

TÓPICOS ATUAIS EM BOTÂNICA

Palestras Convidadas do 51º Congresso Nacional de Botânica
23 - 29 de julho de 2000, Brasília, DF

Organizadores Responsáveis

Taciana Barbosa Cavalcanti
Bruno Machado Teles Walter

Organizadores Assistentes

Glocimar Pereira da Silva
Alba Evangelista Ramos
José Felipe Ribeiro
Micheline Carvalho Silva
Rosa de Belem das Neves Alves
Terezinha Aparecida Borges Dias



Sociedade Botânica do Brasil
SBB



Recursos Genéticos e Biotecnologia
Cenargen

Brasília - julho 2000

TRANSFORMAÇÃO DE FEIJOEIRO PARA OBTENÇÃO DE RESISTÊNCIA AO VÍRUS DO MOSAICO DOURADO

Josias Corrêa de Faria¹ & Francisco José Lima Aragão²

Introdução

As plantas são a principal fonte, direta ou indiretamente, da maioria das roupas, combustíveis, remédios, materiais de construção, e principalmente alimentos. Talvez por esta importância vital, não se deve ficar surpreso de que o homem, desde tempos remotos, tenha se preocupado em desenvolver os tipos que melhor satisfaçam às suas necessidades. A sistematização dos métodos de obter tais plantas resultou na ciência do melhoramento genético de plantas. Problemas como a ausência da característica de interesse dentro da espécie e a incompatibilidade sexual sempre foram empecilhos para obter plantas ou organismos com as combinações genéticas desejadas pelos pesquisadores para satisfazer as crescentes demandas da sociedade; em outras palavras, a variabilidade genética existente na natureza não poderia ser explorada em seu potencial. Esta, talvez, foi a chamada velha biotecnologia. Gradativamente, os pesquisadores foram selecionando as melhores raças de plantas e microorganismos. Portanto, a ação do homem foi a de retirar da natureza os organismos que tinham um melhor conjunto de genes capaz de produzir, eficientemente, produtos para alimentação, saúde humana e uso industrial. Quando o rendimento ainda é baixo, o homem utiliza-se de novos conhecimentos científicos para fazer o melhoramento genético, através de cruzamentos, indução de mutações no genoma dos organismos, etc. Talvez esta tenha sido a nova biotecnologia. Em tempos mais recentes, com os avanços na cultura de tecidos, biologia molecular, bioquímica, etc, o homem passou a melhor entender os organismos e a poder trabalhar mais intensamente o seu material genético (DNA), no que foi denominado de biotecnologia de ponta. Com a tecnologia do DNA recombinante, o homem pode manipular os genes de interesse, e utilizando-se de várias tecnologias, transferi-los para a espécie desejada, sem ter que passar pela fecundação.

Cultivos *In vitro*

Talvez o primeiro relato do estabelecimento de culturas em forma de calo, data de 1939, em cenoura (*Daucus carota* L). Desde essa época, os calos foram utilizados em vários tipos de estudos de divisão celular, morfogênese, biossíntese de certos metabólitos, e mais recentemente, para seleção, mutação, e modificação genética ao nível celular. Protoplastos – célula de planta da qual foi removida a parede celular – foram também idealizados como células com capacidade de regenerar a parede celular, divisão mitótica e proliferação como clones que se diferenciam em meristemas e plantas completas - potencialmente TOTIPOTENTES. Totipotência é a potencialidade que as células vegetais apresentam de se desenvolver em novas plantas. Protoplastos seriam usados para a hibridização entre espécies ou para a transformação usando o DNA exógeno. A necessidade de modificar ainda mais profundamente as plantas, ao nível direto de DNA, levou ao desenvolvimento de métodos avançados de transformação genética.

¹ Embrapa Arroz e Feijão; ² Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Cenargen, CP 02372, CEP 70.770-900, Brasília, DF;

Método de transformação usando *Agrobacterium tumefaciens*

As técnicas de transformação de plantas desenvolveram para o uso de discos ou fragmentos de folhas e fragmentos de caule como explantes para o cocultivo com *Agrobacterium tumefaciens*. Foi descoberto que esta bactéria, estudada por suas propriedades tumorigênicas em plantas, transferia parte de seu DNA para os hospedeiros. Esta bactéria e seu plasmídeo de transferência (Ti) foram devidamente "engenheirados" para portar genes de interesse. Tentativas de transformar o feijoeiro por esta técnica resultaram em insucesso. O problema central foi a falta de totipotência: no caso de transformação utilizando *Agrobacterium*, a regeneração "de novo" de tecidos de feijoeiro é etapa necessária e essencial. De fato, nenhuma parte da planta, sem tecidos meristemáticos, é capaz de regeneração.

