Pelo amor e confiança em mim. Que suportaram a saudade sabendo que seria por um motivo maior. Amo vocês.

Agradeço à minha família, que mesmo longe, mandavam bons pensamentos e incentivos. Que entendiam a ausência em momentos importantes, me incentivando ainda mais a alcançar meus objetivos.

À Universidade Federal de Viçosa, por me oferecer ensino desde a graduação, estrutura física e apoio por todos esses anos.

Aos órgãos fomentadores CAPES, FAPEMIG e CnPQ pelo financiamento da pesquisa e concessão de bolsa.

À Professora Elizabeth Fontes, por ter participado ativamente na minha caminhada em busca do conhecimento. Por ter me recebido em seu laboratório e me ensinado não só apenas ciência, mas também disciplina e perseverança.

Aos meus co-orientadores, que estavam presentes quando eu precisava, fosse por email, whatsapp ou telefone, me guiando e dando dicas.

Aos companheiros de trabalho do LBMP, que ainda estão ou não no laboratório e ao professor Pedro, seja pela ajuda científica ou psicológica, nos momentos de erros e acerto. Sem o apoio de vocês, isso não seria possível. Ciência é feita por profissionais competentes e idealistas. Foi isso que me ensinaram.

À Glaucia e Marlene por cuidarem do laboratório, ao Adriano por cuidar da casa de vegetação.

Agradeço ao Virgílio por todo conhecimento em cultura de tecidos que me ensinou e pelas longas jornadas trabalhando no fluxo, na fome ou na pobreza, na saúde ou na doença.

Agradeço também a todos que não foram citados, mas, sabem que fizeram parte dessa caminhada.

Resiliência

Capacidade de se recuperar
de situações de crise e aprender com ela.
É ter a mente flexível e o pensamento otimista,
com metas claras e a certeza de que tudo tem uma razão.

Resumo

ÁVILA, Larissa Gabriela Morais de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Reconstituição da via de sinalização antiviral mediada por NIK1 de Arabidopsis em tomateiros.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Coorientadores: Paola Avelar Carpinetti Oliveira, Pedro Augusto Braga dos Reis e Anésia Aparecida dos Santos.

Recentemente, uma nova camada de defesa antiviral foi caracterizada em *Arabidopsis thaliana*, que é mediada pelo receptor NIK (NSP-Interacting Kinase) e protege a planta contra begomovirus. Quando a planta é infectada por um vírus, NIK1 oligomeriza com outro receptor imune ou com NIK1 para transfosforilar um ao outro e conseqüentemente, ativar o domínio cinase de NIK1. NIK1 é capaz de se ligar a proteína ribossomal L10 (RPL10), e é capaz de mediar sua fosforilação e subsequente translocação ao núcleo, onde RPL10 interage com LIMYB (L10-interacting Myb domain-containing protein) para regular negativamente a expressão de genes de proteínas ribossomais, levando a supressão global da tradução. Os mRNAs virais não são capazes de escapar ao mecanismo de regulação de tradução do hospedeiro, aumentando assim a resistência contra begomovirus. A proteína viral NSP interage com NIK1 e inibe sua atividade cinase, aumentando a patogenicidade do begomovírus em seu hospedeiro. Foi demonstrado em trabalhos anteriores que o mutante NIK1-T474D é um excelente alvo para engenharia genética, pois é constitutivamente ativada em linhagens transgênicas. Nesse trabalho, primeiramente foi realizado a reconstrução *in silico* da via de sinalização antiviral mediada por NIK1 em tomateiro, identificando possíveis componentes homólogos dessa via. Em seguida, foi examinada a possibilidade do duplo mutante T474D-T469A de conferir resistência contra begomovírus em linhagens transgênicas de tomateiro. Além disso, a linhagem transgênica NIK1-T474D-T469A foi transformada com o componente a jusante da via de sinalização antiviral, LIMYB de Arabidopsis, e examinamos o efeito da reconstituição dessa via de defesa durante a infecção viral. Os resultados dessa investigação indicam que a expressão de NIK1-T474D/T469A em linhagens transgênicas de tomateiro foi efetiva para suprimir a expressão de genes ribossomais, indicando que o duplo mutante é constitutivamente ativado em tomateiro. Além disso, a expressão de LIMYB em combinação com NIK1-T469A/T474D promoveu um efeito aditivo na repressão dos genes de proteínas ribossomais, possivelmente revelando uma melhor

estratégia para obtenção de resistência a begomovírus. Para averiguar essa hipótese, as linhagens transgênicas foram desafiadas com os begomovírus de tomateiro ToYSV e ToSRV e a infecção foi monitorada por meio de sintomatologia e quantificação do DNA viral. Os resultados demonstraram que a expressão de NIK1-T469A/T474D em combinação com LIMYB é potencialmente um alvo melhor para modificar geneticamente genótipos suscetíveis.

Abstract

ÁVILA, Larissa Gabriela Morais de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017.
Reconstitution of the Arabidopsis NIK1-mediated antiviral signaling in tomato.
Advisor: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-advisors: Paola Avelar Carpinetti Oliveira, Pedro Augusto Braga dos Reis and Anésia Aparecida dos Santos.

Recently, a new layer of antiviral defenses was characterized in *Arabidopsis thaliana*, which is mediated by the immune receptor NIK (NSP-Interacting Kinase) and protects plants against begomoviruses. Upon virus infection, NIK1 oligomerizes with itself or another immune receptor to transphosphorylate one another and to activate the NIK1 kinase domain. Activated NIK1 mediates the phosphorylation of the ribosomal protein L10 (RPL10) and subsequent translocation to the nucleus, where RPL10 interacts with LIMYB (L10-interacting Myb domain-containing protein) to down-regulate the expression of ribosomal protein genes, leading to global translation suppression. The viral mRNAs are not able to escape this host translation regulatory mechanism enhancing host resistance against begomoviruses. The viral protein NSP interacts with NIK1 and inhibits its kinase activity, increasing the pathogenicity of begomoviruses by their hosts. We have previously demonstrated that the NIK1 mutant T474D is an excellent target for engineering begomovirus resistance because it is constitutively activated in transgenic lines. In this investigation, we first reconstructed *in silico* the NIK1-mediated antiviral signaling in tomato by identifying the tomato homologs of the components of the signaling pathway. Then, we examined the property of the double mutant T474D-T469A to confer resistance against begomoviruses in tomato transgenic lines. Furthermore, we overexpressed the downstream component of NIK1 antiviral signaling, LIMYB from *Arabidopsis*, in the T474D-T469A transgenic lines and examined the effect of reconstituting the antiviral pathway on begomovirus infection. Our results indicated that expression of T474D/T469A in transgenic lines was effective to suppress the expression of ribosomal protein genes, indicating that this double mutant is constitutively activated in tomato. Furthermore, expression of LIMYB in combination with T469A/T474D promoted an additive effect in ribosomal protein gene repression, possibly uncovering a better strategy to acquire begomovirus resistance. To examine this hypothesis, we challenged the transgenic lines with the tomato-infecting begomoviruses ToYSV and ToSRV and monitored the infection by symptomatology and quantitation of viral DNA.

Our results demonstrated that expression of T469A/T474D in combination with LIMYB holds the potential to be a better target for engineering begomovirus resistance in susceptible genotypes.

Sumário

1. Introdução	1
2. Revisão de literatura	5
2.1. Begomovirus: um gênero da família Geminiviridae	5
2.2. Via de sinalização antiviral mediada pelo receptor imune NIK1	7
2.3. Família de proteínas contendo domínio MYB: o caso LIMYB	8
3. Metodologia.....	11
3.4. Transformação de Agrobactéria	13
3.5. Transformação de tomateiros	13
3.7 Diagnóstico molecular das linhagens transgênicas	15
3.8 Análise da expressão do transgene	16
3.8.1 Síntese de cDNA	16
3.8.2 RT-PCR em Tempo Real (qRT-PCR)	17
3.9. Ensaio de infecção de tomateiros	17
3.10 Diagnóstico molecular da infecção viral	18
3.11 Quantificação do DNA viral por qRT-PCR	18
4. Resultados e discussão	20
4.1 Reconstrução <i>in silico</i> da via de sinalização antiviral mediada por NIK1 em tomateiros	20
4.2 Obtenção de linhagens transgênicas de tomateiros expressando simultaneamente NIK1-T469A/T474D e LIMYB	26
4.3 Reconstituição <i>in vivo</i> da via de sinalização antiviral mediada por NIK1 em tomateiros	29
5. Conclusões.....	37
6. Referências Bibliográficas.....	38

1. Introdução

O Brasil é um grande produtor de muitos alimentos, porém, parte de sua produção é perdida devido ao aparecimento de pragas que limitam a produtividade agrícola. Dentre os alimentos mais produzidos, destaca-se o tomate, sendo a segunda hortaliça mais consumida no Brasil. O país ocupava a nona posição da produção mundial, com uma safra de 3,3 milhões de toneladas, em 2006, segundo dados da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO), e o terceiro em quesito de produtividade.

Os vírus são, sem dúvida, os maiores causadores de danos econômicos ao tomateiro. Na última década, houve um aumento nos surtos epidêmicos de geminivirose, associadas à introdução de um novo biótipo de mosca branca no Brasil, a *Bemisia tabaci* biótipo B. Esse vetor, com um maior círculo de hospedeiros, foi responsável por disseminar os vírus que antes estavam limitados apenas a ervas daninhas, para outras culturas (Mapa, 2016). Novas espécies de vírus estão sendo relatadas, embora apenas a sintomatologia, observada no campo, não seja critério para discernir uma espécie de outra e estes estudos têm sido complementados com sequenciamento do DNA viral.

Os geminivírus também são responsáveis por causar danos a outras culturas, sendo de grande importância identificar as interações moleculares entre vírus-hospedeiro, a fim de que seja possível a obtenção de variedades resistentes por melhoramento genético ou engenharia genética. O melhoramento genético de diferentes variedades tem sido conduzido, na expectativa de obtenção de melhores características agrônomicas e resistência a essas pragas (LOZANO-DURÁN, 2016).

As plantas desenvolveram duas linhas de defesa contra patógenos. A primeira é designada PTI, Imunidade desencadeada por PAMP's, que são padrões moleculares associados a patógenos (JONES; DANGL, 2006). Neste caso, as células vegetais sintetizam receptores de reconhecimento de PAMPs, designados PRRs (Pattern Recognition Receptors), que percebem e interagem com moléculas conservadas apresentadas pelo patógeno, como por exemplo, a flagelina da bactéria, quitinas e glicanos presentes na parede celular de fungos, ou RNA de fita dupla, derivados do genoma de vírus. A interação PRR/PAMPs aciona mecanismos de defesa que resulta em resistência, sendo esta a primeira camada de proteção das plantas contra patógenos. Entretanto, os patógenos são capazes de evoluir mecanismos de virulência que superam a defesa primária das plantas, tornando-as susceptíveis e desenvolvendo doenças

(JONES; DANGL, 2006). Estes mecanismos de virulência são baseados na síntese de efetores pelos patógenos que inibem PTI e ativam o mecanismo, designado suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS), em genótipos suscetíveis (TSUDA; KATAGIRI, 2010). Como resultado de tentativas de predominância entre os vírus e seus hospedeiros, ocorrem mutações e a seleção natural se encarrega de manter as plantas que co-evoluem com o patógeno e são capazes de melhorar sua defesa. Essas plantas resistentes evoluíram os receptores intracelulares, denominadas proteínas de resistência (R), que reconhecem de uma maneira específica as proteínas efetoras dos patógenos e assim conseguem detectar o ataque e sinalizar uma resposta de defesa, designada, imunidade desencadeada por efetores (ETI) (TSUDA; KATAGIRI, 2010). ETI frequentemente gera uma resposta de hipersensibilidade, por parte da planta, que leva a morte celular programada, evitando que o patógeno se espalhe para outras células. Os efetores que são especificamente detectados pela proteína R cognata para ativar ETI, são designados fatores de avirulência (AVR) (JONES; DANGL, 2006). Patógenos que contém o gene Avr são avirulentos para plantas que contém o gene R cognato e virulentos para plantas sem o gene R.

Uma estratégia que vem sendo utilizada pela engenharia genética é transformação de genótipos suscetíveis com genes R, que codificam proteínas de resistência, que detectam os fatores de avirulência dos patógenos, tornando a planta resistente. Esta alternativa para aquisição de plantas resistentes contra patógenos reflete as tentativas de diminuir o uso de inseticidas para controle do vetor, cujas concentrações de aplicação nas culturas são cada vez mais altas, levando à grande impacto ambiental. Além disso, os inseticidas têm se tornado ineficientes devido à resistência adquirida pelos vetores contra as mesmas.

Recentemente, tem sido descrito uma via de sinalização antiviral mediada pelo receptor imune de membrana NIK1 [Nuclear Shuttle Protein (NSP)-Interacting Kinase1] que protege as plantas contra begomovírus por um mecanismo totalmente diferente de PTI ou ETI. Em resposta à infecção viral, a proteína NIK1 dimeriza com ela mesmo ou com um outro receptor para ativar a via de defesa. Assim sendo, quando dimerizada, NIK1 sofre autofosforilação e é ativada, sendo capaz de mediar a fosforilação da proteína ribossomal L10 (RPL10), que é translocada para o núcleo, onde interage com a proteína LIMYB (L10-Interacting Myb domain-containing protein). O complexo RPL10:LYMIB interage com promotores de genes de proteínas ribossomais para reprimir a expressão desses componentes da maquinaria de tradução (ZORZATTO et al., 2015). Como

consequência, ocorre a diminuição da tradução global de proteínas, incluindo proteínas virais. Assim, ocorre diminuição na formação de novos vírus, aumentando a tolerância ao begomovírus.

Entretanto, este mecanismo de resistência parece ter sido superado pelo vírus, pois a proteína viral NSP (Nuclear Shuttle Protein) interage com NIK1, em seu loop de ativação, inibindo a atividade cinase de NIK1 e aumentando a patogenicidade de begomovírus pelo seu hospedeiro (FONTES et al., 2004). Foram mapeadas regiões envolvidas na autofosforilação de NIK1, com o objetivo de se identificarem mutantes, constitutivamente ativos (SANTOS et al., 2010). A substituição do resíduo de treonina na posição 474 por um aspartato resultou no mutante T474D, exibindo maior capacidade de autofosforilação e de redirecionamento de RPL10 para o núcleo e menor capacidade de serem inibidos por NSP (SANTOS et al., 2010). Embora a expressão ectópica de T474D em tomateiros geneticamente modificados (GM) tenha conferido tolerância a begomovírus (BRUSTOLINI et al., 2015), parece que a proteína NIK1 possui papel antagonista a receptores de PTI, como a proteína BAK1 (Brassinosteroid Insensitive 1-Associated Kinase) (ZORZATTO et al., 2015), que aciona o mecanismo de imunidade antibacteriana e antifúngica. Como consequência, a expressão do mutante NIK1 em tomateiros, embora eficiente para tolerância a begomovírus, encerra o potencial de aumentar a suscetibilidade a bactérias e fungos, o que evoca a necessidade de estratégias alternativas para desenvolvimento de eventos GM de tolerância a begomovírus.

