



# Transgênico resistente a GEMINIVIRUS

Feijoeiro geneticamente modificado imune ao vírus do mosaico dourado

**Francisco José Lima Aragão**

PhD em Biologia Molecular  
aragao@cenargen.embrapa.br

**Giovanni Rodrigues Vianna**

MSc., Doutorando em Biologia Molecular

**Margareth das Mercês Cerqueira Albino**

Graduanda em Biologia

**Bárbara Barreto Andrade Dias**

Graduanda em Biologia

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Brasília, DF

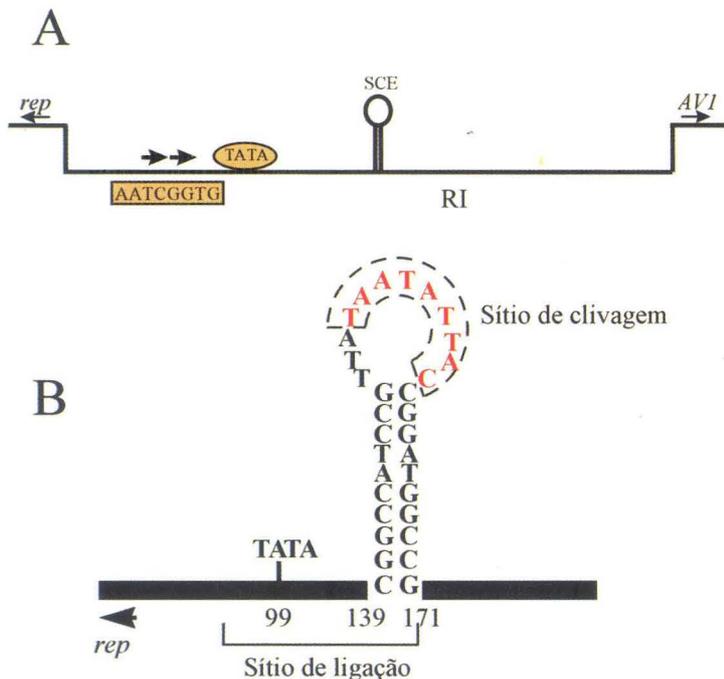
**Josias Corrêa Faria**

PhD em Fitopatologia  
Embrapa Arroz e Feijão  
Santo Antônio de Goiás, GO  
josias@cnpaf.embrapa.br

Fotos cedidas pelos autores

**A**s plantas são, direta ou indiretamente, a principal fonte de combustíveis, de remédios, de material de construção e, principalmente, de alimentos. Talvez, por essa importância vital, não se deva ficar surpreso 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 ausência da característica de interesse dentro da espécie e incompatibilidade sexual sempre foram empecilhos para se obterem 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 todo o seu potencial. Gradativamente, os pesquisadores foram selecionando as melhores raças de plantas e de 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 a alimentação, a saúde humana e o 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. 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 potencial do material genético (genes) disponível. Com a tecnologia do DNA recombinante, o homem pôde manipular os genes de interesse, e utilizando-se de várias tecnologias, transferir os para a espécie desejada, sem ter que passar pela fecundação.



**Figura 1:** A) Estrutura da região intergênica (RI) do BGMV mostrando o elemento iteron (→→), o **TATA box** e a estrutura em **stem-loop**. B) Detalhe da origem de replicação do BGMV, os sítios de clivagem e ligação da proteína viral Rep. A seqüência nanométrica comum a todos os geminivirus está indicada pelo semi-círculo pontilhado. O último A do nanonucleotídeo (em vermelho) é a base onde ocorre o corte do DNA durante a replicação

## Resistência derivada do patógeno

Sanford & Johnson (1985) foram

os primeiros a propor a obtenção de resistência a patógenos em plantas geneticamente modificadas, pela utilização de seqüências genômicas dos próprios patógenos. Na verdade, esse conceito havia sido empregado há várias décadas. Antes mesmo de se 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 (McKinney, 1929). 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 (CP) do vírus, e que a resistência era válida para vírus homólogo ao que forneceu a capa. Sem se importar com qual que fosse o mecanismo, a tecnologia recebeu a denominação de "pathogen derived resistance", que traduzimos como 'resistência derivada do patógeno'.

