

VIRGÍLIO ADRIANO PEREIRA LORIATO

**MECANISMOS DE RESISTÊNCIA CONTRA GEMINIVIROSES E
O POTENCIAL DO MUTANTE DUPLO DE NIK1, NIK1-
T469A/T474D, EM CONFERIR RESISTÊNCIA EM TOMATEIROS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2019

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

T

L872m
2019

Loriato, Virgilio Adriano Pereira, 1985-
Mecanismos de resistência contra geminivirose e o potencial do mutante duplo de NIK1, NIK1-T469A/T474D, em conferir resistência em tomateiros / Virgilio Adriano Pereira Loriato. – Viçosa, MG, 2019.
vii, 76f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Tomate - Resistência a doenças e pragas. 2. Vírus de plantas. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. II. Título.

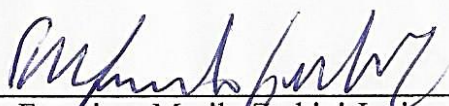
CDD 22 ed. 635.64298

VIRGILIO ADRIANO PEREIRA LORIATO

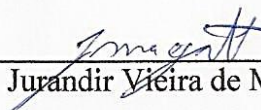
**MECANISMOS DE RESISTÊNCIA CONTRA GEMINIVIROSES E O
POTENCIAL DO MUTANTE DUPLO DE NIK1, NIK1-T469A/T474D, EM
CONFERIR RESISTÊNCIA EM TOMATEIROS**

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

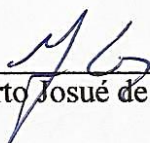
APROVADO: 31 de Julho de 2019.



Francisco Murilo Zerbini Junior



Jurandir Vieira de Magalhaes



Humberto Josué de Oliveira Ramos



Pedro Augusto Braga dos Reis



Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa, pelo suporte técnico e científico a meu aprendizado e contribuição por toda minha formação profissional durante a graduação, mestrado e doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

À professora Elizabeth Fontes, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório como assistente de laboratório, pela exemplar orientação durante o meu Doutorado, pela paciência diante dos meus deslizes, pelo grande exemplo de dedicação a pesquisa, e por me fazer entender que o trabalho não tem limite.

Aos amigos do LBMP, pela excelente convivência e pela oportunidade de aprendizado diária e estímulo a criatividade para resolução de problemas. Ao Caio e Gabriel, pelo apoio durante os ensaios de infecção viral, e análises com IRGA. Ao Cleisinho por me lembrar que nada resiste ao trabalho. A Christiane por me fazer chorar após criação de camundongos, e total apoio durante os ensaios de fosforilação. A Gláucia e Marlene, por manter nosso ambiente sempre harmonioso. Ao professor Humberto Ramos, por todo apoio nos ensaios de fosforilação, e discussões psicodélicas.

Ao professor Leandro, por gentilmente ter nos auxiliado durante a purificação de NIK1, LIMYB, e em outros experimentos.

A Laura Lina, por todo apoio nos experimentos, PACIÊNCIA, e por não ter me deixado desanimar quando o cansaço bateu. Sem você as coisas seriam muito mais difíceis. Obrigado pelo companheirismo e por alegrar minha vida.

A meus amigos da banda Esbórnica; Bruno, Caio, Rogéris, Ruan, por tornarem meus dias de Viçosa muito mais divertidos.

Aos meus pais, Rosania e Humberto, por sempre me apoiarem e pela disposição em todos os momentos que precisei. Pelo carinho com que fui criado, pelos puxões de orelha, e por me lembrarem diariamente das minhas origens, dos princípios e do menino que eles criaram.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	vi
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO I.....	4
Engineering resistance against geminiviruses: overcoming suppressed natural defenses and the use of RNAi and CRISPR/Cas system.....	4
CAPÍTULO II.....	41
Estudos funcionais do mutante duplo AtNIK1-T469at474d <i>in vitro</i> e em linhagens transgênicas de tomateiros expressando ectopicamente AtNIK1-T469at474d Fusionado a GFP.....	41
Resumo	42
1.Introdução	43
2. Material e Métodos	47
2.1. Atividade de auto-fosforilação de NIK1 e versões mutadas.....	47
2.2 Transformação de tomateiros mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	51
2.3 Diagnóstico molecular das plantas transgênicas obtidas via organogênese.....	54
2.4 Análise da ativação da via antiviral mediada por NIK1	55
2.5 Respostas das linhagens transgênicas de tomateiro a begomovirus.....	56
3. Resultados.....	58
3.1. O mutante duplo NIK1-T469A/T474D exibe atividade de fosforilação superior à NIK1 normal e ao mutante simples NIK1-T474D	58
3.2 Linhagens transgênicas de tomateiros.....	60
3.3 Análise da ativação da via de sinalização antiviral mediada por NIK1	61
3.4 Respostas das linhagens transgênicas de tomateiro a begomovirus.....	62
4. Discussão	64
5. Referências.....	66
6. Figuras	70

RESUMO

LORIATO, Virgilio Adriano Pereira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Mecanismos de resistência contra geminivirose e o potencial do mutante duplo de NIK1, NIK1-T469A/T474D, em conferir resistência em tomateiros.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

A família *Geminiviridae* é uma das maiores e mais bem-sucedidas famílias de vírus de plantas que infecta uma grande variedade de culturas agronomicamente importantes, tanto dicotiledóneas quanto monocotiledóneas, e causa perdas significativas de produtividade mundialmente. Este amplo espectro de gama de hospedeiros só é possível porque os geminivírus desenvolveram estratégias sofisticadas para superar o arsenal de defesas antivirais em espécies vegetais tão diversas. Além disso, os geminivírus evoluem rapidamente através de recombinação ou pseudo-recombinação para criar naturalmente uma grande diversidade de espécies de vírus com sequências de genoma divergentes, dando ao vírus uma vantagem sobre o sistema de reconhecimento do hospedeiro. Portanto, não é surpreendente que estratégias moleculares eficientes para combater a infecção por geminivírus, em condições de campo aberto, não tenham sido totalmente desenvolvidas e abordadas experimentalmente. No primeiro capítulo, foi discutido o arsenal anti-geminiviral das defesas de plantas, as estratégias de virulência evoluídas dos geminivírus para superar essas defesas de plantas e as estratégias mais recentes que foram projetadas para resistência transgênica. No segundo capítulo, foi determinado experimentalmente a eficiência da resistência contra begomovírus que infectam tomateiros, derivada da manipulação *in vitro* da atividade da sinalização antiviral mediada por NIK1 [“nuclear shuttle protein (NSP)-Interacting Kinase 1]. Epidemias associadas a begomovírus atualmente ameaçam a produção mundial de tomate devido ao surgimento de espécies de vírus altamente patogênicas. Mais de dez espécies diferentes de begomovírus que infectam tomateiros foram identificadas e caracterizadas em território brasileiro na última década. A sinalização antiviral mediada por NIK1 é ativada pela infecção viral e protege as plantas contra begomovírus em interações incompatíveis, mas é superada pelo supressor viral NSP de NIK1, em interações compatíveis. A fosforilação em Thr-474 é o evento crucial que desencadeia a ativação de NIK1. A construção de um mutante de ganho de função, substituindo o resíduo Thr-474 pelo resíduo fosfomimético Asp, aumentou a resistência contra begomovírus em linhagens de tomateiro transgênico. Para gerar uma estratégia de resistência eficiente contra begomovírus, uma segunda mutação em T474D foi introduzida pela substituição do resíduo Thr-469 por Ala e, assim, eliminando o efeito antagonista da fosforilação em Thr-469. O mutante duplo

T469A/474D apresentou maior atividade de fosforilação *in vitro* em comparação com NIK1 e T474D. Os ensaios funcionais foram realizados usando linhagens de tomate transgênico transformadas com uma construção de DNA expressando T469A / T474D fusionado a GFP sob o controle do promotor 35S. As mutações duplas em NIK1 promoveram a ativação constitutiva das defesas mediadas por NIK1, mesmo em baixos níveis de expressão do transgene, resultando na repressão dos genes da proteína ribossomais, marcadores moleculares da ativação da sinalização antiviral. Além disso, as linhagens transgênicas apresentaram resistência aumentada ao begomovírus *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), um fenótipo associado à ausência de sintomas, baixa eficiência da taxa de infecção e reduzido acúmulo de DNA viral nas folhas sistêmicas. Estes resultados confirmam o efeito antagonista da fosforilação em Thr-469 e Thr-474 na ativação da sinalização antiviral mediada por NIK1, indicando que, provavelmente, a fosforilação em Thr-469 regula negativamente a ativação de NIK1 para prevenir a autoimunidade.

ABSTRACT

LORIATO, Virgilio Adriano Pereira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **Resistance mechanisms against geminiviruses and the potential of the double mutant NIK1-T469A/T474D to confer resistance in tomato plants.** Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

The *Geminiviridae* family is one of the most successful and largest families of plant viruses that infects a large variety of important dicotyledonous and monocotyledonous crops and causes significant yield losses worldwide. This broad spectrum of host range is only possible because geminiviruses have evolved sophisticated strategies to overcome the arsenal of antiviral defenses in such diverse plant species. In addition, geminiviruses evolve rapidly through recombination or pseudo-recombination to naturally create a great diversity of virus species with divergent genome sequences giving the virus an advantage over the host recognition system. Therefore, it is not surprising that efficient molecular strategies to combat geminivirus infection under open field conditions have not been fully addressed. In the first chapter, we discuss the anti-geminiviral arsenal of plant defenses, the evolved virulence strategies of geminiviruses to overcome these plant defenses and the most recent strategies that have been engineered for transgenic resistance. In the second chapter, we determined experimentally the efficiency of resistance against tomato-infecting begomovirus derived from manipulating *in vitro* the activity of the “Nuclear shuttle protein (NSP)-Interacting Kinase 1 (NIK1)-mediated antiviral signaling. Begomovirus-associate epidemics currently threaten tomato production worldwide due to the emergence of highly pathogenic virus species. More than ten different species of tomato-infecting begomoviruses have been identified and characterized in the Brazilian territory in the last decade. The NIK1-mediated antiviral signaling is activated by a viral infection and protects plants against begomoviruses in incompatible interactions but is overcome by the viral NSP suppressor of the NIK1 activity in compatible interactions. Phosphorylation of Thr-474 is the crucial event that triggers NIK1 activation. The construction of a gain-of-function mutant by replacing the Thr-474 residue with the phosphomimetic Asp residue enhanced resistance against begomovirus in transgenic tomato lines. To generate an efficient resistance strategy against begomovirus, we introduced a second mutation in T474D by replacing the Thr-469 residue with Ala, and hence eliminating the antagonistic effect of phosphorylation on Thr-469. The double mutant T469A/474D displayed higher phosphorylation activity *in vitro* compared with NIK1 and T474D. Functional assays were performed using transgenic tomato lines

transformed with a DNA construct expressing T469A/T474D fused to GFP under the control of the 35S promoter. The double mutations on NIK1 promoted constitutive activation of NIK1-mediated defenses, even in low levels of transgene expression, resulting in the repression of ribosomal protein genes, molecular markers of the antiviral signaling activation. Furthermore, the transgenic lines displayed enhanced resistance to the begomovirus *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), a phenotype associated with lack of symptoms, low efficiency of infection ratio, and reduced accumulation of viral DNA in systemic leaves. These results also confirm the antagonistic effect of phosphorylation at Thr-469 and Thr-474 on the activation of the NIK1-mediated antiviral signaling, indicating that probably the phosphorylation on Thr-469 regulates negatively activation of NIK1 to prevent autoimmunity.

INTRODUÇÃO GERAL

A família *Geminiviridae* representa umas das maiores e mais bem-sucedidas famílias de vírus de plantas, sendo composta por vírus de DNA cadeia simples que replica no núcleo de células infectadas via intermediários de DNA fita dupla. Os geminiviruses englobam espécies patogênicas amplamente distribuídas que infectam uma grande variedade de culturas agrônômicas, representando uma restrição severa à produtividade de culturas e hortaliças e, portanto, à segurança alimentar. Pelo menos duas espécies de geminivírus estão incluídas na lista dos dez mais importantes dos vírus de plantas mais relevantes, o begomovírus monossegmentado Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) e o bissegmentado African cassava mosaic virus (ACMV). O vírus *African cassava mosaic virus* provoca a doença mais devastadora da mandioca e impacta consideravelmente a subsistência da população africana. A incidência e severidade de doenças causadas por geminivírus têm aumentado consideravelmente nos últimos 20 anos, devido à alta taxa de mutações, recombinação e rearranjo dos genomas virais, levando ao consequente aumento da diversidade de espécies nesta família. Além disso, espera-se que as mudanças climáticas previstas alterem ainda mais a distribuição do inseto vetor, representando uma ameaça significativa à agricultura mundialmente. Na América do Sul, a grande diversidade de begomovírus que infectam tomateiros faz com que a aquisição de resistência de amplo espectro seja uma característica agrônômica desafiadora a ser alcançada. Portanto, não é surpreendente que várias estratégias moleculares diferentes para gerar resistência contra geminivírus tenham sido desenvolvidas nas últimas duas décadas, sem sucesso.

Estratégias alternativas, recentemente desenvolvidas, para a engenharia de resistência a geminivírus incluem a defesa antiviral baseada em silenciamento de RNA (siRNA) e a imunidade baseada em CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced palindromic repeats- associated nuclease). O potencial de ambas as estratégias para a resistência de engenharia aos geminivírus foi demonstrado nos últimos cinco anos. No entanto, é necessária alguma cautela se quisermos realizar experimentos de resistência a geminivírus. Como ambas as estratégias se baseiam na especificidade de sequência para RNAs complementares, sob pressão seletiva, a taxa de mutações nas regiões alvos e de recombinação entre genomas virais pode aumentar consideravelmente, fornecendo os meios para evasão e evolução acelerada do genoma, o que pode criar espécies mais patogênicas. Além disso, os altos níveis de siRNAs transgênicos fornecidos pela

introdução de construções de siRNA em genomas de plantas têm mostrado afetar o transcriptoma endógeno de linhagens transgênicas que podem resultar em custos de adaptação para o crescimento e desenvolvimento normais de plantas. Além disso, para imunidade derivada de CRISPR, deve-se conduzir uma avaliação profunda dos efeitos de complementariedade do gsRNA em sequências alternativas às sequências alvos, além de se avaliar a rápida evolução das variantes virais resistentes. Estas tarefas limitam o uso da tecnologia para obtenção rápida e eficiente de resistência contra geminivirus. Contudo, o potencial do sistema CRISP/cas para edição de genoma de qualquer organismo abre uma nova avenida para aquisição de tolerância contra geminivirus por meio de silenciamento de genes de susceptibilidade que não causam qualquer efeito adverso no crescimento, desenvolvimento e produtividade de plantas.

Como alternativas, tem sido proposto que defesas do hospedeiro naturalmente suprimidas pelo vírus sejam manipuladas *in vitro* como uma possibilidade eficiente para conseguir resistência de largo alcance contra begomovírus que infetam tomateiros. Um exemplo é a manipulação da defesa antiviral mediada por NIK1 através da construção de mutantes NIK1, que exibem ativação constitutiva e menor inibição pela proteína supressora do vírus. Esta estratégia tem sido usada com sucesso para gerar linhagens transgênicas de tomate, que apresentam maior resistência a diferentes espécies de begomovírus que infectam tomateiros. Uma ressalva para essa estratégia é que ativação da via antiviral mediada por NIK1 constitutivamente culmina com supressão da tradução global que pode afetar o crescimento e o desenvolvimento das plantas em condições de campo. Portanto, a capacidade intrínseca de culturas agronomicamente importantes para resistir aos efeitos deletérios da supressão da tradução global deve ser considerada como uma característica agrônômica relevante quando se utiliza a estratégia derivada da NIK1 para proteção de cultivos contra begomovírus.

Uma série de mutações em sítios de fosforilação do receptor NIK1 foram previamente descritas e que afetam tanto negativamente quanto positivamente a atividade de fosforilação do domínio cinase de NIK1 e, conseqüentemente, a amplitude da transdução do sinal antiviral. Entre estes mutantes, o mutante duplo nas posições Thr-469 e Thr474, resultando em T469A/T474D, tem demonstrado alta capacidade de fosforilação e ativação constitutiva; porém, a amplitude da propagação do sinal antiviral e a robustez da defesa mediada pelo duplo mutante ainda não foram avaliados, o que constitui um dos objetivos desse trabalho.

Os objetivos dessa investigação foram duplos. Em primeiro lugar, foi proposto analisar teoricamente os mecanismos mais recentes que tem sido usados para obter

resistência de amplo espectro contra geminivírus. Estes resultados foram apresentados no primeiro capítulo dessa tese, sendo intitulado: “Engineering resistance against geminiviruses: overcoming suppressed natural defenses and the use of RNAi and CRISPR/Cas system”. O segundo objetivo relacionado à aquisição experimental de resistência em tomateiros contra geminivírus é abordado no segundo capítulo, intitulado: “Estudos funcionais do mutante duplo AtNIK1-T469AT474D *in vitro* e em linhagens transgênicas de tomateiros expressando ectopicamente AtNIK1-T469AT474D fusionado a GFP.

CAPÍTULO I

Engineering resistance against geminiviruses: overcoming suppressed natural defenses and the use of RNAi and CRISPR/Cas system.

Virgílio A. P. Loriato, Laura G. C. Martins, Nivea C. Euclides, Pedro A. B. Reis, Christiana E. M. Duarte, Elizabeth P. B. Fontes. Engineering resistance against geminiviruses: overcoming suppressed natural defenses and the use of RNAi and CRISPR/Cas system. *Plant Science* .

Página 5 a 40

Engineering resistance against geminiviruses: overcoming suppressed natural defenses and the use of RNAi and the CRISPR/Cas system.

Virgílio A. P. Loriato^{a,b}, Laura G. C. Martins^a, Nívea C. Euclides^a, Pedro A. B. Reis^{a,b}, Christiane E. M. Duarte^{a,b}, Elizabeth P. B. Fontes^{a,b*}

^aNational Institute of Science and Technology in Plant-Pest Interactions, Bioagro, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais 36570-000, Brazil

^bDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais 36570-000, Brazil

*Correspondence: bbfontes@ufv.br

Highlights

- Manipulating NIK1-mediated antiviral signaling for resistance to begomovirus
- RNA silencing-based defenses engineered against geminivirus
- Resistance against geminiviruses via the CRISPR/Cas9 system

Abstract. The *Geminiviridae* family is one of the most successful and largest families of plant viruses that infect a large variety of important dicotyledonous and monocotyledonous crops and cause significant yield losses worldwide. This broad spectrum of host range is only possible because geminiviruses have evolved sophisticated strategies to overcome the arsenal of antiviral defenses in such diverse plant species. In addition, geminiviruses evolve rapidly through recombination and pseudo-recombination to naturally create a great diversity of virus species with

divergent genome sequences giving the virus an advantage over the host recognition system. Therefore, it is not surprising that efficient molecular strategies to combat geminivirus infection under open field conditions have not been fully addressed. In this review, we present the anti-geminiviral arsenal of plant defenses, the evolved virulence strategies of geminiviruses to overcome these plant defenses and the most recent strategies that have been engineered for transgenic resistance. Although, the *in vitro* reactivation of suppressed natural defenses as well as the use of RNAi and CRISPR/Cas systems hold the potential for achieving broad-range resistance and/or immunity, potential drawbacks have been associated with each case.

Keywords: Geminiviruses, NIK1, plant antiviral immunity, RNA silencing, CRISPR/cas system

1. Introduction

Geminiviridae is a large family of plant viruses characterized by the unique morphology of their icosahedral geminated capsids and divided into nine genera, *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Capulavirus*, *Curtovirus*, *Grablovirus*, *Eragrovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* and *Turncurtovirus*, which are distinguished based on genome structure (monopartite or bipartite), insect vector (whitefly, treehopper, leafhopper or aphid), host (monocotyledonous or dicotyledonous) and phylogenetic origin of the species [1]. The *Geminiviridae* family encompasses broadly distributed pathogenic species that infect a large variety of essential crops and pose a severe constraint to crop and vegetable productivity and hence food security. The incidence and severity of diseases caused by geminiviruses have increased considerably in the last 20 years [2], [3], due to high levels of mutations, recombination and rearrangement of viral genomes, leading to a concomitant increase in the diversity of this family [4], [5], [6]. Current climate changes are expected to alter more the insect vector distribution throughout the globe, posing a significant threat to agriculture worldwide. Currently, two species of geminiviruses, belonging to the *Begomovirus* genus, the monopartite *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) and the bipartite *African cassava mosaic virus* (ACMV), are included in the top ten list for economically important plant viruses [7]. ACMV causes the most devastating disease in cassava and impact the subsistence of African population considerably. In South America, the large diversity of tomato-infecting begomoviruses, which has emerged with increased pathogenicity, has made broad range resistance a challenging agronomic trait to be achieved. Thus, it is not surprising the existence in the literature of innumerable attempts for the development of pathogen-derived resistance by expressing begomovirus DNA sequences in transgenic plants. In fact, transgenic expression of defective AC1 protein, antisense *AC1* (replication-associated protein) gene, defective movement protein, defective viral DNA and coat protein has been demonstrated to attenuate geminivirus infection [8], [9], [10], [11], [12], [13]. However, none of the previously described transgenic plants had an immune, resistance, or tolerance responses, but rather they displayed at most a delayed infection rate and attenuated symptoms in a narrow spectrum fashion.

On the other hand, transgenic tomato lines expressing peptide aptamers, which bind efficiently to and inhibit the begomovirus replication protein (Rep), have been shown to display enhanced tolerance to TYLCV or *Tomato mottle virus* (ToMoV) [14]. Likewise, expression of the single-stranded DNA binding protein virE2 from *Agrobacterium* in tobacco has been shown to reduce *Mungbean yellow mosaic virus* (MYMV) DNA accumulation, although the spectrum of the resistance has not been established [15]. Nevertheless, in none of these studies, the efficiency of the acquired resistance has been evaluated under open field conditions and pressure of high-density population of the insect vector. As exceptions, transgenic lines expressing a siRNA for *Rep* gene silencing from *Bean golden mosaic virus* (BGMV) [16], and TYLCV [17] are immune to these begomoviruses under field conditions. However, it remains to be determined the spectrum of the acquired resistance.

Strategies for RNAi-derived resistance targeting different viral sequences have been extended to include resistance to *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) [18]; TYLCV [19]; *Chilli leaf curl virus* (ChiLCV) [20]; *Mungbean yellow mosaic India virus* (MYMIV) [21]; *Croton yellow vein mosaic virus* (CrYVMV) [22]; *Cotton leaf curl virus* (CLCuRV) [23], [24], [25]. Polycistronic artificial miRNA has also been used to generate resistance to insect-mediated *Wheat dwarf virus* (WDV) infection [26]. Genome editing has also been used to create plant resistant to geminiviruses by efficiently targeting specific regions in the viral genome using the clustered regularly interspaced palindromic repeats-associated nuclease (CRISPR-Cas) systems. These studies include the use of gene-editing technology to create resistant plants to *Beet severe curly top virus* (BSCTV) [27], [28]; *Bean yellow dwarf virus* (BeYDV) [29], and TYLCV [30], [31], [32]. Although these results are promising and immunity has been achieved, potential pitfalls related to off-target effects and rapid evolution of viral variants that may escape recognition by the CRISPR/Cas9 system are still a matter of debate [33], [34].

The genome of geminiviruses may be either mono or bipartite and is encapsidated as circular single-stranded DNA that is converted into double-stranded DNA in the nuclei of infected cells [35]. Geminiviruses depend extensively on the host replication machinery for viral DNA replication and interact with a large variety of host proteins during infection, reprogramming the

cell cycle of infected cells to induce viral DNA and host chromosome replication [35]. Furthermore, the geminiviruses are capable of altering gene expression profiles, inhibiting cell death pathways, altering the macromolecule trafficking, interfering in cell signaling and protein turnover to redirect or block host defenses and hormone signaling, [35], [36]. This review describes briefly some mechanisms of anti-geminiviral defenses of plants, the virulence strategies to counteract the host defenses, and primarily the most recent strategies, which have been used to engineer plant resistance against geminiviruses, their development and perspectives.

