

## INTRODUÇÃO

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*. 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. 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 à safra de 2004/05 (CONAB 2007). Dentre os principais problemas relacionados com a baixa produção de feijão no Brasil estão à 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 circulativa causando mosaico dourado em feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Os sintomas característicos são: o aparecimento de um mosaico verde amarelado nas folhas, redução do crescimento e vagens distorcidas. A doença é largamente disseminada nas regiões de produções de feijão no Brasil e América Latina causando perdas severas (40 -100%). Devido a grande importância para as regiões onde está estabelecida a cultura do feijoeiro, existe um grande interesse no desenvolvimento de ferramentas tecnológicas que possam acelerar os programas de melhoramento.

Uma das tecnologias que vem se mostrando mais eficiente é a de RNA interferente (RNAi). Vários termos incluindo RNA interferente, 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 e transcricional (Caplen, 2004; Hutvagner & Zamore 2002).

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 antisenso da seqüência do gene silenciado (Elbashir *et al.*, 2001). 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 (Kretschmer-

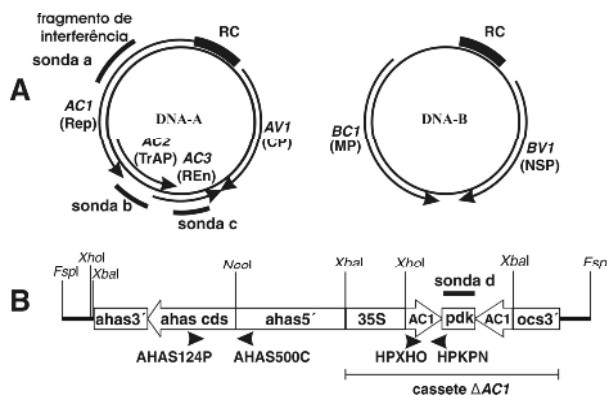
Kazemi Far & Sczakiel, 2003). Esta endoribonuclease (RISC) usa a fita antisenso do siRNA, como *primer*, para encontrar e degradar a seqüência complementar do mRNA alvo a partir da extremidade 3' (Hannon, 2002).

A proteína associada à replicação (Rep), codificada pelo gene *AC1*, exerce uma função essencial no ciclo de infecção viral, e tem sido alvo de um grande número de estudos nos últimos anos. Mutagênese *in vitro* e expressão da proteína em plantas transgênicas demonstraram que esta é a única proteína viral essencial para a replicação (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1990). Desta maneira o gene viral (*AC1*) vem sendo escolhido para a construção de vetores de transformação por RNA interferente (RNAi). O presente trabalho teve como objetivo utilizar a estratégia de RNA interferente (RNAi) usando uma seqüência do gene viral *AC1* do *Bean golden mosaic vírus* (BGMV) para gerar plantas transgênicas de feijão comum altamente resistente a geminivírus.

## RESULTADOS

### Construção do Vetor

Baseado no alinhamento de uma seqüência gene *AC1* do isolado brasileiro do BGMV (BGMV-[BR]) 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), foi escolhida uma seqüência de 411 pb para construção do cassete de interferência (Figura 1B).



**Figura 1.** 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 (intron-hairpin RNA). CR corresponde à 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 *AC1* (35S: promotor 35S do vírus do mosaico da couve flor; introm 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 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).

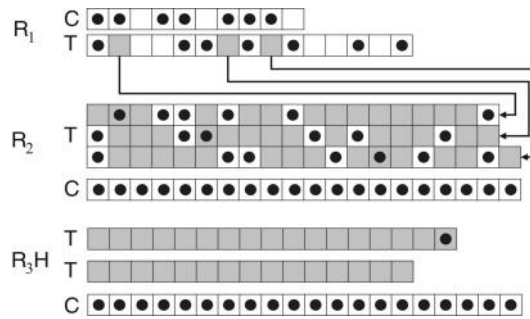
## **Análise da segregação e desafio de linhagens transgênicas**

A geração R<sub>1</sub> foi cultivada em casa de vegetação e apresentou fenótipos nor mais. A análise por PCR revelou uma segregação não-Mendeliana, de quinze plantas analisadas apenas três mostraram a presença dos transgenes ( $\chi^2 = 22,8$ ,  $P = 0,0001$ , 1 gl, para uma hipótese de 3:1 com correção de Yates). Todas as três plantas transgênicas foram resistentes ao BGMV quando inoculadas com o vírus (Figura 2). Essas plantas foram consideradas sub-linhagens 5.1.2, 5.1.7 e 5.1.9 e as progênes (R<sub>2</sub>) foram avaliadas.

