

Desenvolvimento de kits moleculares para a identificação do transgene que confere resistência ao *Bean golden mosaic virus* (BGMV) em genótipos de feijão

Nara Cristina Teixeira¹, Livia Teixeira Duarte², Márcio Vinícius de Carvalho Barros Cortes³, Thiago Lívio Pessoa Oliveira de Souza⁴, Josias Correa de Faria⁵, Adriane Wendland⁶

O mosaico dourado, causado por *Bean golden mosaic virus* (BGMV) é considerado a principal virose do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) por provocar redução de 40% a 100% na produtividade dos grãos. O percentual de perdas varia em função da época de infestação e da variedade plantada, no entanto, foi criada pela Embrapa a primeira cultivar transgênica com efetiva resistência ao BGMV, a BRS FC401 RMD. Para assegurar das características transgênicas da cultivar mediante surgimento de doenças com sintomas similares ao BGMV, ou mesmo em relação a eventuais contaminações entre lotes de sementes convencionais e transgênicas, torna-se necessário a aplicação de um método de detecção molecular rápido e que possa ser facilmente executado. A PCR (Reação Polimerase em Cadeia) é uma importante ferramenta para detecção molecular, porém, devido ao alto custo gerado com aparelhos e mão-de-obra, esta se torna inviável. Recentemente foi desenvolvida uma metodologia de amplificação molecular isotérmica tecnicamente mais simples, rápida e econômica, a LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification), que permite identificar o alvo de forma segura, em decorrência do uso de iniciadores específicos, baseados em regiões exclusivas do genoma. A técnica apresenta vantagens como, alta sensibilidade devido ao reconhecimento de seis regiões do alvo, especificidade, agilidade, economia e segurança no diagnóstico. Portanto, objetiva-se com este trabalho aplicar uma técnica de amplificação molecular isotérmica para diferenciação de plantas transformadas e não transformadas, que seja prática, de baixo custo e que facilite a interpretação direta dos produtos por meio da diferenciação por corantes, dispensando o uso de aparelhos. Para adequação à técnica de amplificação foram realizadas adaptações do método de extração de DNA rápido, nos quais foram conduzidos ensaios com folhas e sementes de feijão trituradas manualmente, excluindo o uso de centrífugas. Para fins comparativos, o DNA alvo também foi extraído pelo método modificado de Dellaporta, e ambos foram quantificados em aparelho Nanodrop. Foi estabelecido, de acordo com a especificidade, um conjunto de *primers* ideal para a identificação da região transformada, sendo otimizada a concentração de uso, a temperatura de anelamento e o tempo mínimo de amplificação. A amplificação foi conduzida sob temperatura constante, em aparelho termobloco. Para facilitar a interpretação dos produtos de amplificação a olho nu foram testados diversos corantes indicadores e intercalantes, e foi selecionado para a condução dos testes, em conjunto com a metodologia, o que apresentou maior discrepância entre amostras. É considerável a redução do tempo de execução e dos custos, em comparação com a PCR, devido ao uso de temperaturas constantes, e a interpretação direta dos resultados por meio da mudança de coloração em amostras positivas, dispensando o uso de termocicladores, de cubas de eletroforese e de foto documentadores. A interpretação dos resultados a olho nu facilita o controle de plantas e sementes em ambientes como laboratórios, armazéns e cooperativas com mínima infraestrutura, influenciando positivamente sobre o direcionamento adequado de lotes, seja para o plantio, consumo ou descarte. Este Kit está sendo testado e será validado pela Embrapa Arroz e Feijão para reconhecimento e diferenciação das linhagens transgênicas resistentes ao BGMV.

¹ Estudante de doutorado no Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade da Rede Pró-Centro-Oeste - Universidade Federal de Goiás, estagiária da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, naracristina015@hotmail.com

² Mestre em Ciências Farmacêuticas, analista da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, livia.duarte@embrapa.br

³ Farmacêutico, mestre em Bioquímica, analista da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, marcio.cortes@embrapa.br

⁴ Engenheiro-agrônomo, doutor em Genética e Melhoramento de plantas, pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, thiago.souza@embrapa.br

⁵ Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitopatologia/Biotecnologia, pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, josias.faria@embrapa.br

⁶ Engenheira-agrônoma, doutora em Fitopatologia, pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, adriane.wendland@embrapa.br