Uma seqüência lógica do desdobramento desse conceito foi o desenvolvimento de estratégias para resistência a viroses, uma vez que os vírus, apesar de terem biologia molecular complexa, são, na maioria dos casos, estruturalmente mais simples que outros organismos causadores de doenças em plantas. A primeira estratégia empregada foi a expressão da CP em plantas geneticamente modificadas (PGM) através da tecnologia do DNA recombinante. O primeiro caso de sucesso foi a expressão da CP do vírus do mosaico do fumo (TMV) em plantas de fumo, gerando linhagens resistentes ao vírus (Powell *et al* 1986). Desde então, uma série de outras tentativas de utilização dessa estratégia foram realizadas, com a utilização de genes estruturais e não estruturais (para



**Figura 2:** Plantas transgênicas de feijoeiro cultivadas *in vitro*

uma revisão, ver Souza & Gonsalves, 1999). Brevemente pôde-se listar: (1) expressão da capa protéica, (2) uso de satélites, (3) RNA senso e antisenso, (4) RNAs defectivos, (5) expressão da replicase, (6) expressão de proteínas do movimento, (7) expressão de anticorpos (*plantbodies*).

Em nossos laboratórios (Embrapa Arroz e Feijão & Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia), temos como objetivo introduzir resistência ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro (BGMV) em *Phaseolus vulgaris*, através de métodos de biologia celular e molecular. Não existe imunidade nem mesmo alto grau de resistência a essa virose em geroplasma de *Phaseolus* spp.

### O mosaico dourado do feijoeiro

O mosaico dourado do feijoeiro foi inicialmente descrito pelo Dr Álvaro Santos Costa como uma doença que, inicialmente não teria importância econômica no Estado de São

Paulo (Costa 1965). Seu agente transmissor, a mosca branca (*Bemisia tabaci* Gennadius), foi também identificado. Subseqüentemente, um vírus de partículas geminadas foi identificado, associado às plantas mostrando sintomas de mosaico. Esse vírus foi então denominado vírus do mosaico dourado do feijoeiro - VMDF (em inglês: *bean golden mosaic virus* - BGMV), um geminivirus.

No início dos anos 70, as plantações de feijoeiro nos estados de São Paulo, Paraná e Minas Gerais foram severamente atingidas pelo mosaico dourado. Esse fato foi atribuído ao avanço da cultura da soja e de outras culturas hospedeiras da mosca branca. Em algumas regiões, devido à grande incidência da doença, os agricultores tiveram como única opção parar com o plantio do feijão.

Essa doença está hoje disseminada por todas as áreas produtoras de feijão do Brasil. Doença semelhante é encontrada em outros países das Américas, tais como Cuba, República Dominicana, Porto Rico, Jamaica, Estados Unidos, México, Belize, Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicarágua, Costa Rica, Panamá, Venezuela e Colômbia.

No Brasil, em condições de campo, as perdas ficam em torno de 40% a 85%, podendo chegar a 100% (Menten *et al* 1980, Gálvez & Morales 1989), dependendo da cultivar, do estágio das plantas quando infectadas e do isolado do vírus.

Quanto aos sintomas, inicia-se pelas nervuras das folhas, que, numa etapa mais avançada, exibem um amarelo brilhante na maior parte do limbo foliar, formando um mosaico. Ocorrem ainda distorções foliares, nanismo, malformação de vagens e sementes. Além disso, as sementes provenientes de plantas infectadas têm a germinação afetada.

### O Vírus

O BGMV consiste numa partícula icosaédrica, que contém DNA de fita simples, circular, como material genético. Trata-se de vírus com genoma dividido em dois componentes, de-



**Figura 3:** Linhagem imune ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro. Esquerda: planta não transgênica inoculada com o vírus mostrando os sintomas de mosaico dourado. Direita: planta transgênica inoculada com o vírus sem qualquer evidência de sintoma

O BGMV é transmitido na natureza pela mosca branca, de uma forma circulativa. Os isolados do BGYMV podem ser transmitidos por inoculação mecânica, isto é, através do extrato de uma planta infectada, friccionado sobre a folha de uma planta sadia. Entretanto, o isolado brasileiro, BGMV-BR, não é transmitido dessa forma (Costa, 1965). Recentemente, pode-se transmitir um isolado brasileiro do vírus, clonado no vetor pBSKS+ (Stratagene), através do processo de biobalística (Aragão *et al.*, 1995). O BGMV não é transmitido através das sementes (Costa, 1965).