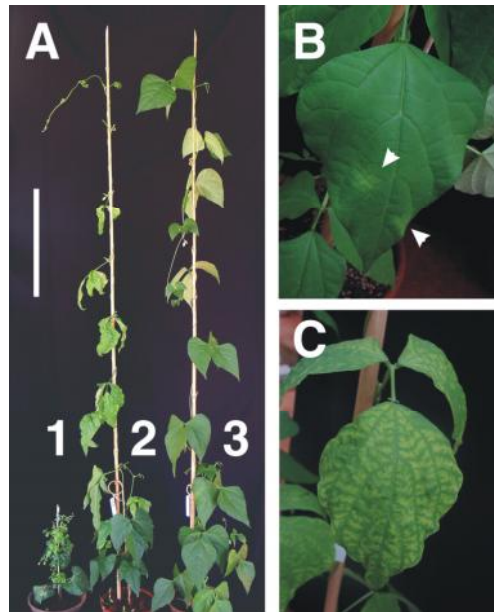
Com exceção de três plantas, todas as plantas transgênicas se revelaram imunes ao BGMV e a análise de PCR revelou a ausência do DNA viral nas plantas sem sintomas. As três plantas infectadas mostraram crescimento normal e sintomas brandos, que apareceram primeiramente nas folhas do alto da planta 30 dias após a inoculação do vírus (Figura 3). Todas as segregantes não transgênicas e plantas controle negativas (não transgênicas) revelaram sintomas severos característicos da doença do mosaico dourado (mosaico verde-amarelado, parada do crescimento e vagens distorcidas) duas semanas após a inoculação com o vírus (Figura 3).

De 58 plantas da geração R<sub>2</sub>, 42 revelaram a presença dos transgenes *ahas* e *AC1* quando analisadas por PCR, apresentando um teste padrão de segregação mendeliana de 3:1 ( $\chi^2 = 0,2$ ,  $P = 0,64$ , 1 gl). Usando a análise de PCR, foi possível identificar duas linhagens homozigotas na geração R<sub>2</sub> (Figura 2).

A análise por PCR possibilitou a identificação de duas linhagens geração R<sub>3</sub>H homozigotas. Quatorze plantas transgênicas homozigotas e vinte não-transgênicas foram inoculadas com vírus através da exposição com moscas-brancas virulentas. O resultado mostrou que todas as plantas não transgênicas apresentaram sintomas severos enquanto que as plantas transgênicas foram totalmente resistentes. Trinta e duas plantas transgênicas da geração R<sub>3</sub>H e vinte plantas não transgênicas (controle negativo) foram expostas a uma alta pressão de inoculação, usando moscas-brancas virulíferas (135/357 moscas por planta) por 6 dias. Os resultados mostraram que 94,1% e 100% das plantas transgênicas não apresentaram sintomas, enquanto todas as plantas não transgênicas apresentaram sintomas severos 29 dias após a inoculação (Figura 2) A análise por PCR mostrou a ausência do DNA viral nas plantas transgênicas.



**Figura 2.** Representação esquemática da segregação das linhagens transgênicas (caixas cinzas) e não-transgênicas (caixas brancas). Primeira geração (R<sub>1</sub>), plantas heterozigotas (R<sub>2</sub>) e plantas homozigotas (R<sub>2H</sub>). As plantas que apresentaram sintomas do BGMV estão marcadas com um círculo preto. As progênies indicadas (geração R<sub>2</sub>) são derivadas de três plantas transgênicas identificadas na primeira geração. C representa o controle negativo (plantas não-transgênicas).



