

FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.) TRANSGÊNICO CONTENDO UM MUTANTE DO GENE *REP* APRESENTA RESISTÊNCIA AO VÍRUS DO MOSAICO DOURADO

J.C. FARIA (1), M.M.C. ALBINO (2), B.B.A. DIAS (2), M.G.R. VIANNA (2), F.J.L. ARAGÃO (2)

(1)Embrapa Arroz e Feijão, Brasil, (2)Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasil

ABSTRACT

The *rep* gene of *Bean golden mosaic virus* (BGMV) is essential for virus replication, and *rep* gene mutations with amino acid codons changes in the putative NTP-binding motif D262R (M_1) was created. *Phaseolus vulgaris* transformation was achieved with a helium driven particle acceleration device. The vector contained the *bar* gene [resistance to ammonium glyphosinate (AG)] and besides the *rep* gene mutant. A total of 17 initial -R(0) - transformants were analyzed. From the R(0) plant M1/4, which had mutation M_1 , six progeny plants with resistance to AG were obtained, and four remained BGMV symptomless after inoculation. From these four plants, a total progeny of 127 R(2) plants were inoculated. Of the 35 progenies of plant M1/4/1, only three plants showed symptoms. From the other 92 plants, 72 had symptoms. Two plants out of 20 in the non-transgenic control plants remained symptomless.

Palavras-chave: bean golden mosaic; virose, tolerância, biobalística, transformação

INTRODUÇÃO

O mosaico dourado do feijoeiro (VMDF ou, em inglês, BGMV) foi inicialmente descrito por A. S. Costa como doença de baixa importância econômica no Estado de São Paulo, em 1965 (Costa, 1965). O agente vetor foi identificado como *Bemisia tabaci* (atualmente *B. argentifolii* é o principal inseto vetor). O mesmo autor observou, por volta de 1970, que plantações de feijoeiro nos Estados do Paraná, São Paulo e Minas Gerais foram severamente atingidas pela doença (Costa, 1975, 1976). Atualmente a doença encontra-se disseminada por praticamente todas as áreas de cultivo do feijoeiro das secas no Brasil. As perdas causadas variam de 40 a 85%, podendo chegar a 100% dependendo da cultivar, e do estágio das plantas quando infectadas.

O agente causal é um vírus possuindo partículas geminadas, icosaédricas, contendo como material genético DNA circular de fita simples. O genoma é dividido em dois componentes (A e B), sendo cada componente encapsidado separadamente. O componente A contém os genes necessários para a replicação e encapsidação da progênie viral, enquanto o componente B contém os genes necessários para o movimento de célula-a-célula, e a longa distância, gama de hospedeiros e desenvolvimento de sintomas. Ambos são necessários para a infecção sistêmica de plantas, mas o componente A se replica independentemente em células isoladas de fumo. Os dois componentes não apresentam similaridade nucleotídica significante, exceto por uma região idêntica com cerca de 200 nucleotídeos, conhecida como região comum. O componente A contém 2617 nucleotídeos, enquanto o componente B contém 2540. O componente A possui pelo menos quatro genes: *cp* (codifica para a capa protéica), *rep* (codifica para uma proteína associada à replicação), *trap* (codifica para uma proteína de função transativadora dos genes *cp* e *mp*, a proteína de movimento, localizada no componente B), e *ren* (codifica para uma proteína que amplifica a replicação viral). O VMDF pertence à família *Geminiviridae*, gênero *Begomovirus*, espécie *Bean golden mosaic virus* (BGMV). Revisão recente sobre o assunto foi publicada por Faria e Zerbini (2000).

Mais de 150 espécies de geminivírus foram seqüenciados por completo. Um exame da seqüência dos geminivírus revelou a existência de uma seqüência conservada de nove nucleotídeos dentro da região comum, a

