

Obtenção de feijoeiro resistente ao vírus do mosaico dourado

Francisco José Lima Aragão
Josias Corrêa de Faria

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Embrapa Arroz e Feijão

Introdução

A cultura do feijão é extremamente importante para o Brasil, por ter grande impacto social e por ser uma fonte fundamental de proteína, tendo também grande relevância cultural. Entretanto, devido a sua suscetibilidade a várias doenças e baixa tolerância à seca, o cultivo do feijão em determinadas épocas do ano é realizado em condições de alto risco. Este fato coloca em risco a segurança alimentar das comunidades que cultivam esta leguminosa. Além disso, a necessidade de utilização de agrotóxicos no combate às pragas produz um impacto ambiental negativo e um aumento do custo de produção, que pode até mesmo inviabilizar seu cultivo devido às variações de mercado.

O mosaico dourado do feijoeiro é uma das principais doenças dessa cultura, que tem dificultado, ou mesmo inviabilizado a produção de feijão em várias regiões do Brasil. A obtenção de imunidade ao vírus através do melhoramento para resistência varietal seria a medida de controle mais adequada e a única realisticamente eficiente. Fontes de imunidade ou elevados graus de resistência têm sido buscadas nos bancos de germoplasma de feijão. Em cerca de 15.000 acessos de germoplasma de *Phaseolus vulgaris* e alguns de *P. lunatus*, *P. acutifolius* e *P. coccineus*, em El Salvador, Costa Rica, Guatemala, México e Brasil, encontrou-se apenas níveis baixos e moderados de resistência ou tolerância à doença (Faria 1999, Galvez & Morales 1889).

Assim, devido à inexistência de imunidade e nem mesmo alto grau de resistência a essa virose em germoplasma de *Phaseolus* spp., em nossos laboratórios da Embrapa Arroz e Feijão e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, objetivamos introduzir resistência ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro (BGMV) em feijão (*Phaseolus vulgaris*), através de métodos de biologia celular e molecular. Para isso, durante vários anos, desde o início dos anos 1990, desenvolvemos um sistema de cultura de tecidos e transformação genética de feijão, ao mesmo tempo em que estudamos o vírus e propusemos estratégias biotecnológicas para obtenção de plantas resistentes. O presente trabalho mostra a obtenção de plantas geneticamente modificadas resistentes à doença, expressando a proteína viral modificada Rep, que devem ter um grande impacto para a cultura do feijão, tanto aquela produzida em sistemas tecnificados quanto aquela de agricultura familiar e de subsistência. Iniciativas como essa contribuem para aumentar a segurança alimentar daquelas comunidades que têm a cultura do feijão como fonte direta ou indireta de sustento.

O Feijoeiro

O feijão é uma leguminosa predominantemente autógama, domesticada há mais de 7 mil anos em dois centros de origem: a Mesoamérica (México e América Central) e a Região Andina. Acredita-se que o feijão, assim como o milho e a abóbora, tenha se manifestado inicialmente como erva daninha em cultivos de mandioca e batata-doce, na América Central. Durante milênios, os agricultores cultivaram misturas complexas de tipos de feijão como cerca viva contra seca, doenças e ataques de pragas. Este processo produziu uma variabilidade genética muito grande, com uma variedade grande de cores, textura e tamanho de grãos, vindo ao encontro das condições de plantio e preferências de sabor, em diferentes regiões.

A cultura do feijoeiro ocupa uma área de 12 milhões de hectares e constitui-se na leguminosa mais importante para a alimentação de mais de 500 milhões de pessoas na América Latina e África. Na

maior parte dos países, a proteína de origem vegetal chega a mais de 80% do total de proteínas da dieta humana.

O Brasil é o maior produtor, com uma produção anual na ordem de dois milhões de toneladas, o que equivale a cerca de 20% da produção mundial de feijão. Além disso o País também é um importador, uma vez que devido a condições de mercados e doenças que afetam a produção, principalmente o mosaico dourado e mofo branco. O feijão é um alimento básico para a população brasileira, constituindo-se em sua principal fonte de proteína vegetal. O consumo anual per capita é de 14 quilogramas. Em regiões mais pobres o consumo de feijão tende a ser maior, como no Nordeste brasileiro que chega a 18,5 quilogramas per capita por ano (CIAT, 2002).