Uma alternativa possível seria a expressão ectópica em tomateiros de componentes a jusante da via de sinalização antiviral mediada por NIK1 e que não afetem PTI. O gene *LIMYB*, componente a jusante da via de sinalização de NIK1, se destaca em potencial, uma vez que tem sido demonstrada que a superexpressão do referido gene em *Arabidopsis thaliana* confere resistência a begomovírus (ZORZATTO et al., 2015). Diante dessas informações, torna-se de grande interesse econômico o estudo do perfil transcricional de tomateiros que superexpressam AtLIMYB, bem como a avaliação da possível resistência de amplo espectro adquirida a begomovírus nestas linhagens transgênicas, como estratégia alternativa para obtenção de tomateiros resistentes a begomovírus. Assim sendo, os objetivos primordiais dessa investigação consistiram em avaliar a eficiência de reconstrução da via de sinalização antiviral mediada por NIK1 de *Arabidopsis* em tomateiros e demonstrar a eficiência de resistência de amplo espectro adquirida pela expressão ectópica do gene LIMYB em tomateiros previamente transformados com o mutante duplo de NIK1, NIK1-T469A/474D. Para isso, esforços

foram direcionados para obtenção de três eventos GM em tomateiros, pela transformação de tomateiros com o gene LIMYB de Arabidopsis no genótipo T469A/T474D e análise do espectro de tolerância adquirida a begomovirus nas linhagens transgênicas.

2. Revisão de literatura

2.1. *Begomovirus*: um gênero da família *Geminiviridae*

A família *Geminiviridae* compreende 7 gêneros, (*Begomovirus*, *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Becurtovirus*, *Eragrovirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus*), sendo o *Begomovirus* o maior gênero, compostos de espécies de vírus que infectam dicotiledôneas e são transmitidas por mosca branca. O Brasil é um centro de origem e diversidade genética de begomovírus, sendo que existem 325 espécies na família *Geminiviridae*, sendo 288 espécies no gênero *Begomovirus*. Entre elas, mais de 60 espécies infectam o tomateiro, sendo que 16 espécies foram descritas (e ocorrem exclusivamente) no Brasil (ICTV Virus Taxonomy).

O geminivírus é um vírus de fita simples de DNA (ssDNA), com aproximadamente 2.600 nucleotídeos, sendo este tamanho do DNA viral, uma propriedade restritiva para encapsidação e movimento do DNA viral e ligação às proteínas de movimento (HARRISON; ROBINSON, 1999; LOURENÇÃO; NAGAI, 1994). A partícula viral é constituída por 22 pentâmeros, e estrutura geminada, característica que levou a denominação dessa família. O genoma do geminivírus pode ser composto por um ou dois componentes. Tipicamente os *begomovirus*, encontrados no Brasil são bipartidos, possuem dois componentes, denominados DNA A e DNA B (BRIDDON et al., 2010). O DNA A possui ORF's (Open Reading Frames) que codificam as proteínas Rep (Replication Initiation Protein), TrAP (Transcription Activator Protein), Ren (Replication Enhancer protein) e CP (Coat Protein). O DNA B possui ORF's que codificam as proteínas de movimento MP (Movement Protein) e NSP (HANLEY-BOWDOIN; BEJARANO; ROBERTSON, 2013). Tanto o DNA A quanto o DNA B possuem uma região conservada, denominada Região Comum, de tamanho aproximado de 200 nucleotídeos, altamente conservada (95% similaridade), quando comparado o DNA A e DNA B do mesmo vírus.

O ciclo replicativo do geminivírus inicia-se com a liberação do ssDNA pelo vírion no núcleo de células infectadas. O ssDNA é convertido em dsDNA por replicação pela DNA polimerase do hospedeiro, sendo então transcrito pela RNA polimerase II, também do hospedeiro, gerando transcritos de Rep e REn, presentes no DNA A. Após a transcrição dos genes Rep e Ren associados a replicação (BISARO; DAVID, 1996), ocorre a formação de oligômero estável e ligação a ORI. Rep cliva o DNA para dar início

à replicação do genoma viral. REN é uma proteína acessória que aumenta a eficiência de replicação do genoma viral (HANLEY-BOWDOIN; BEJARANO; ROBERTSON, 2013). Como a origem de replicação e o promotor se sobrepõem, enquanto Rep é transcrita, não ocorre replicação. Ao se acumular, Rep bloqueia o promotor do próprio gene, suprimindo a própria expressão por um mecanismo de inibição por retroalimentação (HANLEY-BOWDOIN; BEJARANO; ROBERTSON, 2013). A partir daí, TrAP, também codificada pelo DNA A, é transcrita. TrAP é supressora de silenciamento gênico e de resposta de defesa, e ativa transcrição do gene da proteína do capsídeo, CP. Em *begomovirus* bipartidos, também funciona como fator de transcrição, necessário para expressão de NSP. Também é ativada a transcrição da proteína AV2 (em bipartidos) ou V2 (em monopartidos), que também tem função de suprimir o silenciamento gênico. Nos monopartidos, CP e V2 também funcionam como proteínas de movimento (HANLEY-BOWDOIN; BEJARANO; ROBERTSON, 2013).

O DNA B codifica as proteínas de movimento MP e NSP. NSP é responsável pelo transporte do DNA do núcleo para o citosol e MP é responsável pelo transporte do DNA do citoplasma de uma célula até a outra célula, passando pelo plasmodesmo. NSP também funciona como supressora de defesa da planta, pois interage com a proteína do tipo LRR-RLKII, NIK1, impedindo sua atividade cinase e, conseqüentemente, suprimindo a resposta de defesa da planta (FONTES et al., 2004).

Em geral, os sintomas desenvolvidos por infecção por *begomovirus* manifestam-se como clorose das nervuras, a partir da base da folha, seguido de mosaico amarelo, deformação, rugosidade e até mesmo enrolamento das folhas, nanismo e necrose. Quando a infecção é precoce, a diminuição da área foliar reduz a área fotossintética, levando a formação de frutos menores e de número reduzido, caracterizando perdas produtivas e o controle é dificultado pela alta densidade de moscas brancas, frequentemente encontradas colonizando as plantas hospedeiras. (MAPA, 2016).

O vetor do geminivirus é a mosca branca, e a transmissão é classificada do tipo persistente ou circulativa, ou seja, após adquirir o vírus, a mosca pode transmiti-lo por toda sua vida. O surgimento de um novo biótipo de mosca branca, que também hospeda plantas não cultivadas, permite que haja transferência de vírus desses reservatórios naturais, (principalmente *Fabaceae*, *Malvaceae* e *Solanaceae*), para plantas cultivadas (SILVA; SANTOS; NASCIMENTO, 2010). Esse biótipo foi trazido ao Brasil possivelmente pela importação de plantas ornamentais europeias ou norte americanas e identificado no estado de São Paulo a partir de 1992 (HARRISON; ROBINSON, 1999;

LOURENÇÃO; NAGAI, 1994). A maior gama de hospedeiros desse biótipo de mosca branca provavelmente facilitou a co-infecção de plantas, com diferentes begomovírus, ocorrendo assim, o surgimento de novas espécies de begomovírus, através de recombinação ou pseudo-recombinação (LEGG; THRESH, 2000; ZHOU; ROBINSON; HARRISON, 1998).

2.2. Via de sinalização antiviral mediada pelo receptor imune NIK1

NIKs (NSP Interacting Kinases) são receptores do tipo cinase, pertencentes a sub-família II das LRR-RLK's (Receptores do tipo cinase, com domínios repetitivos ricos em leucina). Essas proteínas estão envolvidas na resposta a patógenos e no desenvolvimento da planta (AFZAL; WOOD; LIGHTFOOT, 2008; GISH; CLARK, 2015; JOHNSON; INGRAM, 2005), e são formadas pelo domínio extracelular, capaz de interagir com um ligante (um efector, um hormônio ou um peptídeo sinal, por exemplo), um domínio transmembrana, que conecta o domínio extracelular ao domínio cinase presente no citosol.

O domínio cinase é responsável pela fosforilação de substratos, nos resíduos de serina e treonina, e as vezes, tirosina (GISH; CLARK, 2015; HUBER et al., 2012; LIN et al., 2014). Durante um ataque por um patógeno, algumas moléculas são liberadas pelo hospedeiro, para sinalizar que a célula está sob ataque. A função do domínio extracelular LRR é justamente reconhecer esses DAMP's (Padrões moleculares associados a perigo), ou reconhecer PAMP's (RUBARTELLI; RUBARTELLI; LOTZE, 2015). A sub-família II das LRR-RLK's está dividida filogeneticamente em 3 subfamílias, relacionados à (i) defesa antiviral, (ii) defesa e desenvolvimento e (iii) de função desconhecida (ZHANG et al., 2006). A ativação dessas proteínas ocorre por homodimerização ou heterodimerização.

A proteína NSP, codificada pelo componente B do geminivírus, interage com NIK, impedindo sua atividade cinase. Essa região de interação entre NIK e NSP contém 80 aminoácidos, da posição 422-502, que compreende os domínios VIIb e loop de ativação (subdomínio VII e VIII) (FONTES et al., 2004; HANKS et al., 1988).

Em trabalhos anteriores do nosso grupo, foram feitas mutações pontuais em NIK1, em seu loop de ativação, com objetivos de determinar que aminoácidos são importantes para atividade cinase. Foi descoberto que quando o resíduo T474 é mutado para ácido aspártico (D), mimetizando uma fosforilação, ocorre um aumento da atividade cinase,

resultando em uma ativação constitutiva de NIK1. Já a substituição do resíduo T469 por ácido aspártico (D), diminui a fosforilação do substrato. Porém, a substituição desse resíduo por alanina (A), causa um aumento da atividade de fosforilação do substrato. (Santos et al., 2010). Acredita-se que a Alanina previne a inibição da fosforilação na posição T474, diminuindo o impedimento estérico e aumentando ainda mais a atividade cinase de NIK1. Levando-se em consideração que tomateiros foram transformados com as formas mutantes T474D, ou duplo mutante T474D/T469A, que teoricamente são constitutivamente ativos, torna-se de interesse expressar ectopicamente LIMYB de *Arabidopsis* nestes tomateiros transgênicos a fim de avaliar a reconstituição da via antiviral de *Arabidopsis* em tomateiros.

2.3. Família de proteínas contendo domínio MYB: o caso LIMYB

Fatores da família MYB estão envolvidos no controle de vários processos específicos em plantas e sua sequência se mantém muito conservada (Martin et al., 1997). O primeiro gene MYB identificado foi o oncogene v-MYB, derivado do vírus da mieloblastose aviária. V-Myb se originou de um gene de vertebrado, que se mutou, tornando-se parte do genoma viral. Muitos vertebrados possuem 3 genes relacionados a v-MYB, c-MYB, A-MYB e B-MYB. Embora muito similares, pequenas mutações em suas sequências, levam a variações funcionais responsáveis por diferentes fenótipos. Isso pode ser devido uma expressão temporal ou espacial diferente, tornando-os genes não redundantes. Um único alvo pode ser regulado por fatores da mesma família, porém, sob regulação temporal que leva a diferentes respostas.

Em sua maioria, funcionam como fatores de transcrição, com domínios MYB, capazes de se ligar ao DNA. As proteínas MYB regulam processos do ciclo celular, controlam desenvolvimento, resposta a estresses bióticos e abióticos e rotas metabólicas de produção de antocianinas e flavonóides. (DUBOS et al., 2010). Exemplos desses processos incluem a diferenciação em tricomas em diferentes partes das plantas, ativação de genes da síntese de enzimas envolvidas na síntese de antocianinas, produção de α -amilase na presença de giberelina, durante a germinação (MARTIN; PAZ-ARES, 1997). As proteínas MYB3R de plantas similares a MYBs de animal, possuem funções idênticas envolvidas no controle do ciclo celular, através do reconhecimento de promotores de ciclinas (STRACKE et al., 2001). Também indicando conservação entre Mybs de humanos e plantas, nota-se falta de mutantes nocautes de proteínas MYB3R, pelo possível

papel de regulador do ciclo celular, gerando indivíduos em que a falta desses genes são letais (STRACKE et al., 2001).

Todas as proteínas MYB, sejam de animais ou plantas, apresentam o domínio de ligação ao DNA, que se ligam ao DNA de maneira sequência-específica. As MYBs de animais geralmente contem 3 regiões repetidas (R1, R2 e R3), enquanto as MYBs de plantas, contém 2 repetições imperfeitas de aproximadamente 50 resíduos (R2 e R3). Sua caracterização foi estabelecida de acordo com a quantidade de repetições do domínio MYB. Quando possuem apenas uma repetição, são classificadas como MYB1R, com duas repetições, R2R3-MYB, e com 3 repetições, MYB3R (STRACKE et al., 2001). Esse último grupo constituem a maior família de genes MYB. De todos os 1600 genes que codificam fatores de transcrição, 131 deles são fatores de domínio tipo R2R3-MYB.

Porém, mesmo sendo conservadas, as sequências-alvos das MYBs podem ser bastante diferentes, comparando proteínas de plantas e vertebrados (SUZUKI; YAGI, 1994). O domínio Myb é caracterizado por 3 repetições imperfeitas formando 3 alfa-hélices, com aproximadamente 52 aminoácidos. A segunda e terceira hélice formam uma estrutura hélice-volta-hélice. Nessas 2 repetições, quando vista tridimensionalmente, forma-se um cluster hidrofóbico de 3 resíduos de triptofano, espaçados regularmente, caracterizando o domínio. A terceira hélice de cada repetição é responsável pelo contato direto com o DNA, sendo denominada hélice de reconhecimento. Durante o contato com o DNA, as duas repetições MYB ficam próximas ao sulco maior do DNA, permitindo que as alças de reconhecimento se liguem de maneira específica ao motivo de DNA (STRACKE et al., 2001).

