



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB**

INSTITUTO DE BIOLOGIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

*RESISTÊNCIA AO BEAN GOLDEN MOSAIC VIRUS  
MEDIADA POR RNA INTERFERENTE EM PLANTAS  
DE FEIJOEIRO (PHASEOLUS VULGARIS)*

*Kenny Bonfim*

**Brasília**

**2007**

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Transferência de Genes do Centro de Recursos Genéticos e Biotecnologia da EMBRAPA, com suporte financeiro da Capes.

**Orientador: Francisco J. L. Aragão**

**OFEREÇO:**

À Deus, meu refúgio e fortaleza;  
E a todos que acreditaram em mim e me apoiaram nessa jornada.

**DEDICO:**

**Aos produtores e  
consumidores de feijão.**

## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível com a ajuda material, intelectual e espiritual de várias pessoas e algumas instituições. Assim sou grata:

Ao departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília pela oportunidade de realização deste curso e pelos ensinamentos recebidos.

À EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Dr Francisco J. L. Aragão pela amizade, incentivo, orientação e apoio, e principalmente por dividir a realização deste projeto comigo.

Ao Dr. Josias C. Faria pela realização dos experimentos de inoculação e melhoramento feitos no CNPAF em Goiânia.

À minha Mãe, pela vida, pelo incentivo e apoio, e principalmente pelo amor que me faz forte para continuar seguindo meu caminho.

Ao meu Pai e irmão, pelo amor e por acreditarem e se orgulharem de mim, à minha irmã, amiga e companheira de todos os dias, pela enorme paciência e carinho, e a todos os meus familiares pelo amor incondicional.

A minha grande amiga Elsa pelo carinho, apoio e conselhos, e por fazer parte deste projeto, que não teria sido possível sem a participação dela.

Às minhas amigas Maria Laine e Andréa, por todas as horas divertidas e agradáveis dentro e fora do laboratório, pelos conselhos e colo nas horas difíceis, apoio, incentivo, pelo carinho e principalmente por me mostrar que a vida vale a pena.

Ao Emanuel por ter mudado minha vida com seu amor, pelo apoio e incentivo e especialmente por acreditar que sou capaz.

Às minhas estagiárias e amigas, Érica e Nayche, por toda ajuda e trabalho.

Em especial à Dona Bel, Giovanni e Warley.pelo carinho e pelos ensinamentos e ajuda proporcionada,

Aos meus colegas de trabalho pela amizade, incentivo e apoio em todos os momentos e principalmente pelo carinho e paciência.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma, para meu crescimento e realização final deste trabalho.

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	01
<b>ABSTRACT</b>	03
<b>INTRODUÇÃO</b>	05
Feijão - <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	05
Transformação genética de feijoeiro	08
Geminivírus	14
<i>Bean golden mosaic virus</i> (BGMV)	22
Estratégias para resistência a vírus em plantas geneticamente modificadas	25
Silenciamento gênico	29
<b>OBJETIVOS</b>	33
<b>HIPÓTESE</b>	34
<b>METODOLOGIA</b>	35
Construção do vetor de interferência	36
Transformação genética do feijoeiro	39
Detecção de transgenes em linhagens transformadas através de PCR	40
Análise de Southern <i>Blot</i>	41
Análise dos pequenos RNA em <i>Northern Blot</i>	42
Estudo da concentração de siRNA após a inoculação com moscas brancas virilíferas	43
Efeito da temperatura sobre o acúmulo de siRNA	44
Análise <i>in silico</i> dos siRNA	44
Inoculação das plantas transgênicas com BGMV para avaliação da resistência	45
Análise de PCR para detecção viral semiquantitativa	46
<b>RESULTADOS</b>	48
Transformação de feijoeiro e seleção com o herbicida imazapir	48

Inoculação das plantas com oBGMV com moscas-brancas virulíferas	50
Análise da segregação e desafio de linhagens transgênicas	51
Análise genômica de Southern blot	54
Análise dos siRNA	55
Comparação da resistência ao BGMV entre plantas obtidas pela estratégia de RNA interferente e pela estratégia de transdominância.	59
Transferência da característica de resistência para cultivares comerciais	61
<b>DISCUSSÃO</b>	62
<b>CONCLUSÕES</b>	71
<b>PERSPECTIVAS</b>	72
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	73
<b>ANEXO</b>	98
Artigo científico	

## RESUMO

### **RESISTÊNCIA AO *BEAN GOLDEN MOSAIC VIRUS* MEDIADA POR RNA INTERFERENTE EM PLANTAS DE FEIJOEIRO (*PHASEOLUS VULGARIS*)**

A produção mundial de feijão, compreendendo os gêneros *Phaseolus* e *Vigna*, é superior a 18 milhões de toneladas e o Brasil ocupa o segundo lugar na produção mundial e o primeiro quando se trata apenas do gênero *Phaseolus*. Entretanto, sua produção ainda está aquém do necessário para suprir a demanda interna. Dentre os principais problemas relacionados com a baixa produção de feijão no Brasil estão a competição com plantas daninhas, estresse hídrico e o ataque de pragas e doenças como mosaico dourado do feijoeiro causado por um geminivírus. O *Bean golden mosaic virus* (BGMV), é transmitido por mosca-branca (*Bemisia tabaci*) de uma forma persistente, circulativa, causando mosaico dourado em feijão comum (*Phaseolus vulgaris*). Os sintomas característicos são: mosaico verde amarelado nas folhas, nanismo e vagens distorcidas. A doença é largamente disseminada nas regiões de produção de feijão no Brasil e América Latina causando perdas severas (40 -100%). Neste trabalho, a tecnologia de RNA interferente foi explorada usando uma seqüência do gene viral *ACI* para gerar plantas transgênicas de feijão comum altamente resistentes a geminivírus. Desta maneira o gene viral (*ACI*) foi escolhido para a construção do vetor de transformação uma vez que a proteína Rep exerce uma função essencial no ciclo de infecção viral. Rep não é uma replicase porém é a única proteína requerida para a replicação do genoma viral. O vetor pBGMVRNAiAHAS foi

construído a partir de um fragmento de DNA de 411 pb do gene *ACI* do BGMV ( $\Delta$ 1836-2247, acesso no GeneBank No. M88686). Dezoito linhagens de feijão foram obtidas com a construção de interferência, as quais poderão induzir o silenciamento pós-transcricional do gene *ACI*. Uma linhagem (denominada 5.1) apresentou alta resistência (aproximadamente 93% das plantas não apresentaram sintomas) após alta pressão de inoculação (mais de 300 moscas-brancas virulíferas por planta). Os siRNAs específicos foram detectados nas plantas transgênicas, ambas inoculadas e não inoculadas. Uma análise de PCR semiquantitativo revelou a presença do DNA viral nas plantas transgênicas expostas a moscas-brancas virulíferas por um período de 6 dias. Entretanto, após a retirada dos insetos, não foi detectado DNA viral após um período adicional de seis dias. Devido à importância social e econômica do feijão na América Latina e à falta de genes para resistência a doenças nos bancos de germoplasma, faz-se necessário o desenvolvimento de um programa de melhoramento associado à engenharia genética para o lançamento de novas variedades, que possibilitará a diminuição dos principais problemas relacionados a esta cultura.