Cerca de 151 espécies e/ou isolados de *Geminiviridae* foram inteiramente seqüenciados. Um exame da seqüência dos vários geminivírus revela a existência de um nanômero conservado em todas as espécies, localizado na região intergênica tanto do DNA-A quanto do DNA-B. Esse nanômero (TAATATTAC), chamado de SCE (elemento estruturalmente conservado), foi logo reconhecido como a origem de replicação (*ori*) e como o sítio de clivagem do DNA pela proteína associada à replicação. Esse elemento SCE está localizado dentro de uma seqüência conservada de 30 nucleotídeos, com potencial para formação de uma estrutura em forma de grampo. A manutenção conformacional dessa estrutura é fundamental para sua função de origem de replicação (Orozco & Hanley-Bowdoin, 1996). Outro elemento, chamado de 'iteron', foi localizado a montante dessa estrutura de grampo, repetido duas vezes (no caso do BGMV), ao lado da região TATA (Figura 1), que foi caracterizada como a região de ligação da Rep ao DNA (Walker *et al.* 1982; Lazarowitz *et al.*, 1992; Fontes *et al.*, 1994). Os iterons são específicos para cada vírus. Por exemplo, os iterons do BGMV-BR são diferentes daqueles em BGYMV-GA e em BGYMV-PR. No entanto, sua posição relativa e sua orientação são conservados dentro de *Geminiviridae* filogeneticamente relacionados.

A proteína associada à replicação (Rep), codificada pelo gene *rep*, tem sido alvo de um grande número de estudos nos últimos anos. Essa proteína possui várias funções associadas à replicação: (1) dirigir o complexo re-

nominados 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). 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 o gene da CP (ORF AV1, gene *cp*) e três no sentido complementar (ORFs AC1, AC2 e AC3), correspondentes aos genes *rep* (que codifica o gene para uma proteína associada à replicação); *trap* ("transactivation protein", que é o fator de transcrição que atua *in trans* no promotor de genes de sentido viral

(*cp* e *mp*), - Sunter & Bisaro 1991, 1992; na presença de *trap*, a expressão do promotor da proteína capsidial foi aumentada em cerca de 60 a 90 vezes -Brough *et al.* 1992), e *ren* (que é um fator de amplificação da replicação viral, que, embora não seja essencial para que a replicação ocorra, provoca um acúmulo de DNA viral muito maior quando está presente). No DNA B, estão localizadas as ORFs BV1 e BC1, correspondentes aos genes *ns* e *mp*, respectivamente (Palmer & Rybicki 1998). A proteína ns ("nuclear shuttle"), anteriormente BR1 ou BV1, é necessária para o tráfico intracelular de DNA viral do núcleo para o citoplasma, enquanto que a *mp* ("movement protein"), anteriormente BL1 ou BC1, está envolvida no movimento do DNA viral célula-a-célula, via plasmodesmas. A proteína Rep é a única essencial para a replicação.

O DNA de vários isolados do BGMV foram completamente seqüenciados. O vírus do mosaico dourado amarelo do feijoeiro (BGYMV) da República Dominicana e da Guatemala (Faria *et al.* 1994); de Porto Rico (Howarth *et al.*, 1985) e (BGMV); e o do Brasil (Gilbertson *et al.*, 1993 - Acesso do GenBank M88686 e M88687).

plativo para a origem de replicação; (2) desenovelar o DNA molde (atividade de helicase); (3) clivar o DNA e iniciar o mecanismo de círculo rolante; e (4) separar os genomas após a replicação (atividade de nuclease e ligase). Além da sua principal atividade na replicação, a Rep está envolvida na sua autoregulação: repressão de sua própria síntese ao nível de transcrição.