Estudos *in silico*, juntamente com dados experimentais, demonstraram que a mutação de apenas um resíduo é capaz de alterar a capacidade de interagir com um DNA alvo, por exemplo, troca de um resíduo de Leucina por Glutamina, gera diferentes interações eletrostáticas, podendo modificar seu alvo (SOLANO et al., 1997). Interessante notar que nos domínios Myb, dos 8 resíduos de mantém contato com as bases do DNA, 6 são completamente conservados em Mybs de plantas, e nas 2 bases restantes, é observado que 80% delas são conservadas, demonstrando que poucas mudanças no domínio que interage com o DNA, já são suficientes para mudar o papel da proteína, já que ela passará a interagir com outro DNA-alvo (MARTIN; PAZ-ARES, 1997).

O controle da produção de proteínas Myb pode ocorrer pré-traducionalmente, perceptível pelas diferentes quantidades de acúmulo de RNA de proteínas Myb em diferentes tecidos ou órgãos, como também em resposta a estímulos ambientais, com

estresse osmótico, luz, hormônios, giberelina e ácido abscísico (GUBLER et al., 1995; URAO et al., 1993).

O controle pós-traducional ocorre por mecanismos de fosforilação, interações proteína-proteína e diferença no potencial redox da célula. Membros da família Myb de plantas possuem muitos resíduos de treonina e serina, especialmente na região C-terminal, definindo-as como possíveis substratos de cinases, sugerindo um possível controle por fosforilação (JACKSON et al., 1991; LUSCHER; EISENMAN, 1990).

Recentemente, a LIMYB (L10 Interacting MYB domain containing protein) foi identificada por nosso grupo como a proteína que interage com a proteína ribossomal L10, que é fosforilada por mediação de NIK1. Ao ser fosforilada, RPL10 é translocada para o núcleo, onde interage com LIMYB (ZORZATTO et al., 2015). Essa interação leva à repressão de transcrição de genes ribossomais, consequentemente, diminuindo a tradução global de proteínas, inclusive as proteínas virais, impactando negativamente o processo de infecção viral. Essa descoberta demonstra um novo tipo de defesa contra vírus e é de grande interesse o estudo de LIMYB, o que fundamenta os principais objetivos dessa investigação.

3. Metodologia

3.1 Identificação *in silico* dos componentes da via de sinalização antiviral mediada por NIK1 em tomateiros

3.1.1 Caracterização dos genes ortólogos dos componentes da via de sinalização em tomateiro

A identificação *in silico* dos componentes da via de sinalização antiviral mediada por NIK1 em tomateiros foi realizada utilizando como moldes os genes desta via descritos em *Arabidopsis thaliana*. Os genes transdutores de sinais utilizados como moldes foram AT5G16000 (NIK1), AT3G25560 (NIK2) e AT1G60800 (NIK3) (FONTES et al., 2004). Os genes componentes a jusante da via de sinalização utilizados foram AT1G14320 (rpL10A), AT1G26910 (rpL10B) (CARVALHO et al., 2008) e AT5G05800 (LiMYB) (ZORZATTO et al., 2015). As sequências de aminoácidos dos genes moldes foram recuperados da base de dados TAIR (<http://arabidopsis.org/>). Todas as sequências de aminoácidos de tomateiro foram recuperadas da base de dados (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>) no formato FASTA. As sequências de tomateiro foram preparadas e convertidas para formato de banco de dados utilizando o algoritmo makeblastdb (ALTSCHUL et al., 1997). Posteriormente, as sequências dos genes moldes foram confrontados contra a base de dados de tomateiro utilizando o algoritmo BLASTp (*Basic Local Alignment Search Tools*) (ALTSCHUL et al., 1997). O algoritmo foi ajustado com parâmetro E-value de 10^{-10} . Sendo assim, os genes ortólogos em tomateiro mais próximos dos genes de *Arabidopsis* foram identificados, baseando-se nos critérios de maior identidade, similaridade e cobertura da sequência e pelo índice de confiança E-value.

3.1.2 Reconstrução filogenética do domínio Myb/SANT-like de AtLiMYB e ortólogos em tomateiro

Inicialmente, sequências de aminoácidos de *Arabidopsis* e tomateiro foram confrontados contra os bancos de dados PFAM (<http://pfam.xfam.org/>) e SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) com objetivo de identificar a posição do Myb/SANT-like (PF12776). As sequências com domínio Myb/SANT-like predito foram selecionados seguindo os cutoff de E-value $< 10^{-10}$ e comprimento do domínio $\geq 70\%$ em relação ao

domínio referência das bases de dados. As regiões da sequência contendo os domínios foram extraídas e utilizadas para compor o conjunto de dados.

As sequências do domínio Myb/SANT-like foram alinhadas, utilizando o algoritmo MUSCLE com parâmetros default (EDGAR, 2004). A reconstrução filogenética foi conduzida por meio de inferência bayesiana usando o algoritmo MrBayes v3.2.2 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003). As análises foram configuradas utilizando 20.000.000 de gerações, excluindo as 5.000.000 de primeiras gerações (burnin), modelo de substituição de aminoácidos mistos e quatro cadeias MCMC (Monte Carlo via Cadeias de Markov). A árvore filogenética foi visualizada e editada utilizando o software FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

3.3. Construção de plasmídeos recombinantes

A sequência codificadora AtLIMYB (At5g05800) previamente clonado no vetor de entrada pDONR207 (pUFV1656.1 e pUFV1877.1; ZORZATTO, et al., 2015) foi transferido por meio de recombinação para os vetores de expressão em plantas, pEARLEY 101, 102, 103 e 104, resultando nos clones pUFV2623 (também designado pEarley101-LIMYB), pUFV2638 (pEarley102-LIMYB), pUFV2645 (pEarley103-LIMYB), pUFV2649 (pEarley104-LIMYB), respectivamente. Essas construções foram propagadas em *E. coli*, estirpe DH5 α , para preparo de DNA plasmidial. O diagnóstico das construções de DNA obtidas foi feito por análise por enzima de restrição. O perfil de restrição dos clones obtidos utilizando HindIII é apresentado na Figura 1. O clone pEarley101-LIMYB (pUFV2623), utilizado para transformar tomateiros, contém a ORF de LIMYB fusionada ao amino terminal de YFP, sob o controle do promotor 35S.

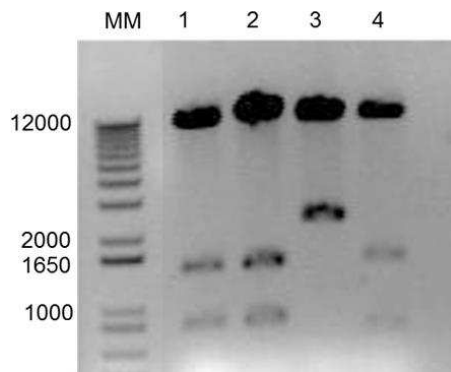


Figura 1: Perfil de restrição dos clones pUFV2623 (também designado pEarley101-LIMYB), pUFV2638 (pEarley102-LIMYB), pUFV2645 (pEarley103-LIMYB), pUFV2649 (pEarley104-LIMYB). O DNA dos clones obtidos foi sujeito à hidrólise com a enzima de restrição HindIII, os fragmentos digeridos foram separados em gel de agarose e visualizado por brometo de etídeo. Os tamanhos esperados são 1431pb e 837pb para pUFV2623 (coluna 1) e pUFV2638 (coluna 2); 2225pb, para pUFV2645 (coluna 3); e 1462pb e 765pb para pUFV2649 (coluna 4).

3.4. Transformação de Agrobactéria

Células eletrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens*, estirpe GV 3101, foram transformadas com o clone pEarley101-LIMYB 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 de seleção do vetor, canamicina 100 mg/L, e da estirpe de agrobactéria, gentamicina (50 mg/l), a 28°C por aproximadamente 40 horas. Foi feito PCR de colônia, para confirmar a transformação, e as colônias positivas foram utilizadas para a transformação do tomateiro, linhagem Money maker, previamente transformada com o clone pUFV1697 (pK7F-NIK1-T469A/T474D) que contem o mutante duplo de NIK1-T469A/T474D fusionado ao amino terminal de GFP, sob o controle do promotor 35S.

3.5. Transformação de tomateiros

A transformação de tomateiros mediada por *Agrobacterium tumefaciens* foi baseada no protocolo desenvolvido por Frary (1996), com algumas modificações (FRARY; EARLE, 1996). As sementes de *Solanum Lycopersicum*, utilizadas nos

experimentos de transformação, foram de uma das linhagens transgênicas transformada com a construção pUFV1697 (gentilmente cedidas por Fontes, EPB, Bioagro/UFV), que corresponde ao cultivar Money maker transformado com o duplo mutante de NIK1-T474D/T469A, fusionado a GFP e sob o controle do promotor 35S. O processo de desinfestação foi feito emergindo as sementes durante um minuto em álcool 70%, e 15 minutos em hipoclorito de sódio. Após desinfestação, as sementes foram lavadas 3 vezes em água estéril destilada e deionizada, colocadas para secagem em papel-filtro estéril e depositadas em magentas, contendo canamicina para seleção das plantas já transformadas em meio MS (Murashige e Skoog). Esse meio consiste em mioinositol a 100 mg/L, sacarose a 30 g/L, ágar gel a 6 g/L e vitaminas MS. As sementes foram mantidas em sala de crescimento (25 ± 2), sob irradiância de 24 a 36 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 16 horas de fotoperíodo. A linhagem transgênica 1697 possui o gene neo, que confere resistência a canamicina. Para selecionar essas linhagens transgênicas, foi usado canamicina a 100 mg/L.

Vinte dias após semeadura, as plântulas foram retiradas do meio de cultura, de forma asséptica, e seus cotilédones e hipocótilos foram seccionados transversalmente sobre o papel filtro estéril, umedecidos com a água estéril. Os cotilédones e hipocótilos foram transferidos para o meio de pré-cultivo (Tabela 1) por 2 dias, sob a mesma irradiância e fotoperíodo anteriores. Em seguida, foi realizado o co-cultivo com a cultura de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, contendo a construção pUFV2623.

A suspensão de agrobactéria foi cultivada overnight em meio LB, acrescido dos antibióticos canamicina (100 mg/L) e gentamicina (50 mg/L), mantidas a 28 °C e 180 rpm. A cultura foi centrifugada a 3.000 x g (5.080 rpm), por 10 minutos a 24 °C, e ressuspendida em meio MS. A densidade ótica da solução foi aferida em espectrofotômetro, e ajustada no valor entre 0,5 e 0,8 por meio de adição de MS. Foi adicionado acetoseringona (200 μM) para então, submergir os explantes por 5 minutos, mantidos no escuro. Os explantes foram transferidos para papel-filtro estéril para retirar o excesso de agrobactéria presente na folha, e transferidos para meio de co-cultivo e deixados no escuro, na temperatura de ($25^\circ\text{C} \pm 2$).

Após dois dias, os explantes foram transferidos para o meio de seleção 1 (tabela 1), e mantidos por 30 dias, ou até a obtenção de brotações. Dessa etapa em diante, os explantes foram mantidos em sala de crescimento ($25^\circ\text{C} \pm 2$), sob irradiância de 24 a 36 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 16 horas de fotoperíodo. Após brotação, os explantes foram transferidos para meio de seleção 2 (Tabela 1), e mantidos por 3-4 semanas, e transferidos para o meio

de seleção 3 (Tabela 1). Foram feitas micropropagação das plantas quando alcançaram tamanho adequado, com o objetivo de obter mais nós, e obter clones. Os meios de seleção estão descritos na Tabela 1, e consistem no meio MS Base, com o acréscimo de hormônios, antibióticos ou agente de seleção, dependendo da etapa de cultivo. As linhagens duplamente transformadas com LIMYB e T469A/T474D foram denominadas LIMYB1, LIMYB2 e LIMYB3.

Tabela 1. Meios de cultivo utilizados para transformação de tomateiros

Meios utilizados								
Meio Base (pH=5,8)	1L	Pré-co cultura	Seleção 1. Indução de alongamento		Seleção 2. Elongamento		Seleção 3. Enraizamento	
MS	4,4g	BAP (2mg/L)	1 ml	Timentin (300mg/L)	1 ml	Timentin (300mg/L)	1 ml	Timentin (300mg/L)
Mio-inositol	0,1g	Acetoseríngona (200µl)	1ml	BASTA (15mg/L)	1,5 ml	BASTA (10mg/L)	1 ml	BASTA (10mg/L)
Sacarose	30g			BAP (2mg/L)	1 ml	GA (2mg/L)	1 ml	AIA (1,0 mg/L)
Ágar	6g			AIA (0,1 mg/L)	100 µl			

3.6 Aclimação dos transformantes primários

Após o enraizamento das plantas transformadas, estas foram retiradas dos frascos, tiveram suas raízes lavadas, e colocadas em substrato orgânico, umedecidas e cobertas com saco plástico com objetivo de manter a umidade da planta. Após alguns dias, os sacos foram furados para aclimação, e transferidas para vasos maiores. Algumas dessas plantas foram para casa-de-vegetação para frutificação e obtenção de sementes. As demais plantas foram clonadas repetidamente para serem utilizadas no experimento de infecção.

3.7 Diagnóstico molecular das linhagens transgênicas

As linhagens transgênicas expressando o mutante simples de NIK1-T474D e a linhagem expressando o mutante duplo T474D/T469A, foram obtidas por meio de transformações prévias (usando as construções pUFV632 e pUFV1697, respectivamente), também mediadas por *Agrobacterium tumefaciens*.

Foram obtidas três linhagens independentes mutante simples T474D, e apenas uma delas obteve fenótipo de maior resistência a infecção viral (T474D-6) (BRUSTOLINI et al., 2015), sendo esta selecionada como controle positivo nos experimentos. As linhagens do duplo mutante T474D/T469A obtidas anteriormente foram as de número 16, 19 e 27. A linhagem T474D/T469A-27 foi usada para transformação com LIMYB, obtendo-se então as plantas T474D/T469A-27-LIMYB_1, T474D/T469A-27-LIMYB_2 e T474D/T469A-27-LIMYB_3.

Para facilitar a identificação das linhagens transgênicas nas figuras, essas foram designadas nas figuras como: T474D (mutante simples), T474D/T469A_1, T474D/T469A_2 e T474D/T469A_3 (linhagens transformadas como o duplo mutante); LIMYB_1, LIMYB_2 e LIMYB_3 (a linhagem duplo mutante T474D/T469A-27 transformada com LIMYB).

Essas plantas foram selecionadas em meio com canamicina e confirmadas por PCR do DNA genômico. Nas linhagens duplamente transformadas com NIK1-T469A/T474D e LIMYB, a transformação também foi mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. A incorporação dos transgenes foi monitorada por PCR de plantas selecionadas em meio com glufosinato de amônio. Para o PCR de diagnóstico, foram utilizados os oligonucleotídeos, descritos na Tabela 2 para a confirmação da presença de NIK1-T474-D ou de NIK1-T474D/T469A, e de LIMYB.