## **ABSTRACT**

### **RNAI-MEDIATED RESISTANCE TO *BEAN GOLDEN MOSAC VIRUS* IN GENETICALLY ENGINEERED COMMON BEAN (*PHASEOLUS VULGARIS*)**

The production of beans, including the genus *Phaseolus* and *Vigna*, is superior to 18 million tons. Brazil is the secondlargest producer of both species genus and the major world producer of *Phaseolus*. However, its production is still below the necessary to supply the internal demand. Competition with weeds, abiotic stress and the occurrence of diseases as bean golden mosaic are some of the main problems related to its low production. *Bean golden mosaic virus* (BGMV), is transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci* in a persistent, circulative manner, and causes the golden mosaic of common bean (*Phaseolus vulgaris*) which characteristic symptoms are yellow-green mosaic of leaves, stunting, and fruit distortion. The disease is the largest constraint on bean production in Brazil and Latin America and causes severe yield losses (40 to 100%). Here we explored the RNAi concept to silence the *AC1* viral gene and generate high resistant transgenic common bean plants. Since the Rep protein performs an essential function in the viral infecting cycle, the *AC1* gene was chosen to construct the transformation vector. Rep is not the replicase, but the only protein required for the replication of the viral genome. The vector pBGMVRNAiAHAS was constructed using the 411 bp fragment from the *AC1* gene ( $\Delta$ 1836-2247, GeneBank accession No. M88686). Eighteen transgenic common bean lines were obtained with the construction to induce post-transcriptional gene silencing against *AC1* gene. One

line (named 5.1) presented high resistance (approximately 93% of plants free of symptoms) upon inoculation at high pressure (more than 300 viruliferous whiteflies per plant). Transgene-specific siRNA were detected in both inoculated and non-inoculated transgenic plants. A semi-quantitative PCR analysis revealed the presence of virus DNA in transgenic plants exposed to viruliferous whiteflies for a period of six days. However, when insects were removed, no virus DNA could be detected after an additional period of six days. Due to its social and economical importance in Latin America and to the lack of genes for resistance, it is necessary to develop an improving program associated to genetic engineering in order to generate new varieties. It Shall allow the decreasing to the production of beans.

## INTRODUÇÃO

### **Feijão (*Phaseolus vulgaris*)**

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) é um membro da família das leguminosas da tribo *Phaseolae*, subfamília *Papilionoideae*, é uma planta predominantemente autógama, domesticada há mais de 7 mil anos em dois centros de origem: a Mesoamérica (México e América Central) e a Região Andina. Acredita-se que o feijão, assim como o milho e a abóbora, tenha se originado inicialmente na América Central como planta daninha em cultivos de mandioca e batata-doce. Durante milênios, os agricultores cultivaram misturas complexas de tipos de feijão como cerca viva contra seca, doenças e ataques de pragas. Este processo produziu uma variabilidade genética muito grande, com uma variedade grande de cores, textura e tamanho de grãos, vindo ao encontro das condições de plantio e preferências de sabor, em diferentes regiões. É considerada a espécie de maior importância dentro do gênero *Phaseolus*, que compreende aproximadamente 55 espécies.

Esta cultura é a base alimentar da população brasileira, uma vez que os grãos de feijão representam uma importante fonte protéica humana nos países em desenvolvimento das regiões tropicais e subtropicais, Na maior parte dos países, a proteína de origem vegetal chega a mais de 80% do total de proteínas da dieta humana. No Brasil, é um dos componentes básicos da dieta alimentar da população e importante fonte de proteína para as classes economicamente menos favorecidas. O teor de proteína das sementes varia de 16 a 33%, sendo também um alimento

energético que contém cerca de 340 cal/100g. Além de uma fonte protéica, o feijão é também uma fonte de ferro (com 5,3 - 8,5 mg/100g), tiamina, riboflavina, niacina e vitamina K. Quando cozido o feijão contém cerca de 3% a 7% de fibras (FAO 2007).

*P. vulgaris* é a espécie mais cultivada entre as demais do gênero *Phaseolus*. Considerando todos os gêneros e espécies de feijão (*Vigna* e *Phaseolus*), a produção mundial situa-se em torno de 18,7 milhões de toneladas, ocupando uma área de 26,9 milhões de hectares (FAO, 2005). O Brasil é o maior produtor de feijão com 16,3% da produção mundial, e produziu aproximadamente quatro milhões de toneladas em lavouras temporárias e permanentes (CONAB safra de 2006/07). Apesar disso, o país é um importador, uma vez que as condições de mercado e doenças afetam consideravelmente a produção, principalmente o mosaico dourado e o mofo branco. Historicamente, o feijão é cultivado no Brasil principalmente por pequenos produtores descapitalizados, com baixo uso de insumos externos e voltados, sobretudo, para a subsistência familiar. Porém, nos últimos 20 anos houve um crescente interesse de produtores de outras classes econômicas, que vêm adotando tecnologias avançadas na cultura do feijoeiro, abastecendo períodos denominados entressafras. Como predominantemente o feijoeiro é cultivado em pequenas propriedades, esta cultura apresenta destaque na absorção elevada mão-de-obra agrícola. Estima-se que esta cultura utilize cerca de 40 milhões de homem/dia por ciclo de produção. O feijão é produzido em todas as regiões do país. A Região Nordeste detém o mais baixo índice de produtividade, decorrente da baixa utilização de insumos agrícolas e problemas com a seca. Os maiores estados produtores são Minas Gerais com 506 mil toneladas, Paraná com 557 mil toneladas, Bahia com uma produção de 426 mil toneladas,

seguidos por Goiás com 280 mil toneladas e São Paulo com aproximadamente 247 mil toneladas (CONAB, [www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br); safra de 2006/07). Suprir a crescente demanda alimentar sem destruir novas áreas naturais tem sido um dos maiores desafios da atualidade. Apesar de o Brasil ser o maior produtor mundial de feijão e a área ocupada com a cultura do feijoeiro aumentar a cada ano, sua produção ainda está aquém do necessário para suprir a demanda interna, que teve um acréscimo de 20% em relação a safra de 2004/05 (CONAB 2007). Dentre os principais problemas relacionados com a baixa produção de feijão no Brasil estão: competição com plantas daninhas, estresse hídrico e o ataque de pragas e doenças como o mosaico dourado do feijoeiro causado pelo *Bean golden mosaic virus* (BGMV). Este vírus é considerado o mais importante economicamente, constituindo um fator limitante para a produção de feijão, chegando a causar perdas de 100% inviabilizando a produção.

Devido a grande importância do feijão para as regiões onde está estabelecida esta cultura, existe um grande interesse no desenvolvimento de ferramentas tecnológicas que possam acelerar os programas de melhoramento. Com o aumento da população e conseqüentemente do consumo de feijão em países como América Latina e África, o aumento na demanda só será suprido se cultivares apresentando rendimentos mais altos, resistência múltipla a doenças, maior tolerância à seca e baixa fertilidade do solo, forem obtidas permitindo um aumento da produtividade (CIAT 2002).

## **Transformação genética de feijoeiro**

A transformação genética de vegetais superiores tem tido avanços consideráveis nas últimas duas décadas, uma vez que, grandes melhorias foram alcançadas com a cultura de tecidos, biologia molecular, bioquímica, passando a se entender melhor os organismos e a poder trabalhar mais intensamente o seu material genético. A tecnologia do DNA recombinante abriu a possibilidade de se isolar e clonar genes exógenos como os de bactérias, vírus, plantas e animais, introduzi-los e expressá-los em plantas, rompendo desta forma, a barreira do cruzamento entre espécies e até entre diferentes reinos. A transformação genética permite a introdução de genes específicos no genoma de cultivares comerciais, auxiliando os programas de melhoramento e permitindo o fluxo de genes (transgenes) para plantas, os quais seriam impossíveis de serem transferidos através de cruzamentos sexuais ou fusão de genomas.

Um método efetivo e reprodutível de regeneração de plantas, a partir de células ou tecidos, é essencial em estudos de genética e melhoramento envolvendo a transferência de genes pela engenharia genética. Os métodos de transformação somente terão sucesso se um protocolo eficiente de regeneração de plantas a partir de tecidos potencialmente transformáveis estiver previamente estabelecido.

O desenvolvimento de uma tecnologia para introdução direta de genes pelo processo chamado de biobalística (bombardeamento de partículas) foi fundamental. O processo de biobalística foi inicialmente proposto por Sanford *et al.* (1987), com o objetivo de introduzir material genético no genoma nuclear de plantas superiores.

Desde então, sua universalidade de aplicações tem sido avaliada, demonstrando ser um processo também efetivo e simples para a introdução e expressão de genes em bactérias, fungos, protozoários, algas, insetos e tecidos animais (Klein *et al.*, 1992; Sanford *et al.*, 1993; Aragão *et al.*, 1992, Trinks *et al.*, 2005; Seo *et al.*, 2004; Hazell *et al.* 2000; Harrier & Millam 2001). Recentemente, Chellappan *et al.* (2005) utilizaram o processo de biobalística para produzir plantas transgênicas de mandioca.