**Figura 3.** Plantas de feijoeiro transgênico (linhagem 5.1) e não transgênicos inoculadas com o *Bean golden mosaic virus* por moscas brancas. A) (1) Plantas não-transgênicas apresentando sintomas severos, (2) plantas transgênicas apresentando sintomas brandos e tardios, (3) plantas transgênicas sem sintomas. Aproximadamente 7% das plantas transgênicas apresentaram bandos e tardios, começando com pequenas áreas amareladas nas folhas do topo (B) aumentando progressivamente (C). As imagens foram feitas após 35 dias de inculação. A barra em A representa 50cm.

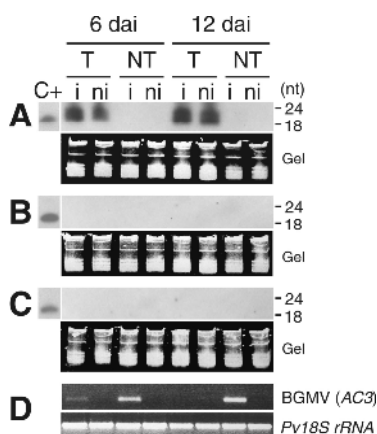
### Análise dos siRNAs

A análise de *northern blot* foi feita para detectar a presença dos pequenos RNA nas folhas de plantas transgênicas e não-transgênicas de feijoeiro. As plantas foram mantidas em contato com moscas-brancas virulíferas, aproximadamente 300-500 moscas por planta, por um período de 6 dias quando então as moscas foram removidas. No 6º dia foi retirado um folíolo e repetida a coleta no 12º dia retirando-se o outro folíolo para a extração de RNA total. A análise mostrou bandas do tamanho esperado, nas plantas transgênicas inoculadas e não inoculadas (Figura 4A), e a quantidade de siRNA não aumentou significativamente do sexto dia para o décimo primeiro dia. Nenhum sinal foi observado nas plantas não-transgênicas inoculadas e não inoculadas. As bandas das

plantas transgênicas inoculadas se mostraram mais intensas do que as observadas nas plantas transgênicas não inoculadas. Como esperado a análise do RNA da linhagem 5.1 revelou a presença de siRNA apenas nas plantas transgênicas, sugerindo que a resistência é devido ao mecanismo de silenciamento induzido pela expressão de *AC1*.

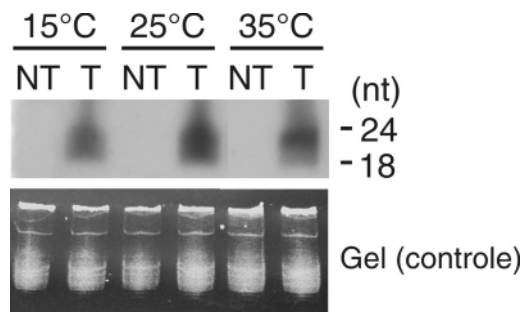
Quando analisada a presença dos pequenos RNA referente aos genes *AC2* e *AC3* usando sondas fora da região de homologia com o gene *AC1*, nenhuma banda foi observada (Figura 4B-C). Todas as plantas não-transgênicas inoculadas com o vírus desenvolveram sintomas típicos da doença do mosaico dourado, enquanto que todas as plantas transgênicas permaneceram sem sintomas.

Uma análise semiquantitativa por PCR foi feita para detectar e estimar o acúmulo de DNA viral nas mesmas folhas analisadas para detectar a presença dos siRNA (Figura 4D). DNA viral foi detectado nas folhas transgênicas inoculadas coletadas após 6 dias de inoculação, entretanto nenhum sinal foi detectado após 12 dias da inoculação. Nenhuma banda foi amplificada nas plantas não inoculadas.



**Figura 4.** Análise de *northern blot* dos siRNAs isolados de plantas de feijão comum transformadas com o fragmento intron-HP RNA. As plantas foram mantidas em contato com moscas brancas virulíferas por um período de 6 dias. RNA foi isolado das folhas primárias transgênicas (T) e não-transgênicas (NT) após 6 e 12 dias após a inoculação (dai). Os siRNAs foram detectados utilizando as sondas correspondentes às seqüências do mRNA para *AC1* (a), *AC2* (b), *AC3* (c) (figura 1A). Os RNAs corados com brometo de etídeo serviram como controle de corrida. Todas as plantas transgênicas não apresentaram sintomas enquanto todas as plantas não-transgênicas apresentaram sintomas severos. O DNA viral foi detectado em PCR semiquantitativo. O gene *Pv18SrRNA* foi usado como controle interno.