2. The NIK1-mediated antiviral signaling is activated and suppressed by begomovirus infection.

The NSP-interacting kinase NIK1 was first identified as a virulence target of NSP. NIK1 is one of the most characterized antiviral transmembrane receptor-like kinases (RLK), involved in response to begomovirus infection [37], [38]. NIK1 exhibits serine/threonine kinase activity, undergoes autophosphorylation, and promotes substrate phosphorylation [38], [39], [40]. NIK1 was first isolated from tomato leaves by its capacity to interact with NSP from *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) and was designated SINIK (*Solanum lycopersicum* NIK) [37]. NSP interaction with NIK1 kinase domain inhibits autophosphorylation activity, which is essential for the transduction of an antiviral signal, and hence prevents the assembly of a defense response against begomoviruses [38]. The NSP-NIK interaction is conserved among begomovirus NSPs and NIK homologs from distinct hosts. NIK orthologs from Arabidopsis (NIK1 and NIK2), tomato, and soybean interact with NSP from *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) and from tomato-infecting begomoviruses, such as TGMV, *Tomato crinkle leaf yellow virus* (TCrLYV), and *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) [37], [38].

While in *A. thaliana* the *NIK1* knockout line *nik1-1* is more susceptible to begomovirus infection [38], the overexpression of *AtNIK1* in begomovirus- infected tobacco leaves titrates the viral NSP and overcomes the inhibitory effect of NSP on NIK1 activity. The NIK1 overexpression

also attenuates symptoms developed by begomoviruses in tomato [41]. However, the effectiveness of the NIK1-mediated antiviral defense is limited, as the NIK1 activation depends on the establishment of the infection and the viral NSP functions as a suppressor of the antiviral signaling [39], [42], [43], [44].

NIK1 is a serine/threonine receptor-like kinase and contains 11 conserved protein kinase domains, in addition to specific motifs of Ser/Thr kinases in the subdomain VIb and VIII [40]. NIK1 undergoes autophosphorylation *in vitro* on Thr-474 and Thr-469 residues. The phosphorylation of the crucial Thr residue at position 474 constitutes the critical regulatory mechanism for NIK1 activation [40]. The mutation of Thr-474 to Ala inhibits the autophosphorylation activity strongly, whereas replacement of Thr-474 with the phosphomimetic Asp residue, enhances the autophosphorylation activity and results in the constitutive activation of NIK1. The constitutively activated NIK1-T474D mutant was used to determine the transcriptome induced by constitutive activation of NIK1 [44], [45]. These studies demonstrated that the NIK1-mediated antiviral signaling is activated upon the perception of begomovirus infection. More recently, begomovirus-derived nucleic acids have been demonstrated to function as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) that activate the NIK1-mediated antiviral signaling directly [46] (Fig. 1). In general, ligand-dependent phosphorylation and activation of receptor-like kinases require homo or heterodimerization of the receptors. In the case of members of the LRRII-RLK subfamily, including BAK1 and SERK4, compelling evidence has revealed that they function primarily as co-receptors for receptor signaling not only in defense but also in development [47]. NIK1 belongs to the LRRII-RLK subfamily and may also function as a co-receptor in active immune complexes [48]. However, NIK1-containing antiviral signaling complexes have not been isolated, and a nucleic acid-sensing PRR (pattern recognition receptor) that would oligomerize with NIK1 to initiate phosphorylation and signaling remains to be identified.

Progress toward elucidating the mechanism by which the NIK1 signaling propagated an antiviral signal includes the identification of the downstream effectors, the ribosomal protein L10 (RPL10) and the L10-interacting Myb domain-containing protein (LIMYB) [39], [42], [44], [49],

(Fig. 1). Both RPL10 and LIMYB were identified by two-hybrid assay, which identified RPL10 as a NIK1 kinase domain-interacting protein and a LIMYB partner. RPL10 and LIMYB have been biochemically and genetically associated with the NIK1-mediated antiviral pathway [39], [42], [44], [49]. RPL10 is localized in the cytoplasm but is redirected to the nucleus by co-expressing NIK1 in transient assays. The nucleocytoplasmic trafficking of RPL10 is regulated by phosphorylation of a Ser residue at position 104 in a NIK1-dependent manner [39].

LIMYB is a transcriptional repressor that interacts with RPL10 in the nucleus of infected cells to bind and coordinately regulate the activity of shared target promoters (Fig. 1). Interaction of LIMYB and RPL10 promotes the repression of translational machinery-related genes, including translational initiation and elongation factors and ribosomal protein (RP) genes, which culminates in the suppression of global translation. The constitutively activated NIK1-T474D mutant requires the LIMYB function to repress the expression of RP genes and to inhibit translation [44]. As a downstream component of the NIK1-mediated antiviral transduction pathway, *LIMYB* overexpression regulates RP gene transcription negatively, suppresses global translation and enhances resistance to begomovirus. In contrast, inactivation of *LIMYB* releases the repression of translation-related genes and increases susceptibility to viral infection. Therefore, LIMYB connects the NIK1 activation with global translation suppression as an antiviral immunity strategy of plants.

2.1. Engineering resistance by manipulating natural suppressed resistance

The success of begomovirus infection depends not only on suppressors of the RNA silencing machinery but also on the viral NSP suppressor of the NIK1 kinase signal-transducing function [38]. The viral NSP binds to the kinase domain of NIK1 to suppress its activity and increase begomovirus pathogenicity. Therefore, the NIK1-mediated antiviral signaling is an antiviral defense evolutionarily overcome by begomovirus infection. Activation of NIK1 kinase is induced by the phosphorylation of Thr-474 within the activation (A)-loop [40]. The replacement of Thr-474 with the phosphomimetic Asp created the NIK1-T474D mutant, which is constitutively

activated and weakly inhibited by NSP [40]. To increase the effectiveness of the NIK-mediated antiviral pathway against begomovirus infection, the gain-of-function AtNIK1-T474D mutant has been stably expressed in Arabidopsis and tomato [44], [41]. Accordingly, the overexpression of the phosphomimetic T474D mutant conferred enhanced resistance to begomovirus as compared to the expression of NIK1 in transgenic Arabidopsis and tomato lines. The T474D-overexpressing tomato lines were more resistant to different species of begomovirus, ToYSV and *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) [41]. This enhanced resistant phenotype was associated with suppression of translation-related genes, reduced loading of coat protein viral mRNA in actively translating polysomes, lower infection efficiency, and reduced accumulation of viral DNA in systemic leaves.

In contrast, the ectopic expression of loss-of-function mutants, including NIK1-T474A and the double mutant NIK1-G4743V/T474A, did not rescue the enhanced susceptibility phenotype of *nik-1* knockout lines, confirming that autophosphorylation at Thr-474 on NIK1 is required for the propagation of the defense response against begomovirus in tomato lines as well [40]. Remarkably, mutations at Thr-474 and Thr-469 affect NIK1 activity antagonistically. It has been proposed that NIK1 undergoes a gradual profile of phosphorylation within the activation loop with different functions of different residues. While mutation at Thr-474 to Ala impairs NIK1 activity, the phosphorylation activity of NIK1 is enhanced by replacement of Thr-469 with Ala [40]. Therefore, a double mutant NIK1-T469A/T474D is expected to display enhanced autophosphorylation activity compared to NIK1 and NIK1-T474D, which would suggest that it might be a better target to engineer begomovirus resistance in crops efficiently. However, studies with the hypothetical double mutant are lacking and the efficiency of a NIK1-T469A/T474D-derived antiviral defense has not been proved. To date, a sustained NIK1 pathway by expressing NIK1-T474D in Arabidopsis and tomato plants has been shown to be effective against begomoviruses, which cannot circumvent the regulatory mechanism of host translation. Nevertheless, the intrinsic capacity of agronomically important crops to withstand the deleterious effects of the suppression of global translation must be considered as a relevant agronomic trait if we are to use the translational control branch of NIK1-mediated antiviral signaling for crop

protection against begomoviruses.

3. Transcriptional and post-transcriptional gene silencing and suppression by viral effectors

RNA silencing is a regulatory conserved, sequence-specific mechanism, which controls gene expression and chromatin methylation status in eukaryotic cells via the biogenesis of small interfering (si)RNA. It is also called RNA interference (RNAi) in animal cells. This strategy is used by plants to defend themselves against invading exogenous nucleic acids, including transgenes and viruses [50], [51]. At least three kinds of gene silencing mechanisms operate in plant cells: (i) post-transcriptional gene silencing (PTGS). (ii) miRNA-based gene silencing and (iii) siRNA-directed transcriptional gene silencing (TGS) and heterochromatin silencing. While miRNA-based gene silencing is often used as a regulatory mechanism for host endogenous gene expression, PTGS and TGS are deployed by plants to defend themselves against viruses and other pathogens. PTGS has evolved as a universal defense mechanism against both RNA and DNA viruses, whereas TGS, which is used to control endogenous gene expression, can also be deployed against DNA viruses (Fig. 2).

The biochemical mechanism of plant RNA silencing can be divided into three steps, biogenesis, amplification, and effector phases [36] (Fig. 2). The primary biochemical activities involved in the biogenesis phase are the RNase-III classes of enzymes specifically designated dicers, which process a larger dsRNA precursor into siRNA of 21-24bp. In siRNA-based antiviral defenses, the dsRNA precursor that triggers siRNA biogenesis is often derived from the genome of RNA virus (structured RNA-hairpin or genome dsRNA) that replicates in the cytosol of plant cells or from viral mRNA (converted to dsRNA by RNA-dependent RNA polymerase 6-RDR6). For DNA viruses, which replicate in the nuclei of plant cells, the dsRNA trigger is derived from overlapping transcripts, structured (hairpin) transcripts or dsRNA synthesized from viral mRNA by RNA-dependent RNA polymerase (RdRP or RDR; Fig. 2) [35]. The dsRNA precursor is then recognized by dicers (DCL2 and DCL4) that hydrolyze the precursor to a 21-22 dsRNA, or by

DCL3 that generates 24 nt dsRNA. These siRNAs potentially undergo multiplication in an amplification step which is driven by RdRP or RDR, and, sequentially, they are invariably stabilized by 2'-O-methylation mediated by HUA ENHANCER 1 (HEN1) to enter the effector phase. The siRNAs are then loaded into effector proteins known as ARGONAUTES (AGOs), which are assembled into RNA-induced silencing complexes (RISC) or RNA-induced transcriptional silencing complexes (RITS) to target complementary RNA or DNA for silencing. RISC uses the single-stranded siRNA to target complementary RNAs promoting cleavage or translational inhibition in the cytosol, the end-products of PTGS. RITS containing siRNA and AGO4 is effective to target DNA methylation in the nuclei, triggering TGS. In TGS, RNA may induce methylation of DNA, known as RNA-directed DNA methylation (RdDM). In addition to the silencing elements, methylation requires methyltransferases. The siRNA-directed DNA methylation in plants is also linked to histone methylation [52]. The nascent transcripts and/or the DNA itself are possible targets of siRNAs [53].

Geminiviruses can both induce and be a target for TGS and PTGS mechanisms of RNA silencing [54], [55], [56]. Production of siRNAs and PTGS has been reported for both monopartite [57] and bipartite geminiviruses [58]. Viral siRNAs (21–22 nt in size) are related to the coding regions (MP, Rep, TrAP, and REn genes), whereas longer size siRNAs (24 nt) have been associated with the intergenic regions [55], [56]. For DNA viruses, viral transcripts do not serve as efficient templates of RDRs. Accordingly, a large fraction of vsiRNAs accumulating during CaLCuV geminivirus infection has been shown to be RDR1/2/6-independent primary siRNAs [59].

Mutations of genes with a role in DNA methylation, such as genes encoding cytosine or histone H3 lysine 9 (H3K9) methyltransferases (*kyp2/suvh4*), components of RNA-directed methylation pathway, or adenosine kinase (*ADK*), have been shown to enhance susceptibility to geminivirus infection [60]. The nuclear-localized AGO4 has also been shown to possess critical antiviral functions against geminiviruses. *dcl3*, *drb3* (dsRNA binding protein 3) and *ago4* mutants fail to hypermethylate the viral genome that is required for host recovery [61]. These lines of

evidence suggest that methylation of viral genomic components is a primary defense pathway against geminiviruses in plants [62].

Like other plant viruses, geminiviruses have evolved different strategies to counteract host RNA silencing as they encode suppressors of RNA silencing (VSR) as an adaptive response to plant defense [62]. A list of geminivirus suppressors, virus species, and mechanism for suppressing RNA silencing is presented in Table 1. Geminivirus suppressors may interfere with both PTGS and TGS in all three-step of the processes: biogenesis (AC4/C4), amplification (β C1, V2, AC2/C2) and effector phase (β C1, AC2/C2). They also act downstream of TGS, affecting directly or indirectly DNA methylation (Rep, C4/AC4, C2/AC2, AC5).

The Rep protein has been shown to interfere with the plant DNA methylation machinery and suppress TGS through repression of the plant DNA methyltransferases, METHYLTRANSFERASE 1 (MET1) and HROMOMETHYLASE 3 (CMT3) [63] and also interacts with 21 and 24 nt siRNA [64]. C2 (from monopartite geminivirus) and AC2 (bipartite) suppress PTGS by a mechanism that depends on its ability to activate transcription by upregulating the host silencing suppressor WEL1 (Werner exonuclease-like 1) [65], [66]. AC2 of MYMIV has also been shown to interact with RDR6 and AGO1 to suppress siRNA biogenesis and impair RISC activity, respectively [67], [68]. C2 and AC2 also suppress TGS via inhibition of host adenosine kinase (ADK), Su(var)3-9 homolog 4/ Kryptonite (SUVH4/KYP) and S-adenosyl methionine synthetase (SAMS) as well as S-adenosyl methionine decarboxylase 1 (SAMDC1) stabilization, to suppress DNA methylation-mediated gene silencing [60], [66], [67], [69], [70], [71], [72]. C4 and AC4 also function as suppressors of RNA silencing by sequestering both long dsRNA from DCL cleavage and siRNA from RISC incorporation [73], [74]. Additionally, C4 protein has been shown to act as an accessory player in the suppression of TSG by Rep protein via downregulation of MET1 and also interacts with AGO4 [63], [75]. AC5 protein affects dsRNA production, suppressing sense RNA-induced gene silencing and reverses TGS of a GFP transgene, probably by inhibiting the expression of a CHH cytosine methyltransferase in *N. benthamiana* [76]. AV2 and V2 affect vsiRNA amplification by inhibiting the activity of the suppressor gene silencing 3 (SGS3), the cofactor of RDR6 [77], and may also compete with SGS3

for the dsRNA with 5'overhang ends that may be an RDR6/SGS3 intermediate/substrate during vsiRNA amplification [78], [79]. Furthermore, V2 interacts with Histone deacetylase 6 (NbHDA6) and interferes with the recruitment of MET1 and HDA6 to the genome viral [80]. V2 from Papaya leaf curl virus (PaLCuV) has also been demonstrated to be a suppressor of PTG and PTGS via an unknown mechanism [81]. The BV1 (NSP) protein from CaLCuV induces ASYMMETRIC LEAVES2 (AS2) expression, causes nuclear exit of AS2 to activate DCP2 decapping activity, which accelerates mRNA turnover rate and inhibits siRNA accumulation [82]. The β C1 protein encoded by betasatellites is a pathogenicity determinant [83], and suppresses gene silencing [74], [84], [85], [86], [87]. β C1 is a suppressor of both PTGS and TGS to facilitate helper virus replication and to enhance symptom production in infected plants. β C1 interferes with the vsiRNA amplification step by interacting with and stabilizing calmodulin-like protein (Nb-rgs CaM), which is required for repressing host RDR6 expression [88], [89]. This protein also interacts physically with AGO1 and regulates the expression of AGO1 and DCL1 in *Arabidopsis thaliana* [90]. Additionally, β C1 affects host methylation-mediated virus defense pathway by inhibiting S-adenosyl homocysteine hydrolase, a methyl cycle enzyme that is also required for TGS [91].

3.1. Engineering resistance by the RNA interference technology.

Although gene silencing is a natural genetic regulatory mechanism in eukaryotes that mediates cellular defenses against RNA and DNA viruses, it can be used rationally to generate resistance against geminiviruses. Indeed, the knowledge of the biochemical mechanisms for biogenesis of naturally synthesized miRNA and siRNA has allowed scientists to successfully inhibit the expression of specific genes and promote the degradation of viral genomes by introducing short double-stranded RNA (dsRNA) segments into the cells. For the RNA silencing-based antiviral defense, the successful introduction of dsRNA to target begomoviruses was first reported for a single common bean transgenic line expressing a siRNA for Rep gene silencing

from BGMV [16], which was later demonstrated to produce siRNA [92]. Likewise, two independently transformed tomato transgenic lines designated to generate siRNA cognate to a Rep gene fragment from TYLCV have been shown to be immune to this begomovirus under field conditions [17]. A pitfall from this later study was the evolution of a newly recombinant begomovirus, the *Tomato latent virus* (TLV), which could evade the repressive sequence-specific action of transgene-derived siRNAs. Furthermore, while the expression of transgene-derived short interfering RNA (siRNAs) at high levels correlated well with resistance, it also caused alterations in the transcriptomic profile of the transgenic lines, which may be associated with some developmental abnormalities observed in the transgenic lines. These results highlight possible limitations for the use of RNA silencing to control rapidly evolving and emerging geminiviruses.

Although not yet evaluated under open field conditions, several other studies have demonstrated the potential of RNA silencing strategies to control geminivirus infection. The expression of dsRNA targeting *AV1* and *AV2* (*CP*) genes from SLCMV and *AC1/AC2* or *AC1/AC2/βC1* from different species of ChiLCV has been demonstrated to activate PTGS, resulting in the production of transgene specific siRNA and cassava and chilli resistant transgenic lines [18], [20]. Likewise, a DNA construct harboring a stack of conserved regions (*IR*, *V1-V2* and *C1-C2*) from TYLCV generated resistant tomato lines, displaying a high level of transgene-siRNA (t-siRNA) accumulation with dominant sizes of 21 nt and 22 nt [19]. Trans-acting small interfering RNA (tasiRNA) targeting *AC2* and *AC4* of the geminivirus *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) has also been used to generate resistance in transgenic tomato lines, which were proportional to the levels of siRNA produced against *AC2* and *AC4* genes [93]. The activation of the gene silencing mechanism in transgenic plants expressing an antisense coat protein gene from CrYVMV in *N. benthamiana* has also been shown to induce resistance against CrYVMV infection [22]. Expression of a small interfering RNA (siRNA) construct designed to target the *AC1* gene of *Cotton leaf curl Kokhran virus-Burewala* (CLCuKoV-Bu) and the *βC1* from

conserved satellite regions of the *Cotton leaf curl Multan betasatellite* (CLCuMB) resulted in leaf curl resistant plants with significant reduction in viral load and betasatellite accumulation [25]. Likewise, RNAi constructs capable of expressing dsRNA homologous to the intergenic region (IR) or targeting the *V2* gene from CLCuKoV-Bu have been shown to generate resistance in transgenic cotton lines [23], [24]. Transgenic cowpea plants, which harbor three different intron hairpin RNAi constructs, containing the *AC2*, *AC4* and fusion of *AC2* and *AC4* (*AC2+AC4*) of seven cowpea-infecting begomoviruses, MYMIV, have also been generated. Nearly 100% resistance against MYMIV infection was observed in transgenic lines, expressing *AC2*-hp and *AC2+AC4*-hp RNA [21].

Although these reports demonstrated the potential of RNA silencing-based antiviral defense to confer resistance against geminiviruses, it remains to be determined whether the mutation rate is increased under selective pressure for geminivirus dominance over the host defense system. Rapidly evolving geminivirus genomes would give an advantage for the virus over the host recognition system and could evade the repressive sequence-specific action of transgene-derived siRNA. Furthermore, an in-depth evaluation of the efficiency of geminiviral suppressors of gene silencing that would circumvent PTGS-derived resistance has not been conducted. Perhaps, the main restrictions for PTGS-based resistance are the sequence specificity that limits resistance to few geminivirus species and the variable levels of resistance of the progeny, which may be regarded to the rapidly evolving genome of geminiviruses.

4. Engineering resistance by gene-editing technology: the CRISPR-Cas system

In the last decade, genome-editing technologies have emerged based on endonuclease-mediated site-specific modifications that efficiently and precisely recognize a region of DNA or

RNA [33]. The four major classes of site-specific nucleases included meganucleases, zinc finger nucleases, transcription activator-like effector nucleases, and clustered regularly interspaced palindromic repeats/CRISPR-associated Cas 9 [94]. The CRISPR-Cas system is an RNA-guided engineered nuclease that allows researchers to disrupt genes or insert sequences of interest with simplicity, efficiency and versatility in any desired position in genomes [95]. It consists of a prokaryotic immunity system against invading nucleic acids, such as viruses or plasmid. The system is composed by *Streptococcus pyogenes* Cas9 endonuclease and a single guide RNA (sgRNA), which directs the Cas9 to a target cleaving the foreign DNA in a sequence-dependent manner [96] (Fig. 3). CRISPR-based immunity acts by integrating small DNA fragments from viral or plasmid invasion into the cell's CRISPR locus. During subsequent infections, these DNA fragments are transcribed as part of the CRISPR array and used in the recognition and cleavage of foreign DNA elements [97]. The first reports of genome editing in plants using the CRISPR/Cas system were in 2013 [98], [99], [100], [101], and recently, this technology has emerged as a powerful tool to engineer resistance to geminiviruses through sgRNAs designed to target viral genomic DNAs [33] (Fig. 3). Three different not self-exclusive mechanisms have been suggested to explain the CRISPR-Cas antiviral action: (i) Cas9/sgRNA complex binds to viral genetic element and prevents access of replication proteins; (ii) Cas9/sgRNA cleaves the viral dsDNA and, thus, interferes with its replication; or (iii) Cas9/sgRNA introduces mutations in the viral genome through the error-prone non-homologous joining DNA repair pathway [102] (Fig. 3).

For resistance against geminiviruses, pioneering studies demonstrated that rational transference of elements of the CRISPR–Cas prokaryotic immune system to plant could effectively inhibit virus accumulation [27], [29], [30]. The common themes that have emerged from these studies were that (i) any sequence of the geminivirus genome can be target by the CRISPR-Cas system and (ii) several gsRNA can be stacked in a single transgene to direct several nucleases against a single virus or multiple viruses and satellites; thereby increasing the potential of durability and the capacity of defeating multiple infections.

To identify highly efficient sgRNA–Cas9 target sites for targeting the BSCTV genome in *Nicotiana benthamiana*, 43 sgRNAs were individually evaluated [27]. The target sites of these sgRNAs lie within one of three 300-nt regions in coding or non-coding sequences of the intergenic region, *CP* and *Rep* genes of the BSCTV genome. Highly efficient sgRNAs were identified that recognize sites in all the three 300bp regions of the BSCTV genome and the efficiency of virus inhibition depended on Cas9 expression level in the independent transgenic lines. These results indicate that geminivirus resistant-transgenic lines can be generated by introducing sgRNA-Cas9 in *Arabidopsis* and *N. benthamiana* and it is possible to identify efficient anti-virus sgRNAs targeting sites in any region of the viral genome. These results were confirmed by targeting the BeYDV genome for destruction with the CRISPR–Cas system [29]. gsRNA-Cas9-expressing *N. benthamiana* lines displayed reduced viral load and attenuated symptoms. In this pathosystem, six target regions of the BeYDV genome were evaluated, which included the Rep binding site (RBS), the hairpin nonanucleotide conserved sequence and three Rep motifs essential for rolling circle replication. Cas9 and gRNAs-expressing-*N. benthamiana* and tomato transgenic lines, which target IR, *CP* or *Rep*, displayed reduced viral DNA accumulation of TYLCV [30], [31], [32]. The CRISPR/Cas9-based immunity remained active across multiple generations in both plants, demonstrating its efficiency for developing durable virus resistance [32]. These studies also demonstrated that the conserved nonanucleotide sequence of the IR hairpin loop could be used as a specific gsRNA target for engineering broad range resistance that could be effective in multiple infections [30]. Efficient gsRNAs targeting multiple geminiviruses are also a big issue for engineering resistance against *Cotton leaf curl virus* (CLCuV) due to the occurrence of natural mixed viral infections under open field conditions [103]. The cotton leaf curl disease (CLCuD) is caused by multiple begomoviruses [*Cotton leaf curl Alabad Virus*, *Cotton leaf curl Bangalore virus*, *Cotton leaf curl Kokhran virus*, CLCuKoV-Bu (Burewala strain), *Cotton leaf curl Multan virus* and *Cotton leaf curl Rajasthan virus*] in association with satellite molecules. This mixed infection raised the need for developing a multiplexed CRISPR/Cas9 system, in which a cassette of stacked sgRNAs is designed to target not only the whole CLCuD-associated begomovirus complex but also the associated satellite molecules [104]. Complete resistance to a single CLCuV

species, CLCuMuV, has been demonstrated in transgenic *N. benthamiana* expressing cas-9 and two stacked sgRNAs targeting simultaneously the IR and *Rep* coding region [105].

