

HERANÇA DOS TRANSGENES E ASSOCIAÇÃO COM A RESISTÊNCIA AO *Bean golden mosaic virus* EM POPULAÇÕES DE FEIJOEIRO COMUM DERIVADAS DA LINHAGEM OLATHE 5.1

Josias Corrêa de FÁRIA¹
Paula Arielle M. Ribeiro VALDISSER¹
Francisco José Lima ARAGÃO²
Maria José DEL PELOSO¹

INTRODUÇÃO

O mosaico dourado do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), transmitido pela mosca branca *Bemisia tabaci*, é uma das principais doenças da cultura, causando perdas de produção de 40 a 100%. Não foi identificado alto grau de resistência genética a esta doença no germoplasma do gênero *Phaseolus*. Com o advento da tecnologia do DNA recombinante novas oportunidades de obtenção de resistência utilizando sequências genômicas do próprio agente causal se tornaram realidade. Os geminivirus associados ao feijoeiro são transmitidos pela mosca branca (*Bemisia tabaci* Gen.), e pertencem à família *Geminiviridae*, gênero *Begomovirus*. Todos os geminivirus possuem DNA circular, de fita simples encapsidado em partículas geminadas. O genoma é dividido em dois componentes, denominados de A e B. O DNA A possui os genes envolvidos na replicação viral (*rep*), capa protéica (*cp*), além de um gene envolvido com a amplificação da replicação viral (*ren*) e outro que é um fator de transcrição viral (*trap*). No componente B existem dois genes. O gene *mp* codifica uma proteína com funções de movimento célula-a-célula, análogas às da proteína 30K do TMV. O gene *ns* codifica uma proteína que realiza a etapa extra que os geminivirus devem realizar para causar infecção sistêmica - o transporte do DNA através do envelope nuclear. O produto do gene *rep* é uma enzima com propriedades de ligação à ácidos nucléicos e de endonuclease. Esta é a única proteína essencial para a replicação do genoma viral. Ela não possui, entretanto, atividade de DNA polimerase. Dessa forma, não é considerada uma replicase, mas sim uma enzima “associada à replicação do DNA”. A síntese de DNA propriamente dita deve ser realizada por enzimas do hospedeiro. A função da proteína REP é de se ligar ao sítio de iniciação da replicação viral e cortar uma das fitas de DNA, iniciando o processo. Com este conhecimento foi desenhado um transgene capaz de atuar ao nível do RNA do gene *rep*, de modo a destruí-lo. Isto foi conseguido com a tecnologia de interferência do RNA ou RNAi. Deste modo o gene *rep* é silenciado, e o vírus não pode se replicar. Um evento elite – Olathe 5.1- foi obtido e caracterizado tanto ao nível de resistência ao mosaico dourado como ao nível molecular (BONFIM et al., 2007).

A herança mendeliana de um transgene é um requerimento para que o mesmo possa ser efetivamente utilizado nas cultivares comerciais derivadas, e padrões de herança mendeliana de transgenes são tipicamente observados em plantas. Há casos, porém, em que se observa segregação não-mendeliana de transgenes, com grande variação entre transformantes e suas progênies. É sabido que a herança estável de um transgene depende da sua natureza, do genoma no qual ele será inserido e do sítio de integração no genoma da planta, fatores sobre os quais não se tem controle no momento da transformação genética. A eliminação e o silenciamento de transgenes também podem explicar distorções na segregação das progênies,

¹ Embrapa Arroz e Feijão, Caixa Postal 179, 75375-00, Santo Antonio de Goiás, GO, E-mail: josias@cnpaf.embrapa.br

² Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB W5 Norte, 70770-900, Brasília, DF, E-mail: aragao@cenargen.embrapa.br

como uma forma de defesa do genoma em algumas espécies. Assim, há exemplos de estudos nos quais apenas um, ou nenhum dos transgenes inseridos é herdado pela progênie de algumas linhagens, ou ainda os dois transgenes são inseridos em locos diferentes, ocorrendo muitas vezes a integração de múltiplas cópias do transgene no genoma da planta.

O objetivo deste trabalho foi o de contribuir no estudo da estabilidade do transgene e sua herança através de várias gerações dos cruzamentos e retrocruzamentos em diferente germoplasma de feijoeiro comum com a linhagem Olathe 5.1, como parte da avaliação de sua biossegurança.