O teor de proteína das sementes varia de 20 a 33%, sendo também um alimento energético, contendo cerca de 340 cal/100g. Além de uma fonte proteica o feijão é também uma fonte de ferro (com 6-10 mg/100g), tiamina, riboflavina, niacina e vitamina K. De acordo com os requerimentos da FAO, o feijão é extremamente deficiente em metionina, cisteína, triptofano e leucina e rico em treonina. Este fato é balanceado com o consumo desta leguminosa juntamente com o arroz que é rico em aminoácidos sulfurados. Associado ao arroz, o feijão constitui o prato típico do brasileiro. Nos últimos anos, entretanto, este importante alimento tem se tornado escasso na mesa, em função do preço elevado e, também, da dificuldade de preparo experimentada pela sociedade moderna. Muitos profissionais da nutrição estão, contudo, empenhados em resgatar esta feliz combinação empregada em nossa tradição. Um dos objetivos do melhoramento genético de feijoeiro tem sido o aumento da qualidade nutricional, pela redução de fatores antinutricionais, como o fitato. A tecnologia desenvolvida pelo nosso grupo abre a possibilidade de manipulação destas características utilizando ferramentas de engenharia genética.

No Brasil, o feijão é produzido basicamente por pequenos produtores. Aproximadamente 80% da produção e da área cultivada encontram-se em propriedades menores que 100 ha. Entretanto, nos últimos anos a agricultura empresarial tem fortalecido as suas lavouras, investindo mais em tecnologias modernas, abastecendo períodos denominados entressafras. Um exemplo é o número de produtores brasileiros que utilizam irrigação e colheita semimecanizada, que embora tenha aumentado, estão desestimulados pelo risco econômico, devido à alta susceptibilidade a pragas e doenças, principalmente o mosaico dourado, e pouca tolerância à seca. O feijão é produzido em todas as regiões do país. A Região Nordeste detém a maior área plantada (45%), seguida das regiões Sul (26%) e Sudeste (21%). A Região Nordeste detém o mais baixo índice de produtividade, decorrente da baixa utilização de insumos agrícolas e problemas com a seca. Os maiores estados produtores são Paraná, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Goiás. Suprir a crescente demanda alimentar sem destruir novas áreas naturais tem sido um dos maiores desafios da atualidade.

Por predominar o cultivo em pequenas propriedades, o feijão apresenta destaque na absorção de mão de obra agrícola, especialmente a familiar. Estima-se que esta cultura utilize cerca de 40 milhões de homem/dia por ciclo de produção. Em nosso país, nas últimas décadas a produção e a área ocupada com a cultura do feijoeiro aumentaram, entretanto a produtividade vem decrescendo. Vários são os fatores que contribuem para este fato: sócio-econômicos, fitossanitários e agroecológicos. Diante dos problemas que esta cultura possui e da sua grande importância para as regiões onde está estabelecida, há um grande interesse no desenvolvimento de tecnologias que possam acelerar o processo de melhoramento. Frente às tendências atuais de crescimento da população e de consumo de feijão, pode ser esperado um aumento da demanda para a América Latina e África. Este aumento de demanda será suprido somente se novos cultivares de feijão com rendimentos mais altos, resistência múltipla a doenças, maior tolerância à seca e baixa fertilidade de solo, forem desenvolvidos, pois, isto permitirá aumentar a produtividade do feijão, alcançando maior estabilidade de rendimento (CIAT 2002).

O mosaico dourado do feijoeiro

O mosaico dourado do feijoeiro foi inicialmente descrito pelo Dr Álvaro Santos Costa como uma doença que, inicialmente, não teria importância econômica, ocorrendo no Estado de São Paulo (Costa 1965). Seu agente transmissor, a mosca branca (*Bemisia tabaci* Gennadius), foi, também, identificado. Subseqüentemente, um vírus de partículas geminadas foi identificado, associado às plantas, mostrando sintomas de mosaico. Esse vírus foi, então, denominado vírus do mosaico dourado do feijoeiro - VMDF (em inglês: *Bean golden mosaic virus* - BGMV), um geminivirus.

No início dos anos 70, as plantações de feijoeiro nos estados de São Paulo, Paraná e Minas Gerais foram severamente atingidas pelo mosaico dourado. Esse fato foi atribuído ao avanço da cultura da soja e de outras culturas hospedeiras da mosca branca. Este inseto é combatido no campo com a utilização de inseticidas, na tentativa de controle da doença. Em algumas regiões, devido à grande incidência da doença, os agricultores tiveram como única opção parar com o plantio do feijão na primeira metade do ano (Figura 1).

