

AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE FEIJÃO-DE CORDA AO CPMV ATRAVÉS DO ACÚMULO DA PROTEÍNA FLUORESCENTE VERDE (GFP)

Oliveira, V.C.¹, Albuquerque Neto, O.M.², Pacheco-Soares, C², Medina-Acosta, E³, Mittmann, J²

¹EE Técnico Industrial Professor Fontes, Rua da Paisagem, 240, Nova Lima/MG, biovinciusco@hotmail.com

²Universidade do Vale do Paraíba, IP&D, Av. Shishima Hifumi, 2911, amoneto143@hotmail.com

³Universidade Estadual do Norte Fluminense, Lab. de Biotecnologia, Av. Alberto Lamego, 2000, quiue@uenf.br

Resumo- Vários vírus de RNA de plantas têm sido usados como vetores para expressão de peptídeos heterólogos e polipeptídeos em plantas. Tais vetores oferecem uma alternativa a transformação genética estável para produção de proteínas importantes. O vírus do mosaico do feijão de corda (CPMV) foi o primeiro vírus de planta a ser desenvolvido como sistema apresentador de epítomos. No presente trabalho o objetivo principal foi utilizar o vírus do feijão-de-corda (CPMV) recombinante, geneticamente modificado para expressar e acumular a proteína GFP, como modelo para avaliar de forma rápida a suscetibilidade de amostras de feijão-de-corda. Os resultados obtidos sugerem que o uso de sementes comerciais não se mostra adequado já que a maioria destas sementes é geneticamente melhorada e, portanto, não susceptíveis a infecção. Além disso, o estabelecimento das condições de infecção e replicação do vírus usando as construções testadas abre perspectivas de uso das mesmas para expressar e acumular outros tipos de proteínas sem a necessidade do uso de sistemas estéreis de produção.

Palavras-chave: CPMV, GFP, feijão-de-corda

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas, Biotecnologia

Introdução

O CPMV é um membro padrão do gênero *Comoviridae*, gênero relacionado aos picornavírus (KING; LOMONOSSOFF; RYAN, 1991), causa uma de muitas doenças virais relatadas no feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), produzindo pontos cloróticos e bordas difusas quando inoculado em folhas primárias. Folhas trifoliadas desenvolvem um mosaico amarelo brilhante ou verde claro com crescimento severo em folhas jovens (KING; LOMONOSSOFF; RYAN, 1991; VALVERDE; FULTON, 1996).

Nos últimos 15 anos, vários vírus de RNA de plantas têm sido usados como vetores para expressão de peptídeos heterólogos e polipeptídeos em plantas. Tais vetores oferecem uma alternativa a transformação genética estável para produção de proteínas importantes, como vacinas ou anticorpos, em plantas (LIU e LOMONOSSOFF, 2002, LIU *et al.*, 2005).

O vírus do mosaico do feijão de corda (CPMV) foi o primeiro vírus de planta a ser desenvolvido como sistema apresentador de epítomos. Isto se deve ao conhecimento das estruturas de suas partículas e a viabilidade de infecção com clone de cDNA, o que o torna um atrativo candidato para um sistema apresentador de epítomos (CAÑIZARES; NICHOLSON; LOMONOSSOFF, 2005).

Além do sistema carreador de peptídeos novos estudos foram realizados com a finalidade desenvolver sistema baseado no CPMV para

expressão de proteínas inteiras em plantas, tendo como foco exclusivo modificações do RNA-2. A principal razão para isso, é que é possível aumentar o tamanho do RNA-2 que tem 3,5 kb até no máximo o tamanho do RNA-1 (6kb), sem afetar sua encapsidação (WELLINK; VAN KAMMEN, 1989).VERVER *et al.*, (1998) demonstraram que é possível inserir seqüências que codificam para proteínas inteiras, como a proteína GFP (Green Fluorescent Protein) de água-viva, entre as seqüências para a proteína de movimento e para a proteína L do RNA-2 de CPMV (VERVER *et al.*, 1998).

Uma das etapas importantes para o uso deste sistema de produção de antígenos é a infecção do feijão-de-corda para que haja propagação e produção de massa viral. Como muitas variedades comerciais do feijão-de-corda são resistentes à infecção pelo vírus, há necessidade de identificar variedades susceptíveis. No presente trabalho foi utilizado vírus recombinante geneticamente modificado para expressar e acumular a proteína GFP, como modelo para avaliar de forma rápida a suscetibilidade de amostras de feijão-de-corda.