MATERIAL E MÉTODOS

Partindo-se de plantas de Olathe 5.1 homozigotas para o transgene foram realizados cruzamentos envolvendo os genitores Olathe Pinto, Jalo Precoce, Dark Red Kidney 18, BRS Supremo, BRS Pontal e Pérola, utilizando-se o transgênico sempre como parental doador de pólen, a fim de facilitar a análise das progênes: As plantas F_1 dos cruzamentos com BRS Pontal e Pérola foram utilizadas como doadores de pólen para obtenção dos retrocruzamentos RC_1 e assim, sucessivamente até o retrocruzamento RC_4 . A partir da geração RC_4F_2 as plantas transgênicas, sem mosaico dourado, foram conduzidas pelo método de descendência de uma única semente. Todas as plantas de cada geração desde o F_1 , ou segregantes foram analisadas quanto à presença do transgene utilizando-se de um par de oligonucleotídeos específicos. Para a análise da resistência ao mosaico dourado foram incluídos como testemunhas 10 plantas dos parentais não transgênicos e 10 do parental transgênico Olathe 5.1. Para facilitar o manuseio e reduzir o espaço inicial requerido para o cultivo e manuseio das plantas na fase inicial, as sementes foram semeadas em copos de 200-300 ml de capacidade preenchidos com solo previamente adubado. Aos sete dias após o semeio, as plântulas já com as folhas primárias expandidas, foram transferidas para o local apropriado de criação de colônia de moscas brancas virulíferas, desenvolvidas sobre plantas de feijão de lima (*P. lunatus*) e soja (*Glycine max*), a fim de serem inoculadas. . O número de moscas brancas utilizadas não foi controlado, tendo variado de 300 a mais que 1000 por plântula, permanecendo em contato com as moscas por oito dias. Após este período as moscas foram removidas e as plântulas foram transplantadas para vasos com 3 a 5 Kg de solo, onde foram mantidas até o final do ciclo. Durante a condução do ensaio as plantas foram pulverizadas com inseticidas e fungicidas para evitar a proliferação de moscas brancas e para o controle de oídio sempre que necessário. Essas foram avaliadas visualmente quanto à presença/ausência de sintomas de mosaico dourado até aos 40 dias após a inoculação. Em casos de dúvidas, a presença do vírus foi detectada por meio de PCR utilizando um par de oligonucleotídeo específicos para o mesmo. Os resultados obtidos foram analisados por qui-quadrado a fim de se comparar as possíveis divergências entre as proporções esperadas e observadas de plantas transgênicas ou de resistentes/suscetíveis após os cruzamentos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Geração F_1

Deteção do transgene: foi observada a banda de DNA esperada para as plantas transgênicas, a qual esteve sempre ausente nos controles com DNA de feijoeiro comum convencional e com substituição de DNA por água (Fig. 1). Todas as plantas F_1 foram transgênicas indicando o sucesso do cruzamento e também a normalidade da transferência do transgene.

Resistência/suscetibilidade ao MD: decorrido o período de incubação do vírus houve o aparecimento de sintomas típicos da virose (Tabela. 1). Todas as plantas transgênicas

parentais (Olathe 5.1) permaneceram sem sintomas e todas as plantas testemunhas das cultivares convencionais apresentaram sintomas típicos da doença.

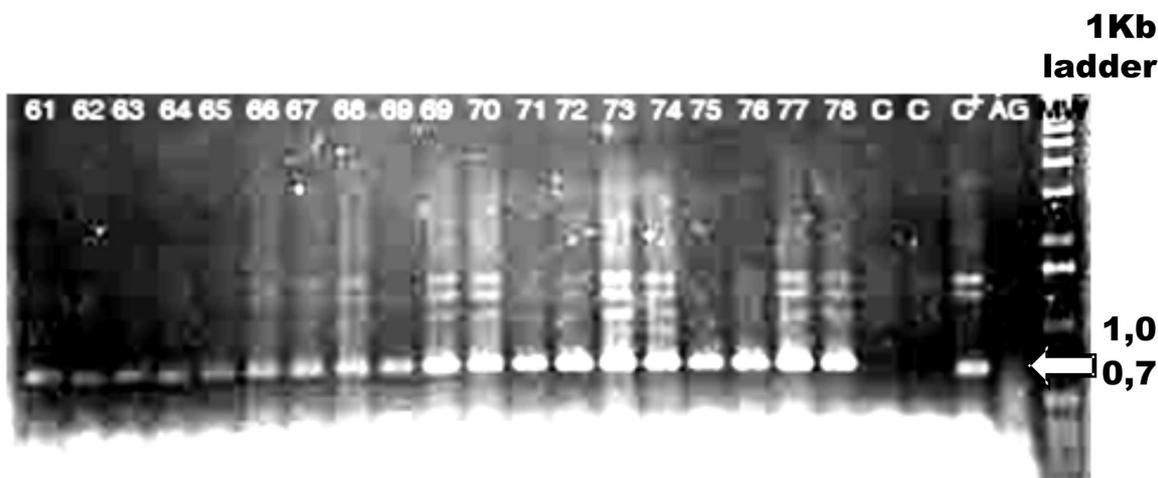


Figura 1. Amplificação do transgene em plantas de feijoeiro comum da geração F_1 . Nota-se a ausência de bandas nos controles específicos utilizados.