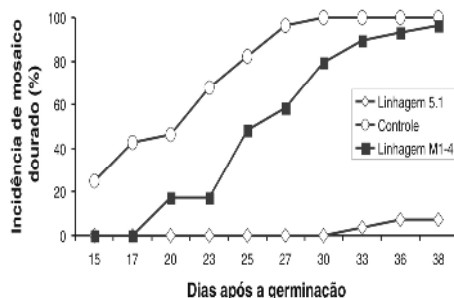
No experimento de temperatura, uma análise Northern blot foi realizada para detectar a presença dos pequenos RNAs, específicos para o gene *AC1*, nas folhas das plantas transgênicas mantidas em diferentes temperaturas (15°C, 25°C e 35°C) por um período de 5 dias. Quando comparada a quantidade de siRNA encontrado na temperatura de 25°C com a quantidade dos siRNA nas demais temperaturas, observou-se uma pequena diminuição em relação à 15°C e um menor acúmulo em relação à 35°C (Figura 5).



**Figura 5.** Análise de *northern blot* dos siRNA isolados de plantas de feijão comum transformadas com o fragmento intron-hpRNA expostas a diferentes temperaturas. Plantas transgênicas não inoculadas foram mantidas a 15°C, 25°C e 35°C por 5 dias. T = plantas transgênicas, NT = plantas não-transgênicas mantidas nas mesmas condições.

### Comparação da resistência ao BGMV entre plantas obtidas pela estratégia de RNA interferente e pela estratégia de transdominância.

Para comparar a resistência da linhagem 5.1 (obtida pela estratégia de RNAi) com a linhagem M1-4 parcialmente resistente que expressa uma proteína mutada (Faria et al. 2006), plantas homocigotas, de cada linhagem, foram germinadas na presença de uma colônia de moscas-brancas virulíferas. O número de moscas-brancas foi estimado em uma média de 100 indivíduos por planta no início da inoculação, e em mais de 300 insetos por planta no fim do período de inoculação (aproximadamente 38 dias). Os resultados revelaram que 28 das 29 plantas (96,6%) da linhagem M1-4 apresentaram sintomas severos, enquanto que apenas 2 das 28 plantas (7,1%) da linhagem 5.1 apresentaram sintomas. Todas as plantas não transgênicas (controle negativo) apresentaram sintomas severos (Figura 3). Nas duas plantas transgênicas que ainda apresentaram sintomas, houve um crescimento normal com um atraso no aparecimento de sintomas se mostrando menos severos (Figura 3A). Nas plantas transgênicas da linhagem 5.1 que continuam sem sintomas o DNA viral não foi detectado por PCR.



**Figura 6.** Desenvolvimento da doença do mosaico dourado em feijoeiros transgênicos desafiados com BGMV. Plantas da linhagem transgênica 5.1 (AC1 intron-hpRNA) (n=28), linhagem transgênica M1/4 (transdominante) (n=29), e controle (não-transgênico) (n=28), foram germinadas na presença de uma população de moscas-brancas virulíferas. A evolução da doença foi feita visualmente de acordo com o aparecimento dos primeiros sintomas de clareamento.

## DISCUSSÃO

No presente trabalho, nós hipotetizamos que o silenciamento da expressão viral do gene *AC1* pela degradação da seqüência específica do mRNA alvo impediria a replicação do vírus que reduziria ou impediria o acúmulo de DNA e, conseqüentemente, o aparecimento dos sintomas virais. Nossos resultados mostram que para silenciar o gene *AC1* a estratégia de RNAi é bastante eficaz para obter alta resistência ao BGMV em plantas modificadas de feijão. A linhagem resistente obtida neste estudo mostrou notável resistência quando comparada com a linhagem transgênica de feijão recentemente gerada que expressa o gene *AC1* mutado pela estratégia de transdominância (Faria et al. 2006).