A biobalística utiliza microprojéteis de ouro ou tungstênio acelerados a altas velocidades (superiores a 1.500km/h) para carrear e introduzir ácidos nucléicos e outras moléculas em células e tecidos *in vivo*. Os sistemas desenvolvidos baseiam-se na geração de uma onda de choque com energia suficiente para deslocar micropartículas cobertas com ácidos nucléicos. A onda de choque pode ser gerada através de uma explosão química (pólvora seca), uma descarga de gás hélio a alta pressão, pela vaporização de uma gota de água através de uma descarga elétrica com alta voltagem e baixa capacitância ou a baixa voltagem e alta capacitância. As micropartículas aceleradas penetram na parede e membrana celular de maneira não-letal, localizando-se aleatoriamente nas organelas. Em seguida, o DNA é dissociado das micropartículas pela ação do líquido celular, ocorrendo o processo de integração do gene exógeno no genoma do organismo a ser modificado. Uma das vantagens do sistema de transformação através do processo de biobalística é que este permite a introdução e expressão gênica em diferentes tipos celulares. Isso permite a transformação *in situ* de células do meristema apical. O processo de biobalística não depende de um tipo particular de célula e qualquer fragmento de DNA, circular ou linear, pode ser introduzido por esta metodologia de transformação, mostrando-se

desta forma vantajoso a outros métodos (Vianna *et al.*, 2004). Uma outra vantagem da biobalística é a capacidade de transferir múltiplos genes utilizando uma mistura de diferentes construções durante a transformação (Chen *et al.*, 1998).

Uma etapa importante dos sistemas de transformação genética é a seleção das células que incorporaram o gene de interesse. O uso de um bom marcador de seleção é fundamental para a recuperação eficiente de plantas transgênicas. O marcador de seleção confere caráter dominante às células transformadas, resultantes da incorporação de nova característica, que não está presente nas células não transformadas (Brasileiro & Aragão 2001, Bowen, 1993). O uso de genes marcadores de seleção é determinante para conferir às células transformadas uma vantagem seletiva de crescimento em relação às células não transformadas que provavelmente irão morrer.

O gene marcador de seleção *bar*, amplamente utilizado para selecionar transformantes, foi isolado de *Streptomyces hygroscopicus* e confere resistência ao herbicida bialafos (glifosinato de amônio), um tripeptídeo composto por dois resíduos de L-alanina e um resíduo de fosfotricina (PPT), um análogo do glutamato. O gene *bar* codifica para a enzima fosfotricina-N-acetiltransferase (Murakami *et al.*, 1986). PPT (composto ativo dos herbicidas comerciais Basta<sup>TM</sup>, Liberty<sup>TM</sup> e Herbiace<sup>TM</sup>) é um inibidor da glutamina sintase (GS), uma enzima que converte glutamato em glutamina e remove a amônia tóxica da célula (Skokut *et al.*, 1978). O tripeptídeo intacto tem pouca ou nenhuma atividade *in vitro*. Peptídeos intracelulares removem os resíduos de alanina e liberam o PPT ativo (Thompson *et al.*, 1987; Lutz *et al.*, 2001). A inibição da enzima GS causa a morte da planta devido ao efeito fitotóxico do

acúmulo de amônia e ruptura dos cloroplastos inibindo a fotossíntese (Lindsey, 1992). A enzima fosfinotricina-N-acetiltransferase realiza uma detoxificação, permitindo que as células sobrevivam mesmo em presença do herbicida.

Um sistema de seleção baseado no uso do herbicida imazapyr para selecionar células meristemáticas transgênicas de soja foi desenvolvido e mostrou-se altamente eficiente, aumentando em 200 vezes a frequência de transformação quando comparada com aquela obtida em outros sistemas de seleção previamente existentes (Aragão *et al.*, 2000). Em algodão, a seleção com imazapir permitiu um aumento de 100 vezes na frequência de transformação (Aragão *et al.*, 2005). O imazapyr é um herbicida da classe das imidazolinonas, de amplo espectro, tendo excelente atividade contra plantas daninhas gramíneas ou de folhas largas, perenes e anuais. O imazapyr inibe a atividade enzimática da acetolactato sintase (ALS ou AHAS), uma enzima da rota metabólica da síntese de aminoácidos ramificados (valina, leucina e isoleucina) (Shaner *et al.*, 1984). A enzima AHAS também é o alvo de outras famílias de herbicidas como as sulfonilureas (Chaleff & Mauvais, 1984; Sing *et al.*, 1988; Oxtoby & Hughes, 1990). O herbicida imazapyr é prontamente absorvido por folhas e raízes e rapidamente translocado para as regiões meristemáticas da planta onde é acumulado. Embora o fim do crescimento e morte da região meristemática ocorra logo após a aplicação, os sinais da morte da planta não são imediatamente observados. O gene marcador *ahas* mutado, isolado de *Arabidopsis thaliana*, codifica para uma proteína que contém uma modificação na posição 653, onde uma serina é substituída por uma asparagina. Esta alteração faz com que a enzima torne-se especificamente tolerante aos herbicidas da classe das imidazolinonas (Sathasivan *et al.*, 1990).

O feijão foi considerado por muitos anos como uma planta recalcitrante à manipulação pela tecnologia do DNA recombinante devido ao fato de não ter sido possível regenerar plantas. Porém, numerosos esforços vêm sendo feitos para gerar plantas de feijão a partir de células e tecidos. Organogêneses *in vitro* a partir de nós cotiledonares foram descritos (Nagl *et al.*, 1997, Svetleva *et al.*, 2003). Além disso, indução de multibrotação apical e lateral de regiões meristemáticas também têm sido demonstradas (Kantha *et al.*, 1981, Martinss & Sondahl, 1984) e mais recentemente Albino *et al.* (2005), obtiveram plantas férteis de *P. vulgaris* regeneradas *de novo* via organogênese de eixos embrionários maduros. Entretanto, a transformação do feijoeiro só foi possível após o desenvolvimento do eficiente protocolo de cultura de tecidos onde ocorre a indução de multibrotação, alongação e enraizamento (Aragão *et al.*, 1996; Aragão & Rech, 1997). As multibrotações são formadas na região do meristema apical (Aragão & Rech, 1997) através do cultivo de embriões maduros na presença de citocininas, zeatina e benzylaminopurina (BAP) (Karta *et al.*, 1981; Martins & sondahl, 1984; McClean & GraFTON, 1989; Franklin *et al.*, 1991; Malik & Saxena, 1992; Mohamed *et al.*, 1992, 1993; Aragão & Rech, 1997).

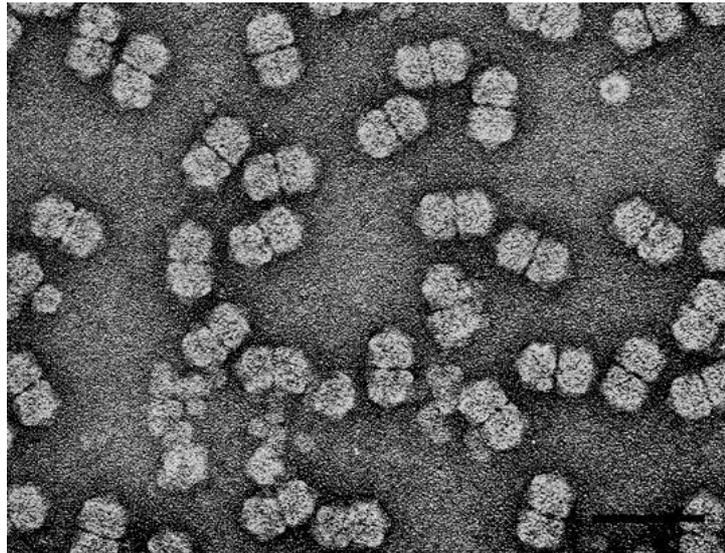
A transformação genética vem contribuindo substancialmente para o melhoramento genético do feijão, permitindo a introdução de genes com características desejáveis. A metodologia de transformação genética do feijoeiro (*P. vulgaris*) que utiliza o processo de biobalística em embriões (Aragão *et al.*, 1996) apresenta ainda baixa eficiência. Uma frequência de 0,9% foi obtida por Aragão *et al.* (1996) usando vetor fechado na transformação e o antibiótico canamicina como agente seletivo, porém, por questões de biossegurança, a utilização de antibióticos na

