



**Universidade de Brasília
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Agronomia**

**Transformação genética de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) visando à
introdução de genes de resistência a viroses.**

Andréa Rachel Ramos Cruz Sousa

TESE DE DOUTORADO EM AGRONOMIA

Brasília/DF,
Março /2013.



Universidade de Brasília
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Agronomia

Transformação genética de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) visando à introdução de genes de resistência a viroses.

Andréa Rachel Ramos Cruz Sousa

Orientador: Ricardo Carmona
Co-Orientador: Francisco José Lima Aragão
(Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)

TESE DE DOUTORADO EM AGRONOMIA

Publicação 011D

Brasília/DF,
Março de 2013.

**Publicação
011D/2013**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de
Brasília. Acervo 1007025.

S725t Sousa, Andréa Rachel Ramos Cruz.
Transformação genética de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*
L. Walp) visando à introdução de genes de resistência
a viroses / Andréa Rachel Ramos Cruz Sousa. -- 2013.
vi, 109 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) - Universidade de Brasília, Faculdade
de Agronomia e Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação
em Agronomia, 2013.
Inclui bibliografia.
Orientação: Ricardo Carmona.

1. Plantas - Melhoramento genético. 2. Feijão.
3. Ácido ribonucléico. I. Carmona, Ricardo. II. Título.

ODU 631.54

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

SOUSA, A. R. R. C. **Transformação genética de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) visando à introdução de genes de resistência a viroses.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2013, 122 p. Tese de Doutorado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DA AUTORA: Andréa Rachel Ramos Cruz Sousa

TÍTULO DA TESE: **Transformação genética de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) visando à introdução de genes de resistência a viroses.**

GRAU: Doutor

ANO: 2013

É concedida à Universidade de Brasília a permissão para reproduzir cópias desta tese de doutorado para único e exclusivamente propósitos acadêmicos e científicos. A autora reserva para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito da autora. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

Andréa Rachel Ramos Cruz Sousa
CPF: 49424297300
Tel. (61) 99621322
E-mail: rachelbsb@terra.com.br



Universidade de Brasília
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Agronomia

Transformação genética de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) visando à introdução de genes de resistência a viroses.

Andréa Rachel Ramos Cruz Sousa

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA DA FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTORA EM AGRONOMIA.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Ricardo Carmona
Orientador (Universidade de Brasília)

Prof. Dr. José Ricardo Peixoto
Examinador interno (Universidade de Brasília)

Prof. Dr. Carlos Roberto Spehar
Examinador interno (Universidade de Brasília)

Dra. Fernanda Rausch Fernandes
Examinadora externa (Embrapa CNPH)

Dr. André Melro Murad
Examinador externo (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)

Brasília/DF, 26 de março de 2013.

Deus nos conceda, a cada dia, uma nova página de vida no livro do tempo. Aquilo que colocamos nela corre por nossa conta.

(Chico Xavier)

Dedico essa tese com todo meu amor e gratidão a Joaquim Orlando Barros de Sousa, por ser marido, amigo e parceiro de todas as horas.

Agradecimentos

A Deus por ter me fortalecido em todos os momentos dessa caminhada.

Aos meus pais Joel Cruz e Osana Cruz, pelos ensinamentos transmitidos que serviram e servem de fundamento para minha vida.

Ao meu marido Joaquim Orlando pela ajuda incondicional em todas as fases desse trabalho.

Aos meus irmãos Marcelo, Alessandra, Rodrigo e todos meus familiares pela torcida e incentivo.

Ao sempre orientador, Francisco José Lima Aragão pela confiança, orientação, incentivo e disponibilidade durante a realização desse trabalho. O meu sincero agradecimento e admiração.

Ao sempre professor, Ricardo Carmona, pela confiança, amizade e incentivo durante esse trabalho.

Aos professores Francisco Freire e Francisco Campos por ter cedido as sementes e estirpes dos vírus.

Aos professores José Ricardo Peixoto e Jean Kleber pela amizade e conselhos sempre oportunos.

À Universidade de Brasília pelo apoio institucional e a CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por todo apoio institucional.

À FINATEC por ter custeado o projeto.

Aos pesquisadores da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Joaquim Castelo, Pedro Barreto, Glaucia Cabral, Cristiano Lacorte, André Murad pela amizade, e especialmente aos queridos Giovani Viana e Júlio Carlai pela ajuda com os ensaios moleculares.

À minha querida amiga Ana Cristina Gomes por todo incentivo, conselhos e ajuda incondicional.

À amiga Fernanda Fernandes pelos conselhos e ombro sempre amigo. Obrigada pelo incentivo e toda torcida.

Às minhas queridas amigas Thaina, Juliane e especialmente a Ana Zotta pela ajuda com as figuras, companhia no laboratório nos finais de semana e feriados.