3.8 Análise da expressão do transgene

3.8.1 Síntese de cDNA

Foi analisado a expressão dos transgenes por qRT-PCR, como também foi avaliada a expressão de genes ribossomais de tomateiros, como marcadores de ativação da via antiviral mediada por NIK1.

As proteínas ribossomais de tomateiros foram identificadas por meio de alinhamento local realizado pelo conjunto de algoritmos BLAST (Basic Local Alignment Search Tools), utilizando como molde as proteínas ribossomais de *Arabidopsis*, cuja expressão é reprimida por LIMYB (ZORZATTO et al., 2015). Depois de identificados os ortólogos, foram feitos oligonucleotídeos específicos, para que fosse possível sua quantificação no qRT-PCR.

O RNA total de folhas de 24 tomateiros foi extraído pelo método Trizol (Invitrogen). A quantificação do RNA foi realizada por espectrofotômetro, e sua qualidade foi monitorada por eletroforese em gel de agarose. Aproximadamente 4 µg de RNA foram tratados com DNase e utilizado para obtenção de cDNA, de acordo com as recomendações do fabricante. Utilizou-se a transcriptase reversa MMLV (Invitrogen) e oligo-dT para amplificação de RNA mensageiro. Após obtenção do cDNA, foi feito um pool com o cDNA de 3 plantas da mesma linhagem para melhor uniformidade da amostra, das 8 linhagens. Foi feito RT-PCR para confirmar expressão do transgene, utilizando os oligonucleotídeos RTAT5G05800BFWF e RTAT5G05800BRVS (Tabela 2).

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

Para a realização da avaliação por qRT-PCR foi utilizado o aparelho 7500 Real time Pcr Systems (Applied Biosystems), oligonucleotídeos específicos para os genes de interesse (Tabela 2), SYBR green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e cDNA das linhagens transgênicas. As condições de amplificação foram: 95 °C por 10 minutos, e 40 ciclos de 94 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 min. Foi utilizado o método comparativo de Ct: $2^{-\Delta\Delta Ct}$, com objetivo de quantificar a expressão gênica. Para controle endógeno foram utilizados os oligonucleotídeos específicos para RNA da actina e proteína APT-1 (Adenosil-fosforibosil transferase) de tomate, tendo sido escolhido actina, que apresentou baixa variação de expressão entre as amostras.

3.9. Ensaio de infecção de tomateiros

O ensaio de infecção de tomateiros transgênicos foi realizado utilizando-se os clones infecciosos de *begomovirus* (ToYSV e ToSRV), por meio de biobalística. O DNA plasmidial foi isolado e quantificado por espectrofotometria a 260 nm e sua qualidade aferida por eletroforese em gel de agarose. 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 membranas foram colocadas no acelerador de partículas, sendo lançadas contra o meristema foliar. Como controle, algumas plantas foram bombardeadas apenas com tungstênio e água.

As plantas foram mantidas em câmara de crescimento, a 22°C onde realizou-se a análise visual de sintomas, assim como extração de DNA total das plantas, a cada 7 dias, durante 28 dias após o bombardeamento, com objetivo de monitorar o progresso da infecção através de PCR em tempo real. Para o bombardeamento, foram usadas 15 plantas de cada linhagem, sendo elas: plantas não transformadas (WT), 1 linhagem de NIK1 mutante simples (NIK1-T474D-6), 3 linhagens de NIK1 duplo mutantes (NIK1 T469A/T474D-16, NIK1 T469A/T474D-19, NIK1 T469A/T474D-27) e 3 linhagens de NIK1 duplo mutante transformadas com LIMYB (LIMYB_1, LIMYB_2 e LIMYB_3), no estágio de desenvolvimento correspondente a 4 folhas verdadeiras, sendo 3 plantas utilizadas como controles, 6 plantas infectadas com ToYSV e 6 plantas infectadas com

ToSRV. Os sintomas observados foram pontos ou manchas amareladas, clorose foliar, enrolamento e enrugamento das folhas.

3.10 Diagnóstico molecular da infecção viral

Foram coletadas amostras foliares a cada 7 dias, durante 28 dias após a inoculação. O DNA foi extraído pelo método CTAB e foi usado para identificação de infecção, através de PCR, usando oligonucleotídeos degenerados específicos para o componente B de begomovirus (ROJAS et al., 1993). O produto de amplificação foi analisado por gel de agarose 1% (p/v), corado com brometo de etídeo 0,1 µl/ml. O progresso da infecção foi registrado como porcentagem de plantas infectadas x dias pós-infecção. A infecção também foi monitorada pela análise visual da severidade dos sintomas.

3.11 Quantificação do DNA viral por qRT-PCR

O acúmulo do DNA viral em plantas infectadas foi quantificado por qPCR, de acordo com protocolo modificado de Brustolini et al., 2015. 150ng de DNA genômico extraído de folhas infectadas com ToSRV foram utilizados nas reações de qPCR em um volume final de 10µL contendo SYBR Green master mix (BIORAD) e primers específicos para ToSRV (1µM; tabela de primers). As amostras foram analisadas no equipamento 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). As cópias genômicas de ToSRV foram normalizadas utilizando o gene APT1 com controle endógeno, de forma a considerar a variação apresentada entre as amostras utilizadas no experimento. Curvas-padrão do DNA viral e do endógeno foram calculadas a partir de diluições seriadas do clone infeccioso DNA-A de ToSRV e do DNA genômico de plantas WT de tomateiro, respectivamente. A determinação do número de unidades genômicas de ToSRV por µg de APT1 foi calculada a partir das equações de regressão obtidas pelos respectivos gráficos de curva-padrão. Foram utilizadas o número três plantas infectadas de cada linhagem por ensaio, e feito a medição da carga viral de cada uma dessas plantas.

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos:

Oligonucleotídeos	Gene	Sequência	Região de anelamento
Oligonucleotídeos confirmação (NIK1 e LIMYB)			
ARAACTIN2FWD	Actina	TAC AAC CAG CTT CGT GTT GC	
ARAACTIN2RVS	Actina	GAT TGA TCC TCC GAT CCA GA	
pK7FGFPRvs (4799)	GFP	CGC CCT CGC CCT CGC CGG ACA C	
MC36 (3408)	35S	TCC TTC GCA AGA CCC TTC CTC	35S
At NIK1 (3773)	NIK1	AAA AAG CAG GCT TCT AGG ACC AGA GAG CTC	Ponto +1 de NIK1
At NIK1 Rvs (3774)	NIK 1	AGA AAG CTG GGT CGA GTC ATA AGA GAT TTC GAT G	Ponto +1098 de NIK1
At5g05800 Fwd	LIMYB	AAA AAG CAG GCT TCA CAA TGA GGC CAA AAG CAG T	Ponto +1 de LIMYB
At5g05800 Rvs ST	LIMYB	AGA AAG CTG GGT CCT ATG TTG TAG TAG GAA TAG G	Ponto +1350 AtNIK1 stop
At5g05800 Rvs NS	LIMYB	AGA AAG CTG GGT CTG TTG TAG TAG GAA TAG G	Ponto +1350 AtNIK1 Não stop
Real-time PCR			
LEQRTAPT1FWD	APT1	GAA CAG ACA AGA TTG AGA TGC ATG TA	
LEQRTAPT1RVS	APT1	CCA CGA GGG CAC GTT CA	
LEQRTACTINFWD	Actina	CGG TGA CCA CTT TCC GAT CT	
LEQRTACTINRVS	Actina	TCC TCA CCG TCA GCC ATT TT	
QRTATNIK1BFWD	NIK 1	AGG CAC GGT GGG TCA CAT T	
QRTATNIK1BRVS	NIK 1	TCC CGA AGC CAA AAA CAT CT	
RTAT5G05800BFWD	LIMYB	AAC CAG GGA CAC ATT TTT CGA	
RTAT5G05800BRVS	LIMYB	ATC GTA CAT GGC GCC TGT TT	
qRT-SI05g051000Fwd	S13	AGTTTGCCAAGAAGGGTTGAC	
qRT-SI05g051000Fwd	S13	TGAGCAATCCCATGAGAATCAC	
qRT-SI02g069850Fwd	S25	AAGGCTCCTCCACCGTCTTC	
qRT-SI02g069850Rvs	S25	TGCTTCCCTTGCTCCACTT	
qRT-SI09g091740Fwd	L13	AATCCTCTGGCGTACCATTG	
qRT-SI09g091740Rvs	L13	AAACCTTCAAACGGGCAAGTG	
PCR Diagnóstico Vírus			
ARAACTIN2FWD	Actina	TAC AAC CAG CTT CGT GTT GC	
ARAACTIN2RVS	Actina	GAT TGA TCC TCC GAT CCA GA	
PBL 1 v 2040	Geminivirus	CTAGCTGCATGCATATTTACRARWATGCCA	Degenerado
PCRC1	Geminivirus	GCCTCTGCAGCARTGRCKATCTTCATACA	Degenerado
Real time PCR Vírus			
LEQRTACTINFWD	Actina	CGG TGA CCA CTT TCC GAT CT	
LEQRTACTINRVS	Actina	TCC TCA CCG TCA GCC ATT TT	
ToYSVFwd	ToYSV	CCA CGA TTT TAA AGC TGC ATT CT	
ToYSVRev	ToYSV	CAA TCC TGG TGA GGG AGT CAG T	
ToSRVFwd	ToSRV	CACGTGCCACATCGTCTT	
ToSRVRev	ToSRV	GGCCGGAACGACCTATTA-3	

4. Resultados e discussão

4.1 Reconstrução *in silico* da via de sinalização antiviral mediada por NIK1 em tomateiros

A via antiviral mediada por NIK1 representa um novo paradigma de defesa contra vírus de DNA em plantas (ZORZATTO et al., 2015). Precedentes na literatura indicam que possivelmente esta via de sinalização seja conservada em plantas. De fato, o receptor do tipo cinase NIK1 está amplamente distribuído no reino vegetal (MARIANO et al., 2004; SAKAMOTO et al., 2012) e parece exibir homologia funcional em todas as espécies analisadas (FONTES et al., 2004; MARIANO et al., 2004). NIK1 foi inicialmente isolada em tomateiros pela sua capacidade de interagir com o fator de virulência de geminivírus NSP (MARIANO et al., 2004). Em seguida, foi demonstrado que os homólogos de Arabidopsis AtNIK1, AtNIK2 e AtNIK3 detinham a capacidade de interagir com NSP e exibiam atividade antiviral (FONTES et al., 2004). Particularmente relevante foi a demonstração de que AtNIK1 era capaz de aumentar a resistência contra begomovírus quando expressa ectopicamente em tomateiros (CARVALHO et al., 2008). Estes resultados suportam a premissa de que a via de sinalização antiviral mediada por NIK1 e decifrada em Arabidopsis possa ser conservada em tomateiros. A fim de examinar esta possibilidade, os componentes da via de sinalização antiviral, NIK1, RPL10 e LIMYB, foram usados como protótipos para identificação de homólogos no genoma de tomateiros. Os homólogos correspondentes e seu número de cópias no genoma de Arabidopsis são apresentados na Tabela 3.

Usando NIK1 como protótipo, foram identificadas seis cópias no genoma de tomateiros dos transdutores NIKs do sinal antiviral. A busca de ortólogos de NIK1 contra a sequência completa do genoma de tomateiros revelou uma cópia predita para SLNIK1 (Solyc02g089550) exibindo 74.44% de identidade e 85.96% similaridade com uma cobertura de 98% da sequência da proteína. Enquanto NIK1 parece ter apenas uma cópia gênica, NIK2 possui três cópias (Solyc04g005910, Solyc05g010400 e Solyc07g006110) e NIK3 duas cópias (Solyc04g039730 e Solyc05g005140) em tomateiros. Estes resultados estão consistentes com a árvore filogenética de membros da subfamília II de receptores LRR-RLKs descrita por Sakamoto et al. (2012), exceto que foi identificado uma cópia a mais de NIK2, não reconhecida anteriormente. Em Arabidopsis, embora tem sido demonstrado que NIK1, NIK2 e NIK3 exibem atividade antiviral e ligam a proteína

viral NSP, NIK1 possui papel predominante na defesa antiviral (FONTES et al., 2004). De fato, o fenótipo de resistência a vírus no nocaute *nik1* é muito mais forte do que nos nocautes *nik2* e *nik3*. Em tomateiros não se sabe qual seria o gene NIK geneticamente predominante em defesa antiviral, embora tem sido demonstrado que a cópia Solyc04g005910 de NIK2 eficientemente complementa a função NIK1 na atividade antiviral quanto expressa no genótipo *nik1* de Arabidopsis (EPB Fontes, comunicação pessoal).

O componente a jusante imediato da via de sinalização mediada por NIK1, RPL10A, também foi examinado no genoma de tomateiros, revelando a presença de duas cópias (Tabela 3). Enquanto que em Arabidopsis, RPL10 é representado por uma pequena família gênica de três cópias, AtRPL10A, ArPRL10B e AtRPL10C, os resultados dessa investigação revelam que o genoma de tomateiros contém uma cópia de RPL10B e parece não conter homólogos de RPL10C. O efetor da via de sinalização antiviral, LIMYB, é representado por duas cópias no genoma de tomateiros (Solyc10g049530 e Solyc12g039050; Tabela 3). Uma vez que LIMYB pertence a uma superfamília multigênica em Arabidopsis, estes últimos resultados foram confirmados por meio de diferentes análises filogenéticas da família Myb/SANT-like em tomateiros.

A sequência de aminoácidos dos genes contendo o domínio de ligação ao DNA Myb/SANT-like foram retirados dos bancos de dados TAIR (<http://arabidopsis.org/>) e Phytozome v12 de *Arabidopsis thaliana* e *Solanum Lycopersicum*. Os domínios funcionais foram preditos usando PFAM e SMART databases. Aquelas que foram identificadas como o domínio DNA Myb/SANT-like foram alinhadas usando MUSCLE.

O resultado da análise da reconstrução filogenética utilizando sequências de aminoácidos mais próximas de AtLIMYB em 15 espécies, apresenta um clado filogênico bem destacado, em que o agrupamento dos genes LIMYB são subdivididos em dois subclados (Figura 1). Os genes em tomateiros mais próximos identificados foram Solyc10g049530 e Solyc12g039050, respectivamente. A análise da sequência de aminoácidos baseia-se na funcionalidade da proteína, e não apenas na similaridade da sequência de nucleotídeos. Solyc10g049530 foi classificada recentemente como um transposon, com apenas 8 pares de bases diferentes da Solyc12g039050, além do domínio de transposase. Parece ter havido uma duplicação gênica no ancestral do tomateiro, divergindo nessas duas proteínas, já que em outras espécies de solanáceas também foram encontradas ortólogos a Solyc10g049530 e Solyc12g039050.