seleção de transformantes deixou de ser o processo preferido na geração de produtos comerciais. Um aumento significativo na frequência de transformantes, aproximadamente 0,2% (Vianna *et al.*, 2004) e 0,3%, (Faria *et al.*, 2004), foi obtido quando vetores lineares foram utilizados na transformação genética e os brotos foram tratados com o herbicida glufosinato (solução aquosa contendo 0,03% de Liberty<sup>TM</sup>) como marcador de seleção. Uma vez que a transformação genética do feijoeiro somente tem sido possível pela transformação de células meristemáticas apicais de eixos embrionários, a seleção destas células com o herbicida imazapyr foi apresentada como uma alternativa promissora. Do ponto de vista dos aspectos de biossegurança a serem considerados, o herbicida imazapyr é de baixa toxicidade para mamíferos, uma vez que a biossíntese da valina, leucina e isoleucina, não ocorrem em animais (Mazur & Falco, 1989; Oxtoby & Hughes, 1990).

## **Geminivírus**

Os geminivírus constituem um grupo de vírus de plantas de grande importância econômica em todos os continentes em diversas culturas. No Brasil, as doenças causadas pelos vírus que vieram a constituir a família *Geminiviridae* foram reconhecidas no início da década de 60, por Costa (1965) e Flores & Siberschmidt (1962). Problemas como a restrição parcial ao floema, ausência de transmissão mecânica para os primeiros geminivírus estudados e baixa estabilidade das partículas virais, contribuíram para uma longa demora até o reconhecimento oficial deste grupo

de vírus pelo International Committee on Taxonomy Virus (ICTV). O nome geminivírus é derivado da estrutura da partícula viral, formado por dois icosaedros incompletos geminados (Figura 1). Todos os geminivírus possuem genoma composto por DNA circular de fita simples (ssDNA), que se replica no núcleo de células infectadas via um DNA intermediário de fita dupla.



**Figura 1.** Micrografia eletrônica mostrando partículas de geminivírus (Cortesia de Faria, J.C. & Zerbini, F.M., 2000).

Além de sua importância econômica, os geminivírus são modelos ideais para o estudo de replicação e expressão gênica em plantas, devido ao fato de se replicarem no núcleo da célula hospedeira. Esses estudos geraram uma enorme quantidade de informações a respeito da biologia molecular dos geminivírus (Fontes *et al.*, 1992, 1994, Trinks *et al.*, 2005; Shivaprasad *et al.* 2005). Atualmente, a pesquisa básica em geminivírus busca principalmente a caracterização de fatores do hospedeiro que interagem com o vírus durante o processo de patogênese. Já a pesquisa aplicada busca principalmente fontes de resistência a geminivírus nas culturas afetadas por esses patógenos, de forma a reduzir as perdas causadas por eles (Fuentes *et al.*, 2006; Abhary, 2006).

A família *Geminiviridae* é dividida em quatro gêneros que são classificados de acordo com o hospedeiro, organização genômica e espécie vetora (Palmer & Rybicki, 1998; Fauquet *et al.*, 2000): os membros do gênero *Mastrevirus* têm o genoma monopartido, são transmitidos por cigarrinhas (Homóptera Cicadellidae) e infectam principalmente monocotiledôneas; os do gênero *Curtovirus* que também possuem genoma monopartido são transmitidos por cigarrinhas (Homoptera Cicadellidae) sendo seus hospedeiros as dicotiledôneas, dificilmente são transmitidos mecanicamente e possuem ampla gama natural de hospedeiros. Na reunião do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) de 1999 foi criado um quarto gênero de geminivírus, denominado *Topocuvirus*, o qual inclui somente o *Tomato pseudo-curly top virus* que possui genoma monopartido e é transmitido por cigarrinhas (Homóptera Auchenorrhyncha) a espécies dicotiledôneas (Van Regenmortel *et al.*, 1999). Os membros do gênero *Begomovirus* possuem o genoma bipartido sendo transmitidos por moscas-brancas (Homóptera Aleyrodidae) para plantas dicotiledôneas. Os geminivírus são considerados um grupo emergente de fitovírus, devido ao grande aumento da incidência e severidade de doenças por eles causadas nas últimas décadas (Brown & Bird, 1992). São largamente distribuídos, principalmente em regiões dos trópicos e subtropicais, ocorrendo em espécies importantes para a alimentação humana como a mandioca, feijão e milho (Timmermans *et al.*, 1994).

A incidência da doença depende de alguns parâmetros como a população do vetor, as condições ambientais, períodos de chuva e estágio de desenvolvimento da planta quando ocorre a transmissão do vírus.

Os *Begomovirus* são considerados um grupo de fitopatógenos importante economicamente, e constituem um fator limitante para a produção de feijão, tomate, pimenta e mandioca, principalmente em países tropicais e sub-tropicais (Brown & Bird, 1992; Polston & Anderson, 1997).

Os *Begomovirus* possuem um genoma bipartido ou monopartido constituído por moléculas de DNA fita simples com aproximadamente 2,6kb cada, chamadas de DNA-A e DNA-B, no caso dos begomovírus bipartidos. Os begomovírus possuem ponto termal de inativação entre 50 e 55°C, e longevidade *in vitro* de 48 horas à temperatura ambiente (Galvez & Castaño, 1976; Bird *et al.*, 1977).

O DNA A contém de quatro a seis ORFs: *AC1* que codifica a proteína associada à replicação (Rep) essencial para a replicação do DNA e associação com a DNA polimerase do hospedeiro; *AC2* que codifica para a proteína ativadora da transcrição (TrAP) responsável pela regulação da expressão gênica; *AC3* que codifica para a proteína associada com a maior eficiência da replicação (REn); *AV1* e *AV2* codificam as proteínas capsidiais e *AC4* que codifica para a proteína relacionada com a multiplicação viral. O DNA-B possui duas ORFs: *BV1*, que codifica a proteína NSP (*nuclear shuttle protein*) que está envolvida no movimento intercelular e *BC1* que codifica para a proteína de movimento (MP, *movement protein*) relacionada ao movimento do vírus de uma célula a outra e a longa distância na planta, que são determinantes dos hospedeiros e os sintomas da doença (Hanley Bowdoin *et al.*, 1999). O DNA-A e DNA-B possuem pequena homologia de seqüência, exceto por uma região de aproximadamente 200 nucleotídeos chamada região comum (CR, *common region*) onde se encontram sinais para reconhecimento de processos comuns

a ambos os genomas: replicação (origem de replicação, iterons), iniciação da transcrição e encapsidação (Lazarowitz, 1992) e a seqüência de ligação reconhecida pela proteína Rep (Arguelo & Astorga, 1994).

A proteína associada à replicação (Rep) tem sido alvo de um grande número de estudos nos últimos anos. Mutagênese *in vitro* e expressão da proteína em plantas transgênicas demonstraram que a proteína Rep é a única proteína viral essencial para a replicação (Hayes & Buck, 1989; Hanley-Bowdoin *et al.*, 1990). O gene *AC1* exerce uma função essencial no ciclo de infecção viral. Rep não é considerada uma replicase porém, esta proteína possui várias funções associadas com a replicação: (1) dirigir o complexo replicativo para a origem de replicação, com propriedade de ligação específica a DNA de fita simples e dupla (Fontes *et al.*, 1992; Thommes *et al.*, 1993), (2) desnover o DNA molde (atividade de helicase) (Gorbalenya *et al.*, 1990), (3) clivar o DNA e iniciar a replicação via círculo rolante (Koonin & Ilyna, 1992; Stanley, 1995); e (4) separar os genomas após a replicação (atividade de nuclease e ligase) (Koonin & Ilyna, 1992). A Rep está envolvida na regulação e repressão de sua própria síntese ao nível da transcrição (Haley *et al.*, 1992; Sunter *et al.*, 1993). A proteína age na forma de multímeros, com domínios responsáveis pela oligomerização, ligação ao DNA e clivagem do DNA (Orozco *et al.*, 1997). O sítio de ligação para Rep é requerido não só para o reconhecimento da origem de replicação mas também para a regulação negativa da transcrição do gene *AC1* (Eagle *et al.*, 1994). Outra função da proteína Rep é a de induzir, indiretamente, a expressão de proteínas responsáveis pela síntese de DNA do hospedeiro em células diferenciadas, criando um ambiente que permite uma eficiente replicação viral (Ach *et al.*, 1997). Rep também interage com

outras proteínas (Morilla *et al.*, 2006) e com a proteína REn (Settlage *et al.*, 2005) induzindo genes celulares requeridos para o acúmulo de DNA viral.