Transformação por Biobalística

Durante a última década, houve grandes avanços na transformação de espécies conhecidas como recalcitrantes à transformação via *Agrobacterium* (maioria das gramíneas e leguminosas). A biobalística utiliza microprojéteis recobertos com o DNA de interesse que são acelerados a alta velocidade para carregá-lo para dentro das células. Esta técnica permite a utilização de órgãos, como o embrião, para a transformação, no caso do feijoeiro. Todo o trabalho é conduzido asépticamente, em câmara de fluxo laminar. Eixos embrionários são retirados de sementes maduras, previamente esterilizadas e embebidas em água estéril por 12-18 horas. Elimina-se os primórdios de folhas primárias, para expor a região apical, onde se localiza o meristema, alvo do bombardeamento. Corta-se também 1/3 à 1/2 da radícula, para facilitar a manipulação nas etapas seguintes. Dez a quinze eixos embrionários são arranjados em círculo, por placa de 5 cm, contendo meio MS, suplementado com 10mg/l de BAP, e 0,8% de Phytigel. O ápice dos eixos devem ser organizados voltados para cima. (Nota: o uso de Phytigel é recomendável: devido à sua ação iônica, o meio não desagrega com a formação de vácuo para o bombardeamento). Para o bombardeamento, partículas de tungstênio são recobertas com o DNA de interesse, na proporção de 5µg de DNA por 50 µl de suspensão de partículas (60mg/ml), e bombardeadas a uma pressão de gás hélio de 1200 psi, com o aparelho sob vácuo de 27 polegadas de mercúrio. Após o cultivo por 7 dias a 28 C, e 16 horas de fotoperíodo, os eixos embrionários são transferidos para novas caixas tipo Magenta, com meio MS contendo BAP e com ágar a 0,8%, por mais 7 dias. Após, é transferido para meio MS sem BAP, com 0,3% de sacarose, para permitir o alongamento das multibrotações. Após o enraizamento, as plântulas são transferidas para vasos contendo solo e vermiculita (1:1) ou apenas vermiculita, cobertas com saco plástico e presos com elástico, para aclimatização. Após esta etapa pode se transferir as plântulas para casa de vegetação e transplantar para vasos normais, contendo solo adubado.

Resistência ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro (Bean Golden Mosaic Virus - BGMV)

O objetivo foi o de introduzir resistência ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro (BGMV) em *Phaseolus vulgaris*, através de métodos de biologia celular e molecular. Não existe imunidade ou mesmo alto grau de resistência a esta virose em germoplasma

de *Phaseolus* spp. Então qual é a fonte de gene? O próprio agente causal.

Resistência derivada do patógeno - Antes de conhecer a composição dos vírus de plantas, por volta de 1929, foram feitas observações de que inoculando-se plantas de fumo com uma estirpe fraca de vírus do mosaico do fumo, ao tentar reinocular com uma estirpe que causava sintomas mais severos, as plantas encontravam-se protegidas contra a super infecção. Isto veio a se chamar proteção cruzada. O mecanismo de tal proteção, nunca foi completamente desvendado. Nos anos 80, com o desenvolvimento de técnicas moleculares, foi possível testar a hipótese de que a proteção era mediada pela capa protéica do vírus, e que a resistência era válida para vírus homólogo ao que forneceu a capa. Sem importar qual seja o mecanismo, a tecnologia recebeu a denominação de "pathogen derived resistance", que traduzimos como 'resistência derivada do patógeno'.