Uma segunda análise foi conduzida, utilizando, como referência, apenas os aminoácidos do domínio Myb/SANT-like, que caracteriza a proteína LIMYB (Figura 2). As árvores filogenéticas foram construídas usando a inferência Bayesiana, usando o programa MrBayes v3.2.2, juntamente com o modelo misto de substituição de aminoácidos (Wag). A análise teve 1.000.000 de gerações e excluindo as primeiras 250.000 gerações como burnin. A árvore filogenética obtida apenas pela comparação do domínio LIMYB agrupou os dois homólogos de tomateiros. SILIMYB, com dois sub-clados de Arabidopsis representando cada um dos dois domínios Myb/SANT-like presente em LIMYB. Interessantemente, enquanto que esta análise reproduziu o número de homólogos de tomateiros, em Arabidopsis, analisando apenas os domínios Myb/SANT-like quatro homólogos de LIMYB foram identificados. Análise funcional desses homólogos em tomateiros e Arabidopsis poderão demarcar melhor os ortólogos de LIMYB em cada espécie.

Tabela 3: Predição de ortólogos dos componentes da via de sinalização mediada por NIK1 em tomateiros.

1) Transdutores de sinais								
Template Arabidopsis	Description	Best hit (Tomato)	Description in tomato	Evalue	Identity	Similarity	Coverage	Reference
AT5G16000 (NIK1)	Protein NSP-Interacting Kinase 1	Solyc02g089550	Protein NSP-Interacting Kinase 1	0.0	75.44	85.96	98	Fontes et al. 2004
AT3G25560 (NIK2)	Protein NSP-Interacting Kinase 2	Solyc04g005910	Protein NSP-Interacting Kinase 2	0.0	74.35	84.09	95	
AT3G25560 (NIK2)	Protein NSP-Interacting Kinase 2	Solyc05g010400	Protein NSP-Interacting Kinase 2	0.0	73.38	83.12	95	
AT3G25560 (NIK2)	Protein NSP-Interacting Kinase 2	Solyc07g006110	Subfamily not named	0.0	63.98	79.25	90	
AT1G60800 (NIK3)	Protein NSP-Interacting Kinase 3	Solyc04g039730	Protein NSP-Interacting Kinase 3	0.0	73.47	83.44	98	
AT1G60800 (NIK3)	Protein NSP-Interacting Kinase 3	Solyc05g005140	Protein NSP-Interacting Kinase 3	0.0	64.78	75.94	100	
2) Componentes a jusante								
Template Arabidopsis	Description	Best hit (Tomato)	Description in tomato	Evalue	Identity	Similarity	Coverage	Reference
AT1G14320 (rpL10A)	Ribosomal protein L16p/L10e family protein	Solyc06g007520	Ribosomal Protein L10	2E-139	87.44	91.63	98	Carvalho et al. 2008
AT1G14320 (rpL10A)	Ribosomal protein L16p/L10e family protein	Solyc06g082650	Ribosomal Protein L10	2E-114	92.94	95.88	77	
AT1G26910 (rpL10B)	Ribosomal protein L16p/L10e family protein	Solyc06g082670	Ribosomal Protein L10	2E-140	86.24	91.74	99	
AT5G05800 (LIMYB)	L10-Interacting Myb Domain-containing Protein	Solyc10g049530	Myb/SANT-like DNA-binding domain / DDE superfamily endonuclease	6E-18	35.19	60.19	85	Zorzatto et al. 2015
AT5G05800 (LIMYB)	L10-Interacting Myb Domain-containing Protein	Solyc12g039050	Myb/SANT-like DNA-binding domain	3E-18	34.26	59.26	56	

Referências

Fontes et al. The geminivirus nuclear shuttle protein is a virulence factor that suppresses transmembrane receptor kinase activity. *Genes & development* 18.20 (2004): 2545-2556.
 Carvalho et al. Regulated nuclear trafficking of rpL10A mediated by NIK1 represents a defense strategy of plant cells against virus. *PLoS pathogens* 4.12 (2008): e1000247.
 Zorzatto et al. NIK1-mediated translation suppression functions as a plant antiviral immunity mechanism. *Nature* 520.7549 (2015): 679-682.

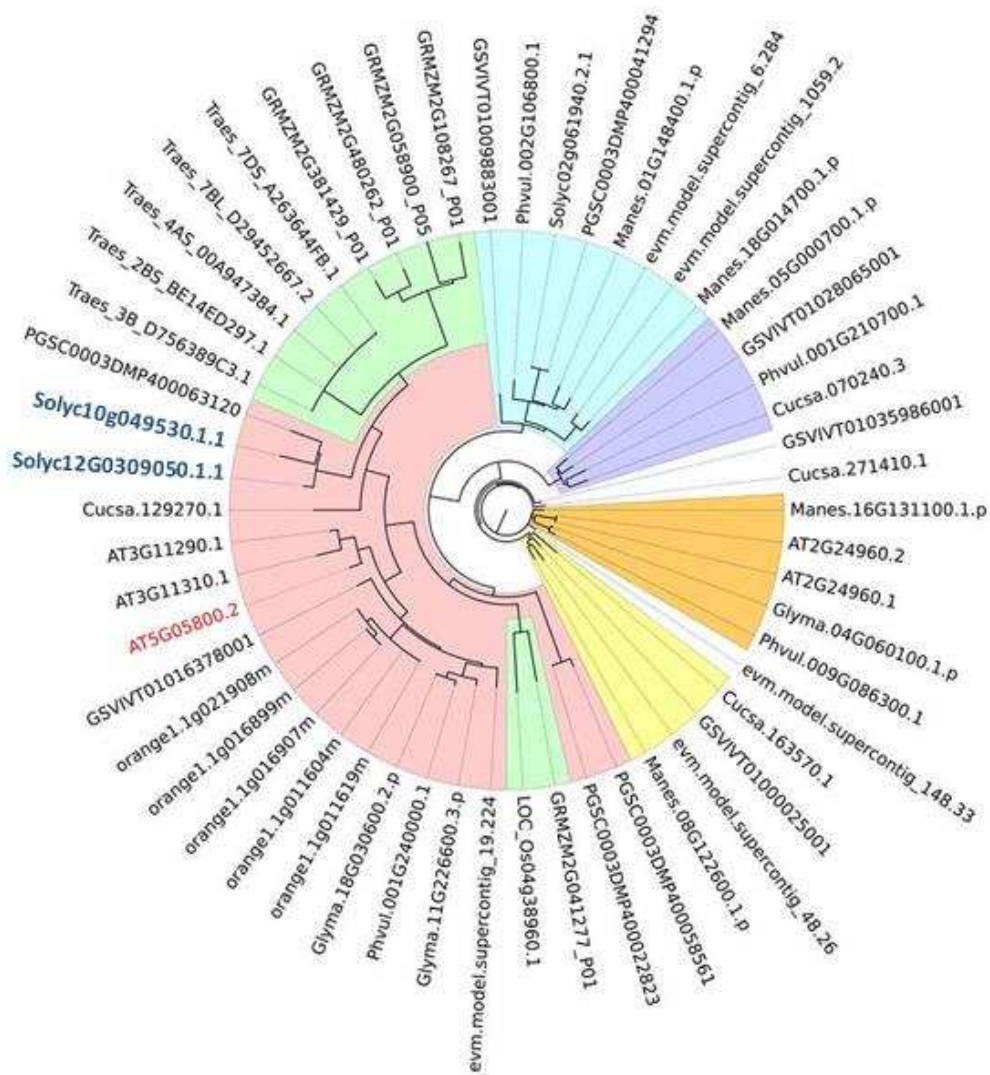


Figura 1. Reconstrução filogenética, baseada nos aminoácidos presente em 15 espécies, tomando como base AtLIMYB. Foram obtidas cerca de 5 proteínas por espécie. AtLIMYB é mostrado em vermelho, e os homólogos em tomateiro em azul.

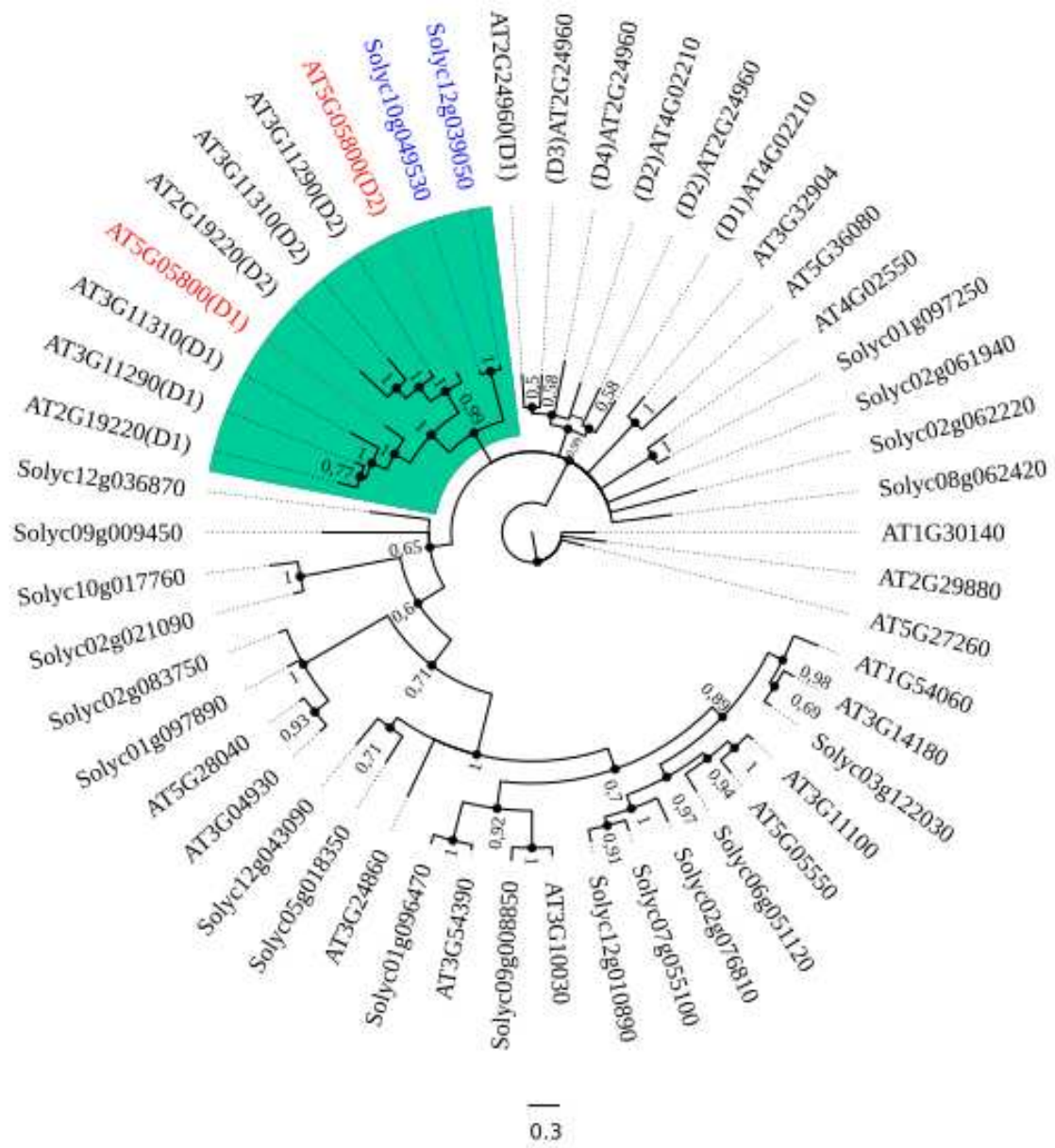


Figura 2. Análise filogenética do domínio Myb/SANT-like. Os domínios Myb/SANT-like de LIMYB são mostrados em vermelho, e os homólogos de tomateiro em azul.

4.2 Obtenção de linhagens transgênicas de tomateiros expressando simultaneamente NIK1-T469A/T474D e LIMYB

Para transformação de tomateiros com o gene LIMYB sob o controle do promotor 35S, o cDNA de LIMYB foi inserido no vetor binário pEarley101, para transformação de plantas mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. O genótipo utilizado para transformação foi a linhagem transgênica de tomateiro (Money maker), previamente transformado com uma construção de DNA, contendo a ORF de mutante duplo de NIK1, NIK1-T469A/474D fusionada a GFP, sob o controle do promotor 35S. Tem sido demonstrado que o mutante NIK1-T474D e NIK1-T469A possuem atividade de fosforilação do substrato 1.5 vezes superior do que NIK1 normal (SANTOS et al., 2010). No caso de NIK1-T474D, foi demonstrado que substituição do resíduo Thr-474 que é crucial para ativação de NIK1, por um resíduo de aspartato, que mimetiza fosforilação na posição 474 e promove ativação constitutiva do receptor, o que justifica sua alta atividade de cinase (BRUSTOLINI et al., 2015; SANTOS et al., 2010; ZORZATTO et al., 2015). Em se tratando de NIK1-T469A, acredita-se que fosforilação no resíduo de Thr-469 iniba a atividade da cinase e, portanto, a substituição desse resíduo na posição 469 por alanina alivia a repressão da fosforilação e ativa a mesma (SANTOS et al., 2010). Conseqüentemente, a hipótese central dessa investigação seria que expressão de um mutante duplo NIK1-T469A/T474D resultaria em ativação constitutiva do receptor sem o efeito inibitório da posição 469 o que resultaria em maior atividade da cinase, sendo assim um melhor alvo para reconstrução de uma via antiviral constitutivamente ativada em tomateiros. Também foi certificado em ensaio de infecção em *Arabidopsis* que a superexpressão do efetor da via de sinalização antiviral LIMYB confere resistência ao begomovírus CaLCuV (*Cabbage leaf curly virus*) (ZORZATTO et al., 2015). Sendo assim, para reconstrução da via de sinalização antiviral em tomateiros, foi utilizado a estratégia de superexpressar LIMYB em plantas ectopicamente expressando NIK1-T469A/T474D. Para avaliar essa hipótese, tomateiros previamente transformados com NIK1-T469A/T474D foram transformados com o gene quimérico LIMYB-YFP sob o controle do promotor 35S. Transformantes primários foram selecionados em cultura de tecido, sendo que hipocótilos foram regenerados, seguindo do brotamento e aclimatização (Figura 3).