Essa doença está hoje disseminada por todas as áreas produtoras de feijão do Brasil. Doença semelhante é encontrada em outros países das Américas, tais como Cuba, República Dominicana, Porto Rico, Jamaica, Estados Unidos, México, Belize, Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicarágua, Costa Rica, Panamá, Venezuela e Colômbia.

No Brasil, em condições de campo, as perdas ficam em torno de 40% a 85%, podendo chegar a 100% (Menten *et al* 1980, Gálvez & Morales 1989), dependendo da cultivar, do estágio das plantas quando infectadas e do isolado do vírus.

Quanto aos sintomas, inicia-se pelas nervuras das folhas, que, numa etapa mais avançada, exibem um amarelo brilhante na maior parte do limbo foliar, formando um mosaico. Ocorrem ainda distorções foliares, nanismo, malformação de vagens e sementes. Além disso, as sementes provenientes de plantas infectadas têm a germinação afetada.



Figura 1. Plantações de feijão infectadas com o vírus do mosaico dourado mostrando perdas totais ou parciais, na Bahia (acima) e em Goiás (abaixo)

O Vírus do mosaico dourado

O vírus do mosaico dourado (BGMV) consiste de uma partícula icosaédrica, que contém DNA de fita simples, circular, como material genético. Trata-se de vírus com genoma dividido em dois componentes, denominados A e B. O DNA viral replica-se no núcleo de células do floema, através de um mecanismo conhecido como círculo rolante, tendo DNA de fita dupla como intermediário de replicação. O DNA A contém os genes necessários para a replicação e encapsidação da progênie viral, enquanto o DNA B contém os genes requeridos para o movimento célula-a-célula e a longa distância, gama de hospedeiros e desenvolvimento de sintomas (Timmermans *et al* 1994). Ambos os componentes são necessários para a infecção sistêmica de plantas. Exceto por uma seqüência de aproximadamente 200 nucleotídeos, denominada de região comum, os dois componentes não apresentam similaridade significativa em suas seqüências de nucleotídeos. O DNA A contém o gene da capa protéica (CP), o gene *rep* (que codifica o gene para uma proteína associada à replicação), o gene *trap* (que é o fator de transcrição que atua *in trans* no promotor de genes virais) e o gene *ren* (que é um fator de amplificação da replicação viral, que, embora não seja essencial para que a replicação ocorra, provoca um acúmulo de DNA viral muito maior quando está presente). No DNA B, estão localizados os genes *ns* e *mp*. A proteína ns ("nuclear shuttle"), é necessária para o tráfico intracelular de DNA viral do núcleo para o citoplasma, enquanto que a mp ("movement protein") está envolvida no movimento do DNA viral célula-a-célula, via plasmodesmas. A proteína Rep é a única essencial para a replicação.

O DNA de vários isolados do BGMV foram completamente seqüenciados. O vírus do mosaico dourado amarelo do feijoeiro (BGYMV) da República Dominicana e da Guatemala (Faria *et al* 1994, Gilbertson *et al.* 1993); de Porto Rico (Howarth *et al.*, 1985) e (BGMV); e o do Brasil (Realizado por nosso grupo - Acesso do GenBank M88686 e M88687).

O BGMV é transmitido na natureza pela mosca branca, de uma forma circulativa. Os isolados do BGYMV podem ser transmitidos por inoculação mecânica, isto é, através do extrato de uma planta infectada, friccionado sobre a folha de uma planta sadia. Entretanto, o isolado brasileiro, BGMV-BR, não é transmitido dessa forma (Costa, 1965).

Cerca de 151 espécies ou isolados de *Geminiviridae* foram inteiramente seqüenciados. Um exame da seqüência dos vários geminivirus revela a existência de um nanônimo conservado em todas as espécies, localizado na região intergênica tanto do DNA-A quanto do DNA-B. Esse nanônimo (TAATATTAC), chamado de SCE (elemento estruturalmente conservado), foi logo reconhecido como a origem de replicação (*ori*) e como o sítio de clivagem do DNA pela proteína associada à replicação. Esse elemento SCE está localizado dentro de uma seqüência conservada de 30 nucleotídeos, com potencial para formação de uma estrutura em forma de grampo. A manutenção conformacional dessa estrutura é fundamental para sua função de origem de replicação (Orozco & Hanley-Bowdoin, 1996). Outro elemento, chamado de 'iteron', foi localizado a montante dessa estrutura de grampo, repetido duas vezes (no caso do BGMV), ao lado da região TATA, que foi caracterizada como a região de ligação da Rep ao DNA (Lazarowitz *et al.*, 1992; Fontes *et al.*, 1994). Os iterons são específicos para cada vírus. Por exemplo, os iterons do BGMV-BR são diferentes daqueles em BGYMV-GA e em BGYMV-PR. No entanto, sua posição relativa e sua orientação são conservadas dentro de *Geminiviridae* filogeneticamente relacionados.