AC2 codifica para a proteína viral TrAp que participa da ativação de genes do hospedeiro e também atua como supressor do silenciamento (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999; Voinnet *et al.*, 1999; Vanitharani *et al.*, 2004; Trinks *et al.*, 2005). Trinks *et al.* (2005) obtiveram uma reversão do silenciamento de GFP na presença de AC2 e mostraram que em begomovírus a supressão do silenciamento é uma função secundária do ativador de transcrição viral AC2. Trabalhos prévios com AC2 de *African cassava mosaic virus* (ACMV) mostrou que a formação dos siRNA, característicos do silenciamento mediado por RNA, foram reduzidos mas não eliminados na presença de AC2 (Hamilton *et al.*, 2002). A identificação de diferentes proteínas que interferem no processo de silenciamento, implica que estas proteínas possuem um papel diferente e conseqüentemente poderiam atuar em caminhos diferentes do silenciamento, ou poderiam interagir com diferentes proteínas do hospedeiro contribuindo com a supressão do silenciamento mediado por RNA. Vanitharani *et al.* mostraram que AC4 de ACMV-[CM] e *Sri-Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) foram capazes de suprimir a indução do silenciamento comparado com AC2 de ACMV-[CM] que mostrou pouca atividade de supressão.

AC3 é um fator de amplificação da replicação viral. Embora não seja essencial para que a replicação ocorra, provoca um acúmulo de DNA viral muito maior quando está presente (Morris *et al.*, 1991). A replicação do *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), na ausência de REn, é reduzida em cerca de 50 vezes (Sunter *et al.*, 1990). Experimentos realizados por Settlage *et al.* (1996) demonstraram que ocorre interação

entre as proteínas Rep e REn, formando oligômeros funcionais, responsáveis pelo aumento da eficiência da replicação viral. Esses autores sugerem que a REn estabiliza o complexo de replicação formado por Rep e fatores do hospedeiro. Estas proteínas podem ainda interagir com fatores da planta pela formação de complexos multiméricos (Selth *et al.*, 2005; Settlage *et al.*, 2005).

A proteína capsidial (CP) é uma proteína multifuncional. Ela determina a especificidade do vetor (Hofer *et al.*, 1997; Hohnle *et al.*, 2001) e protege o DNA viral durante a aquisição pelo inseto vetor (Azzam *et al.*, 1994) ou transmissão mecânica (Frischmuth & Stanley, 1998). A proteína capsidial é necessária para a infecção sistêmica de alguns geminivírus é dispensável para a maioria dos outros (Qin *et al.*, 1998). Outra função da CP parece estar relacionada à movimentação célula-a-célula do vírus e transmissão pelo vetor (Mullineaux *et al.*, 1984; Höfer *et al.*, 1997). Briddon *et al.* (1990) demonstraram que a troca do gene CP do *African cassava mosaic virus* (ACMV), transmitido por mosca-branca, pelo correspondente do *Beet curly top virus* (BCTV), transmitido por cigarrinha, resultou na alteração de especificidade do inseto vetor.

O sítio de replicação de geminivírus está confinado ao núcleo de células infectadas e é totalmente dependente da maquinaria do hospedeiro, o que faz com que eles sejam modelos ideais para o estudo da replicação e expressão gênica em plantas. Esse fato possibilitou um grande acúmulo de informações sobre a biologia molecular destes vírus. As partículas virais acumulam-se exclusivamente no núcleo, na forma de agregados irregulares ou arranjos cristalinos hexagonais (Kim *et al.*, 1978).

Uma vez no núcleo, a replicação dos *Begomovirus* ocorre através da fita complementar que serve de molde para a síntese de várias cópias do DNA genômico, que formam uma longa fita simples de DNA linear contendo vários genomas unitários (multímero ou concatâmero). O multímero é clivado gerando monômeros (os DNAs genômicos), que serão religados gerando moléculas circulares de ssDNA correspondentes ao genoma viral, as quais por sua vez serão encapsulados formando os vírions (Lazarowitz, 1992; Timmermans *et al.*, 1994; Laufs *et al.*, 1995). A origem de replicação (*ori*) está localizada na região intergênica comum entre os dois componentes genômicos. A *ori* possui uma organização modular, com pelo menos três módulos funcionais caracterizados por Fontes *et al.* (1994b). A sequência de nucleotídeos da região comum é altamente conservada para uma dada espécie viral, mas variável entre diferentes espécies de vírus, com exceção de um elemento de 30 nucleotídeos essencial para a replicação (Lazarowitz, 1992).

### ***Bean golden mosaic virus (BGMV)***

O mosaico dourado do feijoeiro foi inicialmente descrito pelo Dr. Álvaro Santos Costa como uma doença que, inicialmente, não teria importância econômica ocorrendo 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 ou *Bean golden mosaic virus* (BGMV), um geminivírus. 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. Este inseto é combatido no campo com a utilização de inseticidas, na tentativa de controle da doença. Essa doença está hoje disseminada por todas as áreas produtoras de feijão do Brasil. Doença semelhante é encontrada em outros países das Américas, causada pelo *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV).

Os isolados do BGMV não podem ser transmitidos por inoculação mecânica (Costa, 1969; 1976). Entretanto, os isolados do BGMV podem ser transmitidos através da introdução dos componentes A e B através do processo de biobalística (Aragão *et al.*, 1995). A transmissão por mosca branca é do tipo circulativa, envolvendo a passagem de partículas virais do intestino para a hemolinfa do inseto, da hemolinfa para as glândulas salivares e da saliva para outras plantas. A eficiência da transmissão está relacionada à concentração do vírus na planta e à duração do período de aquisição

(Timmermans *et al.*, 1994). A mosca-branca (*B. tabaci* Genn, Homoptera Aleyrodidae) é um inseto polífago que se alimenta de mais de 500 espécies de planta, incluindo muitas culturas importantes na agricultura como tomate, feijão, algodão, melão entre outras. A mosca-branca tem se difundido ao redor do mundo causando perdas significantes a culturas em regiões agrícolas tropicais e subtropicais devido à sua natureza polífaga, os efeitos tóxicos da sua saliva, a habilidade de desenvolver populações grandes e a resistência a uma grande gama de inseticidas (Polston & Anderson, 1997). *B. tabaci* é também um vetor de viroses de plantas, sendo considerado um dos mais importantes vetores destes patógenos. Esta espécie é capaz de transmitir vírus de seis famílias.

Quanto aos sintomas, inicia-se pelas nervuras com o amarelamento 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.



**Figura 2.** Planta de feijão mostrando detalhes dos sintomas causados pelo vírus do mosaico dourado do feijoeiro após a inoculação com moscas-brancas virulíferas

## **Estratégias para resistência a vírus em plantas geneticamente modificadas**

Desde o início dos anos 1990 existe um grande interesse em desenvolver estratégias baseadas na tecnologia do DNA recombinante para geração de plantas de feijão resistentes ao BGMV. Isso se dá porque, apesar da análise de uma grande gama de genótipos de feijão para resistência ao BGMV, nenhum genótipo com alto nível de resistência tem sido encontrado. A resistência é insatisfatória em cultivares comerciais que são susceptíveis e apresentam infecções moderadas ou severas (Garrido-Ramirez *et al.* 2000; Morales & Anderson 2001; Seo *et al.*, 2004).