Figura 3. Hipocótilos regenerando, seguido do brotamento e aclimação.

A incorporação do transgene foi monitorada por PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos para AtLIMYB e vetor pEarley 101 (Figura 4). Além disso, nos transformantes primários, a estabilidade do transgene NIK1-T469A/T474D foi confirmada por PCR com oligonucleotídeos específicos para AtNIK1 e vetor pKFWG2. A linhagem transgênica de tomateiro NIK1-T474D-6, previamente descrita (BRUSTOLINI et al., 2015), também foi incluída nos experimentos subsequentes. Além de confirmar a incorporação dos transgenes NIK1-T474D e NIK1-T469A/T474D, nas linhagens transgênicas previamente obtidas, foram obtidas, nesta investigação, três linhagens transgênicas independentes NIK1-T469AT474D/LIMYB_1, NIK1-T469AT474D/LIMYB_2, NIK1-T469AT474D/LIMYB_3. O desempenho de desenvolvimento dessas linhagens transgênicas duplamente transformadas é mostrado na Figura 5.

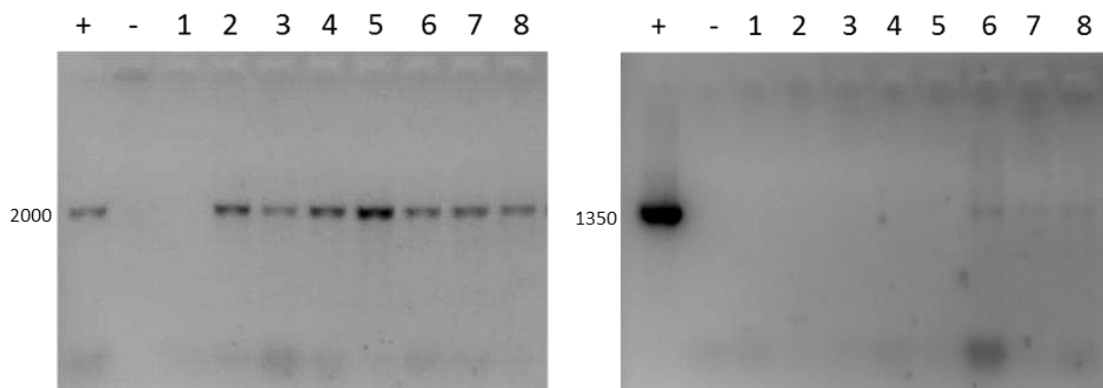


Figura 4. Análise molecular das linhagens transgênicas. A. PCR diagnóstico das linhagens NIK1-T474D, NIK1-T469A/T474D e NIK1-T469A/T474D-27/LIMYB, para identificação da incorporação dos transgenes. DNA total das plantas transformadas foi extraído e utilizado como molde em reações de PCR com oligonucleotídeos específicos para as construções de DNA incorporadas. O gel da esquerda mostra o resultado do PCR diagnóstico da incorporação das versões mutadas de NIK1 e o gel da direita representa o diagnóstico da incorporação de LIMYB. + Controle positivo; - Controle negativo 1- WT; 2- NIK1-T474D; 3- NIK1-T469A/T474D _1; 4- NIK1-T469A/T474D_2; 5- NIK1-T469A/T474D_3; 6- LIMYB_1; 7- LIMYB_2; 8- LIMYB_3; O controle positivo consiste na construção do inserto de LIMYB no vetor Pearley101. Os primers utilizados para identificar NIK foram MC36(3408) e AtNIK1 Rvs(3774), e LIMYB foram At5g05800 Fwd e At5g05800 Rvs NS.

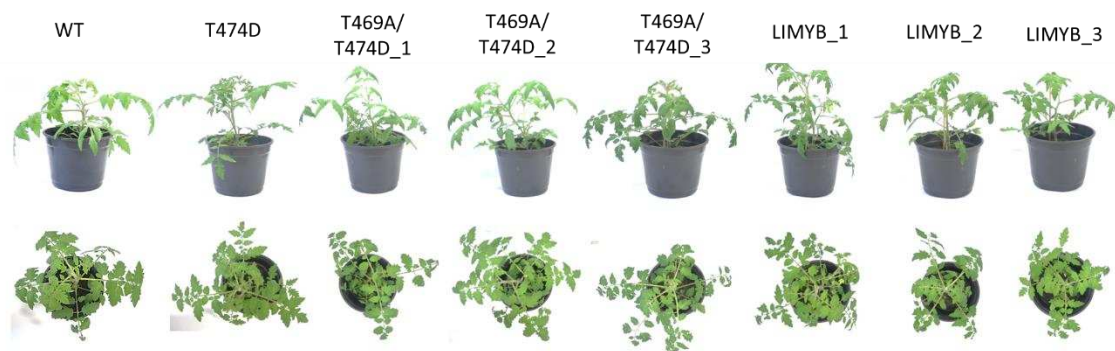


Figura 5. Fenótipo de desenvolvimento das linhagens transgênicas. Foto retirada de plantas de 25 dias .

4.3 Reconstituição *in vivo* da via de sinalização antiviral mediada por NIK1 em tomateiros

A ativação da via de sinalização antiviral mediada por NIK1 culmina com a repressão de genes de proteínas ribossomais mediada por LIMYB (ZORZATTO et al., 2015). De fato, a ativação constitutiva de NIK1, por expressão do mutante NIK1-T474D em *Arabidopsis*, causa repressão dos genes ribossomais S13a, S25, L1/L4, L13 e L28 e, assim como a superexpressão do gene AtLIMYB em *Arabidopsis*. Recentemente, foi demonstrado que NIK1-T474D mantém a propriedade de ativação constitutiva em tomateiros, sendo capaz de sustentar a via de sinalização antiviral ativada na ausência de infecção por begomovirus (BRUSTOLINI et al., 2015). Consistente com esta observação, nesta investigação, a expressão de NIK1-T474D em tomateiros promoveu a supressão da expressão dos genes de proteínas ribossomais SIS25, SIS13 e SIL13, demonstrando que os homólogos de RPL10 e LIMYB em tomateiros são funcionalmente conservados (Figura 6). Com a finalidade de verificar se o mutante duplo NIK1-T469A/474D também é ativado constitutivamente em tomateiros, a expressão dos genes de proteínas ribossomais foi analisada nas três linhagens transgênicas independentes T469A/474D-16, T469A/474D-19 e T469A/474D-27. Como comparado com a linhagem não transformada (WT), os três genes de proteínas ribossomais foram reprimidos nas linhagens expressando o mutante duplo, porém em uma extensão ligeiramente menor para alguns genes ribossomais do que a redução observada na linhagem T474D. Embora este resultado parece contradizer a premissa inicial que preconiza que o mutante duplo T469A/T474D seria mais eficiente do que o mutante simples T474D, os níveis de expressão do transgene T474D foi muito superior do que aqueles dos mutantes duplos nas três linhagens independentes, o que pode explicar eficiência similar desse transgene na repressão dos genes de proteínas ribossomais (Figura 6, AtNIK1). Essa linhagem NIK1 mutante, T474D-6, foi escolhida exatamente por que apresentou fenótipo de maior resistência à infecção viral (BRUSTOLINI et al., 2015). Notavelmente, a expressão de LIMYB na linhagem T469A/T474D-27 promoveu um efeito aditivo na repressão dos genes ribossomais e os níveis de expressão dos genes SIS25, SIS13 e SIL13 reduziu 75-80% nas três linhagens independentes T469A/T474D-27-LIMYB_1, T469A/T474D-27-LIMYB_2 e T469A/T474D-27-LIMYB_3. Estes resultados indicam que a expressão ectópica de LIMYB e do receptor AtNIK1 ativado (T469A/T474D) em tomateiros reconstitui constitutiva e funcionalmente a via de sinalização antiviral mediada por NIK1

em tomateiros com eficiência superior à expressão individual dos receptores ativados NIK1-T474D ou NIK1-T469A/T474D.

Com o objetivo de avaliar a suscetibilidade das plantas mutantes à infecção por begomovírus, linhagens independentes foram inoculadas com clones infecciosos de begomovirus que infectam tomateiros através de biobalística. No total de 15 plantas de cada linhagem utilizada no experimento, 3 plantas foram utilizadas como controles, bombardeadas apenas com tungstênio, 6 plantas foram infectadas com ToYSV e 6 plantas foram infectadas com ToSRV. Foi feito o PCR dessas plantas a cada 7 dias com objetivo de detectar a infecção e observados os seus sintomas. Além do diagnóstico molecular da infecção, a avaliação da resistência das plantas se baseou em análise de sintomatologia e quantificação do acúmulo do DNA viral nas plantas infectadas. Amostragens representativas dos sintomas desenvolvidos nas linhagens desafiadas é mostrada na Figuras 7 e 8.

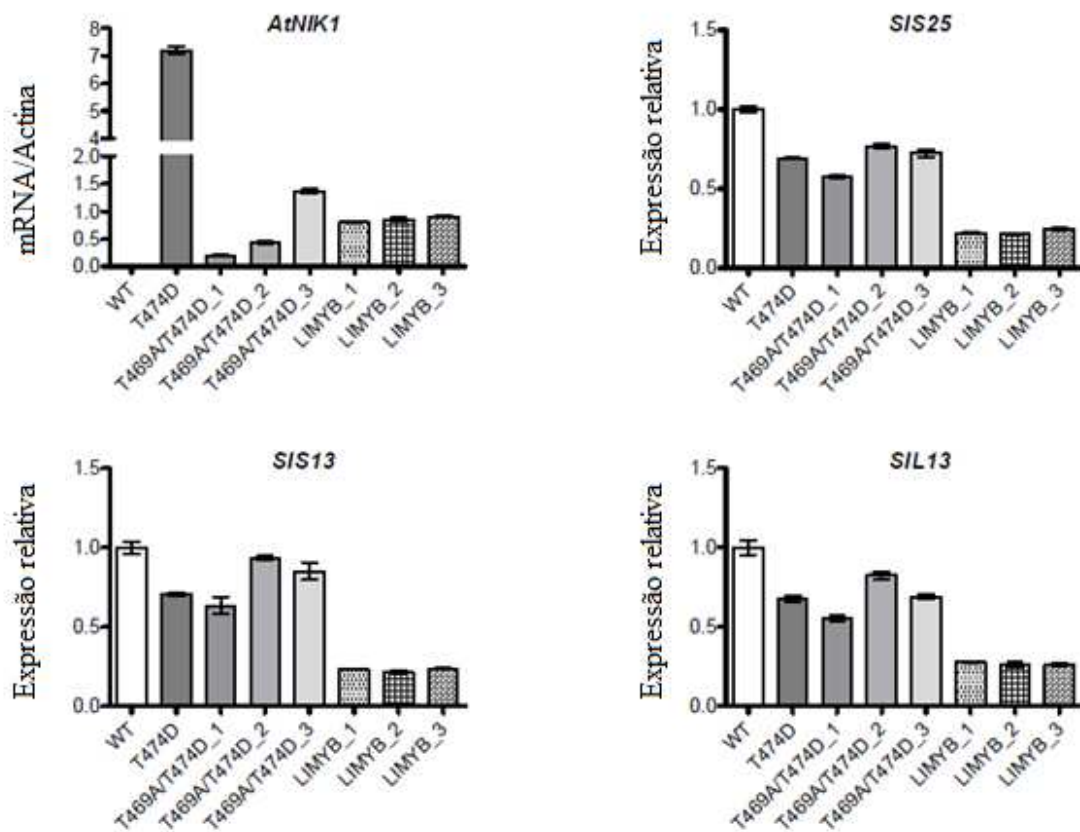


Figura 6. Supressão de genes ribossomais de tomateiros por expressão de NIK1-T469A/T474D e de LIMYB. Todos os valores nos eixos das ordenadas dos quatro gráficos foram normalizados utilizando os valores de actina. O valor do gráfico de NIK1 mostra expressão absoluta, enquanto que nos gráficos das proteínas ribossomais é mostrado o valor relativo a WT.

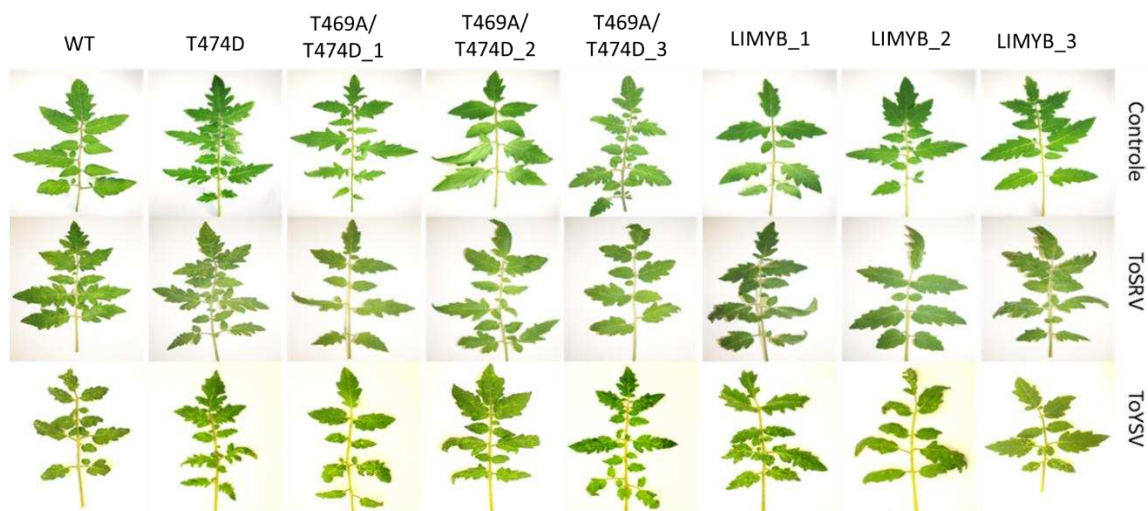


Figura 7. Sintomatologia da infecção viral nas linhagens transgênicas. Linhagens transgênicas e WT foram bombardeadas com TOYSV e TOSRV para comparação de sintomas e resistência. Três plantas também foram bombardeadas apenas com tungstênio, como controle. Cada linha representa um tratamento e cada coluna representa uma linhagem. Foto retirada após 40 dias após infecção.