A proteína associada à replicação (Rep), codificada pelo gene *rep*, tem sido alvo de um grande número de estudos nos últimos anos. Essa proteína possui várias funções associadas à replicação: (1) dirigir o complexo replicativo para a origem de replicação; (2) desenovelar o DNA molde (atividade de helicase); (3) clivar o DNA e iniciar o mecanismo de círculo rolante; e (4) separar os genomas após a replicação (atividade de nuclease e ligase). Além da sua principal atividade na replicação, a Rep está envolvida na sua autoregulação: repressão de sua própria síntese ao nível de transcrição.

Uma seqüência consenso (*NTP-binding motif*) (EGX 4 GKTX 22 DD) foi encontrada na replicase de doze geminivírus analisados (Hanson *et al* 1995). Experimentos feitos *in vivo* mostraram que uma simples mutação na replicase do BGMV [de lisina (K) para histidina (H), ou de ácido aspártico (D) para arginina (R)], anulou a replicação viral e o aparecimento dos sintomas nas plantas de feijoeiro inoculadas (Hanson *et al* 1995). Mutações de lisina (K) para histidina (H) na Rep do *tomato yellow leaf curl geminivirus* (TYLC) reduziram significativamente a atividade de ATPase dessa enzima.

Outro motivo conservado (DVKXYXXKD) no domínio amino terminal da Rep dos geminivírus foi identificado como sítio de clivagem e ligação ao DNA, sendo a tirosina (Y) presente nesse consenso o aminoácido ativo.

Melhoramento de plantas e biotecnologia

As plantas são a principal fonte, direta ou indiretamente, da maioria das roupas, combustíveis, remédios, materiais de construção, e principalmente alimentos. Talvez por esta importância vital, não se deve ficar surpreso de que o homem, desde tempos remotos, tenha se preocupado em desenvolver os tipos que melhor satisfaçam às suas necessidades. A sistematização dos métodos de obter tais plantas resultou na ciência do melhoramento genético de plantas. Problemas como a ausência da característica de interesse dentro da espécie e a incompatibilidade sexual sempre foram empecilhos para obter plantas ou organismos com as combinações genéticas desejadas pelos pesquisadores para satisfazer as crescentes demandas da sociedade; em outras palavras, a variabilidade genética existente na natureza não poderia ser explorada em seu potencial. Esta, talvez, foi a chamada velha biotecnologia. Gradativamente, os pesquisadores foram selecionando as melhores raças de plantas e microorganismos. Portanto, a ação do homem foi a de retirar da natureza os organismos que tinham um melhor conjunto de genes capaz de produzir, eficientemente, produtos para alimentação, saúde humana e uso industrial. Quando o rendimento ainda é baixo, o homem utiliza-se de novos conhecimentos científicos para fazer o melhoramento genético, através de cruzamentos, indução de mutações no genoma dos organismos, etc. Talvez esta tenha sido a nova biotecnologia. Em tempos mais recentes, com os avanços na cultura de tecidos, biologia molecular, bioquímica, etc, o homem passou a melhor entender os organismos e a poder trabalhar mais intensamente o seu material genético (DNA), no que foi denominado de biotecnologia de ponta. Com a tecnologia do DNA recombinante, o homem pode manipular os genes de interesse, e utilizando-se de várias tecnologias, transferi-los para a espécie desejada, sem ter que passar pela fecundação. Aguarda-se uma nova revolução na agricultura que, ao mesmo tempo, obtenha incremento na produtividade, mínimo impacto ambiental e que esteja acessível aos pequenos produtores. A biotecnologia, se suficientemente apoiada e aplicada com cautela e segurança, pode cumprir com estes objetivos, representando um imenso potencial de ação para o bem estar da humanidade.