Uma seqüência consenso (*NTP-binding motif*) (EGX<sub>4</sub>GKTX<sub>22</sub>DD) foi encontrada na replicase de doze geminivírus analisados (Hanson *et al* 1995). Experimentos feitos *in vivo* mostraram que uma simples mutação na replicase do BGMV [de lisina (K) para histidina (H), ou de ácido aspártico (D) para arginina (R)], anulou a replicação viral e o aparecimento dos sintomas nas plantas de feijoeiro inoculadas (Hanson *et al* 1995). Mutações de lisina (K) para histidina (H) na Rep do *tomato yellow leaf curl geminivirus* (TYLC) reduziram significativamente a atividade de ATPase dessa enzima.

Outro motivo conservado (DVKXYXXKD) no domínio amino terminal da Rep dos geminivírus foi identificado como sítio de clivagem e ligação ao DNA, sendo a tirosina (Y) presente nesse consenso o aminoácido ativo.

### Estratégias para resistência

Em geminivírus, a expressão da capa protéica não tem apresentado resultados satisfatórios. De fato, plantas transgênicas de fumo expressando a CP do *abutilon mosaic geminivirus* mostraram sintomas parecidos com os da infecção pelo vírus, e proporcionais à expressão do gene (Wilson 1993). Provavelmente isso se deve ao fato de a CP não ser essencial à infecção e ao desenvolvimento de sintomas em plantas infectadas por geminivírus.

Assim, têm sido propostas outras estratégias para obtenção de plantas transgênicas resistentes a geminivírus, tais como o RNA antisense e a expressão da CP e proteína associada a replicação mutada.

A estratégia de RNA antisense foi empregada para vírus de diferentes grupos, tais como comovírus, potyvírus, tobamovírus e outros. Na maioria dos casos, usou-se o mRNA antisense para o gene da CP. Em geral, obteve-se apenas um nível limitado de proteção, isto é, a proteção ficou limitada a baixos níveis de inóculo viral.

Entretanto, o uso de RNA antisense tem sido bastante eficiente no bloqueio da expressão de genes nucleares em plantas. Esses resultados serviram como suporte para a hipótese de que essa estratégia fosse útil no bloqueio de vírus com parte de seu ciclo de vida e de replicação ocorrendo no núcleo, tais como geminivírus e caulimovírus (Wilson 1993).

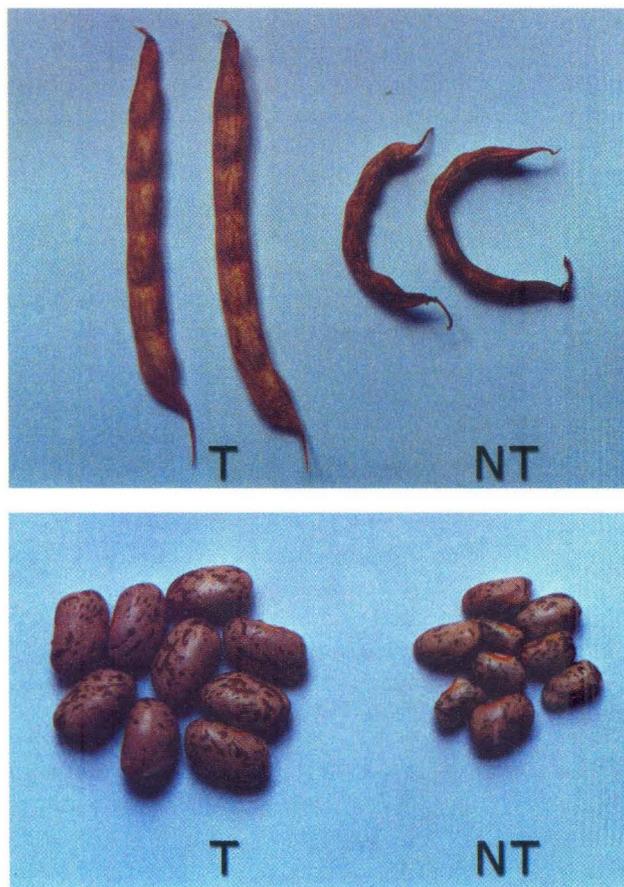
Os mecanismos de ação de seqüências antisense ainda são apenas parcialmente compreendidos. Em ge-