Although CRISPR/Cas9-based immunity has been revealed as a very promising strategy for broad resistance against geminiviruses, major concerns related to off-target effects and rapid evolution of resistant viral variants need to be fully addressed before field trials be considered. Indeed, the constitutively overexpressed CRISPR/Cas9 system has been shown to lead to off-target effects in host plants and virus-inducible CRISPR-Cas vectors have been developed to overcome this problem [28]. Virus-inducible genome-editing (VIGE) has been shown to inhibit BSCTV accumulation in both transient assays (*N. benthamiana*) and transgenic Arabidopsis lines without apparent off-target effects in the host genome [28]. The use of transient expression instead of stably transformed lines appears to reduce off-targets. The applicability of the CRISPR/Cas9 system has also been investigated for crop plants. CRISPR-Cas has been used to inhibit the WDV in barley [106]. The sgRNA targeted four sites within the different viral DNA segments of WDV, which did not exhibit *in silico* predicted off-target effects. Additionally, CRISPR has been used as a tool for site-directed mutagenesis in the *Solanum tuberosum* calmodulin-like protein that contributes to geminivirus infection. [107]. Collectively, these results reinforce the potential of CRISPR/Cas9 system for engineering resistance to geminiviral infection.

Despite the effectiveness of CRISPR technology against geminiviruses, in-depth evaluation of the impact of engineering resistance on virus evolution is required. Geminiviruses ability to escape from the CRISPR/Cas9 machinery have been analyzed for the monopartite CLCuKov, the bipartite virus *Merremia mosaic virus* (MeMV) and different severe and mild strains of TYLCV geminiviruses [31]. The targeting of non-coding intergenic sequences limited the generation of viral variants capable of replication and systemic infection. [31]. Genomic editing was also used to generate cassava plants resistant to ACMV; however, the selection pressure generated a mutant strain resistant to CRISPR-Cas9 cleavage during glasshouse inoculations. These results indicate that caution is needed in field studies with CRISPR-based immunity and the strategies to engineer virus resistance should be optimized to minimize the emergence of virus resistant to genome editing.

5. Conclusion

Several different molecular strategies to generate resistance against geminiviruses have been developed in the last two decades, without success. Recently, alternative strategies based on *in vitro* manipulation of natural suppressed host antiviral signaling, expression of synthetic RNAi and CRISPR-Cas9-derived immunity have emerged as an efficient possibility for achieving broad-range resistance against geminiviruses. Although these strategies have demonstrated promising results and, in some cases, immunity has been achieved, potential drawbacks have been associated with each case.

One such example of reactivation of naturally suppressed defense is the *in vitro* manipulation of the NIK1-mediated antiviral defense. NIK1 mutants, which exhibit constitutive activation and lower inhibition by the viral suppressor NSP, have been successfully used to generate transgenic tomato lines displaying enhanced resistance to different species of tomato-infecting begomoviruses under greenhouse conditions. A caveat for this strategy is that activation of the NIK1-mediated defense constitutively culminates in global translation suppression that may affect plant growth and development under field conditions. Under greenhouse conditions, the constitutive activation of NIK1 does not impact the development of transgenic tomato lines. These transgenic lines may be under a constant perception of stress imposed by suppressed global translation, which would have promoted acclimation to maintain normal growth under greenhouse conditions. However, this issue has not been addressed under open field conditions and field trials are missing to conclusively indicate the transfer of the T474D-mediated defense strategy to other agronomically relevant crops as an efficient strategy for broad-range resistance against begomoviruses. Therefore, the intrinsic capacity of agronomically important crops to withstand the deleterious effects of the suppression of global translation must be considered as a relevant agronomic trait when using the NIK1-derived strategy for crop protection against begomoviruses.

In the case of RNA silencing-based antiviral defense and CRISPR-based immunity, the rapid evolution of viral variants that may escape recognition by RNAi and the CRISPR/Cas9

system may pose a threat for the rational use of these potentially efficient strategies for resistance against geminiviruses. Under open field conditions and selective pressure of the transgene-derived RNAi, at least one rapidly evolving variant of TYLV that escaped sequence-specific recognition of RNAi was identified. The appearance of rapidly evolving viral variants, which were resistant to CRISPR machinery, was also demonstrated in resistant cassava plants under glasshouse trials. Although these resistant viral variants were not assayed for pathogenicity, the selective pressure for virus dominance over the host recognition system may increase the virus mutation rate, providing the means for genome evasion and accelerated evolution to more pathogenic species.

Any off-target perturbations in the plant genome engineered for RNAi- or CRISPR-mediated resistance must also be considered. The high levels of transgene siRNAs provided by introducing hairpin siRNA constructs in plant genomes have been shown to affect the endogenous transcriptome of transgenic lines. This altered transcriptome may promote fitness costs for normal plant growth and development. Furthermore, for engineering CRISPR-derived immunity, one may want to conduct an in-depth evaluation of off-target effects before field trials be considered. Nevertheless, the potential of the CRISPR/Cas system for genome editing of any organism has opened a new promising avenue for silencing host susceptibility genes for resistance to geminiviruses. Host susceptibility genes that do not cause deleterious effects on plant growth, development, and productivity may be more efficient targets for durable resistance against viruses.

Acknowledgments

This work was partially supported by the Brazilian funding agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and the National Institute of Science and Technology in Plant-Pest Interactions (INCTIPP).

Reference

- [1] F. M. Zerbini et al., *J. Gen. Virol.* 98 (2017) 131–133. doi:10.1099/jgv.0.000738.
- [2] S. Mansoor, Y. Zafar, R.W. Briddon, Geminivirus disease complexes: the threat is spreading, *Trends Plant Sci.* 11 (2006) 209–212. doi:10.1016/j.tplants.2006.03.003.
- [3] J. Navas-Castillo, E. Fiallo-Olivé, S. Sánchez-Campos, *Emerging Virus Diseases Transmitted by Whiteflies*, 2011. doi:10.1146/annurev-phyto-072910-095235.
- [4] D. P. Martin, E. Der Van Walt, D. Posada, E.P. Rybicki, The evolutionary value of recombination is constrained by genome modularity, *PLoS Genet.* 1 (2005) 0475–0479. doi:10.1371/journal.pgen.0010051.
- [5] G.W. Harkins et al., Dating the origins of the maize-adapted strain of maize streak virus, MSV-A, *J. Gen. Virol.* 90 (2009) 3066–3074. doi:10.1099/vir.0.015537-0.
- [6] A. T. M. Lima et al., The diversification of begomovirus populations is predominantly driven by mutational dynamics, *Virus Evol.* 3 (2017) 1–14. doi:10.1093/ve/vex005.
- [7] E. P. Rybicki, A Top Ten list for economically important plant viruses, *Arch. Virol.* 160 (2015) 17–20. doi:10.1007/s00705-014-2295-9.
- [8] J. Stanley, T. Frischmuth, S. Ellwood, Defective viral DNA ameliorates symptoms of geminivirus infection in transgenic plants., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87 (1990) 6291–6295. doi:10.1073/pnas.87.16.6291.
- [9] A.G. Day, E.R. Bejarano, K.W. Buck, M. Burrell, C.P. Lichtenstein, Expression of an antisense viral gene in transgenic tobacco confers resistance to the DNA virus tomato golden mosaic virus., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (1991) 6721–6725. doi:10.1073/pnas.88.15.6721.
- [10] A. Von Arnim, J. Stanley, Inhibition of african cassava mosaic virus systemic infection by a movement protein from the related geminivirus tomato golden mosaic virus,

- Virology. 187 (1992) 555–564. doi:10.1016/0042-6822(92)90458-2.
- [11] T. Kunik, et al., Transgenic tomato plants expressing the tomato yellow leaf curl virus capsid protein are resistant to the virus, *Nature*. 12 (1994) 500–504.
- [12] Y. Hong, Virus Resistance in *Nicotiana benthamiana* Conferred by African Cassava Mosaic Virus Replication-Associated Protein (ACI) Transgene, *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9 (2011) 219. doi:10.1094/mpmi-9-0219.
- [13] E. Noris, et al., Resistance to Tomato Yellow Leaf Curl Geminivirus in *Nicotiana benthamiana* Plants Transformed with a Truncated Viral C1 Gene, *Virology*. 224 (1996) 130–138. doi:10.1006/viro.1996.0514.
- [14] M.I. Reyes, T.E. Nash, M.M. Dallas, J.T. Ascencio-Ibanez, L. Hanley-Bowdoin, Peptide Aptamers That Bind to Geminivirus Replication Proteins Confer a Resistance Phenotype to Tomato Yellow Leaf Curl Virus and Tomato Mottle Virus Infection in Tomato, *J. Virol.* 87 (2013) 9691–9706. doi:10.1128/JVI.01095-13.
- [15] S. Sunitha, D. Marian, B. Hohn, K. Veluthambi, Antibegomoviral activity of the agrobacterial virulence protein VirE2, *Virus Genes*. 43 (2011) 445–453. doi:10.1007/s11262-011-0654-0.
- [16] F.J.L. Arago, J.C. Faria, First transgenic geminivirus-resistant plant in the field, *Nat. Biotechnol.* 27 (2009) 1086–1088. doi:10.1038/nbt1209-1086.
- [17] E. Ochagav, et al., Field Trial and Molecular Characterization of RNAi-Transgenic Tomato Plants That Exhibit Resistance to Tomato Yellow Leaf Curl Geminivirus, *Mol. Plant-Microbe Interact.* 29 (2016) 197–209.
- [18] V.O. Ntui, et al., Resistance to Sri Lankan cassava mosaic virus (SLCMV) in genetically engineered cassava cv. KU50 through RNA silencing, *PLoS One*. 10 (2015) 1–23. doi:10.1371/journal.pone.0120551.
- [19] D. Leibman, et al., Immunity to tomato yellow leaf curl virus in transgenic tomato is associated with accumulation of transgene small RNA, *Arch. Virol.* 160 (2015) 2727–

2739. doi:10.1007/s00705-015-2551-7.

- [20] V.K. Sharma, S. Basu, S. Chakraborty, RNAi mediated broad-spectrum transgenic resistance in *Nicotiana benthamiana* to chilli-infecting begomoviruses, *Plant Cell Rep.* 34 (2015) 1389–1399. doi:10.1007/s00299-015-1795-8.
- [21] S. Kumar, B. Tanti, B.L. Patil, S.K. Mukherjee, L. Sahoo, RNAi-derived transgenic resistance to Mungbean yellow mosaic India virus in cowpea, *PLoS One.* 12 (2017) 1–20. doi:10.1371/journal.pone.0186786.
- [22] V. Sinha, N.B. Sarin, D. Bhatnagar, The efficacy of antisense-based construct for inducing resistance against Croton yellow vein mosaic virus in *Nicotiana tabacum*, *Virus Genes.* 53 (2017) 906–912. doi:10.1007/s11262-017-1499-y.
- [23] S. Khatoon, A. Kumar, N.B. Sarin, J.A. Khan, RNAi-mediated resistance against Cotton leaf curl disease in elite Indian cotton (*Gossypium hirsutum*) cultivar Narasimha, *Virus Genes.* 52 (2016) 530–537. doi:10.1007/s11262-016-1328-8.
- [24] A. Yasmeen, et al., Amplicon-Based RNA Interference Targeting V2 Gene of Cotton Leaf Curl Kokhran Virus-Burewala Strain Can Provide Resistance in Transgenic Cotton Plants, *Mol. Biotechnol.* 58 (2016) 807–820. doi:10.1007/s12033-016-9980-8.
- [25] A. Ahmad, et al., Brown, Engineered disease resistance in cotton using RNA-interference to knock down Cotton leaf curl Kokhran virus-burewala and cotton leaf curl multan betasatellite expression, *Viruses.* 9 (2017). doi:10.3390/v9090257.
- [26] A. Kis, et al., Polycistronic artificial miRNA-mediated resistance to Wheat dwarf virus in barley is highly efficient at low temperature, *Mol. Plant Pathol.* 17 (2016) 427–437. doi:10.1111/mpp.12291.
- [27] X. Ji, H. Zhang, Y. Zhang, Y. Wang, C. Gao, Establishing a CRISPR–Cas-like immune system conferring DNA virus resistance in plants, *Nat. Plants.* 1 (2015) 1–4. doi:10.1038/nplants.2015.144.
- [28] X. Ji, et al., Conferring DNA virus resistance with high specificity in plants using virus-

- inducible genome-editing system, *Genome Biol.* 19 (2018) 197. doi:10.1186/s13059-018-1580-4.
- [29] N.J. Baltes, et al., Conferring resistance to geminiviruses with the CRISPR-Cas prokaryotic immune system, *Nat. Plants.* 1 (2015) 4–7. doi:10.1038/NPLANTS.2015.145.
- [30] Z. Ali, et al., CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants, *Genome Biol.* 16 (2015) 1–11. doi:10.1186/s13059-015-0799-6.
- [31] Z. Ali, S. Ali, M. Tashkandi, S.S.E.A. Zaidi, M.M. Mahfouz, CRISPR/Cas9-Mediated Immunity to Geminiviruses: Differential Interference and Evasion, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–11. doi:10.1038/srep26912.
- [32] M. Tashkandi, Z. Ali, F. Aljedaani, A. Shami, M.M. Mahfouz, Engineering resistance against Tomato yellow leaf curl virus via the CRISPR/Cas9 system in tomato, *Plant Signal. Behav.* 13 (2018). doi:10.1080/15592324.2018.1525996.
- [33] S. S.-A. Zaidi, M. Tashkandi, S. Mansoor, M.M. Mahfouz, Engineering Plant Immunity: Using CRISPR/Cas9 to Generate Virus Resistance, *Front. Plant Sci.* 7 (2016) 1–10. doi:10.3389/fpls.2016.01673.
- [34] S. Khatodia, K. Bhatotia, N. Tuteja, Development of CRISPR/Cas9 mediated virus resistance in agriculturally important crops, *Bioengineered.* 8 (2017) 274–279. doi:10.1080/21655979.2017.1297347.
- [35] L. Hanley-Bowdoin, E.R. Bejarano, D. Robertson, S. Mansoor, Geminiviruses: Masters at redirecting and reprogramming plant processes, *Nat. Rev. Microbiol.* 11 (2013) 777–788. doi:10.1038/nrmicro3117.
- [36] I. P. Calil, E.P.B. Fontes, Plant immunity against viruses: Antiviral immune receptors in focus, *Ann. Bot.* 119 (2017) 711–723. doi:10.1093/aob/mcw200.
- [37] A.C. Mariano, et al., Identification of a novel receptor-like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shuttle protein, *Virology.* 318 (2004) 24–31. doi:10.1016/j.virol.2003.09.038.

- [38] E.P.B. Fontes, A.A. Santos, D.F. Luz, A.J. Waclawovsky, J. Chory, The geminivirus nuclear shuttle protein is a virulence factor that suppresses transmembrane receptor kinase activity, *Genes Dev.* 18 (2004) 2545–2556. doi:10.1101/gad.1245904.
- [39] C. M. Carvalho, J.P.B. Machado, F.M. Zerbini, E.P.B. Fontes, NSP-interacting GTPase: A cytosolic protein as cofactor for nuclear shuttle proteins, *Plant Signal. Behav.* 3 (2008) 752–754. doi:10.4161/psb.3.9.6641.
- [40] A.A. Santos, C.M. Carvalho, L.H. Florentino, H.J.O. Ramos, E.P.B. Fontes, Conserved threonine residues within the A-loop of the receptor NIK differentially regulate the kinase function required for antiviral signaling, *PLoS One.* 4 (2009). doi:10.1371/journal.pone.0005781.
- [41] O.J.B. Brustolini, et al., Sustained NIK-mediated antiviral signalling confers broad-spectrum tolerance to begomoviruses in cultivated plants, *Plant Biotechnol. J.* 13 (2015) 1300–1311. doi:10.1111/pbi.12349.
- [42] C.M. Carvalho, et al., Regulated nuclear trafficking of rpL10A mediated by NIK1 represents a defense strategy of plant cells against virus, *PLoS Pathog.* 4 (2008). doi:10.1371/journal.ppat.1000247.
- [43] A.A. Santos, K.V.G. Lopes, J.A.C. Apfata, E.P.B. Fontes, NSP-interacting kinase, NIK: A transducer of plant defence signalling, *J. Exp. Bot.* 61 (2010) 3839–3845. doi:10.1093/jxb/erq219.
- [44] C. Zorzatto, et al., NIK1-mediated translation suppression functions as a plant antiviral immunity mechanism, *Nature.* 520 (2015) 679–682. doi:10.1038/nature14171.
- [45] J.P.B. Machado, O.J.B. Brustolini, G.C. Mendes, A.A. Santos, E.P.B. Fontes, NIK1, a host factor specialized in antiviral defense or a novel general regulator of plant immunity?, *BioEssays.* 37 (2015) 1236–1242. doi:10.1002/bies.201500066.
- [46] R.M. Teixeira, et al., Virus perception at the cell surface: revisiting the roles of receptor-like kinases as viral pattern recognition receptors, *Mol. Plant Pathol.* (2019) 1–7.

doi:10.1111/mpp.12816.

- [47] X. Ma, G. Xu, P. He, L. Shan, SERKING Coreceptors for Receptors, *Trends Plant Sci.* 21 (2016) 1017–1033. doi:10.1016/j.tplants.2016.08.014.
- [48] T. Sakamoto, et al., The tomato RLK superfamily: Phylogeny and functional predictions about the role of the LRRII-RLK subfamily in antiviral defense, *BMC Plant Biol.* 12 (2012). doi:10.1186/1471-2229-12-229.
- [49] C.S. Rocha, A.A. Santos, J.P.B. Machado, E.P.B. Fontes, The ribosomal protein L10/QM-like protein is a component of the NIK-mediated antiviral signaling, *Virology.* 380 (2008) 165–169. doi:10.1016/j.virol.2008.08.005.
- [50] M.A. Matzke, J.A. Birchler, RNAi-mediated pathways in the nucleus, *Nat. Rev. Genet.* 6 (2005) 24–35. doi:10.1038/nrg1500.
- [51] A.S. Zvereva, M.M. Pooggin, Silencing and innate immunity in plant defense against viral and non-viral pathogens, *Viruses.* 4 (2012) 2578–2597. doi:10.3390/v4112578.
- [52] D. Zilberman, X. Cao, S.E. Jacobsen, ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation, *Science* (80-.). 299 (2003) 716–719. doi:10.1126/science.1079695.
- [53] P. Brodersen, O. Voinnet, The diversity of RNA silencing pathways in plants, *Trends Genet.* 22 (2006) 268–280. doi:10.1016/j.tig.2006.03.003.
- [54] R. Vanitharani, P. Chellappan, C.M. Fauquet, Geminiviruses and RNA silencing, *Trends Plant Sci.* 10 (2005) 144–151. doi:10.1016/j.tplants.2005.01.005.
- [55] R. Akbergenov, et al., Molecular characterization of geminivirus-derived small RNAs in different plant species, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) 462–471. doi:10.1093/nar/gkj447.
- [56] E.A. Rodriguez-Negrete, J. Carrillo-Tripp, R.F. Rivera-Bustamante, RNA Silencing against Geminivirus: Complementary Action of Posttranscriptional Gene Silencing and Transcriptional Gene Silencing in Host Recovery, *J. Virol.* 83 (2009) 1332–1340.

doi:10.1128/jvi.01474-08.

- [57] A.G. Castillo, E.R. Bejarano, G.P. Accotto, M. Tavazza, D.B. Celular, Tomato Yellow Leaf Curl Sardinia Virus, *Microbiology*. 77 (2003) 799–800. doi:10.1128/JVI.77.12.6785.
- [58] P. Chellappan, R. Vanitharani, C.M. Fauquet, Short Interfering RNA Accumulation Correlates with Host Recovery in DNA Virus-Infected Hosts, and Gene Silencing Targets Specific Viral Sequences, *J. Virol.* 78 (2004) 7465–7477. doi:10.1128/jvi.78.14.7465-7477.2004.
- [59] M. Aregger, et al., Primary and Secondary siRNAs in Geminivirus-induced Gene Silencing, *PLoS Pathog.* 8 (2012). doi:10.1371/journal.ppat.1002941.
- [60] P. Raja, B.C. Sanville, R.C. Buchmann, D.M. Bisaro, Viral Genome Methylation as an Epigenetic Defense against Geminiviruses, *J. Virol.* 82 (2008) 8997–9007. doi:10.1128/jvi.00719-08.
- [61] P. Raja, J.N. Jackel, S. Li, I.M. Heard, D.M. Bisaro, Arabidopsis Double-Stranded RNA Binding Protein DRB3 Participates in Methylation-Mediated Defense against Geminiviruses, *J. Virol.* 88 (2014) 2611–2622. doi:10.1128/jvi.02305-13.
- [62] D. M. Bisaro, Silencing suppression by geminivirus proteins, *Virology*. 344 (2006) 158–168. doi:10.1016/j.virol.2005.09.041.
- [63] E. Rodríguez-Negrete, et al., Geminivirus Rep protein interferes with the plant DNA methylation machinery and suppresses transcriptional gene silencing, *New Phytol.* 199 (2013) 464–475. doi:10.1111/nph.12286.
- [64] Y. Wang, et al., Identification of an RNA silencing suppressor encoded by a mastrevirus, *J. Gen. Virol.* 95 (2014) 2082–2088. doi:10.1099/vir.0.064246-0.
- [65] R. Rajeswaran, et al., Suppression of RNA Silencing by a Geminivirus Nuclear Protein, AC2, Correlates with Transactivation of Host Genes, *J. Virol.* 79 (2005) 2517–2527. doi:10.1128/jvi.79.4.2517-2527.2005.