Transformação genética do feijoeiro

O feijão foi considerado por muitos anos como uma planta recalcitrante à manipulação pela tecnologia do DNA recombinante devido ao fato de não ter sido possível regenerar plantas de feijão a partir de células e tecidos em cultivo. Nosso grupo superou esses problemas através de um sistema de multi-organogênesis induzido em regiões meristemáticas apicais de embriões de feijão em cultivo em meios com alto teor de reguladores de crescimento vegetais (citocininas). Ao mesmo tempo, desenvolvemos também um sistema de introdução direta de genes nas células apicais, utilizando um equipamento desenvolvido em nosso laboratório (Embrapa Recursos Genéticos e

Biotecnologia), chamado de acelerador de partículas ou arma de genes ("gene gun"). Com esse equipamento, foi possível utilizar um processo chamado de biobalística (balística biológica) para obter plantas de feijoeiro contendo os genes de resistência a vírus.

Atualmente nosso grupo é o único no mundo que tem mostrado plantas geneticamente modificadas de feijoeiro com os genes presentes e estáveis na progênie. Nosso grupo tornou-se uma referência mundial na manipulação genética do feijoeiro pelas técnicas do DNA recombinante. Este fato tem atraído cientistas de vários países do mundo (Estados Unidos, México, Argentina, Índia, Japão, Quênia) ao nosso laboratório com o objetivo de aprender a tecnologia que tem sido utilizada para introdução de vários outros genes em feijão, visando tolerância à seca, resistência a doenças fúngicas e bacterianas e melhoramento nutricional.

Resistência Derivada do Patógeno

Sanford & Johnson (1985) foram os primeiros a propor a obtenção de resistência a patógenos em plantas geneticamente modificadas, pela utilização de seqüências genômicas dos próprios patógenos. Na verdade, esse conceito havia sido empregado há várias décadas. Antes mesmo de se conhecer a composição dos vírus de plantas, por volta de 1929, foram feitas observações de que inoculando-se plantas de fumo com uma estirpe fraca de vírus do mosaico do fumo, ao tentar reinocular com uma estirpe que causava sintomas mais severos, as plantas encontravam-se protegidas contra a super infecção (McKinney, 1929). Isto veio a se chamar proteção cruzada.

Nos anos 80, com o desenvolvimento de técnicas moleculares, foi possível testar a hipótese de que a proteção era mediada pela capa protéica (CP) do vírus, e que a resistência era válida para vírus homólogo ao que forneceu a capa. Sem se importar com qual que fosse o mecanismo, a tecnologia recebeu a denominação de "pathogen derived resistance", que traduzimos como 'resistência derivada do patógeno'.

Uma seqüência lógica do desdobramento desse conceito foi o desenvolvimento de estratégias para resistência a viroses, uma vez que os vírus, apesar de terem biologia molecular complexa, são, na maioria dos casos, estruturalmente mais simples que outros organismos causadores de doenças em plantas. A primeira estratégia empregada foi a expressão da CP em plantas geneticamente modificadas (PGM) através da tecnologia do DNA recombinante. O primeiro caso de sucesso foi a expressão da CP do vírus do mosaico do fumo (TMV) em plantas de fumo, gerando linhagens resistentes ao vírus (Powell *et al* 1986). Desde então, uma série de outras tentativas de utilização dessa estratégia foram realizadas, com a utilização de genes estruturais e não estruturais (para uma revisão, ver Souza & Gonsalves, 1999). Brevemente pôde-se listar: (1) expressão da capa protéica, (2) uso de satélites, (3) RNA senso e antisense, (4) RNAs defectivos, (5) expressão da replicase, (6) expressão de proteínas do movimento, (7) expressão de anticorpos (*plantbodies*).

Estratégias para resistência

Em geminivirus, a expressão da capa protéica não tem apresentado resultados satisfatórios. De fato, plantas transgênicas de fumo expressando a CP do *abutilon mosaic geminivirus* mostraram sintomas parecidos com os da infecção pelo vírus, e proporcionais à expressão do gene (Wilson 1993). Provavelmente isso se deve ao fato de a CP não ser essencial à infecção e ao desenvolvimento de sintomas em plantas infectadas por geminivirus.

Assim, têm sido propostas outras estratégias para obtenção de plantas transgênicas resistentes a geminivírus, tais como o RNA antisense e a expressão da CP e proteína associada à replicação mutada.