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 se inoculando plantas de fumo com uma estirpe fraca de vírus do mosaico do fumo, ao tentar re-inocular 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. 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 homólogos ao que forneceu a capa. Sem se importar com qual que fosse o mecanismo, a tecnologia recebeu a denominação de *pathogen derived resistance*, ou em português “resistência derivada do patógeno”. Esta estratégia para se obter plantas resistentes é uma das mais utilizadas (Prins, 2003).

O DNA de vários isolados do BGMV, tanto do Brasil como de outros países vem sendo seqüenciados e utilizados em estratégias para obtenção de resistência a esta doença (Aragão *et al.*, 1998; Faria *et al.*, 2006). Algumas estratégias de engenharia genética para obter resistência a viroses em plantas transgênicas têm sido feitas (Seo *et al.*, 2004; Wintermantel & Zaitlin, 2000). Para resistência a begomovirose, a maioria das estratégias está envolvida com a expressão de genes defectivos truncados (Kunik *et al.* 1994; Hong *et al.* 1996; Noris *et al.* 1996; Duan *et al.* 1997; Brunetti *et al.* 2001; Lucioli *et al.*, 2003; Chellappan *et al.*, 2004) e RNA antisense (Day *et al.*, 1991; Bejarano & Lichtenstein, 1994; Bendahmane & Gronenborn, 1997; Aragão *et al.* 1998, Asad *et al.* 2003).

A primeira demonstração da expressão de proteínas virais foi feita em plantas transgênicas de tabaco expressando a proteína da capa (CP) do *Tabaco mosaic virus* (TMV) (Abel *et al.*, 1986). A proteína da capa é requerida em infecções de geminivírus monopartidos (Briddon *et al.*, 1989; Rojas *et al.*, 2001), enquanto que em begomovírus bipartidos esta proteína não é absolutamente necessária, pois a NSP pode substituir a função de CP no transporte viral (Ingham *et al.*, 1995; Poorna *et al.*, 1996). Neste caso, tem-se assumido que a estratégia de resistência mediada pela proteína CP contra geminivírus que possuem genomas bipartidos não produzem altos níveis de expressão (ver Revisão em Vandershuren *et al.*, 2007). Nenhuma resistência foi observada em feijão transgênico expressando a proteína CP contra a infecção do BGMV (Azzam *et al.*, 1996) nem em plantas de *Nicotiana benthamiana* expressando CP do ACMV (Frismuth & Stanley, 1998).

A estratégia de RNA antisense foi empregada para vírus de diferentes grupos, tais como comovírus (Cuozzo *et al.*, 1988), potyvírus (Hemmenway *et al.* 1988), tobamovírus (Powell *et al.* 1989) 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 em infecções de geminivírus e caulimovírus (Wilson, 1993). Esta tecnologia de RNA antisense pode ser uma das melhores opções para a expressão de RNA fita dupla, os quais poderiam levar ao silenciamento, pela geração dos pequenos RNAs podendo ocorrer a metilação sítio específico (Aufsatz *et al.*, 2002; Zilberman *et al.*, 2004). Em geral, é proposto que essas seqüências interfeririam, em nível traducional, de forma direta ou indireta, podendo ser em nível nuclear ou citoplasmático. Em 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 em 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.

Como mencionado anteriormente, a proteína Rep está diretamente ligada às etapas de clivagem e ligação no processo de replicação viral (Fontes *et al.*, 1994; Heyraud-Nitschke *et al.*, 1995). Rep também forma complexos com ela mesma e com outras proteínas, sendo um regulador chave na interação com fatores regulatórios do ciclo celular da planta (Kong *et al.*, 2000; Kong & Hanley-Bowdoin, 2002). Além disso, Rep interage com outras proteínas celulares (Morilla *et al.*, 2006) e com a proteína REn (Settlage *et al.*, 2005). Esta função crucial no ciclo de replicação e a múltipla interação feita com a REn torna a proteína Rep um excelente alvo para a estratégia de proteínas mutadas. Outra estratégia para obtenção de resistência a geminivírus em plantas geneticamente modificadas envolve a expressão de um gene mutado da Rep e é chamada de transdominância letal. Esta estratégia gera uma proteína não funcional que se acumularia e competiria com a Rep ativa, produzida pelo vírus, diminuindo ou impedindo a replicação viral (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 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 & Maxwell, 1999).

## **Silenciamento Gênico**

Vários termos incluindo RNA interferente (RNAi), silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS), silenciamento gênico e *quelling* vem sendo usados para se

referir ao silenciamento gênico mediado por RNA. Entretanto as bases genéticas e moleculares destes mecanismos são similares. Estes processos certamente têm revolucionado pesquisas fundamentais na biologia molecular envolvendo a direção e controle dos estágios de desenvolvimento para estabelecer o silenciamento gênico pós transcricional (Caplen, 2004; Hutvagner & Zamore 2002).

O início do silenciamento do RNA por expressão heteróloga começa após a introdução de um gene, ou fragmento de um gene, que é complementar a um gene alvo endógeno dentro da célula hospedeira. Esse mecanismo foi primeiramente descrito em plantas na tentativa de superexpressar um gene chave na biossíntese da antocianina em petúnia (Napoli *et al.*, 1990; van der Krol *et al.*, 1990). Ao contrário do esperado, a pigmentação nas plantas transformadas não aumentou e sim ocorreu uma despigmentação e uma alta redução no nível de transcritos (mRNA) do gene endógeno. Tanto o transgene quanto o gene endógeno foram suprimidos. Este fenômeno observado foi chamado de co-supressão.

Esta maquinaria de silenciamento inclui a ribonuclease DICER, uma enzima homóloga à RNase III de *Escherichia coli* que apresenta um domínio de ligação de dsRNAs e domínios helicase (Bernstein *et al.*, 2001), uma RNA polimerase RNA-dependente (RdRp) e uma proteína Argonauta (AGO).

Neste processo de silenciamento moléculas de RNA fita-dupla (dsRNA) são clivadas pela ribonuclease DICER em pequenos RNA interferentes (siRNA), com 21 a 25 nucleotídeos, que incluem ambos fragmentos senso e antisense da sequência do gene silenciado (Bernstein *et al.*, 2001; Zamore *et al.*, 2001; Elbashir *et al.*, 2001). A atividade da RNA helicase promove o desenrolamento e separação da dupla cadeia de

siRNA (reação ATP-dependente), estes siRNAs são então incorporados a um segundo complexo enzimático chamado “complexo de silenciamento induzido por RNA” (RISC, *RNA induced silencing complex*), a partir da extremidade 5’ desenrolada (Hammond *et al.*, 2000; Hammond *et al.*, 2001; Kretschmer-Kazemi Far & Sczakiel, 2003). Esta endoribonuclease usa a fita antisenso do siRNA, como *primer*, para encontrar e degradar a seqüência complementar do mRNA alvo a partir da extremidade 3’ (Hannon, 2002).

Lipardi *et al.* (2001) propõem que em plantas os pequenos RNA (siRNA) são usados como *primers* para gerar dsRNA que são subsequentemente clivados pela ação da RNase III em novos siRNAs, demonstrando que repetidos ciclos de síntese de dsRNA resultam na degradação do mRNA em um ciclo de “PCR degradativo”.

Pequenas moléculas de RNA, ambas senso e anti-senso, vem sendo detectadas durante os primeiros estágios do silenciamento em vários organismos, evidenciando a formação de um intermediário dsRNA antes da formação dos siRNA. A observação de que dsRNA é um potente ativador do silenciamento comparado com RNA fita simples ou RNA anti-senso é consistente com isso (Waterhouse *et al.*, 1998; Martinez *et al.*, 2002). Hamiltom e Baulcombe (1999) foram os primeiros a demonstrar que pequenos RNA mais tarde denominados pequenos RNA interferentes (siRNA) estão relacionados com o silenciamento. Eles observaram, em três espécies de plantas transgênicas silenciadas, pequenos fragmentos de RNAs que eram complementares aos genes alvos estudados. Sugeriram então, que os siRNAs que ocorreram nas plantas foram grandes o suficiente para definir a especificidade da seqüência que foi requerida no processo de silenciamento, porém foi pequena o suficiente para passar para o

plasmodesmo, corroborando com a idéia de que siRNA adicionalmente estão envolvidos no silenciamento sistêmico. A transcrição de uma fita senso ou de uma antisenso sozinha não é suficiente para causar supressão, evidenciando mais uma vez que o silenciamento é mediado por dsRNA.