Aos queridos companheiros do Laboratório de Transferência e Expressão de Genes da Embrapa: Serginho, Emanuel, Elsa, Maria Laine, Thais, Cristiane, Cristina, Nayane e especialmente a Abdul pela ajuda com o *summary*, a dona Isabel pelas orações, ajuda com as vidrarias e as autoclavagens.

Sumário

Resumo	v
Abstract	vi

Capítulo I – Engenharia Genética do Feijão-Caupi: Uma Revisão

1. Introdução	2
1.1. Revisão de Literatura	6
1.2. Aspectos Botânicos	8
2. Principais Víruses da Cultura do Feijão-Caupi.....	9
2.1. <i>Cowpea severe mosaic virus</i> CPSMV	10
2.2. <i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i> CABMV	12
3. Melhoramento Genético Clássico do Feijão-Caupi.....	14
4. RNA interferente (RNAi).....	17
5. Métodos de Transformação Genética em Plantas	20
6. Meristemas Apicais na Transformação Genética.....	23
7. Transformação Genética do Feijão-caupi	24
8. Hipótese	26
9. Objetivos.....	26
9.1. Objetivo Geral	26
9.2. Objetivos Específicos.....	26
Referências Bibliográficas	28

Capítulo II – Construção do Vetor do Tipo Intron-Haipin (RNAi) Visando Resistência à Víruses do Feijão-caupi

1. Introdução	37
2. Material e Métodos.....	39
2.1. Construção do vetor	39
2.2. Construção do Vetor para Transformação Genética.....	42
3. Resultados e Discussão	44
4. Conclusão	46
Referências Bibliográficas	47

Capítulo III – Transformação Genética. Análise das Plantas Geneticamente Modificadas de feijão-caupi. Desafio com o CPSMV e CABMV

1. Introdução	52
2. Material e Métodos.....	54
2.1. Transformação Genética do Feijão-Caupi Mediada pelo Processo Biobalístico.....	54
2.2. Detecção de Transgenes em Linhagens GM por PCR	59
2.3. Aclimação das Plantas GM	60
2.4. Análise de <i>Southern blot</i>	61
2.4.1. Extração do DNA Genômico, Digestão Enzimática e Transferência para Membrana.....	62
2.4.2. Hibridização Com Sonda dos Vírus, Lavagens e Exposição da Membrana.....	63
2.5. Análise de <i>northern blot</i>	65
2.5.1. Extração do RNA com uso de Trizol® (Invitrogen).....	65
2.5.2. Preparação, Hibridização, Lavagem e Exposição da Membrana.....	66

2.6.	Análise de <i>Dot blot</i>	66
2.7.	Teste de Progênie	67
2.8.	Desafio das Linhagens GM com o CPSMV e CABMV e Obtenção de Dados Agronômicos (Germinação e Peso de Sementes)	68
3.	Resultados e Discussão	70
3.1.	Transformação genética.....	70
3.2.	Detecção de Plantas GM por meio da PCR	71
3.3.	Aclimação das Plantas GM	73
3.4.	<i>Southern blot</i>	74
3.5.	<i>Northern blot</i>	75
3.6.	<i>Dot blot</i>	76
3.7.	Teste de Progênie.....	77
3.8.	Desafio com os Vírus e Dados Agronômicos (Germinação e Peso de Sementes).....	79
4.	Conclusões.....	84
	Referências Bibliográficas	85

Capítulo IV – Avaliação das Linhagens do feijão-caupi GM para Tolerância ao Herbicida Imazapyr

1.	Introdução	89
1.1.	O imazapyr.....	90
1.2.	Plantas Geneticamente Modificadas (GM) Tolerantes a Herbicidas	91
2.	Material e Métodos.....	92
3.	Resultados e Discussão	92
3.1.	Avaliação das Linhagens Tolerantes ao Imazapyr.....	92
3.2.	Análise de <i>Southern blot</i>	94
4.	Conclusões.....	96
	Referências Bibliográficas	97

Considerações Finais e Perspectivas

Introdução.....	101
Perspectivas.....	102
Referências Bibliográficas	103
APÊNDICE	104