Existe ainda uma grande dificuldade na transformação de feijão comum (Veltcheva et al. 2005), e a eficiência relatada de transformação usando vetores linearizados era de 0,2% (Vianna et al. 2004) e 0,3% mostrado por Faria et al. (2006). O uso de vetores lineares é importante para inativar genes de seleção e antibióticos. Um parâmetro importante do sistema de transformação baseado no bombardeamento de tecidos meristemáticos de eixos embriogênicos é a dificuldade de seleção eficiente, uma vez que somente poucas células são transformadas. Nós usamos um novo sistema para selecionar as células transformadas baseado no uso de imazapir, uma molécula capaz de se translocar pelos tecidos vegetais e de se concentrar na região apical do meristema do embrião da planta. Este marcador de seleção resultou em um aumento significativo, 2 a 3 vezes maior na recuperação dos transformantes comparado com o protocolo padrão de transformação de feijão (Vianna et al. 2004). A melhoria na tecnologia de transformação do feijão foi essencial para a obtenção de um maior número de linhagens transgênicas, aumentando a probabilidade de eventos de transformação que se apresentam imunes ao vírus.

Das 18 linhagens transgênicas de feijão testadas para a resistência ao BGMV, uma linhagem, denominada 5.1, permaneceu sem sintomas do vírus após a inoculação com moscas-brancas virulíferas e foi posteriormente analisada. A progênie derivada da planta mãe (transformante primário) revelou um teste de segregação não-Mendeliana. Entretanto, a geração  $R_2$  apresentou uma segregação mendeliana de 3:1. Além disso, a análise de Southern blot realizada com as plantas da geração  $R_2$  revelou que os transgenes estão integrados em um único locus, corroborando a forma observada de segregação. Estes resultados sugerem que a planta mãe (transformante primário) era uma planta quimera. Este fenômeno de quimerismo geralmente é observado em

leguminosas transformadas via biobalística em tecidos meristemáticos (Aragão et al. 1996; Christou et al. 2006).

As próximas gerações da linhagem 5.1 foram analisadas para resistência ao BGMV. A maioria das plantas (92,9%) permaneceu sem sintomas após a exposição a um grande número de moscas-brancas virulíferas. Aproximadamente 7,1% das plantas transgênicas apresentaram sintomas leves em folhas jovens após 30 dias da inoculação. Além disso, estas plantas apresentaram um crescimento similar quando comparadas com as plantas não infectadas e não revelou nenhuma redução aparente na quantidade de sementes.

A análise da linhagem 5.1 revelou a presença dos siRNA somente nas plantas transgênicas, implicando que a resistência é devido ao mecanismo de silenciamento mediado por RNA. Em plantas de feijão infectadas, os siRNA virais não foram observados após 12 dias da inoculação, mesmo que os sintomas fossem observados no 14º dia após a inoculação. Isto sugere que o BGMV foi incapaz de induzir PTGS nos estágios adiantados de infecção, apesar do fato de que o transcrito que corresponde ao gene *AC1* é provavelmente abundante no início do ciclo de infecção. Uma vez que, a transcrição dos genes *AC1*, *AC2* e *AC3* pode ser expressa por um mRNA policistrônico (Haley-Bowdoin et al. 1999), o transgene *AC1*siRNA poderia servir como *primer* para um RNA polimerase RNA-dependente, usando o mRNA viral com molde (Brodersen e Voinnet, 2006), para produzir as moléculas secundárias do siRNA que correspondem aos genes *AL2* e *AL3*. Este mecanismo ampliaria a probabilidade da resistência múltipla da espécie do vírus. Entretanto, nas plantas transgênicas de feijão infectadas com o BGMV, os siRNAs não foram observados fora da região homóloga.