O PTGS está diretamente envolvido na degradação específica de mRNA alvo. Se um transgene é engenherado para sintetizar RNA fita dupla (dsRNA) então uma ou poucas cópias são suficientes para induzir o silenciamento. Estes transgenes produzem dsRNA em um ou vários casos: na transcrição de uma repetição invertida para gerar um longo grampo nos mRNAs (Waterhouse *et al.*, 1998; Tavemarakis *et al.*, 2000; Kennerdel *et al.*, 2000; Fortier & Belote, 2000; Martinek & Young, 2000); na transcrição de fitas senso e antisenso por promotores opostos ou co-transcrição de transgene senso com um transgene antisenso (Wang *et al.*, 2000).

Além da degradação do mRNA, o silenciamento em plantas atua em alguns outros níveis, incluindo supressão transcricional e metilação do DNA (Wassenegger & Pelissier, 1998; Mette *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2001), processamento pré-mRNA (Mishra & Handa, 1998) e tradução (Van Houdt *et al.* 1997).

Em plantas, o silenciamento por RNA está envolvido com resistência a vírus, a regulação da expressão de genes endógenos, formação da heterocromatina e repressão de transposons (Baulcombe, 2005; Waterhouse *et al.*, 2001). Muitos estudos vêm sendo conduzidos utilizando esta tecnologia para se obter resistência a vírus de plantas (Al-Kaff *et al.*, 1998; Chellappan *et al.*, 2004b; Lucioli *et al.*, 2003). Vetores têm sido desenvolvidos para expressão e processamento eficiente da formação de RNA fita dupla (Wesley *et al.*, 2001; Miki & Shimamoto, 2004). Sequências senso e antisenso

são posicionadas entre um intron o qual sofrerá um *splicing* favorecendo o pareamento entre as seqüências e formação de dsRNA, o qual desencadearia toda a maquinaria de silenciamento, resultando em uma maior probabilidade de degradação do gene alvo (Smith *et al.*, 2000; Wesley *et al.*, 2001).

Além do silenciamento do RNA intracelular, existe também a transmissão do estado de silenciamento entre as células (Palauqui *et al.* 1997; Voinnet & Baucombe, 1997; Voinnet *et al.*, 1998). Em plantas o sinal de silenciamento move célula-a-célula através do plasmodesma e a grandes distâncias pelo sistema vascular. Uma possibilidade deste sinal extracelular de silenciamento em plantas é antiviral. O sinal poderia se mover junto, ou em um estágio anterior à infecção pelo vírus, e mediar o silenciamento do RNA viral em células já infectadas. Conseqüentemente, a infecção progrediria mais lentamente ou seria interrompida.

## **OBJETIVOS**

### **Geral**

- Obter plantas de feijão resistentes ao *Bean golden mosaic vírus* (BGMV) através da estratégia de RNA interferente (RNAi).

### **Específicos**

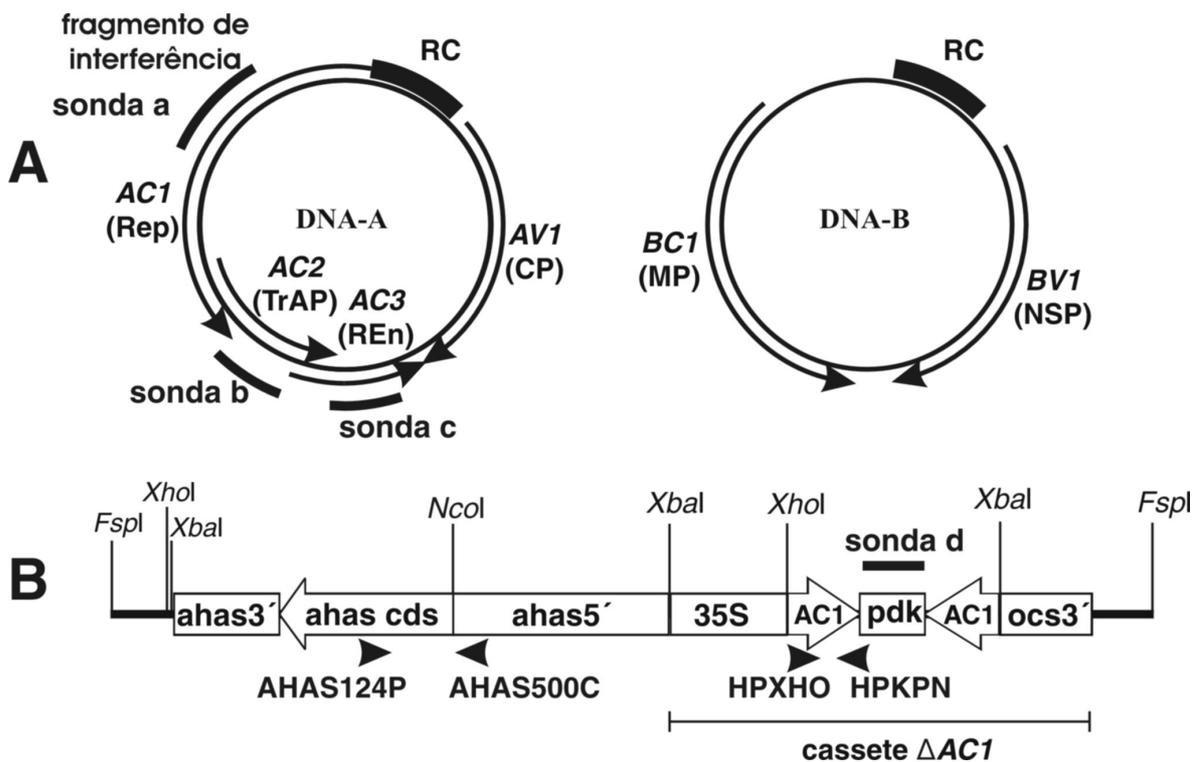
- Obter de plantas geneticamente modificadas de feijão via biobalística com o uso de um novo sistema de seleção baseado em um herbicida da classe das imidazolinonas, baseada no silenciamento de genes virais, através do desenvolvimento de vetores com RNA interferente (hpRNA) contendo regiões conservadas do gene da proteína associada à replicação (*rep*);
- Caracterizar molecularmente as plantas transformadas, para determinar a presença dos transgenes e siRNAs;
- Realizar caracterização biológica das linhagens obtidas pela observação fenológica e determinação da resistência ao BGMV pela inoculação com moscas-brancas virulíferas

## **HIPÓTESE**

Os fragmentos senso e antisense produzirão um dsRNA (RNA fita dupla) que ativar­á o mecanismo de silenciamento pós-transcricional, silenciando assim o mRNA (RNA mensageiro) de um gene vital para o vírus, gerando plantas resistentes.

## METODOLOGIA

O diagrama a seguir (FIGURA 3) mostra representação esquemática do genoma do BGMV e do fragmento do vetor usado na transformação de plantas de feijão comum.