Metodologia

O presente trabalho foi desenvolvido em parceria com o Laboratório de Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense (CQB número 0097/98). O vetor de expressão de proteínas inteiras baseado no CPMV utilizado neste trabalho foi desenvolvido por Liu e

Lomonosoff (2002). O sistema consiste na porção específica do CPMV (CPMV/S-2A-GFP) introduzida em uma versão modificada do vetor binário pBinPlus de *Agrobacterium tumefaciens*, derivado do vetor binário pBIN19 (VAN ENGELEN *et al.*, 1995). O resultado da construção, pBinPS-1, contém a seqüência do RNA-2 mais GFP antes do promotor 35S de CaMV (vírus do mosaico da couve-flor) e do terminador Nos (Figura 1).

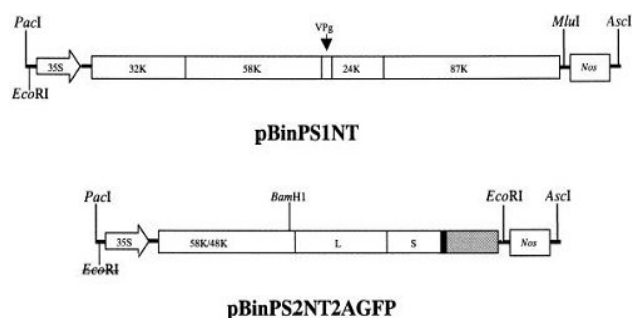


Figura 1: Plasmídeos utilizados no teste de susceptibilidade do feijão-de-corda à infecção por CPMV (modificado de LIU e LOMONOSSOFF, 2002).

Para o teste as sementes de *Vigna unguiculata* foram obtidas em feiras e supermercados e germinadas e mantidas em terra comercial. Após 10 dias da germinação folhas primárias foram agoinfectadas com células de *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404, contendo os plasmídeos pBinPlusS1NT e pBinPlusS2NT2AGFP.

A transformação das bactérias foi realizada utilizando o método descrito por Chen *et al.* (1994). As agrobactérias transformadas com as construções foram cultivadas a 28°C em meio YEB contendo 50 µg/mL de Canamicina e 50 µg/mL de Rifampicina. Os cultivos foram centrifugados a 8.500 xg e as células precipitadas foram homogeneizadas em tampão MMA (1 M de Cloreto de Magnésio; 0,1 M de MES; 0,1 M de Acetosiringona. Volumes iguais da suspensão do clone contendo a construção pBinPlusS2NT2AGFP e da suspensão que contém construção pBINPS1NT (1:1) foram misturados e incubados à temperatura ambiente por 2h e utilizadas para infiltrar as folhas. Como controle, algumas plantas foram infiltradas com tampão fosfato 100 mM (pH 7,4).

A transformação de *A. tumefaciens* foi verificada pela extração de DNA plasmidial dos clones obtidos pelo método de Sambrook *et al.* (1989) com modificações. Uma colônia isolada de cada clone foi crescida em 20 ml de meio YEB líquido contendo 50 µg/ml de Canamicina e 50 µg/ml de Rifampicina, a cultura incubada por 48 horas a 28°C. Aproximadamente 1,5 ml da cultura foi transferido para um tubo de 1,5 ml e centrifugado a 18000 xg durante 15 minutos,

descartando seu sobrenadante após centrifugação.

O precipitado foi homogeneizado em 100 µl de uma solução contendo 50mM de Tris/HCl pH 8,0; 10 mM de EDTA; 100 µg/ml de RNase. A seguir foram adicionados 200 µl da solução contendo 200 mM NaOH; 1% SDS, agitando o tubo por inversão suave, incubando à temperatura ambiente por 5 minutos. Foi adicionado a solução 200 µl de de Acetato de potássio 3 M, pH 5,5. A extração foi finalizada adicionando-se clorofórmio na proporção 1:1, agitando com auxílio de um vortex e centrifugando a 18000 xg durante 10 minutos a 4°C. A fase superior do centrifugado foi retirada e transferida para outro tubo de 1,5 ml. Adicionou-se etanol absoluto na proporção 2,5:1 e centrifugou-se a 18000 xg por 5 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante, e homogeneizou o precipitado de células em 1.400 µl de etanol 70%, centrifugando a 1.8000 xg durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi seco em estufa a 37°C por 30 minutos.

O DNA plasmidial foi ressuspenso em 50 µl de TE-Rnase, incubado a 37°C por 1 hora e estocado no freezer a -20°C.

As amostras de DNA e as folhas infectadas foram visualizadas por exposição à radiação ultravioleta no transluminador (Transluminador UV 302 nm – T26M, BioAgency) e os resultados foram registrados por fotodocumentador (Gel Logic 100 Imaging System, Kodak®).

Resultados

A Figura 2 demonstra que o protocolo de transformação de *A. tumefaciens* pelo método de nitrogênio líquido é eficiente. Na figura abaixo, observam-se bandas correspondentes aos plasmídeos presentes nas bactérias. A banda próxima a 23,1 Kb corresponde aos plasmídeos inseridos pBinPlusS2NT2AGFP e pBINPS1NT e as bandas menores aos plasmídeos Ti desarmados pAL 4404 que contem somente as regiões *vir* e *ori do plasmídeo* Ti, este último característico da cepa LBA4404.

O teste de suscetibilidade demonstrou que as sementes oriundas de supermercados não apresentaram sinais de infecção e não houve acúmulo de GFP nas folhas. Ao comparar folhas de uma planta não infectada com folhas infectadas com CPMV/GFP de sementes oriundas de feiras observou-se que as mesmas são susceptíveis à infecção com o CPMV uma vez que além dos sinais clássicos de infecção pelo vírus houve acúmulo de GFP nas folhas. Para a confirmação da infecção e conseqüente acúmulo de GFP, folhas de feijão-de-corda infectadas com a quimera viral CPMV/GFP, foram visualizadas por exposição à radiação ultra-violeta em transluminador (Figura 3).

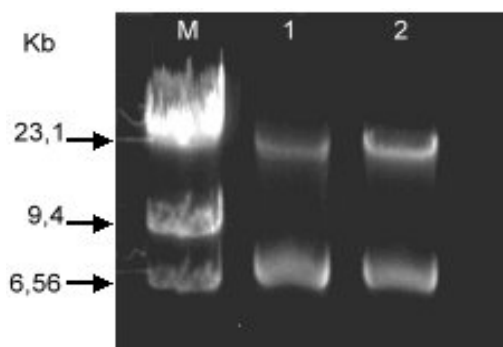


Figura 2: Gel de Agarose a 0,8% demonstrando a transformação de *A. tumefaciens*: **M)** Marcador de peso molecular Lambda /Hind III, **1)** pBinPS1NT extraído **2)** pBinPlusS2NT2AGFPambos extraídos de *A. tumefaciens*.

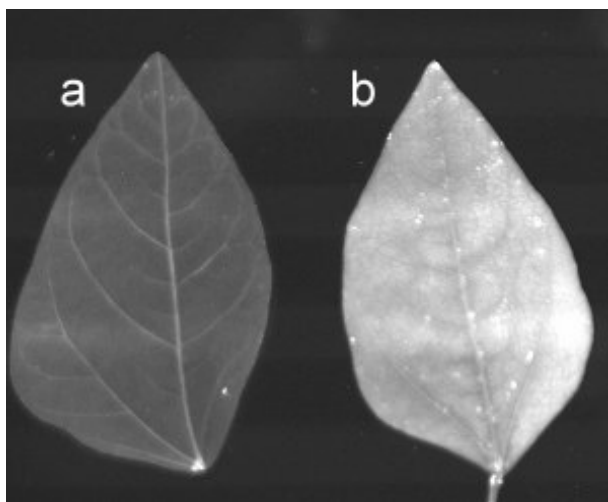


Figura 3: Fotografia de folhas de *Vigna unguiculata*, visualizadas sob radiação UV. **a)** folha de plantas controle e **b)** folha de plantas infectadas.