As interações planta-hopedeiro podem ser afetadas por fatores ambientais, especialmente pela temperatura. O aparecimento de doenças virais geralmente está associado a baixas temperaturas. Em altas temperaturas, os sintomas virais são frequentemente atenuados e as plantas se recuperam rapidamente da doença. Chellapan et al. (2005) observaram um aumento dos siRNA de geminivírus de mandioca elevando a temperatura de 25°C para 30°C, e uma diminuição aparente dos sintomas nas folhas. Szittyta et al. (2003) demonstraram que a defesa mediada por silenciamento do RNA é temperatura dependente. Em baixas temperaturas, ambos, o vírus e o transgêne foram inibidos, conduzindo à susceptibilidade ao vírus e a perda dos fenótipos do transgênico que induz ao silenciamento. Além disso, foi consistente com a redução dos siRNAs do transgêne em baixas temperaturas e em temperaturas mais elevadas (Szittyta et al. 2003). Nossos resultados demonstraram que os níveis de *AC1*siRNA foram reduzidos quando as

plantas transgênicas de feijão foram cultivadas em baixa temperatura (15°C), o que poderia ter provocado uma diminuição na resistência. Entretanto, plantas de feijão são geralmente cultivadas em temperaturas acima de 20°C, o que é muito importante uma vez que, não é comum a queda de temperatura durante o cultivo comercial de feijão, especialmente em áreas de média altitude.

Geminiviruses causam danos severos em diversas outras culturas distribuídas ao redor do mundo, tal como mandioca, feijão-caupi, feijão de Mungo, pimenta, melão, tomate, algodão, feijão de lima, soja, batata, melancia, abóbora e mamão (Morales 2006) e foram considerados a “peste do século” (Morales e Anderson 2001). A estratégia apresentada neste trabalho pode ser estendida para conseguir resistência à geminiviruses de outras espécies de plantas.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aragão FJL, Barros LMG, Brasileiro ACM, Ribeiro SG, Smith FD, Sanford JC, Faria JC, and Rech EL (1996) Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theor Appl Genet* 93:142–150.
- Brodersen P and Voinnet O (2006) The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet* 22:268-280.
- Caplen NJ (2004) Gene therapy progress and prospects. Down-regulating gene expression: the impact of RNA interference. *Gene Ther* 11:1241 -1248.
- Chellappan P, Vanitharani R, Ogbe F and Fauquet CM (2005) Effect of temperature on geminivirus-induced RNA silencing in plants. *Plant Physiol* 138:1828 -1841.
- Christou P, Capell T, Kohli A, Gatehouse JA and Gatehouse AMR (2006) Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. *Trends Plant Sci* 11:302-308.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K and Tuschl T (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494–498.
- Faria JC, Albino MMC, Dias BBA, Cañado LJ, Cunha NB, Silva LM, Vianna GR and Aragão FJL (2006) Partial resistance to *Bean golden mosaic virus* in a transgenic common bean (*Phaseolus vulgaris*) line expressing a mutant *rep* gene. *Plant Sci* 171:565-571.

- Hanley-Bowdoin L, Elmer JS and Rogers SG (1990) Expression of functional replication protein from tomato golden mosaic virus in transgenic tobacco plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1446-1450.
- Hanley-Bowdoin L, Settlage SB, Orozco BM, Nagar S and Robertson D (1999) Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Crit Rev Plant Sci* 18:71-106.
- Hannon GJ (2002). RNA interference. *Nature* 418:244–251.
- Hutvagner G and Zamore PD (2002) RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev* 12:225-232.
- Kretschmer-Kazemi Far R and Sczakiel G (2003) The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 4417-4424.
- Morales FJ (2006) History and current distribution of begomoviruses in Latin America. *Adv Virus Res* 67:127-162.
- Morales FJ and Anderson PK (2001) The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Arch Virol* 146:415-441.
- Schlyth BD, Lorenzen N and Pedersen FS (2006) Antiviral activity of small interfering RNAs: Specificity testing using heterologous virus reveals interferon-related effects overlooked by conventional mismatch controls. *Virology* 349:134-141.
- Szittyá G, Silhavy D, Molnár A, Havelda Z, Lovas A, Lakatos L, Banfalvi Z and Burgyán J (2003) Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defense by the control of siRNA generation. *EMBO J* 22:633-640.
- Veltcheva M, Svetleva D, Petkova SP and Perl A (2005) In vitro regeneration and genetic transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)—Problems and progress. *Sci Hortic* 107:2-10.
- Vianna GR, Albino MMC, Dias BBA, Silva LM, Rech EL and Aragão FJL (2004) Fragment DNA as vector for genetic transformation of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Sci Hortic* 99:371-378.
- Zucker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31:3406-3415.