A estratégia de RNA antisense foi empregada para vírus de diferentes grupos, tais como comovirus, potyvirus, tobamovirus e outros. Na maioria dos casos, usou-se o mRNA antisense para o gene da CP. Em geral, obteve-se apenas um nível limitado de proteção, isto é, a proteção ficou limitada a baixos níveis de inóculo viral.

Entretanto, o uso de RNA antisense tem sido bastante eficiente no bloqueio da expressão de genes nucleares em plantas. Esses resultados serviram como suporte para a hipótese de que essa estratégia fosse útil no bloqueio de vírus com parte de seu ciclo de vida e de replicação ocorrendo no núcleo, tais como geminivírus e caulimovírus (Wilson 1993).

Os mecanismos de ação de seqüências antisense ainda são apenas parcialmente compreendidos. Em geral, é proposto que essas seqüências interfeririam, em nível traducional, de forma direta ou indireta, podendo ser em nível nuclear ou citoplasmático. A nível nuclear, a hibridização RNA-antisense e mRNA pode interferir no processamento do pré mRNA, inibindo o *splicing*, ou ainda o transporte do mRNA do núcleo para o citoplasma. Esse dúplex formado pode ser reconhecido pela RNase H a nível nuclear ou citoplasmático, e, subseqüentemente, o mRNA é degradado. No nível citoplasmático, a interação do RNA antisense e do mRNA pode interferir na ligação de fatores de iniciação de tradução ou inibir diretamente a tradução do mRNA pelos ribossomos. Interações RNA antisense e DNA podem também ocorrer, sendo esse híbrido também substrato para a RNase, que hidrolisa a fita de RNA.

Os fenômenos de co-supressão, podem também ser responsáveis pela resistência a vírus em plantas transgênicas. A presença de uma seqüência de DNA no genoma da planta poderá suprimir a expressão (silenciar) do próprio gene e de um gene homólogo presente. Assim, a presença de uma seqüência do vírus integrado ao genoma da planta poderá silenciar sua expressão por parte do próprio vírus, quer por interações entre os genes, quer por metilação ou ativação de mecanismos específicos de degradação de RNA.

Seqüências que englobam os genes *rep*, *trap*, *ren*, e *mp* do BGMV-BR foram posicionadas em antisense, sob controle do promotor 35S do *cauliflower mosaic virus* (35S CaMV). Essa construção foi então utilizada para obtenção de plantas geneticamente modificadas de feijoeiro (Aragão *et al* 1996).

Isolados do BGMV de alguns estados do Brasil (Goiás, São Paulo e Pernambuco) foram caracterizados no nível molecular e achou-se que havia uma grande homologia entre suas seqüências (75-100%) (Faria e Maxwell, 1999). Portanto, considera-se que o isolado utilizado nesse estudo representa os demais isolados existentes no país.

As plantas transgênicas com as seqüências do BGMV foram autofecundadas durante 4-5 gerações e, então, inoculadas com o vírus. A inoculação foi feita com a utilização de moscas brancas virulíferas. Algumas linhagens transgênicas não apresentaram diferença significativa nos sintomas em relação às plantas não transgênicas. Entretanto, duas linhagens mostraram um retardamento no aparecimento dos sintomas, além desses serem mais fracos que aqueles normalmente apresentados pelas plantas controle. Além disso, uma titulação do vírus através de análises por *Southern blot* nas plantas inoculadas mostrou que havia uma quantidade inferior de DNA viral nas plantas transgênicas (Aragão *et al.*, 1998).

Transdominantes letais

Embora os resultados tenham sido bastante animadores, o nosso objetivo principal ainda era a obtenção de plantas imunes ao vírus, isto é, linhagens nas quais não ocorresse replicação viral. Assim, outra estratégia foi proposta, denominada transdominância letal. Essa estratégia envolve a criação de uma Rep não funcional que interferiria com a ligação do tipo normal de Rep produzido pelo vírus (Hanson *et al.*, 1995). A mutagênese da proteína Rep de BGMV mostrou que a mutação de um códon no sítio envolvido na etapa de corte do DNA ou no motivo de ligação e transferência de nucleosídeo trifosfato - NTP-binding motifs - (Hanson *et al.*, 1995) são letais. Esses dois motivos são conservados em todas as proteínas Rep, e são sítios atrativos para construir plantas transdominantes letais (Hanson *et al.*, 1999). Obtivemos plantas transgênicas contendo o gene *rep* com a mutação D262R (ácido aspártico da posição 262 para arginina), que inibiu eficientemente a replicação do DNA A, em *trans*, em experimentos com células de fumo. Entre as plantas geneticamente modificadas de feijão obtidas, foi possível conseguir a completa resistência ao vírus

(Figuras 2 e 3). Essas plantas estão, no momento, na décima geração, apresentando o mesmo comportamento.