qual encontra-se flanqueada por seqüência de 30 nucleotídeos repetida em forma invertida, formando uma estrutura denominada de SCE (elemento estruturalmente conservado), e que constitui a origem (*ori*) de replicação de todos os geminivírus, sendo ainda onde se localiza o sítio de clivagem do DNA para início da replicação pelo mecanismo de círculo rolante. Outra região conservada dentro da região comum, é o elemento chamado de “íteron”, localizado à montante do TATA, local onde a proteína rep se liga ao DNA e forma oligômeros entre si e com a proteína ren (Fontes et al., 1994). A proteína rep possui várias funções, associadas à replicação do vírus: 1. Dirigir o complexo replicativo para a origem de replicação; 2. Desenovelar o DNA molde – atividade de helicase; 3. Clivar o DNA na origem de replicação para o início do mecanismo de círculo rolante; e, 4. Separar os genomas após a replicação – atividade de nuclease e ligase. A rep ainda funciona na sua própria autoregulação, ou seja a repressão de sua própria síntese ao nível de transcrição. A seqüência consenso EGX₄GKTX₁₂DD, caracterizada como motivo de ligação de NTPs (NTP binding motif) foi encontrada em rep (Hanson et al., 1995). A mutação de D262R (ácido aspártico para arginina) aboliu completamente a infectividade do isolado da Guatemala denominado de *Bean golden yellow mosaic virus*.

Foi observada a inibição da replicação do componente A de BGMV em até 100% em nossos estudos envolvendo a co-eletroporação de protoplastos de fumo com este componente e a construção contendo os genes *rep*, *trap* e *ren* com a mutação D262R do *rep*. Foi ainda encontrado que plantas transgênicas da linhagem de feijoeiro expressando esta construção mostram resistência completa ao vírus quando inoculadas usando moscas brancas.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizando-se de mutagênese a sítios direcionados, foi feita a substituição do ácido aspártico da posição 262 por arginina, no gene *rep*. Esta construção, que contém também os genes *trap* e *ren*, foi colocada em frente do promotor e35S (“enhanced 35S”) do vírus do mosaico da couve-flor (construção pAC123M₁ ou M₁). A mesma construção, sem a mutação, foi também avaliada (Construção WT).

Foram feitas inoculações de protoplastos preparados a partir de suspensão de células de fumo com ambas as construções acima, em separado, para verificar a capacidade de replicar o componente B do VMDF, o que indicaria a produção e funcionalidade da proteína rep. Foram também feitos experimentos idênticos utilizando o componente A, o qual se replica autonomamente em protoplastos.

Todas as plantas obtidas foram analisadas quanto à presença do gene por PCR. As linhagens transgênicas foram analisadas por Southern blot para se demonstrar a integração dos genes bem como fazer uma estimativa do número de cópias integradas ao genoma da planta.

A transformação do feijoeiro, cv. Olathe, foi feita com a construção M₁, à qual foi adicionado o gene *bar* para seleção de transformantes, asando a ser denominada de M₁bar ou pAC123M₁bar. A metodologia utilizada foi a descrita em Aragão et. al. (1996). A análise de transformantes foi feita por PCR dos genes integrados, resistência ao herbicida glifosinato de amônia, e por “southern blot”.

RESULTADOS E DISCUSSÃO.

Os experimentos com protoplastos de fumo derivados de suspensão de células foram colhidos após três dias da eletroporação. Quando se utilizou a eletroporação da construção WT contendo o gene *rep* junto ao componente B, houve a replicação de B em *trans* indicando que a expressão do gene *rep* estava correta e produziu a proteína funcional, uma vez que o componente B não se replica autonomamente. Por outro lado a presença do gene *rep* mutagenizado, não resultou em amplificação do componente B (Dados não apresentados).

A inoculação do componente A, juntamente com o gene *rep* mutagenizado, resultou em redução significativa da sua replicação autônoma, fenômeno denominado de transdominância letal (Tabela 1). Tornou-se evidente que a proteína rep modificada interferiu com a replicação do DNA-A, no sistema avaliado.

Foram realizados 174 experimentos de transformação de feijoeiro cv. Olathe Pinto via biobalística com diferentes construções tendo sido bombardeados aproximadamente 40.000 embriões de feijão. Foram obtidas 17 linhagens R(0) com a construção pM₁bar.

Uma linhagem (M1-4) mostrou-se altamente resistente ao vírus inoculado através de moscas brancas, tendo sido considerada pelo programa como um evento-elite.