Tabela 1.

Cruzamento	Transgênicas	Resistentes	Suscetíveis	% Suscetíveis
Olathe 5.1 X Jalo Precoce	20	13	7	35,0
Olathe 5.1 X Olathe Pinto	20	17	3	15
Olathe 5.1 X Dark Red Kidney 18	20	13	7	35,0
Olathe 5.1 X BRS Supremo	20	8	2	10,0
Olathe 5.1 X BRS Pontal	58	37	21	30,2
Olathe 5.1 X Pérola	36	29	7	19,4
Parental Olathe 5.1				0,0

Gerações segregantes

Deteção do transgene na quarta geração do quarto retrocruzamento (F_4RC_4): todas as plantas transgênicas foram positivas por PCR na geração F_4RC_4 (Tabela 2).

Resistência/suscetibilidade ao MD: os resultados obtidos para a inoculação com o VMDF encontram-se na Tabela 2, onde o teste de qui-quadrado mostra que as relações de transgênico: não-transgênico observadas foram conforme o esperado. Em geral, houve a co-segregação da presença do transgene e da resistência ao vírus do mosaico dourado no caso do cruzamento com Pérola e seguiram os padrões mendelianos para um único locus, embora não se possa afirmar que exista apenas uma única cópia. No experimento com o cruzamento com BRS Pontal houve vários escapes no controle suscetível, e várias plantas, que não tinha o transgene, também se comportaram como resistentes, ou vice-versa, afetando a relação esperada resistente:suscetível. As plantas segregantes apresentaram fenótipo normal.

Tabela 2. Segregação observada na geração F₄RC₄ com as cultivares BRS Pontal e Pérola

Olathe 5.1 X Pontal	PCR		Mosaico Dourado	
Geração F ₄ RC ₄	Observadas	Esperadas	Observadas	Esperadas
Positivas	64	63,8	70	61,5 (sem MD)
Negativas	21	21,3	12	20,5 (com MD)
Total	85		82	
BRS Pontal	-	-	16 de 20 inoc.	20 com MD
Olathe 5.1			0 de 20 inoc	0 com MD
Qui-quadrado, 3:1	0,004 (P≥95)**		4,7 (P≥0,02) n.s.	
Olathe 5.1 X Pérola				
Geração F ₄ RC ₄				
Positivas	34	33,75	34 (sem MD)	33,75
Negativas	11	11,25	11 (com MD)	11,25
Total	45			
Qui-quadrado		0,007 (P≥0,95)**	0,007 (P≥0,95)**	
Pérola			20 de 20 inoc.	20 com MD
Olathe 5.1			0 de 20 inoc.	0 com MD

** - significativo; n.s.= não significativo

Todas as linhagens conduzidas por descendência de uma única semente que supostamente deveriam estar em homozigose, se comportaram como resistentes ao mosaico dourado, semelhante ao observado para a planta parental Olathe 5.1, para ambos os cruzamentos. Entretanto, no caso de heterozigotas, o padrão observado de resistência ao mosaico dourado é coerente com o conceito de “efeito de dosagem gênica” ou expressividade (RIEGER et al., 1976), onde há a ação diferencial dos alelos de um gene sobre a expressão fenotípica do caráter em questão. Obviamente que o PCR avalia apenas a presença do gene, enquanto a inoculação revela o seu efeito.

Como conclusão pode-se afirmar que a herança seguiu o padrão mendeliano com segregação típica monogênica dominante, mas existindo um efeito de expressividade gênica marcante, que possa causar desvios significativos na proporção esperada de segregação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- RIEGER, R.; MICHAELIS, A.; GREEN, M. M. **Glossary of genetics and cytogenetics – classical and molecular**. Fourth completely revised edition. Springer Verlag, New York. 647p. 1976.
- BONFIM, K.; FARIA, J. C.; NOGUEIRA, E. O. P. L.; MENDES, E. A.; ARAGAO, F. J. L. RNAi-Mediated Resistance to Bean golden mosaic virus in Genetically Engineered Common Bean (*Phaseolus vulgaris*). **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, p. 717-726, 2007

Apoio: EMBRAPA e FINEP

Área: Genética e Melhoramento