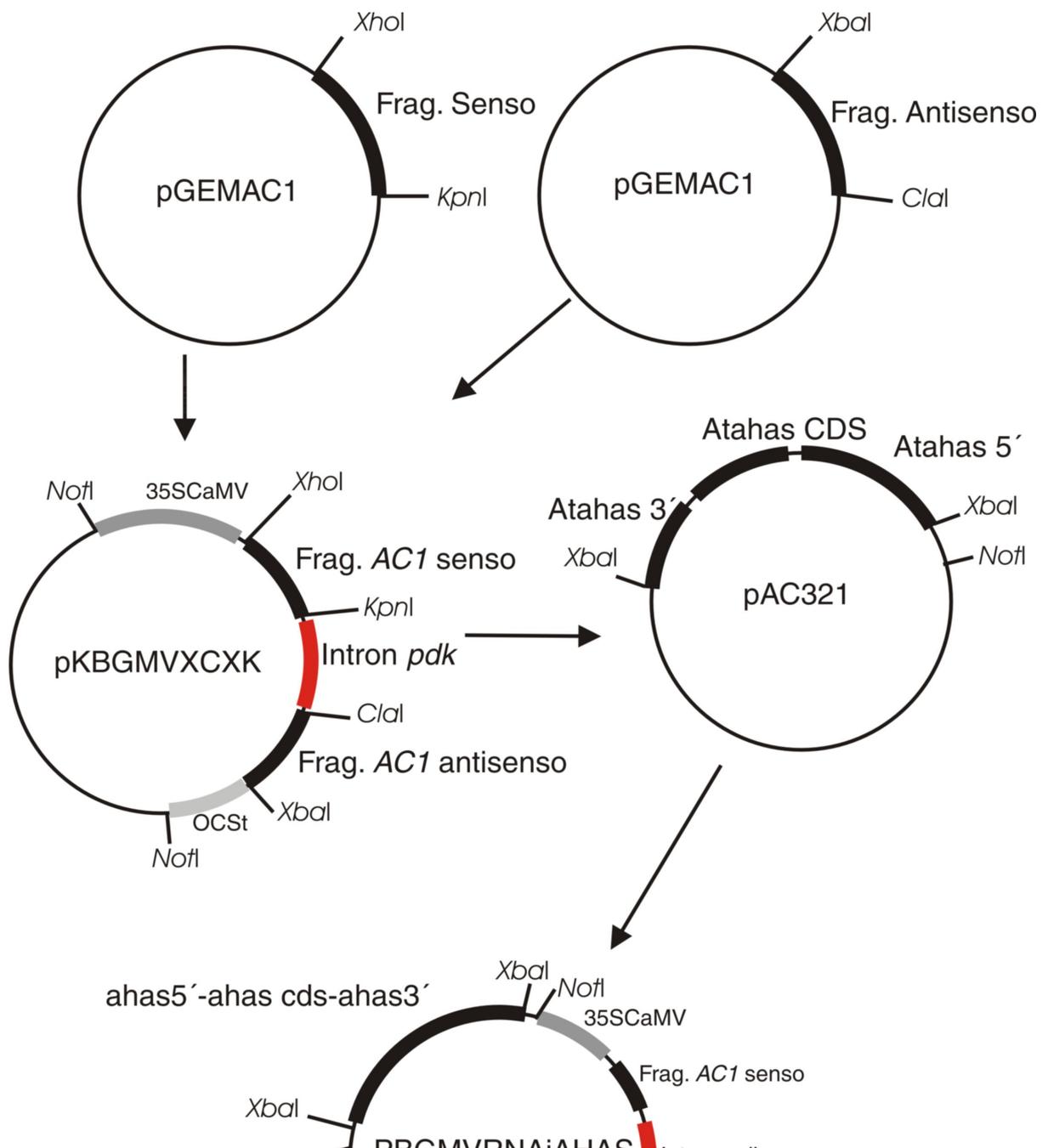


**Figura 3.** Diagrama representando o genoma do BGMV e do fragmento do vetor usado na transformação de plantas de feijão comum. A) Organização do genoma do BGMV mostrando os componentes A e B os quais, respectivamente codificam os genes envolvidos na expressão, replicação e encapsidação (*AC1*, *AC2*, *AC3* e *AV1*), movimento (*BC1* e *BV1*), e do fragmento *AC1* (fragmento de interferência) usado para a construção do cassete de expressão ( $\Delta AC1$ ). CR corresponde a região comum entre os dois genomas. B) Mapa do fragmento pBGMVRNAiAHAS contendo o gene *ahas* (*ahas5'*: promotor do gene *ahas*; *ahas cds*: seqüência codificante do gene *ahas* de *A. thaliana*; *ahas3'*: terminador do gene *ahas*) e o cassete  $\Delta AC1$  (*35S*: promotor *35S* do vírus do mosaico da couve flor; intron do gene *pdk* de *Flaveria trinervia*; terminador do gene da octopina sintase de *Agrobacterium tumefaciens* (*ocs3'*). Os fragmentos de interferência *AC1* foram clonados nas orientações senso e antisenso. As setas pequenas indicam os primers usados para PCR. As barras em A e B representam as sondas usadas nas análises de *northern blot* para detecção dos RNAi (sondas a, b e c) e análises de *Southern blot* (sonda d).

### **Construção do vetor de interferência**

O vetor utilizado para a transformação de feijão foi construído a partir do alinhamento das seqüências do gene *ACI* das espécies de geminivírus: BDMV, BGYMV-[DO], BGYMV-[GT], BGYMV-[Mex], BGYMV-[PR] e BGYMV-[JP], e na análise *in silico* para verificar qual o melhor fragmento para obter uma estrutura secundária de RNA satisfatória com mínima energia livre de formação de estruturas secundárias (Zucker, 2003). A análise do alinhamento mostrou uma região de maior similaridade na região entre os nucleotídeos 1836 e 2247. Uma seqüência de 411pb do isolado brasileiro do BGMV (BGMV-[BZ], acesso do GenBank No. M88686) foi escolhido para ser clonado. Foram usados dois pares de primers: HPBGMVXBA (5'-GTCTAGATAGTGGGGTGCGAT-3') e HPBGMVCLA (5'-GATCGATGCGGCATCCGAAGC-3') que contém respectivamente um sítio de *Xba*I e *Cla*I (na região 5' da seqüência, região sublinhada) para amplificar um fragmento de 421 pb de parte do genoma do BGMV e HPBGMVXHO (5'-CCTCGAGATAGTGCGGTGCGA-3') e HPBGMVKPN (5'-AGGTACCATGCGGCATCCGAAGC-3') que contém um sítio de *Xho*I e *Kpn*I (na região 5' da seqüência, região sublinhada) respectivamente para amplificar um fragmento de 424 pb de parte genoma BGMV. A amplificação por PCR foi feita no volume final de 50µL contendo 40ng de DNA, 60 mM Tris-SO<sub>4</sub> (pH 8.9), 18 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 250 nM de cada dNTP; 200 nM de cada primer, 5 U de Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A reação de amplificação foi realizada usando o termociclador PTC-100 Thermal Cycler (M.J. Research, Inc.), seguindo o programa PLATINUM: desnaturação a 95°C (5

min), 35 ciclos de amplificação (95°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min) com um ciclo de alongação final de 5 min a 72°C. O produto da reação de PCR foi analisado em gel de agarose 1% (w/v), contendo brometo de etídeo (0,5µg/L), a eletroforese correu durante 2h a 50V e foi visualizado em transiluminador UV. Um fragmento de DNA de 411 pb, com ambos os pares de primers, foi purificado do gel e eluído usando o Kit QIAquick<sup>®</sup> Spin Handbook – QIAGEN (QIAquick Gel Extraction Kit). Os produtos do PCR denominados Xho/Kpn e Xba/Cla foram clonados no vetor pGEMT-Easy (Promega, Madison, WI, USA) e seqüenciados usando os *primers* universais M13 e T7 em seqüenciador automático (ABI Prism1 3700). Os fragmentos foram removidos do vetor pGEMT-Easy com *XbaI/ClaI* e *XhoI/KpnI* respectivamente e inseridos no vetor pKannibal (Wesley *et al.*, 2001) para gerar o plasmídeo pKBGMVXCXK. O cassete para interferência foi removido do vetor pKBGMVXCXK e clonado no sítio de *NotI* no vetor pAC321, o qual contém o gene *ahas* (que confere resistência ao herbicida imazapir) de *Arabidopsis thaliana* (Aragão *et al.*, 2000), gerando o vetor pBGMVRNAiAHAS (FIGURA 4). Este vetor foi utilizado para transformação do feijoeiro.



**Figura 4.** Detalhes da construção do vetor de transformação pBGMVRNAiAHAS usado para transformação genética de feijoeiro. Vetor final contém o cassete de interferência (fragmentos sense e antisense do gene *AC1*) e o gene *ahas* que confere resistência ao herbicida imazapir usado para selecionar os transformantes.

#### **Transformação genética do feijoeiro**

ERROR: ioerror  
OFFENDING COMMAND: image

STACK: