

FEIJOEIRO EXPRESSANDO O GENE *REP* DO VÍRUS DO MOSAICO DOURADO APRESENTA MENOR INCIDÊNCIA DA DOENÇA

JULIANNE SOUSA LIMA¹, JOSIAS CORRÊA DE FARIA²

INTRODUÇÃO: O mosaico dourado é uma das principais doenças que afetam a cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado na estação “das secas” dificultando a produção de feijão ou mesmo inviabilizando-a em várias regiões. Os sintomas são evidenciados quando as plantas apresentam de duas a quatro folhas trifolioladas manifestando-se por um amarelecimento intenso da lâmina foliar delimitado pela coloração verde das nervuras, dando um aspecto de mosaico. As vagens das plantas infectadas podem apresentar-se deformadas e manchadas. As sementes quando formam-se, são de tamanho, peso e qualidade reduzidas. O agente transmissor da doença é a mosca branca (*Bemisia tabaci* Gen.), cuja população ocorre com maior intensidade em climas mais quentes. O mosaico dourado foi assim denominado antes da caracterização molecular do vírus, realizada por Gilbertson et al. (1993). Contudo, após esta caracterização, ficou evidente que vírus distintos causavam o mosaico dourado do feijoeiro no Brasil, na América Central e Caribe (Faria et al., 1994). A denominação atual para a espécie viral encontrada no Brasil é *Bean golden mosaic virus* (BGMV), enquanto a espécie encontrada na América Central e Caribe manteve o nome *Bean golden yellow mosaic virus* (BGMV). De acordo com Morales & Anderson (2001) o mosaico dourado está disseminado por toda a área de produção de feijão, tanto no Brasil como em outros países da América. Foi observado que no Brasil, em condição de campo, as perdas variam de 40% a 85%, podendo chegar a 100%. O vírus do mosaico dourado consiste de partículas germinadas icosaédricas, contendo DNA de fita simples, circular, como material genético. O seu genoma é constituído de dois componentes, denominados de A e B, sendo estes encapsidados independentemente. Exceto por uma seqüência de aproximadamente 200 nucleotídeos, denominadas de região comum, os dois componentes não apresentam similaridades significativas. O componente A contém os genes necessários para replicação e encapsidação da progênie viral. No DNA-A são encontrados os genes da capa protéica (*cp*), no sentido viral, enquanto os genes da proteína associada à replicação (*rep*), da transativação (*trap* - fator de transcrição que atua em *trans* nos promotores dos genes *cp* e *ns*), e da amplificação da replicação viral (*ren*) são codificados na fita complementar. O componente B contém os genes requeridos para o movimento de célula a célula (*ns*) e a longa distância (*mp*). Ambos os componentes são necessários para infecção sistêmica da planta. A Embrapa Arroz e

¹ Estagiária de graduação, Universidade Católica de Goiás, Goiânia, GO;

² Engenheiro Agrônomo, Pesquisador, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO (0xx62) 533-2186, josias@cnpaf.embrapa.br

Feijão vem avaliando uma linhagem de feijoeiro comum, da cultivar Olathe Pinto, transformada com o gene *rep* do BGMV contendo uma mutação do aminoácido 262, com o objetivo de torná-la resistente ao mosaico dourado. O provável mecanismo da resistência seria a dominância letal, onde a *rep* mutagenizada interferiria com o tipo normal de *rep* produzida pelo vírus. Ao mutagenizar o DNA, foi incluído o sítio único de restrição para a enzima *NruI*, útil para verificação da sua presença e também de possível recombinação do vírus com o transgene. Esta linhagem recebeu o nome de Olathe M1-4. No presente trabalho avaliou-se a resistência da linhagem M1-4 à virose em comparação ao cultivar Olathe Pinto convencional, sob condições de incidência natural de mosaico dourado. Avaliou-se também a possibilidade do vírus encontrado em plantas transgênicas haver recombinado com o transgene *rep*.

MATERIAL E MÉTODOS: O experimento foi conduzido na Embrapa Arroz e Feijão, no município de Santo Antônio de Goiás, GO, em área previamente autorizada pelos órgãos governamentais. O delineamento experimental foi o inteiramente ao acaso, conduzido com dois tratamentos (transgênico- Olathe M1-4 e convencional- cultivar Olathe Pinto) e dez repetições. Esse experimento foi instalado em 23/02/2005. As avaliações de incidência de mosaico dourado foram realizadas a partir da detecção das primeiras plantas com sintomas em 17/03, duas vezes por semana, até 11/04. Apenas as plantas com sintomas característicos da doença foram consideradas. Os dados foram analisados através da curva de progresso da doença. A taxa de progresso foi calculada pela regressão dos dados tomando como variável independente o número de dias após o semeio (para fins de cálculo o primeiro dia de observação de doença é dado como zero) e a percentagem de plantas infectadas como variável dependente. Foram coletadas amostras de plantas apresentando sintomas de mosaico dourado, entre as plantas transgênicas, para análise de mutação do DNA viral. O preparo de DNA total foi realizado de acordo com Dellaporta et al (1983). A amplificação do DNA viral da parte do componente A, que inclui o sítio correspondente ao da mutação, foi feito com um par de primers específico. O produto de PCR foi analisado em gel de agarose a 1% para verificar o tamanho dos fragmentos amplificados. O DNA amplificado foi ainda digerido com a enzima *NruI*, cujo sítio existe apenas no transgene. A sua existência no vírus seria o indicador de recombinação entre vírus e transgene.

RESULTADOS E DISCUSSÃO: As plantas M1-4 expressam a proteína viral *rep* modificada (dados não apresentados). Hanson & Maxwell (1999) conduziram experimentos com protoplastos de *Nicotiana tabacum*, nos quais demonstraram que a referida modificação da proteína *rep* interfere com a replicação viral. A cultivar Olathe Pinto e a M1-4 tem ciclos de crescimento idênticos, de cerca de 60 dias. A epidemia do mosaico dourado desenvolveu-se lentamente no início, provavelmente causada pela necessidade de pulverização de inseticida para o controle de *Diabrotica sp* e *Ceratomyza sp*, que pode ter interferido com a população de mosca

branca. A Figura 1 indica uma taxa de progresso de doença de 0,12 por dia para a linhagem M1-4, enquanto a taxa para Olathe Pinto foi de 0,42 por dia. Estes dados indicam claramente o potencial da linhagem M1-4 na redução dos danos causados pelo mosaico dourado devido à menor incidência de doença. Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram do tamanho esperado para o par de primers utilizado (Figura 2). O tratamento com *NruI* não resultou em digestão do DNA viral, indicando a ausência deste sítio e portanto de possível recombinação do vírus com o transgene. O número de amostras analisados foi pequeno, contudo. Ademais, sabe-se que esta mutação é letal ao vírus e não se espera que sejam encontradas progênes virais com a mesma.

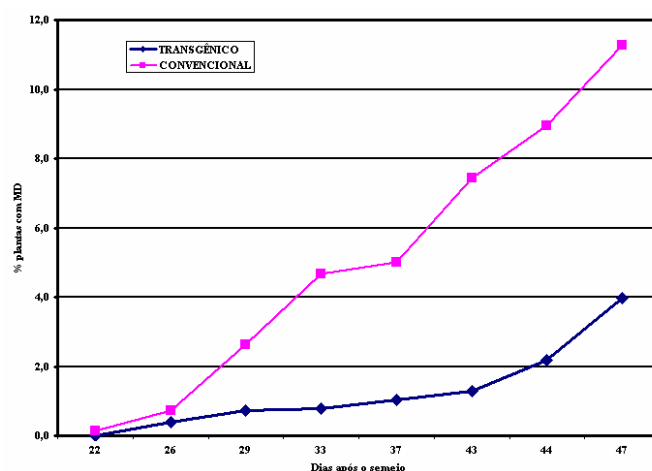


Figura 1. Incidência de mosaico dourado em feijoeiro transgênico e convencional em 2005. ◆ - feijoeiro Olathe transgênico; ■ - feijoeiro Olathe convencional

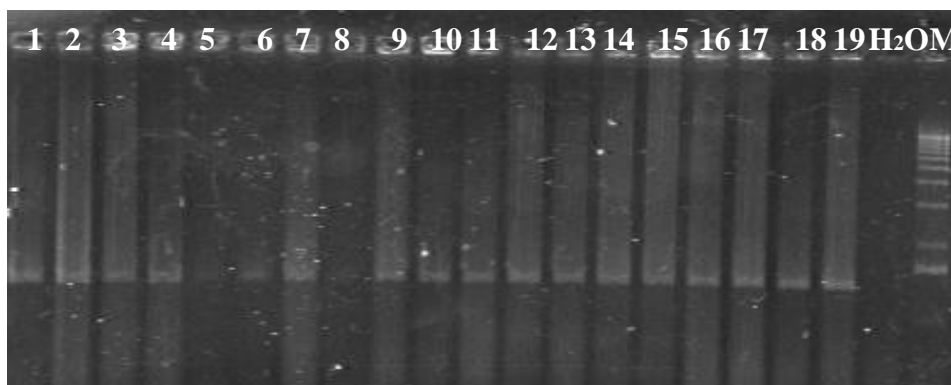


Figura 2. Produto da amplificação de DNA viral em plantas transgênicas. Poços 1-19 contém DNA do produto de amplificação de DNA viral, de aproximadamente 1,4Kb. Poço H₂O - controle negativo; M- marcador de peso molecular 1Kb.

CONCLUSÕES: O feijoeiro transgênico expressando o gene *rep* apresentou menor incidência de mosaico dourado em 2005, semelhante ao ocorrido em 2004 (não apresentado), fato interpretado como devendo à sua maior resistência que o feijoeiro convencional ao mosaico dourado. A ausência do sítio da enzima *NruI* no fragmento viral é indicativa da falta de recombinação entre o vírus e o transgene, mas tendo em vista o reduzido tamanho da amostragem utilizada, não se deve tirar conclusões definitivas. O trabalho completo será repetido por um mais um ano. O plantio comercial de feijoeiro geneticamente modificado para resistência ao mosaico dourado depende de autorizações dos órgãos competentes, após avaliações de aspectos de biossegurança.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA miniprep: Version II. **Plant Mol. Biol. Rep.**, v.1, n. 4, p.19-21, 1983
- FARIA, J. C.; GILBERTSON, R. L.; HANSON, S. F.; MORALES, F. J.; AHLQUIST, P.; LONIELLO, A. O.; MAXWELL, D. P. Bean golden mosaic geminivirus type II isolates from the Dominican Republic and Guatemala: Nucleotide sequences, infectious pseudorecombinants, and phylogenetic relationships. **Phytopathology**, Saint Paul, v.84, p. 321-329, 1994.
- FARIA, J.C.; ANJOS, J.R.N.; COSTA, A.F.; SPERÂNDIO, C.A.; COSTA, C.L. **Doenças causadas por vírus e seu controle**. In: ARAÚJO, R.S.; RAVA, C.A.; ZIMMERMANN, M.J.O. (Org.). Cultura do feijoeiro comum no Brasil. Piracicaba, SP, 1996, v. 1, p. 731-769
- FARIA, J.C.; MAXWELL, D.P. Variability in geminivirus isolates associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. **Phytopathology**, Saint Paul, v.89, p.262-268, 1999.
- GILBERTSON, R. L.; FARIA, J. C.; AHLQUIST, P., MAXWELL, D. P. Genetic diversity in geminiviruses causing bean golden mosaic disease: the nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of a Brazilian isolate of bean golden mosaic geminivirus. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p.709-715, 1993.
- HANSON, S. F.; MAXWELL, D. P. *Trans*-dominant inhibition of geminiviral DNA replication by bean golden mosaic geminivirus *rep* gene mutants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 89, p.480-486, 1999.
- MORALES, F.J.; ANDERSON, P.K. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. **Archives of Virology**, Viena, v.146, p. 415-441, 2001.