ral, é proposto que essas seqüências interfeririam, em nível traducional, de forma direta ou indireta, podendo ser em nível nuclear ou citoplasmático. A nível nuclear, a hibridização RNA-antisense e mRNA pode interferir no processamento do pré mRNA, inibindo o *splicing*, ou ainda o transporte do mRNA do núcleo para o citoplasma. Esse dúplex formado pode ser reconhecido pela RNase H a nível nuclear ou citoplasmático, e, subseqüentemente, o mRNA é degradado. No nível citoplasmático, a interação do RNA antisense e do mRNA pode interferir na ligação de fatores de iniciação de tradução ou inibir diretamente a tradução do mRNA pelos ribossomos. Interações RNA antisense e DNA podem também ocorrer, sendo esse híbrido também substrato para a RNase, que hidrolisa a fita de RNA.

Os fenômenos de co-supressão, podem também ser responsáveis pela resistência a vírus em plantas transgênicas. A presença de uma seqüência de DNA no genoma da planta poderá suprimir a expressão (silenciar) do próprio gene e de um gene homólogo presente. Assim, a presença de uma seqüência do vírus integrado ao genoma da planta poderá silenciar sua expressão por parte do próprio vírus, quer por interações entre os genes, quer por metilação ou ativação de mecanismos específicos de degradação de RNA.

Seqüências que englobam os genes *rep*, *trap*, *ren*, e *mp* do BGMV-BR foram posicionadas em antisense, sob controle do promotor 35S do *cauliflower mosaic virus* (35S CaMV). Essa construção foi então utilizada para obtenção de plantas transgênicas de feijoeiro (Aragão *et al* 1996).

Isolados do BGMV de alguns estados do Brasil (Goiás, São Paulo e Pernambuco) foram caracterizados no nível molecular e achou-se que havia uma grande homologia entre suas seqüências (75-100%) (Faria e Maxwell, 1999). Portanto, considera-se que o isolado utilizado nesse estudo representa os demais isolados exis-



**Figura 4:** Vagens e sementes de plantas transgênicas (T) e de plantas não transgênicas (NT), ambas inoculadas com o vírus do mosaico dourado do feijoeiro

tentes no país.

As plantas transgênicas com as seqüências do BGMV foram autofecundadas durante 4-5 gerações e, então, inoculadas com o vírus. A inoculação foi feita com a utilização de moscas brancas virulíferas. Algumas linhagens transgênicas não apresentaram diferença significativa nos sintomas em relação às plantas não transgênicas. Entretanto, duas linhagens mostraram um retardamento no aparecimento dos sintomas, além desses serem mais fracos que aqueles normalmente apresentados pelas plantas controle. Além disso, uma titulação do vírus através de análises por *Southern blot* nas plantas inoculadas mostrou que havia uma quantidade inferior de DNA viral nas plantas transgênicas (Aragão et al., 1998).

### Transdominantes letais

Embora os resultados tenham sido bastante animadores, o nosso objetivo principal ainda era a obtenção de plantas imunes ao vírus, isto é, linhagens nas quais não ocorresse replicação viral. Assim, outra estratégia foi proposta, denominada transdominância letal. Essa estratégia envolve a criação de uma Rep não funcional que interferiria com a ligação do tipo normal de Rep produzido pelo vírus (Hanson et al., 1995). A mutagênese da proteína Rep de BGMV mostrou que a mutação de um códon 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. Esses dois motivos são conservados em todas as proteínas Rep, e são sítios atrativos para construir plantas transdominantes letais (Hanson et al., 1999). Obtivemos plantas transgênicas contendo 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. Entre as plantas transgênicas de feijão obtidas, foi possível conseguir a completa resistência ao vírus. Essas plantas estão, no momento, na terceira geração,

apresentando o mesmo comportamento.