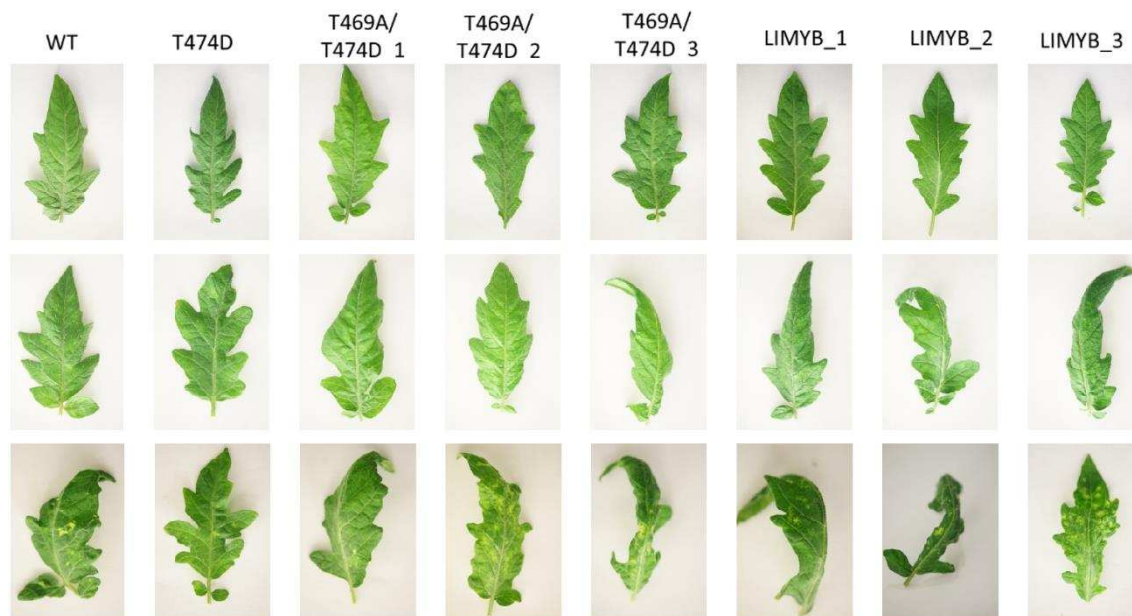


Figura 8. Sintomatologia da infecção viral nas linhagens transgênicas. Linhagens transgênicas e WT foram bombardeadas com TOYSV e TOSRV para comparação de sintomas e resistência. Três plantas também foram bombardeadas apenas com tungstênio, como controle. Cada linha representa um tratamento e cada coluna representa uma linhagem. Foto retirada após 40 dias após infecção.

Os principais sintomas observados foram aqueles dos quais se derivou o nome dos vírus, ou seja, o principal sintoma do ToSRV (*Tomato severe rugose virus*) é a

rugosidade, assim como o principal sintoma do ToYSV (*Tomato yellow spot virus*) é o aparecimento de pontos amarelados, que com o passar do tempo aumentam de diâmetro, chegando a formar manchas. Também foi analisada a porcentagem de plantas que apresentaram os sintomas que compõem o quadro de desenvolvimento da doença, como: rugosidade, encurvamento da folha, aparecimento de pontos/manchas amarelas e clorose, mostrados na Tabela 4.

Na Tabela, durante o progresso da infecção, observa-se a diminuição da severidade de alguns sintomas ao invés de aumento de severidade. Ocorre a impressão de que os sintomas progrediram, porém, como a severidade foi observada em termos de porcentagem de folhas afetadas e gravidade dos sintomas, algumas plantas que continuaram apenas com folhas antigas apresentando sintomas, e folhas novas sadias, houve uma diminuição relativa de sintomas. A infecção com ToYSV desenvolveu sintomas precoces bem pronunciados (denominados spots amarelos) e com intensidade crescente. Os sintomas desenvolvidos por ToSRV foram tardios e mais pronunciados aos 28 dias após inoculação.

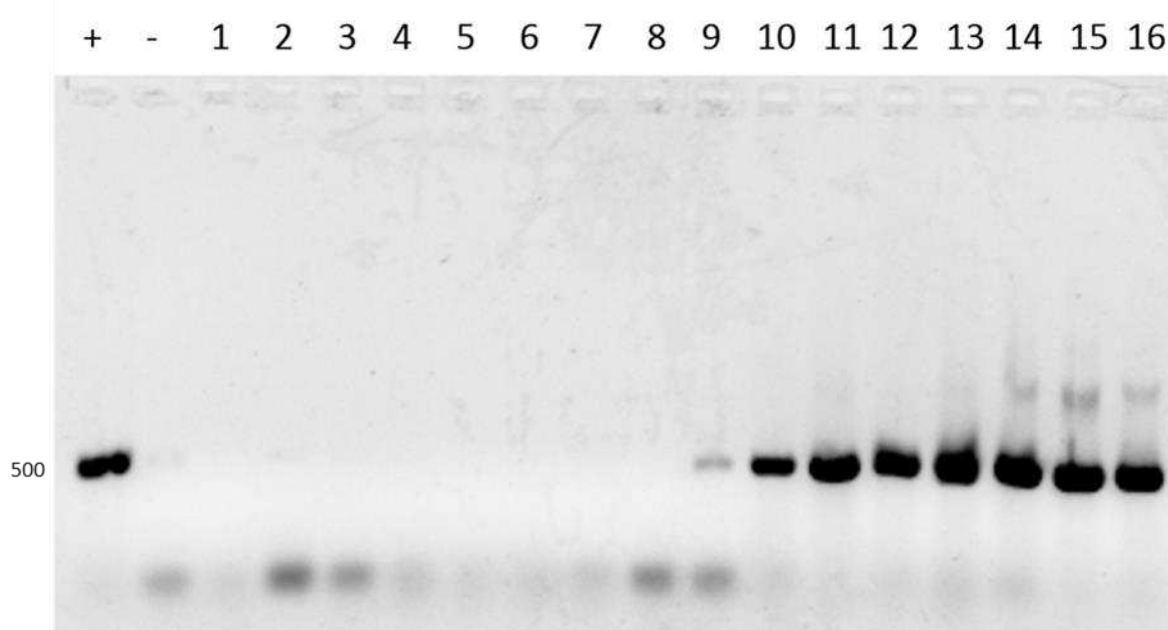


Figura 9. Diagnóstico da infecção viral de TOYSV nas linhagens transgênicas. Linhagens transgênicas e WT tiveram seus DNA extraídos e foi feito a confirmação de infecção usando oligonucleotídeos degenerados. + Controle positivo; - Controle negativo. Controles inoculados com tungstênio: 1- WT; 2- NIK1-T474D; 3- NIK1-T474D/T469A_1; 4- T474D/T469A_2; 5- T474D/T469A_3; 6- LIMYB_1; 7- LIMYB_2; 8- LIMYB_3; Linhagens inoculadas com TOYSV: 9- WT; 10- NIK1 T474D; 11- NIK1-

T474D/T469A_1; 12- T474D/T469A_2; 13- T474D/T469A_3; 14- LIMYB_1; 15- LIMYB_2; 16- LIMYB_3;

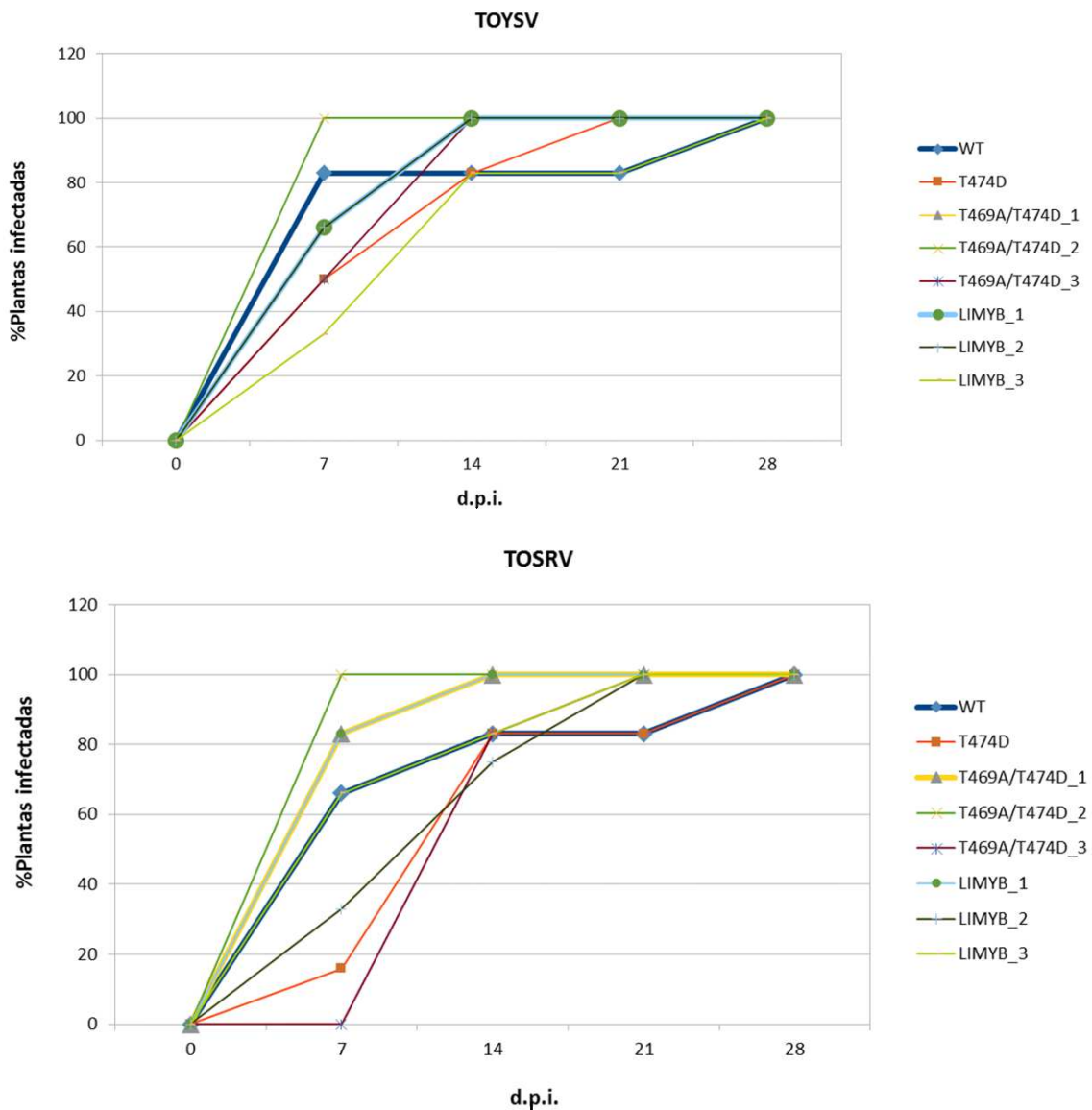


Figura 10. Progressão da infecção viral nas linhagens transgênicas. Bombardeadas com ToYSV e ToSRV. Cada linha representa uma linhagem e mostra a porcentagem de plantas infectadas, considerando análise de sintomas e diagnóstico por PCR. No eixo X, está representado dias pós inoculação (DPI).

Após confirmadas as plantas infectadas (Figura 9), procedeu-se à quantificação da carga viral. A avaliação do acúmulo do DNA viral por Real-Time-PCR foi feito no 14º dia após a infecção. Foi feito PCR em tempo real apenas das amostras infectadas por ToSRV, aos 14 dias após a infecção. Nas amostras infectadas por ToYSV, apenas uma

planta WT foi infectada e confirmada por PCR, não possibilitando confiabilidade estatística para avaliação dos resultados.

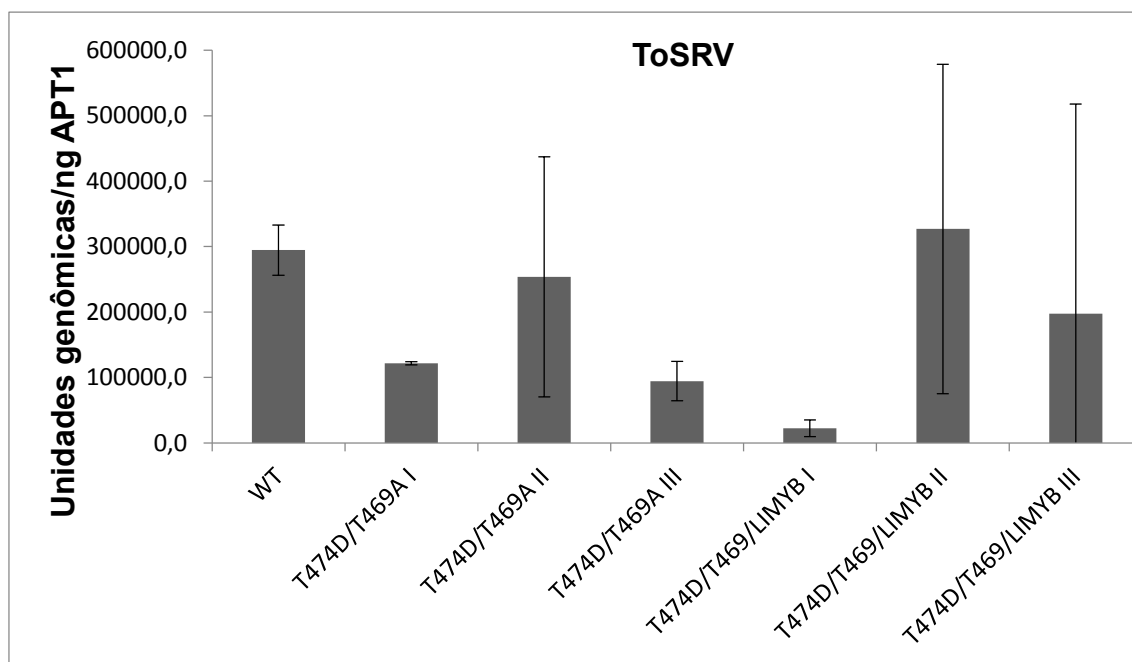


Figura 11. Quantificação da carga viral de tomateiros infectados com ToSRV. DNA total foi extraído de linhagens transgênicas e WT aos 14 dias após inoculação. O DNA viral foi quantificado por real time PCR, utilizando os oligonucleotídeos PCRC 1 e PBL1 v 2040 , específicos para o componente B de ToSRV.