Reação ao vírus do mosaico dourado: Do total de 17 transformantes iniciais R(0) analisados, uma planta com resistência ao herbicida glifosinato de amônia foi identificada, a qual foi também resistente ao VMDF. Desta planta (M1-4), obteve-se seis sementes, das quais resultaram seis plantas. Após a inoculação com o VMDF, quatro não apresentaram nenhum sintoma da doença, além de ser resistentes ao herbicida. De 127 sementes obtidas e analisadas em R(2) somente três plantas mostraram sintomas, enquanto 2 de 20 plantas testemunhas ficaram sem sintomas (10%). Destes estudos e de análises conduzidas em gerações subsequentes, notou-se que as plantas poderiam apresentar dois fenótipos: completa imunidade ou suscetibilidade, dependendo da quantidade de inóculo, medido pela população de moscas brancas usadas na inoculação. À medida em que se aumenta a população de moscas brancas também se aumenta a percentagem de plantas com sintomas (Figura 1). Entretanto, com populações de até 20 moscas aparentemente virulíferas, por planta, nenhuma planta transgênica foi infectada em nossos experimentos. A estabilidade do transgene vem sendo mantida após seis gerações da linhagem original, analisadas através de PCR, e por Southern Blot. Foram também realizados cruzamentos entre a linhagem transgênica e quatro cultivares comerciais de classes diferentes de grão, tendo-se observado o comportamento dominante do transgene na primeira geração.

Em conclusão, a linhagem M1-4 de feijoeiro transgênico oferece o potencial para o controle da virose, a nível satisfatório. A presença e herança do transgene encontram-se estáveis, até a geração analisada, e nenhum efeito epigenético foi observado até o momento.

BIBLIOGRAFIA

- Aragão, F.J.L., Barros, L.M.G., Brasileiro, A.C.M., Ribeiro, S.G., Smith, F.D., Sanford, J.C., Faria, J.C., and Rech, E.L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean *Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theory Applied Genetics* 93:142-150. 1996.
- Costa, A. S. Increase in the populational density of *Bemisia tabaci*, a threat of widespread virus infection of legume crops in Brazil. Pages 27-49 in J. Bird and K. Maramorosch. eds. *Tropical Diseases of Legumes*. Academic Press. New York, 171 pp. 1975.
- Costa, A. S. Three whitefly-transmitted virus diseases of beans in São Paulo, Brazil. *FAO Plant Prot. Bull.* 13:121-130. 1965.
- Costa, A. S. Whitefly-transmitted plant diseases. *Ann. Rev. Phytopathol.* 14: 429-449. 1976.
- Faria, J.C., Zerbini, F.M. Família *Geminiviridae* – Taxonomia, replicação e movimento. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 8:27-57. 2000.
- Fontes, E.P.B., Gladfelter, H. J., Schaffer, R.L., Petty, I.T.D., and Hanley-Bowdoin, L. Geminivirus replication origins have a modular organization. *Plant Cell* 6:405-416. 1994.

Hanson, S. F., Hoogstraten, R. A., Ahlquist, P., Gilbertson, R. L., Russell, D. R., and Maxwell, D. P. Mutational analysis of a putative NTP-binding domain in the replication-associated protein (AC1) of bean golden mosaic geminivirus. *Virology* 211:1-9. 1995

Tabela 1. Replicação do componente A do VMDF em protoplastos de fumo co-inoculado com três concentrações da construção candidata a transdominante.

	Quantificação de DNA no gel (área em cm ²)	Replicação relativa (%)
DNA A	74766	100
M ₁ (1:25)	10145	13,5
M ₁ (1:50)	10535	14,1
M ₁ (1:100)	0	0,0
Controle sem inoculação	0	0,0

* M1- mutação D262R (Ácido Aspártico posição 262 para Arginina)

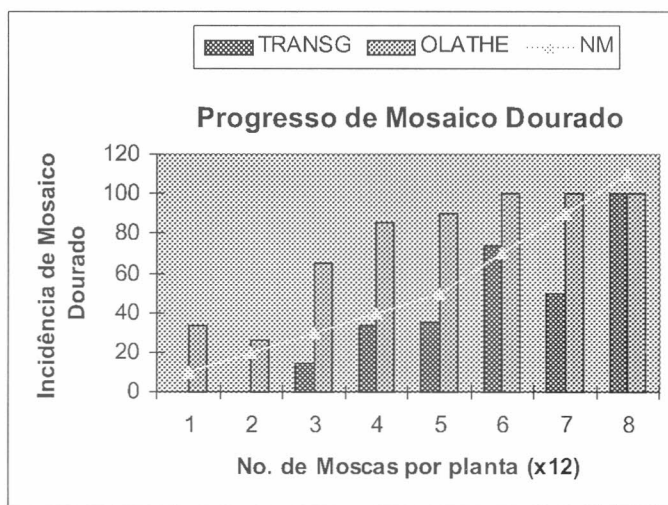


Figura 1. Progresso de mosaico dourado em plantas transgênicas e testemunha.