- [66] J.N. Jackel, R.C. Buchmann, U. Singhal, D.M. Bisaro, Analysis of Geminivirus AL2 and L2 Proteins Reveals a Novel AL2 Silencing Suppressor Activity, *J. Virol.* 89 (2015) 3176–3187. doi:10.1128/jvi.02625-14.
- [67] Z. Zhang, et al., BSCTV C2 Attenuates the Degradation of SAMDC1 to Suppress DNA Methylation-Mediated Gene Silencing in Arabidopsis, *Plant Cell.* 23 (2011) 273–288. doi:10.1105/tpc.110.081695.
- [68] V. Kumar, et al., Mungbean yellow mosaic Indian virus encoded AC2 protein suppresses RNA silencing by inhibiting Arabidopsis RDR6 and AGO1 activities, *Virology.* 486 (2015) 158–172. doi:10.1016/j.virol.2015.08.015.
- [69] H. Wang, K.J. Buckley, X. Yang, R.C. Buchmann, D.M. Bisaro, Adenosine Kinase Inhibition and Suppression of RNA Silencing by Geminivirus AL2 and L2 Proteins, *J. Virol.* 79 (2005) 7410–7418. doi:10.1128/jvi.79.12.7410-7418.2005.
- [70] R. C. Buchmann, S. Asad, J.N. Wolf, G. Mohannath, D.M. Bisaro, Geminivirus AL2 and L2 Proteins Suppress Transcriptional Gene Silencing and Cause Genome-Wide Reductions in Cytosine Methylation, *J. Virol.* 83 (2009) 5005–5013. doi:10.1128/jvi.01771-08.
- [71] C. Castillo-González, et al., Geminivirus-encoded TrAP suppressor inhibits the histone methyltransferase SUVH4/KYP to counter host defense, *Elife.* 4 (2015) 1–31. doi:10.7554/eLife.06671.
- [72] A. Ismayil, et al., Cotton Leaf Curl Multan virus C4 protein suppresses both transcriptional and post-transcriptional gene silencing by interacting with SAM synthetase, *PLoS Pathog.* 14 (2018) 1–24. doi:10.1371/journal.ppat.1007282.
- [73] P. Chellappan, R. Vanitharani, F. Ogbe, C.M. Fauquet, Effect of Temperature on Geminivirus-Induced RNA Silencing in Plants, *Plant Physiol.* 138 (2005) 1828–1841. doi:10.1104/pp.105.066563.
- [74] I. Amin, et al., Suppressors of RNA Silencing Encoded by the Components of the Cotton

- Leaf Curl Begomovirus-BetaSatellite Complex, *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24 (2011) 973–983. doi:10.1094/mpmi-01-11-0001.
- [75] T. Vinutha, G. Kumar, V. Garg, T. Canto, P. Palukaitis, S. V. Ramesh, S. Praveen, Tomato geminivirus encoded RNAi suppressor protein, AC4 interacts with host AGO4 and precludes viral DNA methylation, *Gene.* 678 (2018) 184–195. doi:10.1016/j.gene.2018.08.009.
- [76] F. Li, et al., The AC5 protein encoded by Mungbean yellow mosaic India virus is a pathogenicity determinant that suppresses RNA silencing-based antiviral defenses, *New Phytol.* 208 (2015) 555–569. doi:10.1111/nph.13473.
- [77] E. Glick, et al., Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by tomato yellow leaf curl virus V2 protein, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (2008) 157–161. doi:10.1073/pnas.0709036105.
- [78] R. Fukunaga, J.A. Doudna, dsRNA with 5' overhangs contributes to endogenous and antiviral RNA silencing pathways in plants, *EMBO J.* 28 (2009) 545–555. doi:10.1038/emboj.2009.2.
- [79] A.P. Luna, et al., V2 from a curtovirus is a suppressor of post-transcriptional gene silencing, *J. Gen. Virol.* 98 (2017) 2607–2614. doi:10.1099/jgv.0.000933.
- [80] B. Wang, X. Yang, Y. Wang, Y. Xie, *Crossm.*, 92 (2018) 1–16.
- [81] M. Mubin, R.W. Briddon, S. Mansoor, The V2 protein encoded by a monopartite begomovirus is a suppressor of both post-transcriptional and transcriptional gene silencing activity, *Gene.* 686 (2019) 43–48. doi:10.1016/j.gene.2018.11.002.
- [82] J. Ye, et al., Geminivirus Activates ASYMMETRIC LEAVES 2 to Accelerate Cytoplasmic DCP2-Mediated mRNA Turnover and Weakens RNA Silencing in Arabidopsis, *PLoS Pathog.* 11 (2015) 1–21. doi:10.1371/journal.ppat.1005196.
- [83] J. Zhang, M. Dang, Q. Huang, Y. Qian, Determinants of disease phenotype differences caused by closely-related isolates of begomovirus betasatellites inoculated with the same

- species of helper virus, *Viruses*. 7 (2015) 4945–4959. doi:10.3390/v7092853.
- [84] O. Eini, S. C. Dogra, I.B. Dry, J.W. Randles, Silencing suppressor activity of a begomovirus DNA β encoded protein and its effect on heterologous helper virus replication, *Virus Res.* 167 (2012) 97–101. doi:10.1016/j.virusres.2012.03.012.
- [85] P. Gopal, et al., Differential roles of C4 and β C1 in mediating suppression of post-transcriptional gene silencing: Evidence for transactivation by the C2 of Bhendi yellow vein mosaic virus, a monopartite begomovirus, *Virus Res.* 123 (2007) 9–18. doi:10.1016/j.virusres.2006.07.014.
- [86] T. Kon, P. Sharma, M. Ikegami, Suppressor of RNA silencing encoded by the monopartite tomato leaf curl Java begomovirus, *Arch. Virol.* 152 (2007) 1273–1282. doi:10.1007/s00705-007-0957-6.
- [87] M. Saeed, R. Briddon, A. Dalakouras, G. Krczal, M. Wassenegger, Functional Analysis of Cotton Leaf Curl Kokhran Virus/Cotton Leaf Curl Multan Betasatellite RNA Silencing Suppressors, *Biology (Basel)*. 4 (2015) 697–714. doi:10.3390/biology4040697.
- [88] F. Li, X. Yang, D.M. Bisaro, X. Zhou, The β C1 Protein of Geminivirus–Betasatellite Complexes: A Target and Repressor of Host Defenses, *Mol. Plant*. 11 (2018) 1424–1426. doi:10.1016/j.molp.2018.10.007.
- [89] F. Li, et al., A calmodulin-like protein suppresses RNA silencing and promotes geminivirus infection by degrading SGS3 via the autophagy pathway in *Nicotiana benthamiana*, *PLoS Pathog.* (2017). doi:10.1371/journal.ppat.1006213.
- [90] O. Eini, A betasatellite-encoded protein regulates key components of gene silencing system in plants, *Mol. Biol.* 51 (2017) 579–585. doi:10.1134/s0026893317030037.
- [91] X. Yang, et al., Suppression of methylation-mediated transcriptional gene silencing by β c1-sahh protein interaction during geminivirus-betasatellite infection, *PLoS Pathog.* 7 (2011). doi:10.1371/journal.ppat.1002329.
- [92] F.J.L. Aragão, E.O.P.L. Nogueira, M.L.P. Tinoco, J.C. Faria, Molecular characterization

- of the first commercial transgenic common bean immune to the Bean golden mosaic virus, *J. Biotechnol.* 166 (2013) 42–50. doi:10.1016/j.jbiotec.2013.04.009.
- [93] A. Singh, J. Taneja, I. Dasgupta, S.K. Mukherjee, Development of plants resistant to tomato geminiviruses using artificial trans-acting small interfering RNA, *Mol. Plant Pathol.* 16 (2015) 724–734. doi:10.1111/mpp.12229.
- [94] D. Carroll, Genome Engineering with Targetable Nucleases, *Annu. Rev. Biochem.* 83 (2014) 409–439. doi:10.1146/annurev-biochem-060713-035418.
- [95] L. Bortesi, R. Fischer, The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond, *Biotechnol. Adv.* 33 (2015) 41–52. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.12.006.
- [96] M. Jinek, et al., A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity, *Science* (80-.). 337 (2012) 816–821. doi:10.1126/science.1138140.
- [97] Y. Cui, J. Xu, M. Cheng, X. Liao, S. Peng, Review of CRISPR/Cas9 sgRNA Design Tools, *Interdiscip. Sci. Comput. Life Sci.* 10 (2018) 455–465. doi:10.1007/s12539-018-0298-z.
- [98] Z. Feng, et al., Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system, *Cell Res.* 23 (2013) 1229–1232. doi:10.1038/cr.2013.114.
- [99] J.F. Li, et al., Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9, *Nat. Biotechnol.* 31 (2013) 688–691. doi:10.1038/nbt.2654.
- [100] V. Nekrasov, B. Staskawicz, D. Weigel, J.D.G. Jones, S. Kamoun, Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease, *Nat. Biotechnol.* 31 (2013) 691–693. doi:10.1038/nbt.2655.
- [101] K. Xie, Y. Yang, RNA-Guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system, *Mol. Plant.* 6 (2013) 1975–1983. doi:10.1093/mp/sst119.
- [102] A. Chaparro-Garcia, S. Kamoun, V. Nekrasov, Boosting plant immunity with CRISPR/Cas, *Genome Biol.* 16 (2015) 4–7. doi:10.1186/s13059-015-0829-4.

- [103] A. P. Uniyal, S.K. Yadav, V. Kumar, The CRISPR–Cas9, genome editing approach: a promising tool for drafting defense strategy against begomoviruses including cotton leaf curl viruses, *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 28 (2019) 121–132. doi:10.1007/s13562-019-00491-6.
- [104] Z. Iqbal, M.N. Sattar, M. Shafiq, CRISPR/Cas9: A Tool to Circumscribe Cotton Leaf Curl Disease, *Front. Plant Sci.* 7 (2016) 1–11. doi:10.3389/fpls.2016.00475.
- [105] K. Yin, T. Han, K. Xie, J. Zhao, J. Song, Y. Liu, Engineer complete resistance to Cotton Leaf Curl Multan virus by the CRISPR/Cas9 system in *Nicotiana benthamiana*, *Phytopathol. Res.* 1 (2019) 1–9. doi:10.1186/s42483-019-0017-7.
- [106] A. Kis, É. Hamar, G. Tholt, R. Bán, Z. Havelda, Creating highly efficient resistance against wheat dwarf virus in barley by employing CRISPR/Cas9 system, *Plant Biotechnol. J.* 17 (2019) 1004–1006. doi:10.1111/pbi.13077.
- [107] Z. Osmani et al., CRISPR/Cas9-Mediated Editing of Genes Encoding rgs-CaM-like Proteins in Transgenic Potato Plants, *Methods Mol Biol.* (2019) 2028:153-165. doi: 10.1007/978-1-4939-9635-3_9.
- [108] D. Mehta, A. Stürchler, R.B. Anjanappa, S.S.E.A. Zaidi, M. Hirsch-Hoffmann, W. Gruissem, H. Vanderschuren, Linking CRISPR-Cas9 interference in cassava to the evolution of editing-resistant geminiviruses, *Genome Biol.* 20 (2019) 1–10. doi:10.1186/s13059-019-1678-3.

Figure legends

Fig.1. A mechanistic model for the NIK1-mediated antiviral immunity against begomoviruses. In infected cells, the disassembled CP-bound viral ssDNA is translocated to the nucleus, where viral ssDNA is converted to dsDNA via host polymerase (1). NSP binds to newly-synthesized vDNA and facilitates its translocation to the cytosol via nuclear pore (2). At the cytosolic side, the NSP-interacting GTPase (NIG) binds to NSP to accessorize the release of vDNA-NSP from the nuclear pores to the cytosol (3). MP and NSP plays a crucial role in transporting vDNA to the plasmodesmata via endosome. MP interacts with the endosomal protein SYTA (4) and may also interact with vDNA-NSP complex to move the complex to the plasmodesmata via an endocytic recycling pathway for the MP-assisted cell-to-cell spread. In incompatible interactions, the receptor like kinase NIK1-mediated antiviral signaling is activated upon perception of begomovirus-derived nucleic acids, which act as PAMP (5). Then, NIK1 undergoes dimerization with itself or another receptor (yet to be discovered) that may function as nucleic acid-sensing PRR, which leads to phosphorylation of Thr474 within the NIK1 activation loop and subsequent activation of the kinase. Endogenous DAMPs possibly activated during infection by the insect vector may also activate the NIK1-mediated antiviral signaling (7), although evidence for a DAMP activation is lacking. Activated NIK1 mediates the phosphorylation of RPL10 at Ser-104 (8) and promotes translocation of the ribosomal protein to the nucleus, where it interacts with LIMYB to fully repress the expression of translation-related genes, such as ribosomal protein (RP) genes (9). Prolonged down-regulation of translation-related genes leads to global translation suppression, which also impairs viral mRNA (vmRNA) translation (10). In compatible interactions, NSP binds to the NIK1 kinase domain and prevents activation of the host defense (11); thereby creating an environment that favors virus infection.

Fig. 2. RNA silencing-derived defense against geminiviruses. Upon Geminivirus infection (1), virions are disassembled in the cytosol and ssDNA is translocated to the nucleus where it is converted in double-stranded intermediates (2). The viral genome is bidirectionally transcribed and (3) produces overlapping transcripts which form double-stranded RNA (dsRNA) fragments

and also structured mRNAs, which trigger silencing response. In the nucleus, dsRNA is processed by the enzyme Dicer 3 (DCL3) to produce small interfering RNAs duplexes (siRNA) of about 24-nt (4), which are stabilized by the HUA Enhancer 1 (HEN1)-dependent methylation (5). The siRNAs interact with Argonaute 4 (AGO4) and associated proteins to form RITS complex (RNA-induced transcriptional silencing complex) (6), responsible for chromatin remodeling. DNA methylation is assisted by DRM1/2 (Domain rearrangement methyltransferase 1/2) and DRD (defective in RNA-directed DNA methylation) and leads to repression of mRNA transcription (7) and transcriptional gene silencing (TGS). In post-transcriptional gene silencing (PTGS), dsRNA in the cytoplasm is cleaved by Dicer 2 and 4 (4) in duplexes of about 21 to 22-nt, which are methylated by HEN1 (5) and subsequently loaded into two main effectors AGO1 and AGO2 to form RNA-induced complexes (RISC) (8). RISC induces translational inhibition (9) and mRNA degradation (10). RNA-dependent RNA polymerase (RDR) complex may further amplify the silencing signal using AGO-sliced products, aberrant RNAs or aborted viral transcripts as templates (11).

Fig. 3. Engineering resistance to geminivirus via the CRISPR-Cas9 system. Plants might be stably transformed with CRISPR/Cas9 system via *Agrobacterium*-mediated transformation. Alternatively, no-transgenic strategies may be deployed: Cas9 may be delivered as mRNA molecules in a mix with gRNA, or it may be delivered as a functional ribonucleoprotein complex Cas9/gRNA. Upon Geminivirus infection (1), virions release the viral single-stranded DNA (ssDNA) into cytosol, which is translocated to the nucleus. Host DNA polymerase mediates the complementary strand synthesis resulting in double-stranded DNA (2), which by rolling circle replication produces multiple viral copies. The Cas9/gRNA complex binds to viral genome (3) and acts as a molecular scissor creating double-stranded breaks within a 20 nt short sequence provided by the complementary gRNA. PAM motif downstream of the target DNA is a prerequisite for cleavage. Under the action of CRISPR, virus replication is disrupted (4). Three different mechanisms not self-exclusive can explain the CRISPR-Cas antiviral action: (I) Cas9-gRNA prevents access of replication proteins; (II) Cas9/gRNA introduces mutations in the viral

genome through the error-prone non-homologous end joining DNA repair pathway or (III) Cas9/sgRNA cleaves the viral dsDNA, which leads to disruption of the target. Cas: CRISPR-associated. CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeats. dsDNA: double-stranded DNA. sgRNA: single guide RNA. ssDNA: single-stranded DNA. PAM: protospacer adjacent motif.

Viral Protein	Species	Mechanism of action	Interaction	Reference
β C1	<i>Tomato yellow leaf curl China virus</i> (TYLCCNV) TYLCCNB	Modulation of NbCaM expression, a NbSGS3 interactor		Li <i>et al.</i> , 2017
β C1	TYLCCNV	Inhibition of SAHH activity	SAHH (S-adenosyl homocysteine hydrolase)	Yang <i>et al.</i> , 2011
TrAP (AC2)	<i>Tomato golden mosaic virus</i> (TGMV) <i>Cabbage Leaf Curl Virus</i> (CaLCuV)	inhibition of KYP <i>in vitro</i> . Decrease in H3K9me2-dependent CHH methylation	Su(var)3-9 homolog 4/ Kryptonite (SUVH4/KYP)	Castillo-Gonzalez <i>et al.</i> , 2015
AL2 (AC2, C2 ou TrAP) L2 (C2)	TGMV <i>Beet curly top virus</i> (BCTV)	Up-regulation of RNA silencing inhibitors (Werner exonuclease-like 1) and rgsCaM. Interaction with ADK	Adenosine kinase (ADK)	Jackel <i>et al.</i> , 2015
AC2	<i>Mungbean Yellow Mosaic India Virus</i> (MYMIV)	Interaction with RDR6 and AGO1. Inhibition of RDR6 activity.	RNA-dependent RNA polymerase 6 (RDR6) and Argonata 1 (AGO1)	Kumar <i>et al.</i> , 2015
C2	<i>Beet severe curly top virus</i> (BSCTV)	Stabilization of SAMDC1	S-adenosyl-methionine decarboxylase 1 (SAMDC1)	Zhang <i>et al.</i> , 2011
C4	<i>Cotton Leaf Curl Multan virus</i> (CLCuMuV)	Inhibition of NbSAMS2 activity	NbSAMS2 S-adenosyl methionine synthetase (SAMS)	Ismayil <i>et al.</i> , 2018
AC4	<i>Tomato leaf curl New Delhi virus</i> (ToLCNDV)	AGO4 interaction and influence on cytosine methylation in the genome	Argonata 4 (AGO4)	Vinutha <i>et al.</i> , 2018
BV1	CaLCuV	Upregulation of AS2 expression Interaction with DCP2 increasing decapping	ASYMMETRIC LEAVES2 (AS2)	Ye <i>et al.</i> , 2015

Rep	<i>Tomato yellow leaf curl Sardinia virus</i> (TYLCSV)	Downregulation of NbMET1 and NbCMT3 expression		Rodriguez-Negrete <i>et al.</i> , 2013
Rep	<i>Wheat dwarf virus</i> (WDV)	Interaction with 21 and 24nt siRNA	21 and 24 nt siRNA	Wang <i>et al.</i> , 2014
AC5	MYMIV	Repression of <i>DRM2</i> (DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE2) expression		Li <i>et al.</i> , 2015
V2	<i>Tomato yellow leaf curl geminivirus</i> (TYLCV)	Inhibition of SISGS3 activity	Suppressor of Gene Silencing 3 (SGS3)	Glick <i>et al.</i> , 2008
V2	<i>Papaya leaf curl virus</i> (PaLCuV)	Suppression of PTG and PTGS		Mubin <i>et al.</i> , 2018
V2	TYLCV	NbHDA6 interaction and influence on MET1 and HDA6 recruitment to the genome viral	Histone deacetylase 6 (NbHDA6)	Wang <i>et al.</i> , 2018
V2	BCTV	Interfere in RDR6-dependent amplification of siRNA		Luna <i>et al.</i> , 2017

Figure 1

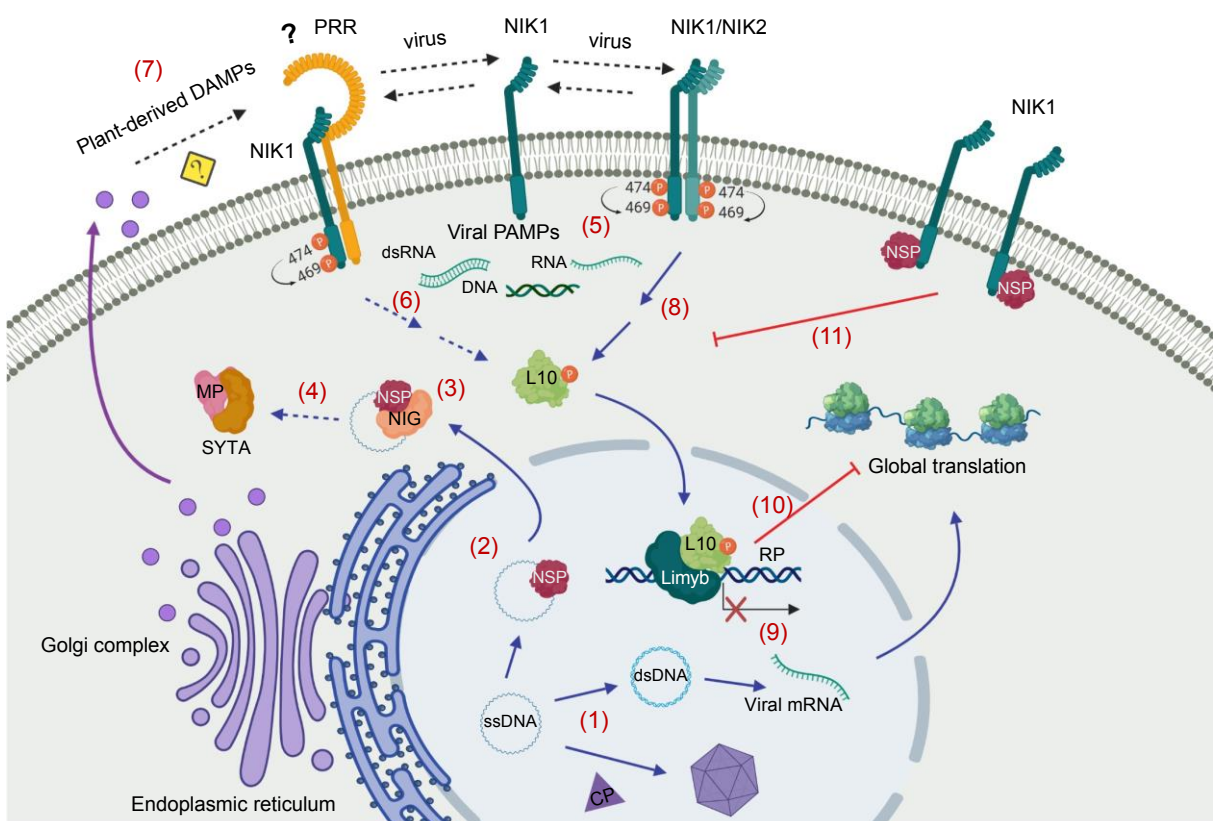


Figure 2

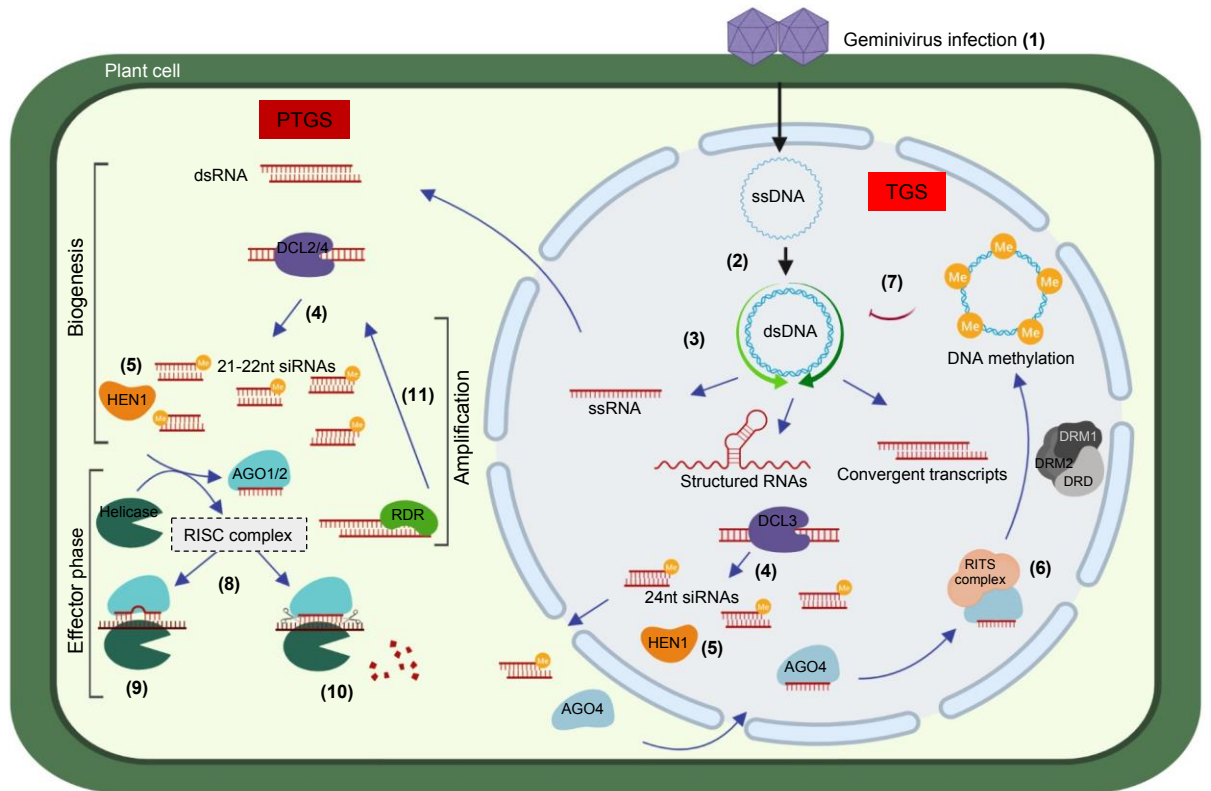
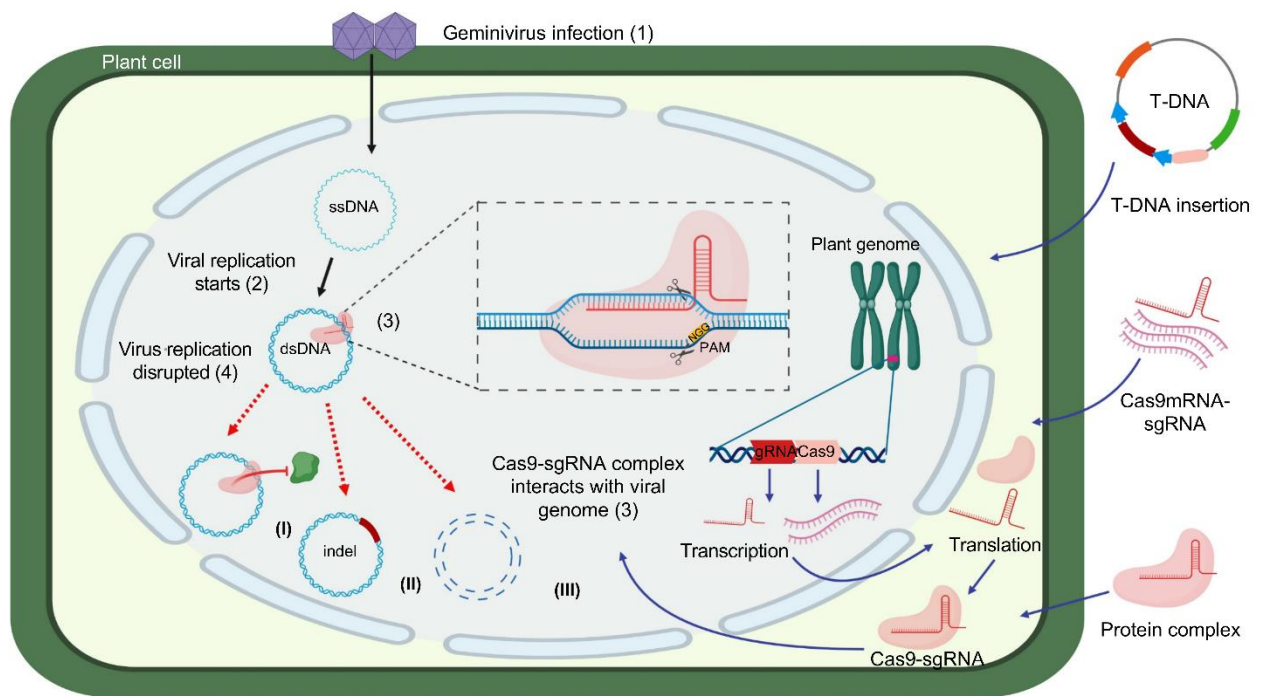


Figure 3



CAPÍTULO II

Estudos funcionais do mutante duplo AtNIK1-T469at474d *in vitro* e em linhagens transgênicas de tomateiros expressando ectopicamente AtNIK1-T469at474d Fusionado a GFP.