O intervalo de confiança (IC) nos mostra a confiabilidade e repetibilidade de um dado. Logo quanto menos as amostras diferirem entre si, menor o intervalo de confiança. O IC de algumas amostras foram demasiadamente grandes. Essa amplitude do intervalo é associada à incerteza que temos à respeito do parâmetro. Isso pode ser explicado pelo variação biológica natural entre as plantas individuais e pelo número reduzido de repetições biológicas nos ensaios de infecção. Nos dados analisados em que as amostras possuem um IC pequeno, ou seja, maior confiabilidade fica demonstrado que amostras das linhagens NIK1 duplo mutante (NIK1-T469A/T474D) possuem aproximadamente 66% menos unidades genômicas de vírus do que WT. Na linhagem com IC confiável transformada com LIMYB, há aproximadamente 92% menos unidades genômicas de vírus do que WT. Esses resultados indicam que a reconstituição da via antiviral ativada por expressão de NIK1-T469A/T474D e AtLIMYB em tomateiros confere alto nível de resistência contra o begomovirus ToSRV. Entretanto, é necessário que se analisem mais

linhagens independentes para sustentabilidade científica desses resultados de resistência a begomovírus.

Tabela 4: Análise semanal da porcentagem de plantas que apresentam sintomas no período de 28 dias.

Linhagens	Pontos-manchas amarelos			Clorose foliar			Encarquilhamento			Enrolamento das folhas		
	Dias após inoculação	ToYSV	ToSRV	Dias após inoculação	ToYSV	ToSRV	Dias após inoculação	ToYSV	ToSRV	Dias após inoculação	ToYSV	ToSRV
WT	7 dias	0	50	7 dias	0	0	7 dias	0	0	7 dias	0	0
	14 dias	0	0	14 dias	16,6	0	14 dias	0	50	14 dias	33,3	16,6
	21 dias	0	66,6	21 dias	16,6	83,3	21 dias	0	0	21 dias	0	0
	28 dias	0	100	28 dias	0	100	28 dias	0	0	28 dias	0	100
T474D	Dias após inoculação	ToYSV	ToSRV	Dias após inoculação	ToYSV	ToSRV	Dias após inoculação	ToYSV	ToSRV	Dias após inoculação	ToYSV	ToSRV
	7 dias	100	0	7 dias	0	0	7 dias	0	0	7 dias	0	0
	14 dias	0	33,3	14 dias	0	0	14 dias	0	0	14 dias	0	0
	21 dias	100	0	21 dias	0	50	21 dias	0	0	21 dias	0	0
	28 dias	100	0	28 dias	0	66,6	28 dias	0	0	28 dias	0	33,3
T469A/T474D 1	Dias após inoculação	ToYSV	ToSRV	Dias após inoculação	ToYSV	ToSRV	Dias após inoculação	ToYSV	ToSRV	Dias após inoculação	ToYSV	ToSRV
	7 dias	0	0	7 dias	0	0	7 dias	0	0	7 dias	0	0
	14 dias	50	0	14 dias	16,6	0	14 dias	0	0	14 dias	16,6	33,3
	21 dias	33,3	0	21 dias	66,6	33,3	21 dias	0	0	21 dias	0	0
	28 dias	100	0	28 dias	0	16,6	28 dias	50	0	28 dias	0	100
T469A/T474D 2	Dias após inoculação	ToYSV	ToSRV	Dias após inoculação	ToYSV	ToSRV	Dias após inoculação	ToYSV	ToSRV	Dias após inoculação	ToYSV	ToSRV
	7 dias	83,3	0	7 dias	83,3	0	7 dias	0	0	7 dias	0	0
	14 dias	33,3	0	14 dias	33,3	0	14 dias	0	0	14 dias	16,6	33,3
	21 dias	50	0	21 dias	50	0	21 dias	0	0	21 dias	0	0
	28 dias	83,3	0	28 dias	83,3	0	28 dias	0	0	28 dias	0	100
T469A/T474D 3	Dias após inoculação	ToYSV	ToSRV	Dias após inoculação	ToYSV	ToSRV	Dias após inoculação	ToYSV	ToSRV	Dias após inoculação	ToYSV	ToSRV
	7 dias	50	0	7 dias	0	0	7 dias	0	0	7 dias	0	0
	14 dias	100	0	14 dias	0	50	14 dias	0	0	14 dias	16,6	0
	21 dias	100	0	21 dias	0	100	21 dias	0	0	21 dias	100	100
	28 dias	100	100	28 dias	0	50	28 dias	100	100	28 dias	0	100
LIMYB_1	Dias após inoculação	ToYSV	ToSRV	Dias após inoculação	ToYSV	ToSRV	Dias após inoculação	ToYSV	ToSRV	Dias após inoculação	ToYSV	ToSRV
	7 dias	50	0	7 dias	0	0	7 dias	0	0	7 dias	0	0
	14 dias	66,6	16,6	14 dias	0	50	14 dias	0	0	14 dias	0	16,6
	21 dias	83,3	0	21 dias	0	100	21 dias	0	0	21 dias	83,3	0
	28 dias	100	0	28 dias	0	100	28 dias	100	100	28 dias	0	100
LIMYB_2	Dias após inoculação	ToYSV	ToSRV	Dias após inoculação	ToYSV	ToSRV	Dias após inoculação	ToYSV	ToSRV	Dias após inoculação	ToYSV	ToSRV
	7 dias	33,3	0	7 dias	0	50	7 dias	0	0	7 dias	0	0
	14 dias	100	0	14 dias	0	25	14 dias	0	0	14 dias	0	25
	21 dias	100	50	21 dias	0	0	21 dias	0	0	21 dias	50	0
	28 dias	100	0	28 dias	0	0	28 dias	50	0	28 dias	0	25
LIMYB_3	Dias após inoculação	ToYSV	ToSRV	Dias após inoculação	ToYSV	ToSRV	Dias após inoculação	ToYSV	ToSRV	Dias após inoculação	ToYSV	ToSRV
	7 dias	16,6	0	7 dias	0	0	7 dias	0	0	7 dias	0	0
	14 dias	66,6	0	14 dias	50	0	14 dias	0	0	14 dias	16,6	33,3
	21 dias	50	83,3	21 dias	0	0	21 dias	0	0	21 dias	16,6	0
	28 dias	83,3	0	28 dias	0	0	28 dias	100	100	28 dias	0	100

5. Conclusões

Os resultados dessa investigação forneceram evidências de que a via antiviral sinalizada por NIK1 é conservada em plantas e opera funcionalmente em tomateiro. Análises *in silico* permitiram identificar em tomateiros homólogos que compartilham alta identidade de sequência com os componentes da via de sinalização caracterizados em *Arabidopsis*, contendo domínios conservados, que sugerem homologia funcional. A alta similaridade da proteína Solyc12g039050.1 e Solyc10g049530 com AtLIMYB nas diversas análises filogenéticas indicam que LIMYB é representada por duas cópias no genoma de tomateiros. Além disso, a expressão de mutantes de AtNIK1, constitutivamente ativados, NIK1-T474D e NIK1-T469A/T474D, suprime a expressão de genes de proteínas ribossomais homólogas as proteínas ribossomais de *Arabidopsis*, indicando que os mecanismos regulatórios e de funcionalidade da via de sinalização antiviral são conservados em tomateiros e em *Arabidopsis*. As análises no duplo mutante transformados com AtLIMYB e a queda mais brusca nos níveis de proteínas ribossomais reforça ainda mais essa hipótese. No ensaio de infectividade viral, os resultados confirmam a importância da NIK1 superativa para a ativação da via, como também demonstram menor acúmulo de carga viral pela superexpressão de AtLIMYB.

6. Referências Bibliográficas

AFZAL, A. J.; WOOD, A. J.; LIGHTFOOT, D. A. Plant Receptor-Like Serine Threonine Kinases : Roles in Signaling and Plant Defense. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 21, n. 5, p. 507–517, 2008.

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997.
BISARO, D.. 30 Geminivirus DNA Replication. Cold Spring Harbor Monograph Archive, North America, 31, jan. 1996

BRIDDON, R. W. et al. Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses. **BCM Evolutionary Biology**, v. 10, n. 97, p. 1–17, 2010.

BRUSTOLINI, O. J. B. et al. Sustained NIK-mediated antiviral signalling confers broad-spectrum tolerance to begomoviruses in cultivated plants. **Plant Biotechnology Journal**, v. 13, n. 9, p. 1300–1311, 2015.

CARVALHO, C. M. et al. Regulated nuclear trafficking of rpL10A mediated by NIK1 represents a defense strategy of plant cells against virus. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 12, 2008.

DUBOS, C. et al. MYB transcription factors in Arabidopsis. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 10, p. 573–581, 2010.

EDGAR, R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.

FONTES, E. P. B. et al. The geminivirus nuclear shuttle protein is a virulence factor that suppresses transmembrane receptor kinase activity. **Genes & Development**, v. 18, p. 2545–2556, 2004.

FRARY, A.; EARLE, E. D. An examination of factors affecting the efficiency of Agrobacterium-mediated transformation of tomato. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 235–240, 1996.

GISH, L. A.; CLARK, S. E. The RLK/Pelle family of Kinases. **Plant Journal**, v. 66, n. 1, p. 117–127, 2015.

GUBLER, F. et al. Gibberellin-Regulated Expression of a myb Gene in Barley Aleurone Cells: Evidence for Myb Transactivation of a High-pI α -Amylase Gene Promoter. **The Plant Cell**, v. 7, n. November, p. 1879–1891, 1995.

HANKS, S. K. et al. The Protein Kinase Family : Conserved Features and Deduced Phylogeny of the Catalytic Domains Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/1701319>
REFERENCES Linked references are available on. **Science**, v. 241, n. 4861, p. 42–52, 1988.

HANLEY-BOWDOIN, L.; BEJARANO, E. R.; ROBERTSON, D. Geminiviruses : masters at redirecting and reprogramming plant processes. **Nature Publishing Group**, v. 11, n. 11, p. 777–788, 2013.

HARRISON, B. D.; ROBINSON, D. J. Natural Genomic and Antigenic Variation in Whitefly-Transmitted geminiviruses (Begomoviruses). **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, n. 11, p. 369–398, 1999.

HUBER, S. C. et al. Tyrosine Phosphorylation of the BRI1 Receptor Kinase Occurs via a Post-Translational Modification and is Activated by the ... Tyrosine phosphorylation of the BRI1 receptor kinase occurs via a post-translational modification and is activated by the juxta. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, n. August, p. 11–14, 2012.

JACKSON, D. et al. Expression Patterns of myb Genes from Antirrhinum Flowers. **The Plant Cell**, v. 3, n. February, p. 115–125, 1991.

JOHNSON, K. L.; INGRAM, G. C. Sending the right signals : regulating receptor kinase activity. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, p. 648–656, 2005.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. November, p. 323–329, 2006.

LEGG, J. P.; THRESH, J. . Cassava mosaic virus disease in East Africa : A dynamic disease in a changing environment Cassava mosaic virus disease in East Africa : a dynamic disease in a changing environment. **Virus Research**, v. 71, n. June 2017, p. 135–149, 2000.

LIN, W. et al. Tyrosine phosphorylation of protein kinase complex BAK1 / BIK1 mediates Arabidopsis innate immunity. **PNAS**, v. 111, n. 9, p. 3632–3637, 2014.

LOURENÇÃO, A. L.; NAGAI, H. Surtos Populacionais no Estado de São Paulo. **Bragantia**, v. 53(1), p. 53–59, 1994.

LOZANO-DURÁN, R. Tansley insight Geminiviruses for biotechnology : the art of parasite taming. **New Phytologist**, v. 210, p. 58–64, 2016.

LUSCHER, B.; EISENMAN, R. N. New light on Myc and Myb . Part I . Myc. **Genes & Development**, v. 4, p. 2025–2035, 1990.

MAPA, Guia para o Reconhecimento e Manejo da Mosca-branca, da Geminivirose e da Crinivirose na Cultura do Tomateiro. Disponível em: ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/127764/1/CT-142.pdf, Retirado na data 21 de novembro de 2016.

MARIANO, A. C. et al. Identification of a novel receptor-like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shuttle protein. **Virology**, v. 318, n. 1, p. 24–31, 2004.

MARTIN, C.; PAZ-ARES, J. MYB transcription factors in plants. **Trends in Genetics**, v. 13, n. 2, p. 67–73, 1997.

ROJAS, M. R. et al. Use of Degenerate Primers in the Polymerase Chain Reaction to

Detect Whitefly-Transmitted Geminiviruses Plant Disease, 1993.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3 : Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572–1574, 2003.

RUBARTELLI, A.; RUBARTELLI, A.; LOTZE, M. T. Inside , outside , upside down : molecules (DAMPs) and redox. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 10, p. 429–436, 2015.

SAKAMOTO, T. et al. The tomato RLK superfamily: phylogeny and functional predictions about the role of the LRR-II-RLK subfamily in antiviral defense. **BMC Plant Biology**, v. 12, p. 229, 2012.

SANTOS, A. A. et al. NSP-interacting kinase , NIK : a transducer of plant defence signalling. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 14, p. 3839–3845, 2010.

SILVA, A.; SANTOS, C.; NASCIMENTO, A. TRANSMISSÃO DE BEGOMOVÍRUS DE PLANTAS DANINHAS PARA TOMATEIROS PELA MOSCA-BRANCA. **Planta Daninha**, v. 28, n. 3, p. 507–514, 2010.

SOLANO, R. et al. A Single Residue Substitution Causes a Switch from the Dual DNA Binding Specificity of Plant Transcription Factor MYB . Ph3 to the Animal c-MYB Specificity *. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 5, p. 2889–2895, 1997.

STRACKE, R. et al. The R2R3-MYB gene family in Arabidopsis thaliana The R2R3 - MYB gene family in Arabidopsis thaliana. **Cell signalling and gene regulation**, v. 4, p. 447–456, 2001.

SUZUKI, M.; YAGI, N. DNA recognition code of transcription factors in the helix-turn-helix , probe helix , hormone receptor ,. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. December, p. 12357–12361, 1994.

TSUDA, K.; KATAGIRI, F. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, n. 4, p. 459–465, 2010.

URAO, T. et al. An Arabidopsis myb Homolog 1 s Induced by Dehydration Stress and Its Gene Product Binds to the Conserved MYB Recognition Sequence. **The Plant Cell**, v. 5, n. November, p. 1529–1539, 1993.

ZHANG, X. S. et al. Domain-Specific Positive Selection Contributes to the Evolution of Arabidopsis Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinase (LRR RLK) Genes. **Journal of Molecular Evolution**, v. 63, p. 612–621, 2006.

ZHOU, X.; ROBINSON, D. J.; HARRISON, B. D. Types of variation in DNA-A among isolates of East African cassava mosaic virus from Kenya , Malawi and Tanzania. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 2835–2840, 1998.

ZORZATTO, C. et al. NIK1-mediated translation suppression functions as a plant antiviral immunity mechanism. **Nature**, v. 0, p. 1–19, 2015.