Na próxima fase será realizado um estudo mais detalhado do comportamento das plantas transgênicas de feijoeiro em condições de campo. Nesses estudos, seriam avaliadas as interações das plantas transgênicas com outras plantas do ambiente agrícola, e também a estabilidade da expressão dos genes introduzidos. Dessa forma, devem ser avaliadas as questões relativas à biossegurança. Além disso, há ainda necessidade de estudo do comportamento desses genes no que diz respeito a fatores relacionados com a interação destes e a complexa fisiologia dessas plantas submetidas a estresse natural nas condições agroclimáticas tropicais.

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

### Agradecimentos

Os autores agradecem o excelente suporte técnico dado pelas seguintes pessoas: Elsa O. P. L. Nogueira, Vanderlino M. Santana., Warley Almeida e Luiz Lemos. Este trabalho foi financiado pela EMBRAPA, PADCT, CNPq.

### Referências Bibliográficas

Aragão FJL, Brasileiro ACM, Ribeiro SG, Faria JC & Rech EL 1995 *Fitopatologia Brasileira* 20:642-644.  
Aragão FJL, Barros LMG, Brasileiro ACM, Ribeiro SG, Smith FD, Sanford JC, Faria JC & Rech EL 1996 *Theoretical Applied Genetics* 93:142-150.  
Aragão FJL, Ribeiro SG, Barros LMG, Brasileiro ACM, Maxwell DP, Rech EL, Faria JC 1998 *Molecular Breeding* 4:491-499.  
Brough C L, Sunter G, Gardiner W E & Bisaro D M 1992 *Virology* 187:1-9

Costa A S 1965 *FAO Plant Prot Bull* 13:121-130.

Faria JC & Maxwell DP 1999 *Phytopathology* 89:262-268.

Faria J C, Gilbertson R L, Hanson S F, Morales F J, Ahlquist P, Loniello A O & Maxwell D P 1994 *Phytopathology* 84:321-329.

Fontes EPB, Gladfelter H J, Schaffer RL, Petty ITD & Hanley-Bowdoin L 1994 *Plant Cell* 6:405-416.

Gálvez G E & Moráles F J 1989 *Bean Production in the Tropics* CIAT Cali, Colombia.

Gilbertson R L, Faria J C, Ahlquist P & Maxwell D P 1993 *Phytopathology* 83:709-715.

Hanson S F, Hoogstraten R A, Ahlquist P, Gilbertson R L, Russell D R & Maxwell D P 1995 *Virology* 211:1-9.

Hanson S F & Maxwell D P 1999 *Phytopathology* 89:480-486.

Hoogstraten R A, Hanson S F & Maxwell D P 1996 *Mol Plant-Microbe Interact* 9:594-599.

Howarth A J, Catón J, Bossert M & Goodman R M 1985 *PNAS USA* 82:3572-3576.

Lazarowitz S G 1992 *CRC Crit Rev Plant Sci* 11:327-349.

McKinney HH 1929 *Journal Agricultural Research* 39:557-578.

Menten JOM, Tulmann Neto A & Ando A 1980 *Turrialba* 30:173-176.

Orozco BM & Hanley-Bowdoin L 1996 *Journal of Virology* 70:148-158.

Palmer KE & Rybicki EP 1998 *Advances Virus Research* 50:183-234.

Powell PA, Nelson C, De B, Hoffmann N, Rogers SG, Fraley RT & Beachy RN 1986 *Science* 232:738-743.

Sanford JC & Johnson SA 1985 *Journal of Theoretical Biology* 115:395-405.

Souza Jr MT & Gonsalves D 1999 *Fitopatologia Brasileira* 24:485-506.

Sunter G & Bisaro D M 1991 *Virology* 180:416-419.

Sunter G & Bisaro D M 1992 *Plant Cell* 4:1321-1331.

Timmermans M C P, Das O P & Messing J 1994 *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 45:79-112.

Walker JE, Saraste M, Runswick MJ & Gay NJ 1982 *EMBO Journal* 1:945-951.

Wilson TMA 1993 *PNAS USA* 90:3134-3141.