Resumo

Epidemias associadas a begomovírus atualmente ameaçam a produção mundial de tomate devido ao surgimento de espécies de vírus altamente patogênicas. Mais de dez espécies diferentes de begomovírus que infectam tomateiros foram identificadas e caracterizadas em território brasileiro na última década. A sinalização antiviral mediada por NIK1 [“nuclear shuttle protein (NSP)-Interacting Kinase 1] é ativada pela infecção viral e protege as plantas contra begomovírus em interações incompatíveis, mas é superada pelo supressor viral NSP de NIK1, em interações compatíveis. A fosforilação em Thr-474 é o evento crucial que desencadeia a ativação de NIK1. A construção de um mutante de ganho de função, substituindo o resíduo Thr-474 pelo resíduo fosfomimético Asp, aumentou a resistência contra begomovírus em linhagens de tomateiro transgênico. Para gerar uma estratégia de resistência eficiente contra begomovírus, uma segunda mutação em T474D foi introduzida pela substituição do resíduo Thr-469 por Ala e, assim, eliminando o efeito antagonista da fosforilação em Thr-469. O mutante duplo T469A/474D apresentou maior atividade de fosforilação *in vitro* em comparação com NIK1 e T474D. Os ensaios funcionais foram realizados usando linhagens de tomate transgênico transformadas com uma construção de DNA expressando T469A / T474D fusionado a GFP sob o controle do promotor 35S. As mutações duplas em NIK1 promoveram a ativação constitutiva das defesas mediadas por NIK1, mesmo em baixos níveis de expressão do transgene, resultando na repressão dos genes da proteína ribossomais, marcadores moleculares da ativação da sinalização antiviral. Além disso, as linhagens transgênicas apresentaram resistência aumentada ao begomovírus *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), um fenótipo associado à ausência de sintomas, baixa eficiência da taxa de infecção e reduzido acúmulo de DNA viral nas folhas sistêmicas. Estes resultados confirmam o efeito antagonista da fosforilação em Thr-469 e Thr-474 na ativação da sinalização antiviral mediada por NIK1, indicando que, provavelmente, a fosforilação em Thr-469 regula negativamente a activação de NIK1 para prevenir a autoimunidade.

1.Introdução

Os begomovírus pertencem à família *Geminiviridae*, são transmitidos por mosca branca e causam doenças severas que impactam economicamente diversas culturas agronomicamente relevantes em áreas tropicais e sub-tropicais (Hanley-Bowdoin, 2013). Espera-se que mudanças climáticas alterem a distribuição geográfica da mosca branca o que certamente causará uma ameaça considerável à agricultura mundial. Esta ameaça é particularmente relevante em tomateiros, os quais são suscetíveis a uma variedade de espécies emergentes e patogênicas de begomovírus. No Brasil, mais de 10 novas espécies de begomovírus infectando tomateiros foram identificadas nas últimas duas décadas e, atualmente, representam uma séria limitação à plantação de tomateiros no sudeste, centro-oeste e nordeste do território brasileiro. Diversas estratégias para desenvolvimento de resistência baseada no patógeno têm sido desenvolvidas, porém nenhuma delas tem demonstrado ser efetiva em conferir resistência de amplo espectro contra as espécies brasileiras de begomovírus que infectam tomateiros (Hanley-Bowdoin, 2013). Consequentemente, a identificação de estratégias de resistência de amplo espectro contra begomovirose continua sendo o foco de estudos intensivos.

Os begomovírus possuem o genoma circular de DNA fita simples que podem ser mono ou bissegmentados. Tipicamente, os begomovírus encontrados no Brasil possuem dois componentes genômicos, designados DNA-A e DNA-B (Hanley-Bowdoin et al., 2013). O DNA-A codifica as proteínas requeridas para replicação (Rep, replication associated protein and REn, replication enhancer), transativação dos genes virais, TrAP (Transactivation protein), supressores de silenciamento do RNA (TRaP e AC4) e encapsidação do genoma viral, CP (coat protein). O DNA B é requerido para movimento intra e intercelular do DNA viral e desenvolvimento de sintomas e codifica as proteínas NSP (nuclear shuttle protein) e MP (movement protein). A proteína NSP facilita o movimento intracelular do DNA viral do núcleo para o citoplasma e age em conjunto com MP para promover o tráfico do DNA viral para células adjacentes, não infectadas. NSP também exerce uma função de virulência pois é capaz de suprimir a ativação de uma via de sinalização antiviral mediada pelo receptor imune NIK1 (NSP-Interacting Kinase 1) aumentando a patogenicidade do vírus pelo hospedeiro (Fontes et al., 2004, Carvalho et al., 2008).

NIK1 foi inicialmente identificada como um alvo de virulência da proteína NSP do begomovírus TGMV, *Tomato golden mosaic virus* (Mariano et al., 2004). Além da função de virulência de NSP como supressor de NIK1, outras linhas de evidência indicam

que NIK1 exerce um papel relevante na defesa antiviral. Inicialmente, foi demonstrado que a perda da função de *NIK1* em *Arabidopsis* está associada a um fenótipo de suscetibilidade aumentada contra a infecção por *Cabbage leaf curl vírus*, CaLCuV (Fontes et al., 2004; Rocha et al., 2008; Santos et al. 2009). Em segundo lugar, a superexpressão de *NIK1* de *Arabidopsis* em tomateiros atenua o desenvolvimento de sintomas e atrasa o progresso de infecção por *Tomato yellow spot vírus*, ToYSV (Carvalho et al., 2008). Finalmente, como um transdutor autêntico de sinal antiviral, mutações na alça de ativação (A-loop) de NIK1 que bloqueiam a atividade de autofosforilação também impedem a capacidade de NIK1 em elicitar uma resposta de defesa contra begomovírus (Santos et al., 2009).

O modelo atual da via de defesa antiviral mediada por NIK1 estabelece que, em resposta à infecção viral, NIK1 forma hetero ou homodímeros, promovendo a ativação do receptor por meio de autofosforilação do resíduo de treonina na posição 474, presente na alça de ativação da quinase (Figura 1B; Santos et al., 2009). Recentemente foi demonstrado que ácidos nucléicos derivados de infecções por begomovírus funcionam como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, Figura 1A) e ativam a via de sinalização antiviral mediada por NIK1 (Teixeira et al., 2019). O receptor NIK1 ativado intermedia a fosforilação de rpL10A, resultando em sua translocação para o núcleo (Carvalho et al., 2008; Santos et al., 2009). No núcleo, rpL10A interage com LIMYB (L10-interacting Myb domain-containing protein), e influencia sua atividade transcricional, promovendo a repressão transcricional da expressão de genes de proteínas ribossomais (Zorzatto et al., 2015). A regulação negativa prolongada de componentes da maquinaria de tradução causa uma supressão da tradução global, inibindo a tradução de genes virais e, conseqüentemente, a replicação e movimento do genoma viral (Zorzatto et al., 2015; Bustrolini et al., 2015). Contrapondo a este mecanismo de ativação da defesa antiviral, NSP de begomovirus liga à alça de ativação do domínio de quinase de NIK1 e impede a fosforilação de seu resíduo de treonina-474 e, assim, previne ativação da via de sinalização antiviral, criando um ambiente que é mais favorável à infecção viral (Fontes et al., 2004; Santos et al., 2009). Conseqüentemente, a sinalização antiviral por NIK1 representa uma resposta de resistência evolucionariamente superada por uma estratégia de virulência de begomovírus.

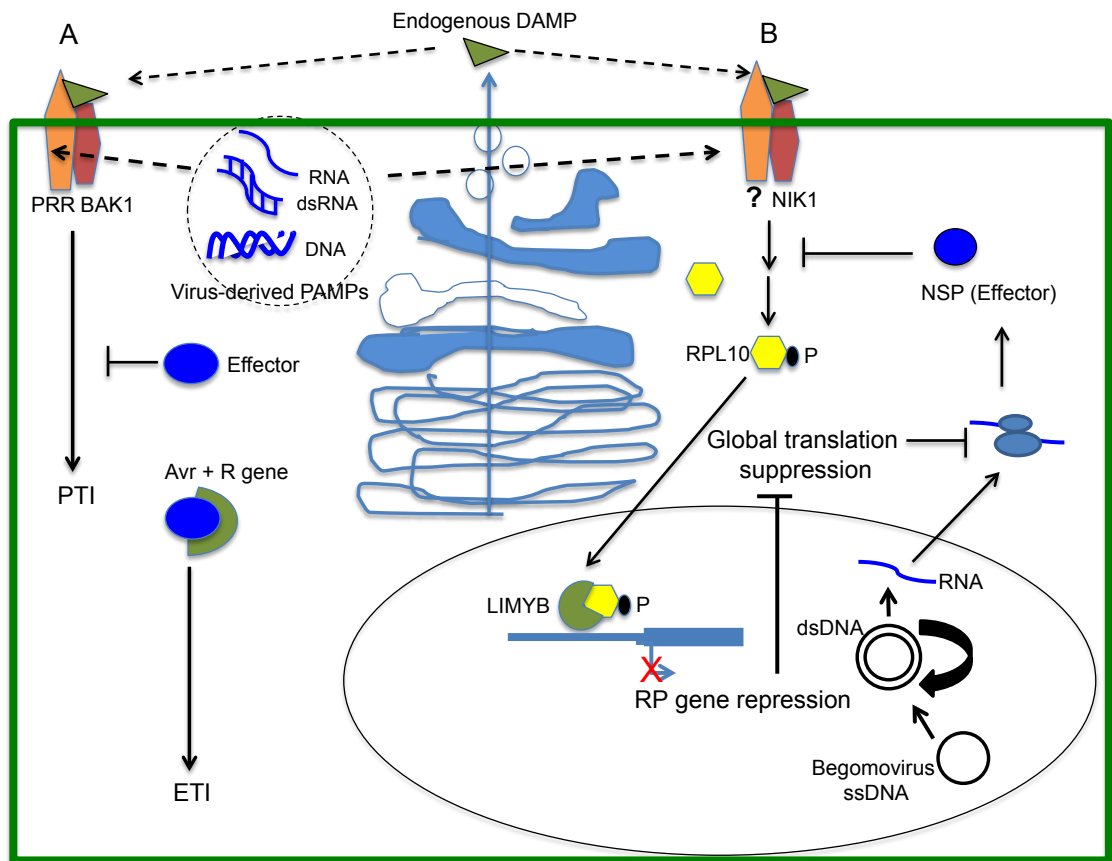


Figura 1: Imunidade inata antiviral em plantas. (A) PTI (PAMP-triggered immunity) e ETI (effector-triggered immunity) nas interações vírus hospedeiros. Durante a infecção viral, a replicação e a expressão do genoma do vírus levam ao acúmulo de ácidos nucléicos derivados do vírus com características de PAMPs, os quais podem ser reconhecidos por PRRs (pattern recognition receptors) do hospedeiro que, por sua vez, oligomerizam com co-receptores, como BAK1 e BKK1, para ativar PTI. Alternativamente, PTI pode ser ativada diante do reconhecimento de DAMPs (damage-associated molecular patterns) por PRRs; DAMPs são induzidas pela infecção e enviadas para o apoplasto pelo aparelho secretor do hospedeiro. Em uma infecção bem-sucedida, a expressão do genoma viral resulta no acúmulo de efetores do vírus que suprimem PTI, levando à doença. Entretanto, em genótipos resistentes, o gene de resistência especificamente reconhece, direta ou indiretamente, os efetores virais, designados fatores de avirulência (Avr), ativando ETI que leva à resistência. (B) Ramo de controle traducional da via de sinalização mediada por NIK1 em imunidade inata antiviral. Oligomerização de NIK1 induzida pela infecção viral promove transfosforilação na Thr-474 ativando a quinase. Alternativamente, NIK1 interage com outro receptor RLK de uma maneira dependente de estímulo (infecção viral). Embora a infecção viral ative a via de sinalização de NIK1, a base molecular dessa elicitação é desconhecida e pode ser PAMPs, derivadas de ácidos nucléicos do vírus ou DAMPs endógenos liberadas no apoplasto pelas células hospedeiras. NIK1 ativada intermedia a fosforilação de RPL10, promovendo sua translocação para o núcleo, onde interage com LIMYB para reprimir a expressão de genes relacionados com tradução. Conseqüentemente, a propagação do sinal antiviral culmina com a supressão de tradução global que também inibe a tradução do mRNA viral, como um mecanismo de defesa. Nas interações compatíveis entre begomovírus e o hospedeiro, a ligação de NSP ao domínio quinase de NIK1 (A-Loop) inibe autofosforilação na Thr-474, impedindo a ativação do receptor e fosforilação de

RPL10, de forma a superar esta camada de defesa. O ssDNA viral replica via intermediários dsDNA que são transcritos no núcleo de plantas infectadas. NSP liga ao DNA viral nascente, facilita o movimento para o citoplasma e age em concerto com MP para transferir o DNA viral para as células adjacentes. (Gouveia et al., 2017)

Esta limitação da via de defesa foi, recentemente, revertida em *Arabidopsis* e tomateiros por meio da ativação constitutiva de NIK1 promovida pela substituição do resíduo chave de ativação Thr-474 por aspartato (Brustolini et al., 2015; Zorzatto et al., 2015). Foi demonstrado que a expressão ectópica do mutante AtNIK1-T474D em *Arabidopsis* geneticamente modificada (GM) conferiu resistência ao begomovirus CaLCuV e, em tomateiros GM, aos begomovírus ToYSV e “*Tomato severe rugose virus*” (ToSRV) (Brustolini et al., 2015; Zorzatto et al., 2015). Entretanto, resultados preliminares indicam que a proteína NIK1 possui papel antagonista a receptores de PTI, como a proteína BAK1 (Brassinosteroid Insensitive 1-Associated Kinase;), que aciona o mecanismo de imunidade antibacteriana e antifúngica (Machado et al, 2015). Como consequência, a expressão do mutante NIK1 em tomateiros, embora eficiente para tolerância a begomovirus, 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. Componentes a jusante já caracterizados incluem RPL10 e LIMYB. O gene LIMYB se destaca em potencial, uma vez que tem sido demonstrada que a superexpressão do referido gene em *Arabidopsis thaliana* conferiu resistência a begomovírus (Zorzatto et al., 2015). Nesta investigação, propõe-se avaliar a atividade aumentada de autofosforilação do mutante duplo AtNIK1-T469AT474D, comparado com AtNIK1 e AtNIK1-T474D, e examinar se possui a capacidade de potencializar o sinal antiviral em resposta a infecções por ToYSV, como estratégia alternativa para obtenção de tomateiros resistentes a begomovírus.

2. Material e Métodos

2.1. Atividade de auto-fosforilação de NIK1 e versões mutadas.

2.1.1 Clonagem dos domínios cinases de NIK1 e formas mutadas em vetores de expressão em bactéria

O clone pGST-NBSNIK1 (pUFV568) contém o domínio cinase de NIK1 fusionado a GST (Fontes et al. 2004), enquanto os clones pGST-NBSNIK1T474D (pUFV630) e o duplo mutante pGST-NBSNIK1T474D/T469A (pUFV1625) contém o domínio cinase de NIK1 com as mutações indicadas (Santos et al., 2009). Já o clone pGST- Δ KDNIK1 (pUFV750) contém o domínio cinase de NIK1 inativo pela deleção do sítio de ligação ao nucleotídeo do domínio kinase (Δ KD; Fontes et al., 2004).

O clone HBT-AtNIK1Km-HA contendo a região codificadora de NIK1, com substituições de resíduos de lisina 340 para ácido glutâmico, (K340E) foi gentilmente cedido pelo Dr Bo Li. O fragmento de DNA contendo o domínio cinase de NIK1Km foi amplificado, a partir dos oligonucleotídeos NBSAtNIK1F-GA (3848) e AtNIK1RGst (4204), e inserido, por recombinação, no vetor de entrada pDONR207, utilizando-se a enzima BP clonase (Invitrogen), segundo especificações do fabricante. O clone resultante pUFV3152, foi utilizado para transferência de NIKKm para o vetor de destino pDEST15, por recombinação, a partir da enzima LR clonase a 25°C por 12 h. As reações foram utilizadas na transformação de células competentes de *Escherichia coli* da estirpe DH5 α , pelo método de eletroporação. Os transformantes positivos foram selecionados com ampicilina (100 mg/L), diagnosticados por sequenciamento e armazenados em glicerol 50% (v/v). O clone gerado pGST-NBSNIK1Km (pUFV3153) permite a síntese heteróloga do domínio cinase de NIK1Km fusionado à região C-terminal de GST (Glutathione S-Transferase).

Colônias individuais de *E.coli*, confirmadas por sequenciamento, foram incubadas em 5 mL de meio LB contendo o antibiótico específico, à 37°C por 12 h. O DNA plasmidial foi extraído por meio do *kit Miniprep Extraction kit* (Qiagen) e uma alíquota foi utilizada para transformação de *E. coli* da estirpe BL21(DE3)-pRARE2, para o ensaio de expressão.

2.1.2 Preparo de células competentes e expressão heteróloga

Células competentes de *Escherichia coli*, estirpe BL21(DE3)-pRARE2 foram transformadas com os plasmídeos de expressão pDEST15 contendo as versões mutadas e truncadas do domínio cinase de NIK1. Para isso, células de *E. coli* foram cultivadas em 5 mL de LB, contendo o antibiótico de seleção cloranfenicol (35 mg/mL). A cultura foi centrifugada a 4200 g por 15 minutos e o pellet foi ressuspensionado em 1000 µL de CaCl₂ 0,1M, por duas vezes consecutivas. Posteriormente, o pellet foi ressuspensionado em 150 µL de CaCl₂ 0,1 M (Sambrook *et al.*, 1989). As alíquotas de 75 µL foram transformadas com cada plasmídeo, pelo método de choque térmico, e a cultura crescida foi plaqueada em meio LB sólido contendo os antibióticos de seleção, ampicilina (100 mg/L) e cloranfenicol (35 mg/mL). Os transformantes foram confirmados por PCR com oligonucleotídeos específicos para o gene de interesse e para o vetor (Tabela 2); o produto amplificado foi visualizado em gel de agarose 1% (p/v) e sequenciado.

Os transformantes selecionados foram usados para ensaio de expressão em larga escala. A expressão foi feita, utilizando-se como pré-inóculo 10 mL de meio LB acrescido de ampicilina 100 mg/L, e mantidos sob agitação a 225 rpm por 16 horas a 37°C. O pré inóculo foi diluído 1:100 em 500 mL de meio LB contendo ampicilina 100 mg/L e a cultura foi incubada a 37°C, sob agitação de 225 rpm até atingir densidade óptica (A_{600nm}) entre 0,6 e 0,8, quando a expressão da proteína foi induzida com 0,4 mM de IPTG (isopropilil-β-D-thiogalactopiranosídeo) e os tubos foram mantidos sob agitação a 225 rpm por 4 horas a 37°C. Após 4 horas de indução, a suspensão do inóculo foi dividida em volumes iguais e centrifugada a 7700 g por 10 minutos a 4 °C para sedimentar as células e o pellet foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C até uso.

2.1.3 Montagem da coluna de afinidade à proteína NIK

Para montagem da coluna de afinidade para NIK1, fez-se necessário a produção de anticorpo contra a proteína de interesse. Assim, a proteína NIK1-GFP (Fontes *et al.*, 2004) foi purificada por coluna de afinidade à GFP. Para confirmar a purificação da proteína, foi realizada análise eletroforética em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). A corrida eletroforética teve duração aproximada de 50 min a 80-120 mA e 190 V.

As proteínas foram visualizadas após coloração com Comassie Blue R-250 (50 % metanol (v/v), 10 % ácido acético (v/v), 0,1 % Comassie Blue R-250 (m/v)).

Posteriormente, foram descoradas em 20 % metanol (v/v) e 10 % ácido acético (v/v) e então as bandas de interesse, foram recortadas do gel com auxílio de um bisturi e utilizada na imunização de camundongos para produção de anticorpos.

Foram utilizados 2 Camundongos BALB/c macho de 4 a 8 semanas de idade, gentilmente cedidos pelo professor Dr Leandro Licursi, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa – UFV, sendo mantidos e manuseados no biotério de experimentação do setor de Imunologia e Virologia do Departamento de Biologia Geral – DBG/UFV, sob o ciclo fotoperiódico claro/escuro de 12 h e receberam água e alimento. Os animais foram imunizados por via intraperitoneal, pela aplicação de 200 μ L de solução preparada a partir de 3 a 4 bandas de proteína NIK-GFP, recortadas do gel de poliacrilamida e trituradas com homogeneizador de tecidos em tampão PBS ao qual acrescentaram-se 50 μ g de saponina antes da imunização. O tratamento foi constituído de 3 doses com intervalos de 15 dias entre cada dose. Quatro semanas após a infecção, os camundongos foram eutanasiados. A eutanásia foi realizada pela técnica de deslocamento cervical.

O sangue obtido dos animais foi mantido à temperatura ambiente por 45 minutos, tempo necessário para coagulação. A seguir o material foi centrifugado a 4000 g por 10 minutos, e o soro obtido foi transferido para um novo tubo. O soro hiperimune foi então aquecido em termobloco a 56 °C por 30 minutos para inativação das proteínas do complemento. A dosagem da concentração dos anticorpos foi feita pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

O anticorpo anti-nik1 produzido, foi utilizado para a confecção da coluna de afinidade. Posterior à dosagem das proteínas por Bradford, o pH do soro foi ajustado para 8.0 com 100 mM de carbonato de sódio pH 9.6. A seguir cerca de 2 mL de resina *NHS-activated Sepharose* (GE Healthcare) foi depositada em um suporte de coluna cromatográfica e lavada com 20 mL de 1 mM de HCl gelado. Resina e soro hiperimune foram incubados por 4 horas à temperatura ambiente em agitador orbital. A reação de conjugação foi interrompida pela adição de Tris-HCl 0,1 M pH 8.0 à resina, com incubação de 1 h à temperatura ambiente sob agitação, seguida pela lavagem com Tris-HCl 0,1 M / NaCl 0,5 M. A resina conjugada com anticorpo anti-NIK1, foi utilizada para o empacotamento da coluna de afinidade, para purificação cromatográfica líquida por gravidade. A coluna foi armazenada em etanol 20 % a 4 °C.