Discussão

Os protocolos tradicionais de transformação de cepas de *A. tumefaciens* envolve o uso de três cepas de bactérias diferentes *E. coli*, contendo o plasmídeo de interesse, células de *E. coli* contendo o plasmídeo pRK2013 ("helper") e *A. tumefaciens*. Entretanto podemos sugerir que o método proposto por Chen *et. al* que utiliza nitrogênio líquido é um método mais barato uma vez que utiliza apenas uma cepa, diminuindo custos com meios de cultivo, placas de petri, antibióticos e demais reagentes e materiais necessários quando utiliza-se o método de conjugação triparental. Além disso, reduz os riscos de contaminações já que as manipulações acontecem com apenas uma cepa de bactéria (CHEN; NELSON; SHERWOOD, 1994)

O sistema de expressão de proteínas inteiras utilizando o vírus do mosaico do feijão-de-corda têm sido utilizado para estudos relacionados a localização intracelular das proteínas do movimento do CPMV (GOPINATH *et al.*, 2003), dos efeitos da replicação do vírus na morfologia e

distribuição dos sistemas de endomembranas das células vegetais (CARETTE, *et al.*, 2000). Este sistema parece ser interessante também para testar a suscetibilidade de variedades de feijão-de-corda, uma vez que o acúmulo da GFP só é possível se houver infecção e replicação do vírus na planta.

Conclusão

O uso de sementes comerciais não se mostra adequado já que a maioria destas sementes é geneticamente melhorada e, portanto, não susceptíveis a infecção, sendo aconselhável testar a susceptibilidade antes de dar início aos ensaios.

O estabelecimento das condições de infecção e replicação do vírus usando as construções testadas abre perspectivas de uso das mesmas para a expressão e acúmulo de outros tipos de proteína de interesse, permitindo que a planta funcione como um sistema de produção de proteínas recombinantes, sem a necessidade de grandes aparatos de fermentação ou uso de sistemas estéreis para a sua produção.

Referências

- CAÑIZARES, M. C., NICHOLSON, L., LOMONOSSOFF, G. P. Use of viral vectors for vaccine production in plants. *Immunology and Cell Biology*. v.83, n.3, p.263-70, 2005
- CARETTE, *et al.*, Cowpea Mosaic Virus Infection induces a massive proliferation of endoplasmic reticulum but not golgi membranes and is dependent on de novo membrane synthesis. *Journal of Virology*, vol. 74, n. 14, p. 6556-6563. 2002.
- CHEN, H., NELSON, R. S., SHERWOOD, J. L. Enhanced recovery of transformants of *Agrobacterium tumefaciens* after freeze-thaw transformation and drug selection. *Biotechniques*. n.16, p.664-669, 1994.
- GOPINATH, K., WELLINK, J., PORTA, C., TAYLOR, K.M., LOMONOSSOFF, G.P., VAN KAMMEN, A. Engineering cowpea mosaic virus RNA-2 into a vector to express heterologous proteins in plants. *Virology* 267:159-73. 2000
- KING, A. M. Q., LOMONOSSOFF, G. P., RYAN, M. D. Picornaviruses and their relatives in the plant Kingdom. *Seminars in virology*. n.2, p.11, 1991.
- LIU, L. *et al.* Cowpea mosaic vírus-based systems for the production of antigens and antibodies in plants. *Vaccine*. v.23, n.15, p.1788-92, 2005.

- LIU, L., LOMONOSSOFF, G. P. Agroinfection as a rapid method for propagating Cowpea mosaic virus-based constructs. *Journal of virological methods*. n.105, p.343-8, 2002.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. v.3, p.198. New York: Cold Spring Harbor, 1989.
- VALVERDE, R. A., FULTON, J. P. Comoviruses: Identification and diseases caused. *In*:
- HARRISON, B. D., MURANT, A. F. Ed, *Plant viruses: Polyhedral virions and bipartite RNA genomes*, v.5, New York, Plenum Press, p.17-34, 1996.
- VAN ENGELEN, F. A. *et al.* pBINPLUS: an improved plant transformation vector based on a pBIN19. *Transgenic research*. n.4, p.288-290, 1995.
- WELLINK, J., VAN KAMMEN, A. A Cell-to-Cell transport of cowpea mosaic virus requires both the 58/48K proteins and the capsid proteins. *The Journal of general virology* p.2279-86, 1989.