Mosaico dourado - É um vírus com partículas icosaédricas, geminadas, contendo DNA de fita simples, circular, como material genético. Trata-se de vírus com genoma dividido em dois componentes, denominados de A e B, sendo encapsidados independentemente. Replica-se no núcleo de células do floema do hospedeiro, através de um mecanismo conhecido como círculo rolante, tendo DNA de fita dupla como intermediário de replicação. O DNA A contém os genes necessários para a replicação e encapsidação da progênie viral, enquanto o DNA B contém os genes requeridos para o movimento célula-a-célula e a longa distância, gama de hospedeiros e desenvolvimento de sintomas (Timmermans *et al.* 1994, Palmer & Rybicki 1998). Ambos os componentes são necessários para a infecção sistêmica de plantas. Exceto por uma seqüência de aproximadamente 200 nucleotídeos, denominada de região comum, os dois componentes não apresentam similaridade significativa em suas seqüências de nucleotídeos. O DNA A contém dois genes no sentido viral, codificando a proteína capsial (ORF AV1, gene *cp*) e três no sentido complementar [ORFs AC1, AC2 e AC3, correspondentes aos genes *rep* (codifica o gene para uma proteína associada à replicação), *trap* (é um fator de transcrição, que atua *in trans* no promotor de genes de sentido viral (*cp* e *ns*), - Sunter & Bisaro 1991, 1992 -; na presença de TrAP, a expressão do promotor da proteína capsial foi aumentada em cerca de 60 a 90 vezes -Brough *et al.* 1992), e *ren* (é um fator de amplificação da replicação viral, que embora não seja essencial para que a replicação ocorra, o acúmulo de DNA viral é muito maior quando essa proteína está presente)]. No DNA B estão localizadas as ORFs BV1 e BC1, correspondentes aos genes *mp* e *ns*, respectivamente (Palmer & Rybicki 1998). A proteína NS ("nuclear shuttle", anteriormente BV1 ou BR1) é necessária para o tráfico intracelular de DNA viral do núcleo para o citoplasma, enquanto que a MP ("movement protein", anteriormente BC1 ou BL1) está envolvida no movimento do DNA viral célula-a-célula, via plasmodesmas. A proteína Rep é a única proteína viral essencial para a replicação (Eagle *et al.* 1994, Eagle & Hanley-Bowdoin 1997).

Transdominantes letais

Experimentações com outro geminivírus, *Tomato golden mosaic virus*-TGMV, determinaram que a ligação da proteína Rep a DNAs repetidos de forma direta, a 5' da caixa TATA do gene *rep* é específica para a seqüência de cada geminivírus; ou seja, a Rep de um vírus não pode se associar à replicação de outro geminivírus. Após ligar à origem de replicação, ocorre um corte do DNA no A sublinhado da seqüência TAATATTAC

de uma estrutura em grampo, conservada em todos os geminivírus (Laufs et al. 1995). Um mecanismo antiviral baseado nesta interação específica entre Rep e a origem de replicação foi então proposta. Ela envolve a criação de uma Rep não funcional que interferiria com a ligação do tipo normal de Rep produzido pelo vírus (Hanson et al. 1991). A mutagênese da proteína Rep de BGMV mostrou que a mutação de um codon no sítio envolvido na etapa de corte do DNA (Hoogstraten et al., 1996) ou no motivo de ligação e transferência de nucleosídeo trifosfato - NTP-binding motifs - (Hanson et al. 1995) são letais. Estes dois motivos são conservados em todas as proteínas Rep, e são sítios atrativos para construir plantas transdominantes letais. Obtivemos plantas transgênicas com o gene *rep* com a mutação D262R (ácido aspártico da posição 262 para arginina), que inibiu eficientemente a replicação do DNA A, em *trans*, em experimentos com células de fumo. Dentre as plantas obtidas, foi possível conseguir a completa resistência ao vírus.

Entre outras conclusões do trabalho, pode se afirmar que: a) É possível a transformação consistente de feijoeiro via o método de biobalística; b) o gene *rep* mutagenizado no motivo relacionado à ligação de nucleosídeo trifosfato, expresso em *trans*, completamente inibiu a infecção das plantas pelo menos pelo vírus homólogo ao de onde fora extraído o gene.