2.1.4 Purificação de proteínas em coluna de afinidade

As células sedimentadas de *E. coli*, expressando as proteínas de interesse, foram ressuspensas em 10 mL de tampão PBS 1X (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH7,3) com adição de inibidores de protease, PMSF 30 µM, Benzamidina 15 µM e Thiourea 15 µM. Nesta solução, foram também adicionados 100 µg.mL⁻¹ de lisozima, mantendo-se por 30 minutos no gelo. A lise celular foi obtida por ultrassonicação com intervalo de 10 segundos entre cada pulso, mantendo-se os tubos em gelo durante todo o procedimento. Em seguida, o material foi centrifugado a 10000 x g por 30 minutos para a remoção de restos celulares e obtenção do sobrenadante, o qual foi utilizado para a purificação das proteínas de interesse.

A purificação foi realizada a partir da Cromatografia Líquida por gravidade. Para lavar e equilibrar a coluna de afinidade preparada conforme já descrito, foi utilizado tampão Tris-NaCl (Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM; NaCl 50 mM) e para eluição foi utilizado Glicina 0,1 M, pH 2,8. Para neutralização das amostras após a eluição, acrescentaram-se imediatamente 100 µL de Tris-HCl 1 M, pH 9.0, para cada 1 mL de eluído. A fração de proteína obtida foi dialisada contra tampão PBS utilizando-se membrana de acetato de celulose. Uma alíquota do eluato foi analisada em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% (M/V) e quantificado pelo método de Bradford (1976). A absorbância a 595 nm é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, e uma solução de BSA (albumina de soro bovina) a 2 % (M/V) foi utilizada para determinação da curva padrão.

2.1.5 Ensaio de fosforilação *in vitro*

O ensaio de fosforilação *in vitro* foi realizado com a proteína purificada GST-NBSNIK1, proteína contendo o domínio cinase truncado GST-ΔKDNK1 e proteínas contendo o sítio ativo mutado, GST-NBSNIK1T474D, GST-NBSNIK1T474D/T469A e GST-NBSNIK1K340. Para isso, cada proteína purificada foi incubada sozinha para análise da autofosforilação, ou com GST-ΔKDNK1 a 25 °C por 1 hora em Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, MgCl₂ 10 mM, EDTA 5 mM, NaCl 100 mM, DTT 1 mM e ATP 100 µM. Para análise de fosforilação em resíduos de serina, as fosfoproteínas foram analisadas por SDS-page e detectadas por *Western blotting*, utilizando anticorpos anti-serine-HRP e anti-NIK. Os blots também foram sondados com anticorpo contra NIK1, e o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a HRP, e revelados com o sistema de

detecção SuperSignal®West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific). A atividade de auto-fosforilação dos mutantes foi determinada pelo densitometria do sinal das bandas de proteínas fosforiladas normalizado com o acúmulo da respectiva versão de NIK1.

2.2 Transformação de tomateiros mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

2.2.1 Material vegetal (explantes)

As sementes de tomateiro (*Solanum lycopersicum*, cultivar Moneymaker) foram germinadas *in vitro* para obtenção dos explantes (cotilédones e hipocótilos). A desinfestação superficial das sementes foi feita por meio da imersão das sementes em etanol 70% (v/v) durante 1 minuto, seguida da imersão em hipoclorito de sódio 1% (v/v) por 15 min. Após desinfestação, as sementes foram lavadas 3 vezes em água estéril para retirar o hipoclorito residual e dispostas sob o meio de cultura com metade da concentração dos sais MS (Murashige e Skoog), acrescido de mio-inositol (100 mg/L), sacarose (10 g/L), e Phytigel™ (1.5 g/L) (Figura 2A). As sementes foram mantidas no escuro por 15 dias (Figura 2B) para estiolamento do hipocótilo durante a germinação e, em seguida, cultivadas em sala de crescimento ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), sob irradiância de $36 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas por 2 dias.

2.2.2 Condições de pré-cultivo

As plantas com 17 dias, a contar da emissão da radícula, foram utilizadas para obtenção dos explantes (Figura 2C). Essas foram retiradas do meio de cultura, em câmara de fluxo laminar, de forma asséptica, seus cotilédones e hipocótilos seccionados transversalmente sobre papel filtro estéril (Figura 2 D), umedecido com água autoclavada para evitar a desidratação dos tecidos e então transferidos para o meio de pré-cultivo (Figura 2E e 2F, Tabela 1) onde permaneceram por um dia.

2.2.3 Construção de plasmídeos recombinantes

O clone pk7-AtNIK1 (pUFV710), contendo o cDNA de NIK1, sob o controle do promotor 35S, clonado no vetor binário de transformação de plantas pk7WG2, foi

previamente descrito por Fontes et al., 2004. O clone pK7F-NIK1T474D (pUFV 632), 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), representa o mutante duplo de NIK1 (Santos et al., 2009).

2.2.4 Transferência dos vetores para a *Agrobacterium tumefaciens*

Células eletrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens*, estirpe GV 3101, foram transformadas com o clone pk7-AtNIK1-T469A/T474D, 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 mg/l) para seleção da estirpe de agrobactéria e o antibiótico de seleção do vetor, canamicina (100mg/L), a 28°C por 48 horas.

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 (A_{600} entre 0,7 e 1,0) para as transformações de tomateiros.

2.2.5 Transformação de tomateiros via *Agrobacterium*

A construção pk7F-AtNIK1-T469A/T474D foi utilizada para a transformação de tomateiro (*Solanum lycopersicum*, cultivar MoneyMaker). A transformação foi realizada conforme protocolo desenvolvido por Frary (FRARY; EARLE, 1996).

Após 1 dia de pré-cultivo, o meio de cultura líquido foi descartado e os explantes permaneceram nos erlenmeyers de 125 mL. A suspensão bacteriana foi transferida para os recipientes e o co-cultivo realizado em 20 minutos no escuro o que proporcionou a infecção dos explantes pela *Agrobacterium*. O excesso de solução bacteriana foi retirado, secando os explantes em papel filtro estéril.

2.2.6 Obtenção das plantas transgênicas

Os explantes submetidos ao co-cultivo foram transferidos para placas de petri (2x13cm) contendo meio de cultura MS semi-sólido acrescido de zeatina (1mg/L) e do antibiótico Timentim (350mg/L) para paralização do crescimento bacteriano (Figura 2G, Tabela 2). Os explantes foram cultivados em fotoperíodo de 16 h até o aparecimento das brotações.

Após a fase de indução de brotações por 30 dias (Figura 2H), as gemas foram individualizadas procurando excluir os calos e transferidas para frascos contendo meio de cultura seletivo (MS semi-sólido acrescido de 50 mg/L de canamicina e 300mg/L de Timentim) (Figura 2I, Tabela1). Cada brotação representou um transformante independente, que foi transferido individualmente para frasco contendo meio de cultura MS semi-sólido para enraizamento e formação da nova planta. As plantas transformadas foram aclimatadas para a produção de sementes (Figura 2J).

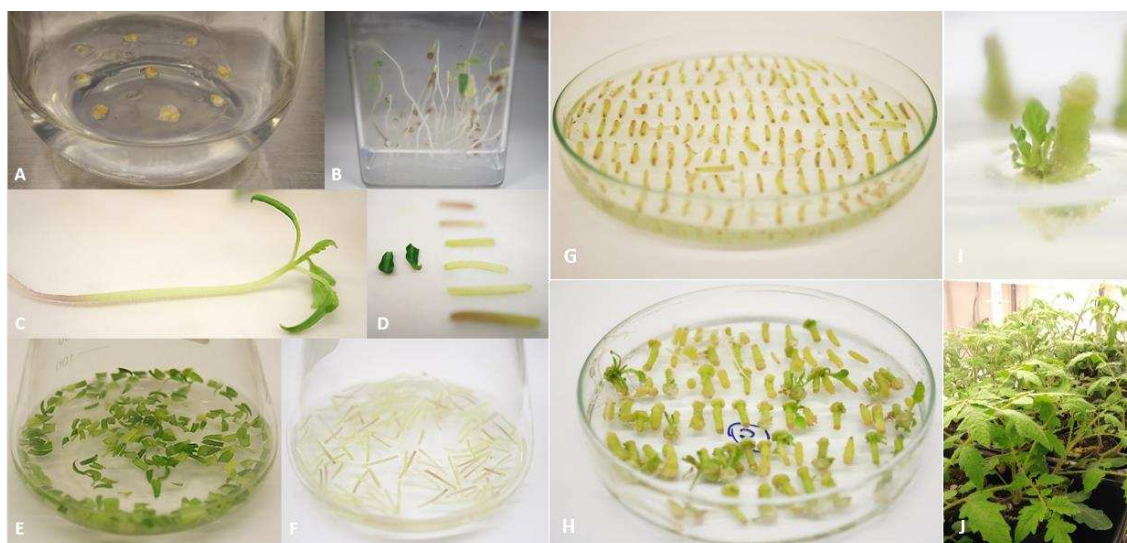


Figura 2 – Germinação *in vitro*, obtenção dos explantes, regeneração. A. inoculação das sementes em meio de cultura MS; B. Germinação e estiolamento dos hipocótilos no escuro por 15 dias; C. Planta utilizada para obtenção dos explantes – 17 dias; D. Secção transversal dos explantes e inoculação dos cotilédones (E) e hipocótilos (F) em meio de pré-cultivo por 1 dia. G. cocultivo. H. Regeneração. I. brotações em frascos. J. aclimação.

A linhagem transgênica 35S::NIK1-4 transformada com a construção pK7-NIK1 e as linhagens transgênicas 35S::T474D-2, 35S::T474D-5, 35S::T474D-6, transformadas com a construção pK7F-NIK1T474D, foram previamente descritas (Brustolini et al., 2015). Entre as plantas transgênicas obtidas, foram selecionadas três linhagens

independentemente transformadas, contendo a construção pk7F-AtNIK1-T469A/T474D, designadas NIK1-T469A/T474D-16, NIK1-T469A/T474D-19, NIK1-T469A/T474D-27.

2.3 Diagnóstico molecular das plantas transgênicas obtidas via organogênese

2.3.1 Confirmação da inserção dos transgenes

A presença do transgene foi confirmada por PCR do DNA genômico extraído das linhagens transformadas. Para confirmação dos transgenes, foram utilizados os oligonucleotídeos descritos na Tabela 2 para a confirmação da presença de AtNIK1, AtNIK1-T474-D-GFP, AtNIK1-T474D/T469A-GFP, de acordo com a construção que contém o vetor e o gene de interesse.

Após a obtenção das plantas (organogênese ou germinação), foram coletadas amostras foliares individualmente para obtenção de DNA genômico (Dellaporta et al., 1983). O DNA foi usado como molde na reação de PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos para AtNIK1 (AtNIK1FG-3773 e AtNIK1RGst-4204) ou para o vetor (pK7FWG2-MC36) e para AtNIK1 (AtNIK1RGst-4204), conforme descrito na Tabela 2.

2.3.2 Análise de expressão de transgenes

O RNA total de folhas de tomateiros expressando os genes quiméricos *AtNIK1*, *AtNIK1-T474-D-GFP*, *AtNIK1-T474D/T469A-GFP* foi extraído utilizando o tampão de extração CTAB (Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide) 2% (w/v), 2% (w/v) PVP, 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 µg.mL⁻¹. O RNA total foi quantificado no espectrofotômetro e a concentração foi expressa em µg.µL⁻¹. O RNA total isolado (4µg) foi tratado com DNase livre de RNase (Invitrogen) e utilizados para obtenção do cDNA, usando a enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen) e oligo-dT, de acordo com determinação do fabricante.

A quantificação absoluta dos níveis do transcrito de AtNIK1 das plantas que foram utilizadas nos ensaios 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, e cDNA das respectivas linhagens. Três réplicas técnicas de cada amostra foram utilizadas. Os níveis dos transcritos foram expressos em relação ao gene de actina de tomate, o qual foi utilizado como controle endógeno para a normalização dos dados. 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.

2.4 Análise da ativação da via antiviral mediada por NIK1

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 pela ativação da via antiviral mediada por NIK1 e 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 tomateiros foi extraído pelo método CTAB, conforme descrito a cima. A quantificação do RNA foi realizada por espectrofotômetro, e sua qualidade foi monitoradas 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. 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.

Como forma de constatar uma possível repressão dos genes ribossomais S25, S13, e L13 quando da ativação da via de sinalização antiviral mediada por NIK1, foi realizado um PCR em tempo real, para quantificar o nível de expressão dos genes envolvidos. O PCR em tempo real, foi conduzido seguindo informações contidas nos manuais fornecidos pela Applied Biosystems. As reações foram conduzidas no equipamento ABI7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems), usando SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) a partir dos oligonucleotídeos específicos para genes ribossomais, conforme Tabela 2. 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. A expressão gênica foi quantificada utilizando o método comparativo de Ct: $2^{-\Delta\Delta Ct}$. O gene actina de tomateiro foi usado como controle endógeno, para normalização dos

dados.

2.5 Respostas das linhagens transgênicas de tomateiro a begomovirus

2.5.1 Descrição das linhagens

Nos experimentos de infecção viral foram utilizadas plantas WT (cultivar MoneyMaker) como controle e as seguintes linhagens transgênicas: NIK1-4 (expressando AtNIK1), AtNIK1-T474D-2, AtNIK1-T474D-5, e AtNIK1-T474D-6 (expressando o mutante simples de NIK1), T474D/T469-16, T474D/T469A-19 e T474D/T469A-27 (expressando o mutante duplo de AtNIK1).

2.5.2 Ensaio de infecção em tomateiros

O ensaio de infecção de tomateiros transgênicos foi realizado, utilizando-se os clones infecciosos do begomovírus *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) por meio de biobalística. 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 seis 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, e o alvo foi 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 foi realizada a análise visual de sintomas e a coleta de amostras foliares para extração de DNA total, feita a cada 15 dias, por um período de 50 dias após o bombardeamento, com objetivo de monitorar o progresso da infecção por meio de PCR em tempo real. Para o bombardeamento, foram usadas 15 plantas por linhagem independente para infecção (WT, NIK1, mutante simples, duplo mutante) e 15 plantas como controle, no estágio de desenvolvimento correspondente a 2 folhas verdadeiras. Os sintomas observados foram pontuações amareladas, clorose foliar, enrolamento e enrugamento das folhas.

2.5.3 Diagnóstico molecular da infecção viral por PCR convencional.

O DNA foi extraído pelo método CTAB, conforme descrito acima, e utilizado para confirmação da infecção através de PCR com os oligonucleotídeos degenerados

apropriados para o componente B de begomovírus (Rojas et al. 1993). O produto da amplificação foi aplicado em gel de agarose 1% (p/v), corado com brometo de etídeo 0,1 µl/ml, e visualizado em foto-documentador. Os resultados foram apresentados em porcentagem de plantas infectadas versus dias pós-infecção.

2.5.4 Quantificação do DNA viral por PCR quantitativo.

O acúmulo do DNA viral em plantas infectadas foi quantificado por qPCR, de acordo Brustolini et al (2015). Resumidamente, 150 ng de DNA genômico extraídos das folhas infectadas foram utilizados nas reações de qPCR em um volume final de 10 µL contendo SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e os oligonucleotídeos específicos para o vírus (Tabela 2). As reações foram conduzidas no equipamento *ABI7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems). As cópias genômicas do vírus foram normalizadas utilizando o gene actina de tomateiro como 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 do vírus ToYSV e do DNA genômico de plantas WT de tomateiro, respectivamente. A determinação do número de unidades genômicas virais por µg de actina foi calculada a partir das equações de regressão obtidas pelos respectivos gráficos de curva-padrão. Foram utilizadas três plantas infectadas de cada linhagem por ensaio, e foi feita a medição da carga viral de cada uma dessas plantas.

Tabela 1: Condições de cultivo para obtenção das plantas transgênicas.

Etapa	Composição	Temperatura	Fotoperíodo	Duração
Germinação	MS SS 1% de sacarose	25 graus	0h	15 dias
Germinação	MS SS 1% de sacarose	25 graus	16h	2 dias
Précultivo	MS L 2% de sacarose + Z1	25 graus	16h	1 dia
Transformação	MS L	25 graus	escuro	20 min
Cocultivo	MS SS + 2% de sacarose + Z1	25 graus	16h	2 dias
Regeneração	MS SS 3% de sacarose + Z1 + T300	25 graus	16h	30 dias
Seleção	MS SS 3% de sacarose + Z1 + T300 + A. seletivo	25 graus	16h	30 dias

MS = meio de cultura MS; SS = Semi-sólido; L = Líquido; Z1 = Zeatina (1mg/L); T350= Timetim (350mg/L); agente seletivo (Canamicina); GEN 50 = Gentamicina (50mg/L); SP= Espectinomicina (100mg/L).

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos

Oligonucleotídeos	Gene	Sequência
PCR diagnóstico NIK1		
ARAACIN2FWD	Actina	TAC AAC CAG CTT CGT GTT GC
ARAACIN2RVS	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
At NIK1 (3773)	NIK1	<u>AAA AAG CAG GCT</u> TCT AGG ACC AGA GAG CTC
At NIK1 Rvs (3774)	NIK 1	AGA AAG CTG GGT CGA GTC ATA AGA GAT TTC GAT G
NBSAtNIK1F-GA (3848)	NIK1	AAAAAGCAGGCTTCACAATGAGGAGATTGGTTTC
PCR diagnóstico vírus		
ARAACIN2FWD	Actina	TAC AAC CAG CTT CGT GTT GC
ARAACIN2RVS	Actina	GAT TGA TCC TCC GAT CCA GA
PBL 1 v 2040	Geminivirus	CTAGCTGCATGCATATTTACRARWATGCCA
PCRc1	Geminivirus	GCCTCTGCAGCARTGRCTCKATCTTCATACA
PCR em tempo real		
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
LEQRTACTINFWD	Actina	CGG TGA CCA CTT TCC GAT CT
LEQRTACTINRVS	Actina	TCC TCA CCG TCA GCC ATT TT
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
qRT-SI05g051000Fwd	S13	AGTTTGCCAAGAAGGGTTTGAC
qRT-SI05g051000Fwd	S13	TGAGCAATCCCATGAGAATCAC
qRT-SI02g069850Fwd	S25	AAGGCTCCTCCACCGTCTTC
qRT-SI02g069850Rvs	S25	TGCTTTCCCTTGCTCCACTT
qRT-SI09g091740Fwd	L13	AATCCTCTGGCGTACCATTCCG
qRT-SI09g091740Rvs	L13	AAACCTTCAAACGGGCAAGTG

3. Resultados

3.1. O mutante duplo NIK1-T469A/T474D exibe atividade de fosforilação superior à NIK1 normal e ao mutante simples NIK1-T474D

A proteína NIK1 foi descrita como um receptor de sinalização que medeia uma resposta de defesa antiviral com base em suas propriedades bioquímicas de cinase caracterizadas “in vitro”, na inibição de sua atividade cinase decorrente da interação com a proteína NSP de geminivírus e no aumento de suscetibilidade à infecção por CaLCuV em plantas nocautes (Fontes et al, 2004). A principal característica de uma RLKs é o domínio cinase contendo características estruturais típicas como sítio de ligação ao ATP,

sítio ativo da proteína e domínio catalítico. O domínio cinase é o responsável pelo evento de fosforilação entre os parceiros tendo como consequência a regulação de uma via de sinalização. Ensaio *in vitro* da atividade de autofosforilação e fosforilação do substrato de NIK1 e suas formas mutantes foram realizados com a finalidade de verificar se a sinalização antiviral mediada por NIK1 pode ser de fato aumentada pela inserção das mutações no domínio intracelular com atividade cinase.

Previamente, foi demonstrado que os mutantes NIK1-T474D e NIK1-T469A possuem atividade de fosforilação do substrato 1.5 vezes superior à NIK1 normal (SANTOS et al., 2010). No caso da mutação NIK1-T474D, foi demonstrado que a substituição do resíduo Thr-474 (crucial para ativação de NIK1), por um resíduo de aspartato (que mimetiza fosforilação na posição 474) 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 da mutação 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). Consequentemente, a hipótese central dessa investigação é que a expressão do mutante duplo NIK1-T469A/T474D resultaria em ativação constitutiva e potencializada do receptor sem o efeito inibitório da posição 469 o que promoveria maior atividade da cinase, sendo assim um melhor alvo para reconstrução de uma via antiviral constitutivamente ativada em tomateiros.

Para validar essa hipótese, a capacidade de autofosforilação e de fosforilação do substrato foi comparada. Para isso, o domínio cinase de versões mutadas e truncadas do receptor NIK1 foram clonados para expressão em *E. coli* e purificação das proteínas. A Figura 3 esquematiza as regiões características das proteínas LRR-RLKs, incluindo as regiões ricas em leucina (LRR), o domínio transmembrana (TM) e o domínio cinase. Os domínios cinases, delimitados pelos oligonucleotídeos, indicados pelas setas vermelhas, foram expressos em *E. coli*.

Embora utilizadas as mesmas condições de indução e purificação da proteína, foram verificados diferentes níveis de expressão entre as versões de NIK1, e o maior nível foi observado em domínios não mutados, seguido do mutante simples e o menor nos mutantes duplos (Figura 4 e 5a). No entanto, os maiores níveis de autofosforilação e fosforilação do substrato foram maiores no duplo mutante, sugerindo que a substituição de Thr-469 por alanina alivia a repressão da fosforilação aumentando a atividade da cinase (Figura 5b, c) compensando os menores níveis de expressão. Considerando o nível aumentado da atividade de fosforilação do mutante duplo, ensaios funcionais foram

conduzidos para se examinar o efeito de NIK1-T469A474D na via de sinalização antiviral utilizando diversas abordagens diferentes. Inicialmente, tomateiros transgênicos foram transformados com a construção de DNA contendo NIK1-T469A474D fusionado a GFP e sob o controle do promotor 35S. Em seguida, foi examinado se o mutante duplo era constitutivamente ativado e capaz de manter a via de sinalização antiviral ativada. Para isso, foram selecionados três genes ribossomais como componentes a jusante para confirmar a ativação constitutiva da via antiviral. Finalmente, os tomateiros transgênicos foram desafiados com ToYSV para se avaliar o efeito da expressão do mutante duplo sobre a infecção.

3.2 Linhagens transgênicas de tomateiros

Tomateiros foram transformados com NIK1-T469A/T474D e avaliados quanto a inserção do transgene e seu nível de expressão. As sementes de tomateiro (*Solanum lycopersicum*, cultivar MoneyMaker) foram germinadas *in vitro* para obtenção dos explantes (cotilédones e hipocótilos), que foram utilizados para produção das linhagens transgênicas independentes T474D/T469-16, T474D/T469A-19 e T474D/T469A-27 (expressando o mutante duplo de AtNIK1). As demais linhagens transgênicas utilizadas, NIK1-4 (expressando AtNIK1), AtNIK1-T474D-2, AtNIK1-T474D-5, e AtNIK1-T474D-6 (expressando o mutante simples de NIK1) 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 (50mg/L). Em seguida, monitorada por PCR, utilizando o DNA genômico como molde e oligonucleotídeos específicos para NIK1 (Figura 6A, Tabela 2). Os níveis de expressão das versões de NIK1 foram examinados por RT-PCR convencional (Figure 6D) e quantificados por RT-PCR em tempo real utilizando como molde cDNA sintetizado a partir de RNA total extraído com o tampão CTAB (Figure 6B e 6C), e utilizando oligonucleotídeos específicos para AtNIK1 (Figura 6E). Enquanto que a expressão do transgene NIK1 foi muito superior na linhagem 35S:NIK1-4 do que em WT, seguido pela expressão do mutante simples nas linhagens 35S:T474D-2, 35S:T474D-6 e 35S:T474D-2, as linhagens transgênicas expressando ectopicamente o mutante duplo NIK1-T469A/T474D exibiram acúmulo de NIK1 ligeiramente superior a WT e muito inferior àquele das demais linhagens transgênicas. Os primers de AtNIK1 não amplificam LeNIK1 endógeno de tomateiros, confirmando que o baixo acúmulo de transcritos de AtNIK1 nas linhagens dos duplos mutantes é devido

à expressão do transgene. Esta variação acentuada 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.