Entre outras conclusões do nosso trabalho, pode-se afirmar que: a) é possível a transformação consistente de feijoeiro via método de biobalística; b) O gene *rep* mutagenizado no motivo relacionado com a ligação de nucleosídeo trifosfato, expresso em *trans*, inibiu completamente a infecção das plantas, pelo menos quanto ao vírus homólogo ao de onde fora extraído o gene.



Figura 2. Planta geneticamente modificada (direita) mostrando imunidade à doença do mosaico dourado e uma planta não modificada (esquerda) apresentando os sintomas típicos. Ambas foram inoculadas com o vírus transmitido por mosca branca.



Figura 3. Vargens de uma planta geneticamente modificada resistente ao vírus do mosaico dourado (esquerda) e vargens de plantas comuns com os sintomas provocados pela infecção com o vírus (direita).

As variedades de feijoeiro resistentes ao mosaico dourado estão sendo avaliadas quanto à segurança alimentar e ambiental através de ensaios da Rede Embrapa de Biossegurança, que é constituída de 16 Centros de pesquisa da Embrapa, Universidade de São Paulo e Universidade Fluminense. Espera-se que estes estudos estejam completados em três anos quando possivelmente as sementes destas variedades serão disponibilizadas para os produtores. Este é o maior exemplo mundial de impacto social e alimentar do uso da tecnologia do DNA recombinante.

Referências Bibliográficas

- Aragão FJL, Barros LMG, Brasileiro ACM, Ribeiro SG, Smith FD, Sanford JC, Faria JC & Rech EL 1996 *Theoretical Applied Genetics* 93:142-150.
- Aragão FJL, Ribeiro SG, Barros LMG, Brasileiro ACM, Maxwell DP, Rech EL, Faria JC 1998 *Molecular Breeding* 4:491-499.
- Costa A S 1965 *FAO Plant Prot Bull* 13:121-130.
- Faria JC & Maxwell DP 1999 *Phytopathology* 89:262-268.
- Faria J C, Gilbertson R L, Hanson S F, Morales F J, Ahlquist P, Loniello A O & Maxwell D P 1994 *Phytopathology* 84:321-329.
- Fontes EPB, Gladfelter H J, Schaffer RL, Petty ITD & Hanley-Bowdoin L 1994 *Plant Cell* 6:405-416.
- CIAT – Centro Internacional de Agricultura Tropical 2002 Common bean improvement. Cali, <http://www..ciat.cgiar.org/beans/index.htm> (16. maio. 2002).
- Gálvez G E & Moráles F J 1989 *Bean Production in the Tropics* CIAT Cali, Colombia.
- Gilbertson R L, Faria J C, Ahlquist P & Maxwell D P 1993 *Phytopathology* 83:709-715.
- Hanson S F, Hoogstraten R A, Ahlquist P, Gilbertson R L, Russell D R & Maxwell D P 1995 *Virology* 211:1-9.
- Hanson S F & Maxwell D P 1999 *Phytopathology* 89:480-486.
- Howarth A J, Caton J, Bossert M & Goodman R M 1985 *PNAS USA* 82:35723576.
- Lazarowitz S G 1992 *CRC Crit Rev Plant Sci* 11:327-349.
- McKinney HH 1929 *Journal Agricultural Research* 39:557-578.
- Menten JOM, Tulmann Neto A & Ando A 1980 *Turrialba* 30:173-176.
- Orozco BM & Hanley-Bowdoin L 1996 *Journal of Virology* 70:148-158.
- Powell PA, Nelson C, De B, Hoffmann N, Rogers SG, Fraley RT & Beachy RN 1986 *Science* 232:738-743.
- Sanford JC & Johnson SA 1985 *Journal of Theoretical Biology* 115:395-405.
- Souza Jr MT & Gonsalves D 1999 *Fitopatologia Brasileira* 24:485-506.
- Timmermans M C P, Das O P & Messing J 1994 *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 45:79-112.
- Wilson TMA 1993 *PNAS USA* 90:3134-3141.