Referências Bibliográficas

- ARAGÃO, S., RIBEIRO, G., BARROS, L.M.G., BRASILEIRO, A.C.M., MAXWELL, D.P., RECH, E.L. & FARIA, J.C. 1998. Transgenic beans (*Phaseolus vulgaris* L.) engineered to express viral antisense RNAs showed delayed and attenuated symptoms to bean golden mosaic geminivirus. *Molecular Breeding* 4:491-499.
- ARGUELLO-ASTORGA, G.R., HERRERA-ESTRELLA, L. & RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. 1994. Experimental and theoretical definition of geminivirus origin of replication. *Plant Mol. Biol.* 26:553-6.
- AZZAM, O., DIAZ, O., BEAVER, J. S., GILBERTSON, R. L., RUSSELL, D. R., & MAXWELL, D. P. 1996. Transgenic beans with the bean golden mosaic geminivirus coat protein gene are susceptible to virus infection. *Annual Repr. Bean Improv. Cooperative* 39: 276-277.
- BRASILEIRO, A.C.M. & CARNEIRO, V.T.C. Manual de transformação genética de plantas. Embrapa, SPI, Brasília, DF. 1998. 309p.
- BROUGH, C.L., GARDINER, W.E., INAMDAR, N.M., ZHANG, X., EHRlich, M. & BISARO, D.M. 1992. DNA methylation inhibits propagation of tomato golden mosaic virus DNA in transfected protoplasts. *Plant Mol. Biol.* 18:703-12.
- EAGLE, P.A. & HANLEY-BOWDOIN, L. 1997. *cis* elements that contribute to geminivirus transcriptional regulation and the efficiency of DNA Replication. *J. Virol.* 71:6947-55.
- EAGLE, P.A., OROZCO, B.M. & HANLEY-BOWDOIN, L. 1994. A DNA sequence required for geminivirus replication also mediates transcriptional regulation. *Plant Cell.* 6:1157-70.
- FARIA, J. C., GILBERTSON, R. L., HANSON, S. F., MORALES, F. J., AHLQUIST, P., LONIELLO, A. O. & MAXWELL, D. P. 1994. Bean golden mosaic geminivirus type II isolates from the Dominican Republic and Guatemala: Nucleotide sequence, infectious pseudorecombinants, and phylogenetic relationships. *Phytopathology* 84:321-329.
- FARIA, J.C. & MAXWELL, D.P. 1999. Variability in Geminivirus Isolates Associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. *Phytopathology* 89:262-268.
- GILBERTSON, R. L., FARIA, J. C., AHLQUIST, P. & MAXWELL, D. P. 1993. Genetic diversity

- in geminiviruses causing bean golden mosaic disease: The nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of a Brazilian isolate of bean golden mosaic geminivirus. *Phytopathology* 83:709-715.
- HANSON, S. F. & MAXWELL, D. P. 1999. Trans-dominant inhibition of geminiviral DNA replication by bean golden mosaic geminivirus *rep* gene mutants. *Phytopathology* 89:480-486.
- HANSON, S. F., GILBERTSON, R. L., AHLQUIST, P. G., RUSSELL, D. R. & MAXWELL, D. P. 1991. Site-specific mutations in codons of the putative NTP-binding motif of the AL1 gene of bean golden mosaic geminivirus abolish infectivity. *Phytopathology* 81:1247.
- HANSON, S. F., HOOGSTRATEN, R. A., AHLQUIST, P., GILBERTSON, R. L., RUSSELL, D. R. & MAXWELL, D. P. 1995. Mutational analysis of a putative NTP-binding domain in the replication-associated protein (AC1) of bean golden mosaic geminivirus. *Virology* 211:1-9.
- HOOGSTRATEN, R. A., HANSON, S. F., & MAXWELL, D. P. 1996. Mutational analysis of the putative nicking motif in the replication-associated protein (AC1) of bean golden mosaic geminivirus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9:594-599.
- LAUFS, J.; TRAUT, W.; HEYRAUD, F.; MATZEIT, V.; ROGERS, S.G.; SCHELL, J. & GRONENBORN, B. 1995. In vitro cleavage and joining at the viral origin of replication by the replicator initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:3879-83.
- PALMER, K.E. & RYBICKI, E.P. 1998. The molecular biology of mastreviruses. *Adv. Virus Res.* 50:183-234.
- SUNTER, G. & BISARO, D.M. 1991. Transactivation in a geminivirus: AL2 gene product is needed for coat protein expression. *Virology* 180:416-9.
- SUNTER, G. & BISARO, D.M. 1992. Transactivation of geminivirus AR1 and BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. *Plant Cell*, 4:1321-31.
- TIMMERMANS, M.C.P., DAS, O.P. & MESSING, J. 1994. Geminiviruses and their uses as extrachromosomal replications. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45:79-112.
- WEISSBACH, A. & WEISSBACH, H. *Methods for Plant Molecular Biology*. Academic Press. New York. 1988. p. 543.