Interessantemente, as plantas com maiores níveis de expressão de AtNIK1 foram aquelas contendo a construção NIK1 sem a mutação, seguido dos mutantes simples e dos mutantes duplos respectivamente. Entre as linhagens independentes do mutante simples os níveis de expressão de AtNIK1 foram decrescentes na seguinte ordem: NIK1-T474D-2, NIK1-T474D-6 e NIK1-T474D-5. Enquanto nos duplos mutantes a expressão diminui na seguinte ordem: T469A/474D-27, T469A/474D-16 e T469A/474D-19. Esses resultados foram compatíveis com aqueles obtidos pela expressão do domínio cinase em bactéria em que também foi possível visualizar níveis decrescentes de expressão dos transgenes de acordo com aumento do número de mutações em NIK1 (Figura 4). Esses resultados evidenciam que a redução dos níveis de expressão de AtNIK1 parece estar correlacionada, em dois organismos (bactérias e tomateiros), com o aumento do número de mutações.

3.3 Análise da ativação da via de sinalização antiviral mediada por NIK1

A ativação da via de sinalização antiviral mediada por NIK1 culmina com a repressão de genes de proteínas ribossomais mediada pelo complexo LIMYB e RPL10 (ZORZATTO et al., 2015). Apesar da diminuição da expressão de AtNIK1 no mesmo sentido do aumento do número de mutações, a capacidade autofosforilação de NIK1 aumenta com a inserção da mutação T469A, o que sustenta a hipótese de que a substituição resíduo Thr-469 por alanina alivia a repressão da fosforilação e ativa constitutivamente o receptor NIK1 sem o efeito inibitório da posição 469 o que promove maior atividade cinase, e uma via antiviral constitutivamente mais ativa em tomateiros na seguinte ordem: T474D/T469 > AtNIK1-T474D > NIK1-4. Esta hipótese foi avaliada pela análise da repressão dos genes ribossomais, marcadores moleculares da ativação da via antiviral (Zorzatto et al., 2015, Brustolini et al., 2015) pela expressão das versões mutadas de NIK1 nas linhagens transgênicas.

De fato, a ativação constitutiva de NIK1, por inserção via transgenia de versões mutadas de NIK1, causa alterações dos níveis de expressão dos genes ribossomais S13a, S25, L13 (Figura 7). Os resultados indicam que os níveis de expressão dos transgenes se correlacionam com o nível de repressão dos genes ribossomais, exceto para o transgene duplo mutante que apesar de baixa expressão nas linhagens transgênicas foi capaz de

suprimir a expressão dos genes ribossomais com alta eficiência. Na linhagem NIK1-4, que apresentou os maiores níveis de expressão de AtNIK1, a supressão dos genes ribossomais correlacionou bem com os níveis de expressão do transgene. Recentemente, foi demonstrado que mutantes NIK1-T474D mantêm 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, a expressão de NIK1-T474D em três linhagens independentes (2, 5, 6) em tomateiros alterou a expressão dos genes de proteínas ribossomais SIS25, SIS13 e SIL13, em diferentes níveis proporcionais ao nível de expressão de AtNIK1 nessas linhagens (Figura 7).

Com a finalidade de verificar se o mutante duplo NIK1-T469A/474D é mais ativo que o mutante simple, a expressão dos genes de proteínas ribossomais foi analisada nas três linhagens transgênicas independentes T469A/474D-16, T469A/474D-19 e T469A/474D-27. Os três genes de proteínas ribossomais foram reprimidos nas linhagens expressando o mutante duplo, em uma extensão ligeiramente maior do que a redução observada na linhagem T474D, indicando que menores níveis de expressão do duplo mutante promovem maior repressão da expressão dos genes ribossomais. Assim sendo, quando normalizado ao nível de expressão do transgene, observa-se que as três linhagens independentes expressando níveis reduzidos do mutante duplo foram mais eficientes em reduzir a expressão dos três genes ribossomais avaliados. Coletivamente, estes resultados demonstram que o mutante duplo NIK1-T469A/474D. Estes resultados são compatíveis a atividade de fosforilação determinada para os mutantes de NIK1, já que o mutante simples foi mais expresso do que o mutante duplo em bactéria e, no entanto, este último apresentou maior capacidade de fosforilação.

3.4 Respostas das linhagens transgênicas de tomateiro a begomovirus

A ativação da via antiviral também foi verificada quanto a capacidade de redução do acúmulo do vírus e dos prejuízos causados por ele. Para avaliar a suscetibilidade das plantas mutantes à infecção por begomovirus, linhagens independentes foram inoculadas com o clone infeccioso do begomovirus ToYSV através de biobalística. No total de 15 plantas de cada linhagem foram utilizadas no experimento, 6 plantas foram utilizadas como controles, bombardeadas apenas com tungstênio, 9 plantas foram infectadas com ToYSV. O diagnóstico da infecção foi realizado por PCR das plantas inoculadas a cada 7 dias e pela visualização dos respectivos 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. Amostras representativas dos sintomas envolvidos nas linhagens avaliadas é mostrada na Figura 8.

Os principais sintomas observados foram aqueles dos quais se derivou o nome dos vírus, ou seja, ToYSV (Tomato yellow spot vírus) com o aparecimento de pontos amarelados (Figura 8) que com o passar do tempo aumentam de diâmetro, chegando a formar manchas. As linhagens com maior quantidade de pontuações amarelas foram AtNIK1-4 e T474D-2 respectivamente, linhagens que apresentaram maiores níveis de expressão de versões menos ativas de NIK1. Essas plantas desenvolveram sintomas precoces (10 dias após o bombardeamento) bem pronunciados (denominados spots amarelos) e com intensidade crescente. Durante o progresso da infecção, observou-se a diminuição da severidade de alguns sintomas, provavelmente devido ao fenômeno de recuperação. No entanto, com o crescimento das plantas os sintomas ficaram restritos as folhas mais velhas próximas às folhas bombardeadas. As plantas WT apesar da ocorrência de leves cloroses não apresentaram o sintoma característico do vírus. No entanto, a presença do mesmo foi diagnosticada via PCR, e PCR em tempo real. Até 30 dias após a inoculação não foi verificado nenhuma pontuação amarela nas demais linhagens (Figura 8).

O diagnóstico molecular por PCR confirmou a presença do vírus nas linhagens bombardeadas, exceto na linhagem 5 do mutante simples. O progresso da infecção foi mais acelerado na linhagem NIK4-1 e foi retardado nas linhagens expressando o duplo mutante T469A/7474D (16 e 27) quando comparado com WT (Figura 9A). As linhagens T469A/7474D-16 e T469A/7474D-27 também exibiram menor taxa de infecção, 25% e 10% de plantas infectadas após 30 dias de inoculação. Após confirmadas as plantas infectadas, procedeu-se à quantificação da carga viral (Figura 9B). A avaliação do acúmulo do DNA viral por Real-Time-PCR foi feito 30 dias após a infecção.

Os resultados da quantificação da carga viral demonstram que WT apresentou o maior acúmulo de vírus, apesar de não desenvolvimento de sintomas. Além disso, as linhagens transgênicas NIK1-4 e T474D-2, que apresentaram os maiores níveis de expressão de AtNIK1, apresentaram sintomas característicos do vírus utilizado, porém com redução acentuada da carga viral. Coerente com o diagnóstico da PCR, no mutante simples 5 não foi verificada a presença do vírus por PCR em tempo real. As linhagens independentes expressando o duplo mutante, não apresentaram sintomas característicos, tendo acumulado baixo nível do DNA viral, apesar da baixa expressão do transgene nas três linhagens avaliadas. Coletivamente, estes resultados indicam que o nível de proteção

fornecido pela superexpressão de NIK1 e T474D depende do nível de expressão do transgene, enquanto que o mutante duplo T469A/T474D é eficiente em proteger as plantas contra begomovírus mesmo em níveis muito baixos de expressão, confirmando que a atividade antiviral do mutante duplo é superior ao mutante simples e correlaciona com a atividade aumentada de fosforilação.

4. Discussão

NIK1 [nuclear shuttle protein (NSP)-Interacting Kinase 1] é uma quinase que interage com NSP, identificada como um alvo de virulência de begomovírus e responsável por desencadear uma resposta imune em plantas (Fontes, 2004). A sinalização antiviral mediada por NIK1 é ativada pela infecção viral e protege as plantas contra begomovírus em interações incompatíveis, mas é superada pelo supressor viral NSP de NIK1, em interações compatíveis.

Em trabalho anterior foram descobertos sítios de fosforilação em NIK1, e um padrão gradual de fosforilação dentro do seu domínio de ativação (Aloop) com papéis distintos para diferentes resíduos de treonina na resposta anti-viral (Santos, 2009). Foi demonstrado em *Arabidopsis thaliana* e *Solanum lycopersicum* que a via pode ser ativada mimetizando o efeito da fosforilação no resíduo Thr-474 (Santos, 2009; Brustoline, 2015) e na atual investigação, ela pode ser potencializada eliminando o efeito antagônico da fosforilação no resíduo Thr-469, através da substituição de aminoácidos de NIK1, sendo possível obter via ativa de forma constitutiva e eliminar o efeito negativo de fosforilações que a limitam. A construção de um mutante de ganho de função, substituindo o resíduo Thr-474 pelo resíduo fosfomimético Asp, aumentou a resistência contra begomovírus (Santos 2009; Brustoline, 2015), e para gerar uma estratégia de resistência potencializada contra begomovírus, uma segunda mutação foi introduzida substituindo o resíduo Thr-469 por Ala e, assim, eliminou-se o efeito antagonista da fosforilação em Thr-469.

Para validar essa hipótese, inicialmente versões de NIK1 tiveram seus domínios quinases clonados e fundidos com GST (GST-KDNIK1, GST-KDNIK1-T474D, GST-KDNIK1-T469A/T474D, GST-KDNIK1-K340E), expressos e avaliados quanto a capacidade de autofosforilação de NIK1 e fosforilação do substrato Δ KD-NIK1 (que contém o domínio cinase de NIK1 inativo pela deleção do sítio de ligação ao nucleotídeo do domínio cinase). GST-KDNIK1, consiste na versão não mutada de NIK1; GST-KDNIK1-T474D possui uma mutação na posição T474D; GST-KDNIK1-T469A/T474D

possui duas substituições uma na posição T469A e outra na T474D. A versão GST-KDNIK1-K340E consiste de uma versão mutada na posição 340. Essa modificação substitui uma Lisina por ácido glutâmico e inibe a capacidade de NIK1 se autofosforilar e de fosforilar o seu substrato (Figura 3 e 4).

Foi demonstrado que existem diferentes níveis de expressão entre as versões de NIK1 e que ocorre a diminuição da expressão com o aumento da quantidade de mutações. A autofosforilação foi semelhante entre AtNIK1-4 e AtNIK1-T474D, e o duplo mutante (AtNIK1-T469A/T474D) apresentou o maior valor, diferindo estatisticamente das demais (Figura 5B). A GST-KDNIK1-K340E, como esperado, não foi capaz de se autofosforilar confirmando que a mutação inativou o sítio responsável pela autofosforilação do domínio quinase. Quanto a fosforilação do substrato, verificou-se diferença estatística entre todas as versões de NIK1 em relação a GST-KDNIK1 e o aumento dos valores acompanhou o aumento do número de mutações em NIK1. Esse resultado está de acordo com a hipótese avaliada, sugerindo que a substituição de Thr-469 por alanina alivia a repressão da fosforilação do substrato e aumenta a atividade da cinase de NIK1 (Figura 4 a, b, c), e fortalece a hipótese de que a expressão dessa construção em tomateiros irá potencializar a resposta de defesa anti-viral.

Diante dessas respostas, linhagens transgênicas de tomateiros, expressando AtNIK1 sem mutações (NIK1-4), os mutantes simples (AtNIK1-T474D-2, AtNIK1-T474D-5, e AtNIK1-T474D-6), e os mutantes duplos (AtNIK1T474D/T469-16, T474D/T469A-19 e T474D/T469A-27) foram avaliados quanto a inserção e o nível de expressão do transgene, e colocadas a prova, sendo submetidas a infecção pelo begomovirus TOYSV. A inserção do transgene foi confirmada via PCR (Figura 5A), e o nível de expressão via PCR em tempo real (Figura 5 A e B). Verificou-se redução da expressão dos transgenes com o aumento do número de mutações (Figura 5b), padrão de expressão semelhante ao observado em bactérias durante os ensaios de fosforilação (Figura 3 e 4), sugerindo uma possível correlação entre o nível de expressão e a quantidade de mutações no domínio quinase de NIK1

Em busca de mais informações sobre o comportamento dos mutantes em relação a ativação da via antiviral, analisamos o nível de expressão dos genes marcadores da via S25, S13, L13 (Figura 6). Para avaliar o comportamento dos mutantes em relação a infecção, foi quantificado o acúmulo de DNA viral. As plantas infectadas apresentaram pontuações amarelas e enrugamento foliar, (figura 7) como observado por (Brustoline 2015). A quantificação da carga viral mostrou que apesar do não desenvolvimento de sintomas na linhagem WT, essa linhagem apresentou o maior acúmulo do vírus. Foi

observado que as linhagens expressando NIK1 sem mutações e o mutante simples (linhagens que com os maiores níveis de expressão do transgene, e os sintomas característicos do vírus) apresentaram baixo acúmulo de DNA viral. Coerente com o diagnóstico da PCR, no mutante simples 5 não foi verificada a presença do vírus por PCR em tempo real. O duplo mutante não apresentou nenhum sintoma característico e foi observado baixo acúmulo do vírus.

Os resultados desse trabalho auxiliam no entendimento dos mecanismos de defesa antiviral. A capacidade aumentada do mutante simples, e ainda maior do duplo mutante em se autofosforilar e de fosforilar o seu substrato confirma a hipótese desse trabalho onde era esperado uma via anti-viral mais ativa contra begomovírus em tomateiros contendo a dupla mutação. Esse resultado está interligado com a repressão dos genes ribossomais, visto que o duplo mutante reduz de forma mais acentuada a expressão da maquinaria de tradução do hospedeiro necessária para multiplicação e movimentação dos begomovírus. Mesmo não sendo verificado a ocorrência de sintomas nas plantas WT, o menor acúmulo viral nas linhagens transgênicas, e principalmente no duplo mutante está correlacionado com os níveis de autofosforilação e fosforilação do substrato, onde foram estatisticamente superiores aos demais transformantes. Esses resultados indicam que a supressão global da síntese de proteínas pode efetivamente proteger as células das plantas contra o DNA do vírus, e confirma a importância da via de defesa anti-viral mediada por NIK1.

Portanto, é possível concluir que o mutante NIK1-T469A/T474D promoveu a ativação constitutiva das defesas mediadas por NIK1, mesmo em baixos níveis de expressão do transgene, reduzindo de forma acentuada a expressão dos genes ribossomais, marcadores moleculares da ativação da sinalização antiviral. Além disso, as linhagens transgênicas apresentaram resistência aumentada ao begomovírus *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), um fenótipo associado à ausência de sintomas, baixa eficiência da taxa de infecção e reduzido acúmulo de DNA viral nas folhas sistêmicas. Estes resultados confirmam o efeito antagonista da fosforilação em Thr-469 e Thr-474 na ativação da sinalização antiviral mediada por NIK1, indicando que a fosforilação em Thr-469 regula negativamente a ativação de NIK1 para prevenir a autoimunidade.

5. Referências

Albuquerque, Leonardo C., Arvind Varsani, Fernanda R. Fernandes, Bruna Pinheiro, Darren P. Martin, Paulo de Tarso Oliveira Ferreira, Thaís Oliveira Lemos, and

- Alice K. Inoue-Nagata. 2012. "Further Characterization of Tomato-Infecting Begomoviruses in Brazil." *Archives of Virology* 157 (4): 747–52.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.
- Brustolini, Otávio J.B., Joao Paulo B. Machado, Jorge A. Condori-Apfata, Daniela Coco, Michihito Deguchi, Virgílio A.P. Loriato, Welison A. Pereira, et al. 2015. "Sustained NIK-Mediated Antiviral Signalling Confers Broad-Spectrum Tolerance to Begomoviruses in Cultivated Plants." *Plant Biotechnology Journal* 13 (9): 1300–1311.
- Carvalho, Claudine M., Joao Paulo B. Machado, Francisco Murilo Zerbini, and Elizabeth P.B. Fontes. 2008. "NSP-Interacting GTPase: A Cytosolic Protein as Cofactor for Nuclear Shuttle Proteins." *Plant Signaling and Behavior* 3 (9): 752–54.
- Carvalho, Claudine M., Anésia A. Santos, Silvana R. Pires, Carolina S. Rocha, Daniela I. Saraiva, João Paulo B. Machado, Eliciane C. Mattos, Luciano G. Fietto, and Elizabeth P.B. Fontes. 2008. "Regulated Nuclear Trafficking of RpL10A Mediated by NIK1 Represents a Defense Strategy of Plant Cells against Virus." *PLoS Pathogens* 4 (12).
- Castillo-Urquiza, Gloria P., José Evando A Beserra, Fernanda P. Bruckner, Alison T M Lima, Arvind Varsani, Poliane Alfenas-Zerbini, and F. Murilo Zerbini. 2008. "Six Novel Begomoviruses Infecting Tomato and Associated Weeds in Southeastern Brazil." *Archives of Virology* 153 (10): 1985–89.
- Fontes, E P B, a a Santos, D F Luz, a J Waclawovsky, and J Chory. 2004. "The Geminivirus Nuclear Shuttle Protein Is a Virulence Factor That Suppresses Transmembrane Receptor Kinase Activity." *Genes & Development* 18: 2545–56.
- Fontes, Elizabeth P.B., Anesia A. Santos, Dirce F. Luz, Alessandro J. Waclawovsky, and Joanne Chory. 2004. "The Geminivirus Nuclear Shuttle Protein Is a Virulence Factor That Suppresses Transmembrane Receptor Kinase Activity." *Genes and Development* 18 (20): 2545–56.
- Frery, Anne, and Elizabeth D Earle. 1996. "An Examination of Factors Affecting the

Efficiency of *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Tomato.” *Plant Cell Reports* 16: 235–40.

- Galvão, Rafaelo M., Andrea C. Mariano, Dirce F. Luz, Poliane F. Alfenas, Eduardo C. Andrade, Francisco M. Zerbini, Márcia R. Almeida, and Elizabeth P B Fontes. 2003. “A Naturally Occurring Recombinant DNA-A of a Typical Bipartite Begomovirus Does Not Require the Cognate DNA-B to Infect *Nicotiana Benthamiana* Systemically.” *Journal of General Virology* 84 (3): 715–26.
- Gouveia, Bianca C., Iara P. Calil, João Paulo B. Machado, Anésia A. Santos, and Elizabeth P.B. Fontes. 2017. “Immune Receptors and Co-Receptors in Antiviral Innate Immunity in Plants.” *Frontiers in Microbiology* 7 (JAN): 1–14.
- Hanley-Bowdoin, Linda, Eduardo R. Bejarano, Dominique Robertson, and Shahid Mansoor. 2013. “Geminiviruses: Masters at Redirecting and Reprogramming Plant Processes.” *Nature Reviews Microbiology* 11 (11): 777–88.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Mariano, Andrea C., Maxuel O. Andrade, Anésia A. Santos, Sonia M.B. Carolino, Marli L. Oliveira, Maria Cristina Baracat-Pereira, Sergio H. Brommonschenkel, and Elizabeth P.B. Fontes. 2004. “Identification of a Novel Receptor-like Protein Kinase That Interacts with a Geminivirus Nuclear Shuttle Protein.” *Virology* 318 (1): 24–31.
- Rocha, Carolina S., Anésia A. Santos, João Paulo B. Machado, and Elizabeth P.B. Fontes. 2008. “The Ribosomal Protein L10/QM-like Protein Is a Component of the NIK-Mediated Antiviral Signaling.” *Virology* 380 (2): 165–69.
- Rojas, Maria R., Robert L Gilbertson, David R Russell, and Douglas P Maxwell. 1993. “Use of Degenerate Primers in the Polymerase Chain Reaction to Detect Whitefly-Transmitted Geminiviruses.” *Plant Disease*.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. *Molecular cloning - A Laboratory Manual*, Ed.2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, (1989).
- Santos, Anésia A., Claudine M. Carvalho, Lilian H. Florentino, Humberto J.O. Ramos, and Elizabeth P.B. Fontes. 2009. “Conserved Threonine Residues within the A-

Loop of the Receptor NIK Differentially Regulate the Kinase Function Required for Antiviral Signaling.” *PLoS ONE* 4 (6).

Santos, Anésia A., Kênia V G Lopes, Jorge A C Apfata, and Elizabeth P B Fontes. 2010. “NSP-Interacting Kinase, NIK: A Transducer of Plant Defence Signalling.” *Journal of Experimental Botany* 61 (14): 3839–45.

Teixeira, Ruan M., Marco Aurélio Ferreira, Gabriel A. S. Raimundo, Virgílio A. P. Loriato, Pedro A. B. Reis, and Elizabeth P. B. Fontes. 2019. “Virus Perception at the Cell Surface: Revisiting the Roles of Receptor-like Kinases as Viral Pattern Recognition Receptors.” *Molecular Plant Pathology*, 1–7.

Zorzatto, Cristiane, João Paulo B. MacHado, Kênia V.G. Lopes, Kelly J.T. Nascimento, Welison A. Pereira, Otávio J.B. Brustolini, Pedro A.B. Reis, 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>.
Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.

6. Figuras

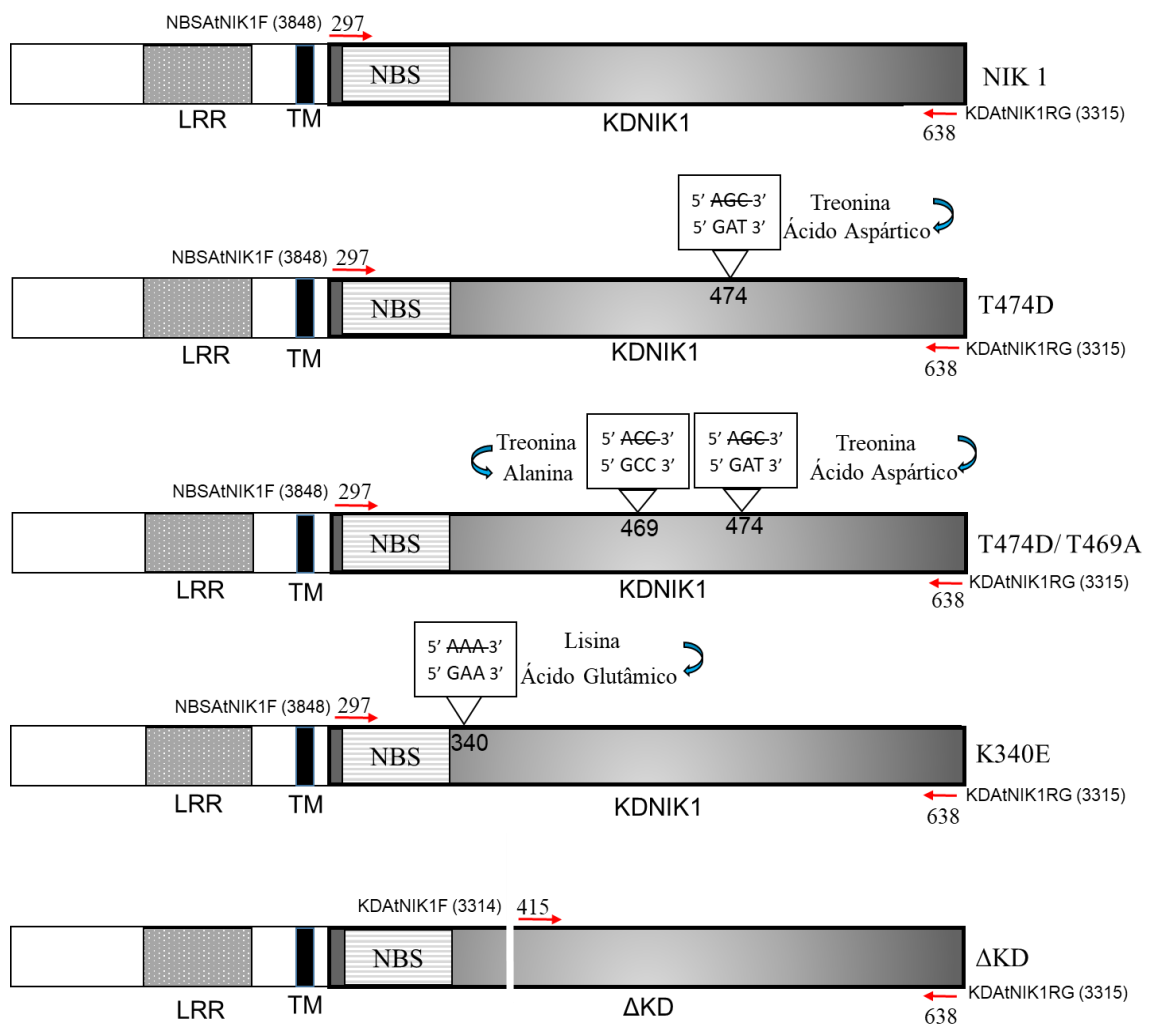


Figura 3. Representação esquemática do domínio cinase de AtNIK1, versões mutadas de NIK1: T474D, T474D/T469A, K340E e sua forma truncada ΔKD. As setas em vermelho, indicam a posição dos *primers* utilizados para clonagem do domínio cinase das respectivas proteínas. Setas em azul, indicam a posição e os resíduos utilizados para mutações do domínio cinase de NIK1, de acordo com substituições de aminoácidos. LRR - regiões ricas em leucina; TM - domínio transmembrana; KD - domínio cinase; NBS- representa o sítio de ligação ao nucleotídeo. ΔKD- contém o domínio cinase de NIK1 inativo pela deleção do sítio de ligação ao nucleotídeo do domínio cinase.

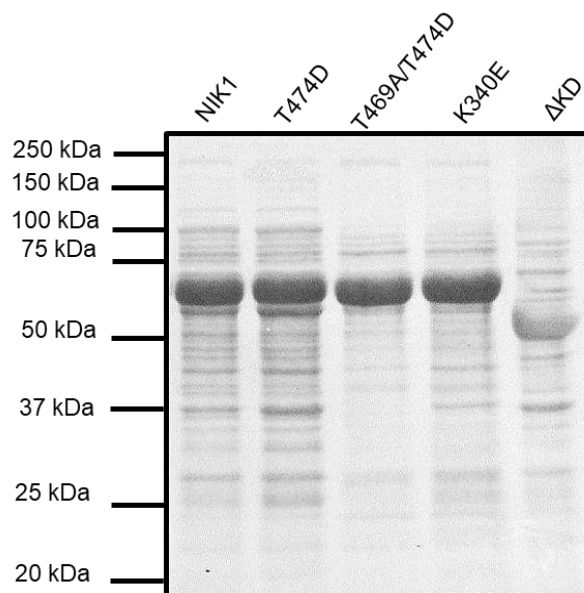


Figura 4. Purificação do domínio cinase da proteína NIK1, construções de NIK1 mutadas e Δ KD. Os domínios cinases fusionados a GST da proteína NIK1 normal, NIK1 mutadas e truncada foram estavelmente expressas em bactérias, purificadas por coluna de afinidade à proteína NIK1 e submetidas a gel SDS-PAGE 10% (m/v). Proteínas purificadas são indicadas nas canaletas e apresentam a seguinte massa molecular: KDNIK1 (63kDa), T474D (63kDa), T474D/T469A (63kDa), K340E (63kDa) e Δ KD (52kDa) conforme predito pela massa molecular dos domínios de cinase e de GST. O peso da massa molecular em kDaltons são indicados em barras laterais.

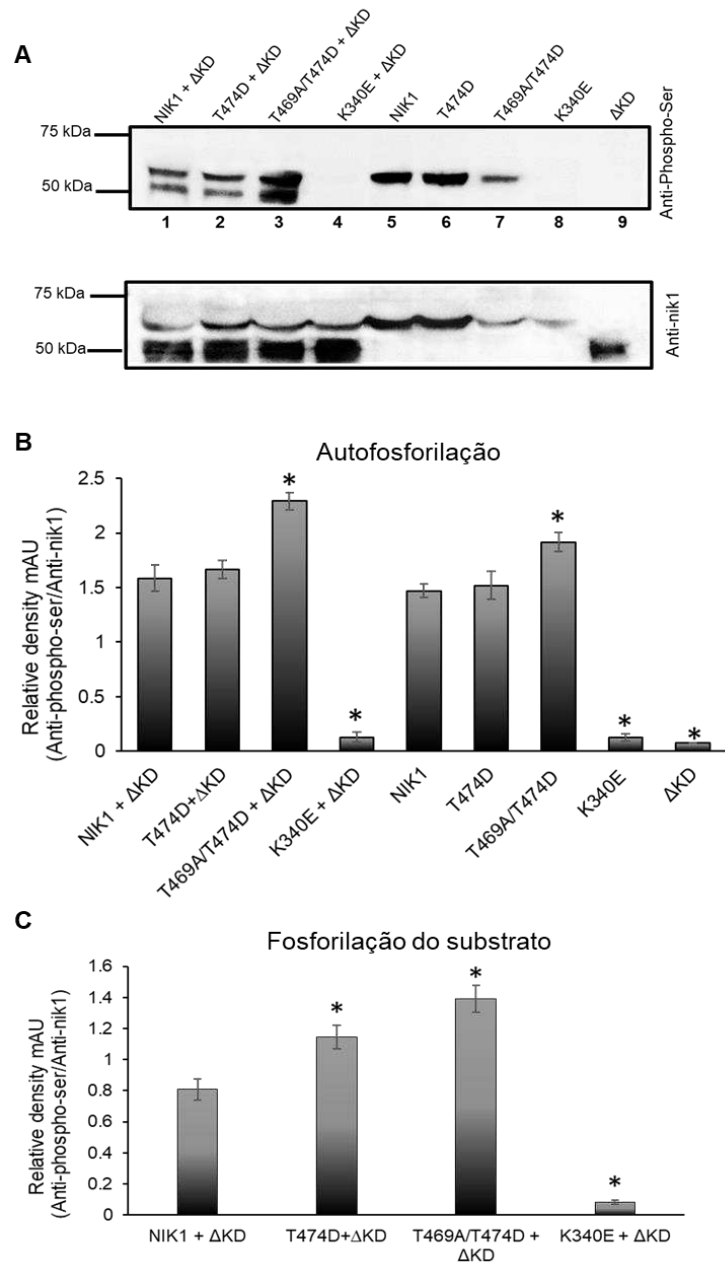


Figura 5. Atividade de autofosforilação e fosforilação do substrato de NIK1 e suas formas mutantes Fosforilação *in vitro* a partir o domínio cinase das construções de NIK1 purificadas e ATP. (A) Fusões purificadas de NIK, foram incubados com igual quantidade de proteínas ΔKD, na presença de ATP (Adenosina Trifosfato), separadas por SDS-PAGE 10% (m/v), as fosfoproteínas foram detectadas por *western blotting* revelados com o anticorpo anti-SERINE-HRP e normalizadas com o anticorpo anti-NIK1. O domínio cinase de todas construções de NIK1 fusionados a GST (GST-KD), tal como sua versão truncada (ΔKD) são indicados. A posição do marcador molecular está representado à direita em kDa. (B) A atividade relativa da autofosforilação (C) e a fosforilação do substrato foram quantificadas e expressas como densidade relativa. Os gráficos representam a média de três experimentos independentes (\pm) desvio padrão. Os asteriscos indicam diferença significativas em $P \leq 0,05$.

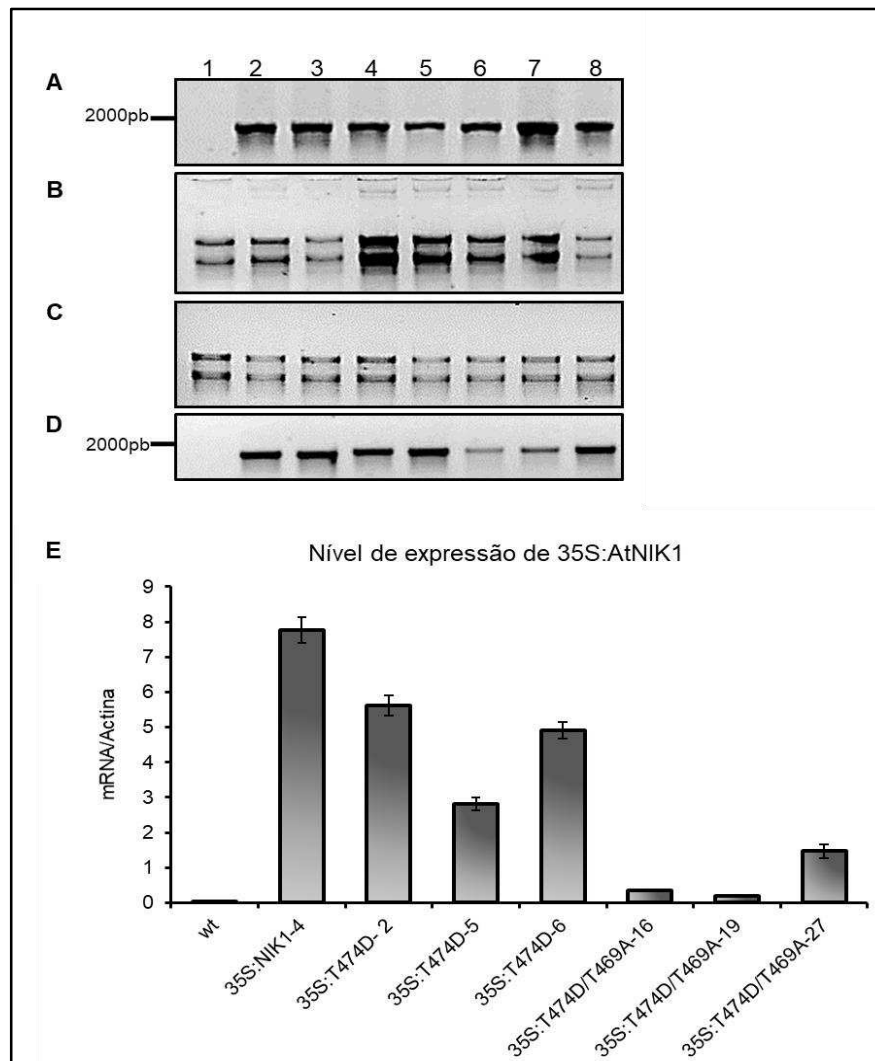


Figura 6. Análise molecular das linhagens transgênicas. (A) PCR diagnóstico das linhagens NIK1, NIK1-T474D, NIK1-T469A/T474D para identificação da incorporação dos transgenes. DNA total das plantas transformadas foi extraído e utilizado como molde em reações de PCR com oligonucleotídeos específicos para as construções de DNA incorporadas. O gel mostra o resultado do PCR diagnóstico da incorporação das versões de NIK1 sem mutação e de versões mutadas de NIK1: 1-WT; 2-NIK1 sem mutação, 3-NIK1-T474D_2; 4-NIK1-T474D_5; 5-NIK1-T474D_6; 6-NIK1-T469A/T474D_16; 7-NIK1-T469A/T474D_19; 8-NIK1-T469A/T474D_27. Os *primers* utilizados para identificar NIK1 foram MC36 (3408) e AtNIK1 Rvs (4204). (B) Extração de RNA das linhagens transgênicas e WT não tratado com DNase (C) RNA total das linhagens transgênicas e WT após tratamento com DNase. (D) Expressão de NIK1 por RT-PCR. RNA total das amostras indicadas foi utilizado para síntese de cDNA e a expressão de NIK1 monitorada por RT-PCR convencional (E) Determinação quantitativa do acúmulo dos transcritos de NIK1 nas linhagens indicadas na figura. Níveis de transcritos de NIK1 foram determinados por RT-qPCR em plântulas NIK1-4; NIK1-T474D-2, NIK1-T474D-5, NIK1-T474D-6, T474D/T469-16, T474D/T469A-19 e T474D/T469A-27. 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 e replicatas biológicas (n=4).

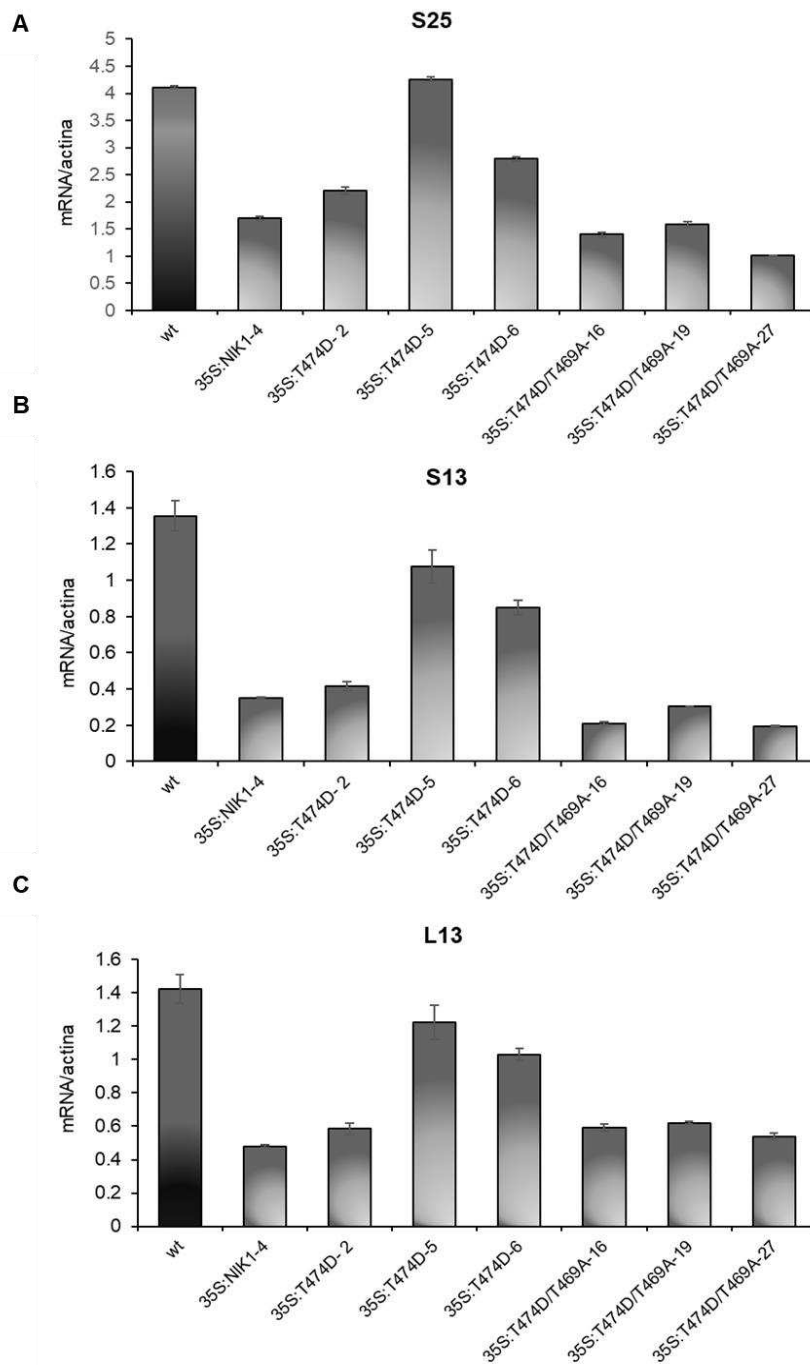


Figura 7. Supressão de genes ribossomais de tomatesiros por expressão de NIK1, NIK1-T474D e NIK1T469A/T474D. Os níveis de transcritos dos genes ribossomais indicados na figura foram determinados por RT-qPCR em plântulas WT, NIK1-4; NIK1-T474D-2, NIK1-T474D-5, NIK1-T474D-6, T474D/T469A-16, T474D/T469A-19 e T474D/T469A-27. 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 repetições técnicas e replicatas biológicas (n=4).

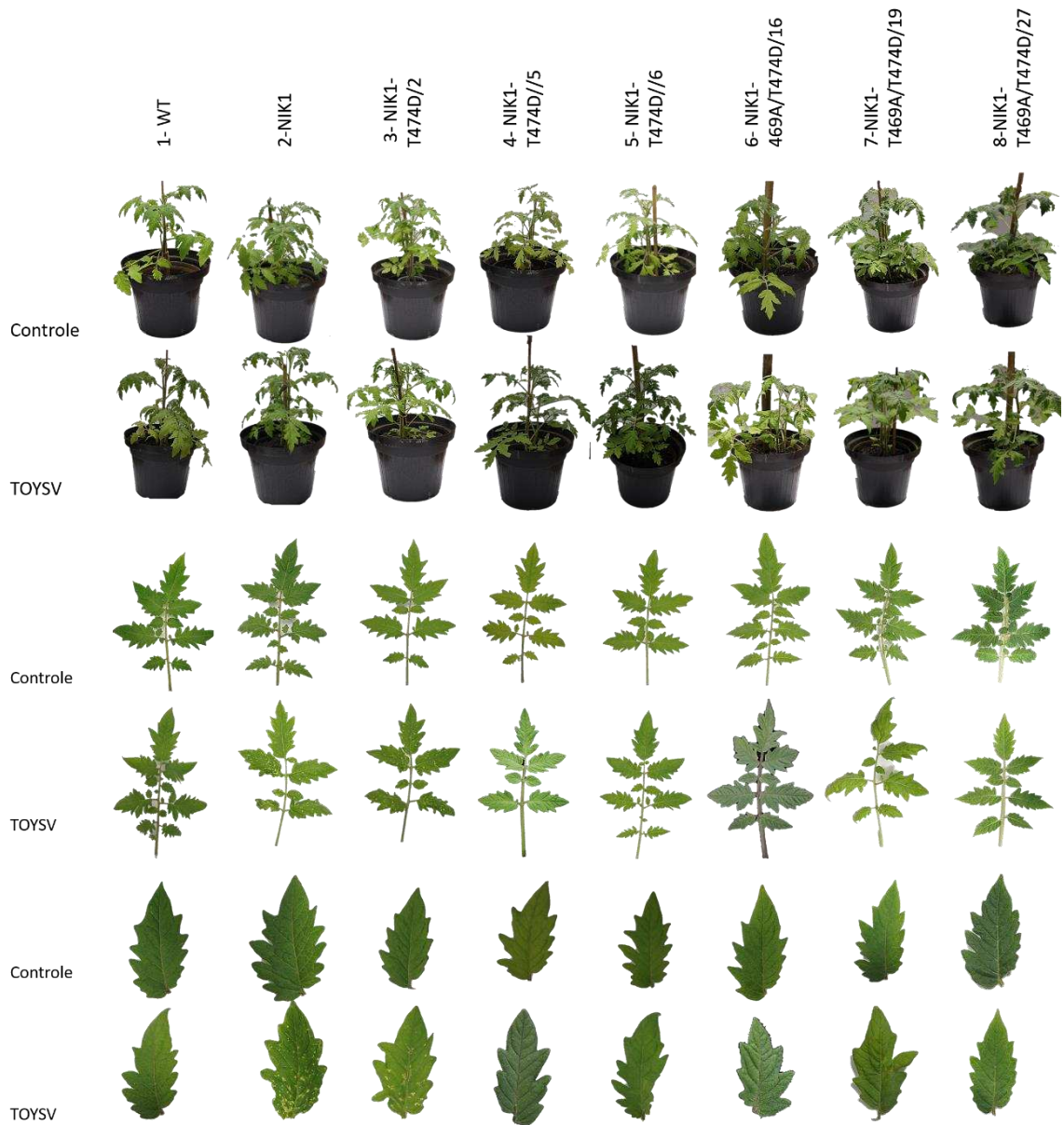


Figura 8. Sintomatologia da infecção TOYSV. Linhagens WT e transgênicas, conforme indicado na figura, foram bombardeadas com TOYSV para comparação de sintomas e resistência. As imagens foram obtidas 30 dias após infecção.

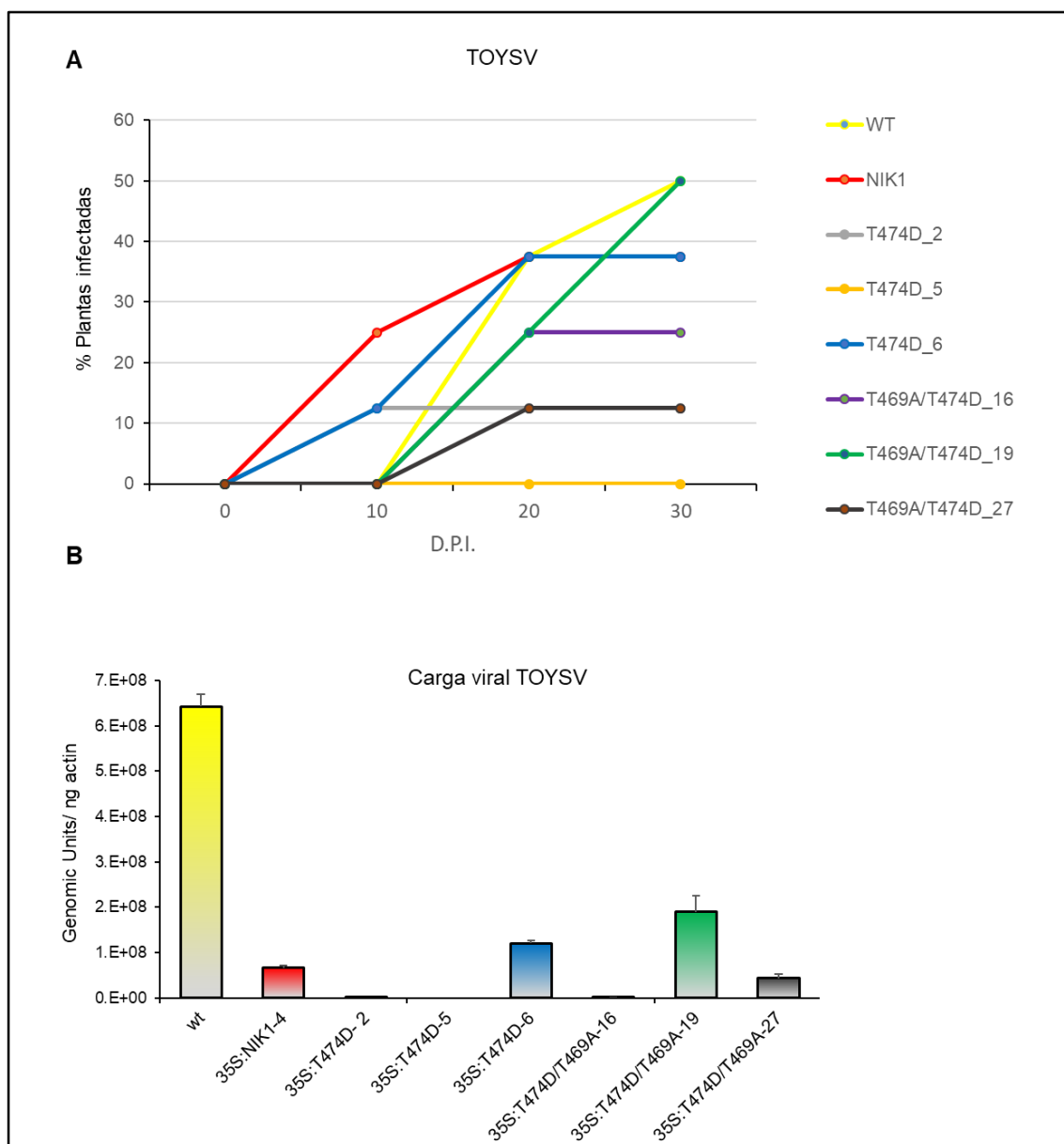


Figura 9. Progressão e quantificação da carga viral em linhagens de tomateiro. (A) Progressão da infecção viral nas linhagens transgênicas bombardeadas com ToYSV. Cada linha representa uma linhagem e mostra a porcentagem de plantas infectadas, considerando análise de sintomas e diagnóstico por PCR. DPI significa dias pós inoculação. **(B)** Quantificação da carga viral em tomateiros. DNA total foi extraído de linhagens transgênicas e WT aos 30 dias após inoculação. O DNA viral foi quantificado por PCR em tempo real, utilizando os oligonucleotídeos ToYSVFwd e ToYSRvs (Tabela 2), específicos para o componente B de ToYSV. Actina foi utilizada como controle endógeno. As barras indicam o desvio padrão da média, baseado em repetições técnicas e replicatas biológicas (n=3).