Lista de figuras

	pág.
Figura 1.1. Representação da estrutura das duas partículas do CPSMV, representando o genoma bipartido em duas partículas isométricas comuns aos vírus do gênero <i>Comovirus</i>	10
Figura 1.2. Planta de feijão-caupi apresentando bolhosidades, sintoma típico do CPSMV	12
Figura 1.3. Representação da estrutura da partícula dos <i>Potyvirus</i> , representando a organização da partícula alongada e flexuosa	12
Figura 1.4. Esquema representando o processo de obtenção de uma nova cultivar de feijão-caupi via cruzamento	16
Figura 1.5. Modelo do mecanismo de RNA interferente	19
Figura 1.6. Equipamento de biobalística desenvolvido para acelerar micropartículas carreadoras de material genético	22
Figura 2.1. Estratégia para construção do vetor pSIUCSMVCABM	41
Figura 2.2. Vetor final pSIUCSMVCABMV usado na transformação via biobalística de meristemas apicais de feijão-caupi	45
Figura 2.3. Estrutura genética e organização gênica do CABMV e CPSMV	46
Figura 3.1. Sequência de etapas do experimento de transformação genética até o desenvolvimento em casa de vegetação das plantas T ₀ de feijão-caupi	58
Figura 3.2. Esquema mostrando estrutura genética e organização gênica dos vírus	64
Figura 3.3. Inoculação das plantas com o CPSMV e CABMV. A: Folhas infectadas com os isolados de CPSMV e CABMV em tampão fosfato e B: inoculação dos vírus em plantas de feijão-caupi	69
Figura 3.4. Eletroforese das plantas mães (T ₀) de feijão-caupi pSIUCSMVCABMV após PCR com os primers Caupi 1 e Caupi 2	71
Figura 3.5. Comparação da linhagem com padrão atípico de desenvolvimento e uma linhagem com padrão normal, onde A- planta da linhagem T ₀ 101 GM e B- planta da linhagem T ₀ 12 GM, ambas com 80 dias após aclimação	74
Figura 3.6. <i>Southern blot</i> de plantas GM resistentes ao CPSMV e CABMV	75
Figura 3.7. Interferência genética após inoculação com os vírus CPSMV e CABMV expressando siRNA em planta GM de feijão-caupi	76
Figura 3.8. Análise de <i>Dot blot</i>	77
Figura 3.9. Plantas GM inoculadas com os vírus CPSMV e CABMV	80
Figura 3.10. Plantas GM de feijão-caupi inoculadas de maneira severa	82
Figura 3.11. Teste de germinação das sementes obtidas das plantas GM inoculadas com os vírus CPSMV e CABMV e controle não inoculado	83
Figura 3.12. Peso das sementes oriundas das plantas GM inoculadas com os vírus CPSMV e CABMV	83
Figura 4.1. Eletroforese das plantas GM após PCR com os primers SojaE1F e SojaE1R	92
Figura 4.2. Resultado do teste de <i>S. blot</i> , onde a linha 1 representa o controle negativo, as linhas de 2 a 11 representam as linhagens GM 12, 21, 39, 52, 59, 71, 99, 110, 112 e 119. Os números à esquerda referem-se ao marcador molecular em Kb	95
Figura 4.3. Plantas das linhagens GM e Controle. Onde A1: 59, A2: 12 e A3: Controle negativo submetidas a 200 g.ha ⁻¹ do herbicida imazapyr	95

Lista de Tabelas

	pág.
Tabela 1.1. Classificação Botânica do feijão-caupi	8
Tabela 3.1. Características da cultivar BRS Novaera	56
Tabela 3.2. Experimentos de transformação genética do feijão-caupi com o vetor pSIUCSMVCABMV	70
Tabela 3.3. Análise via PCR das plantas T ₁ de pSIUCSMVCABMV, indicando número de plantas analisadas e positivas bem como o teste qui-quadrado	78
Tabela 4.1. Relação do número de plantas e sintomas apresentados ao final de 30 dias da pulverização com 100g.ha ⁻¹ com herbicida imazapyr	93
Tabela 4.2. Relação do número de plantas e sintomas apresentados ao final de 30 dias da pulverização com 200g.ha ⁻¹ com herbicida imazapyr	94

Resumo

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) é conhecido nas regiões Norte e Nordeste do Brasil como feijão-de-corda, feijão-verde, feijão macassar ou feijão-de-praia. É uma planta muito importante na alimentação humana por ser fonte natural de proteínas, calorias, vitaminas e minerais. Dentre as doenças que mais causam perdas para a cultura destacam-se as viroses, e dentre elas o mosaico severo (*Cowpea severe mosaic virus*- CPSMV) que pode levar a perdas de até 100% da produção nas áreas afetadas, e a virose causada pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), que tem importância devido à sua ampla ocorrência. O presente trabalho teve como objetivo a obtenção de plantas de feijão-caupi geneticamente modificadas (GM) resistentes ao CPSMV e ao CABMV, por meio da estratégia RNA interferente. Nesse trabalho foram obtidas 15 linhagens GM, sendo testadas 14 delas para avaliar a resistência aos vírus. Algumas linhagens apresentaram alta resistência para as condições de inoculação severa sem alteração na produção de vagens e sementes viáveis, enquanto que para as plantas controle a inoculação severa resultou na morte de todas as plantas. As linhagens GM também apresentaram tolerância ao herbicida imazapyr na concentração de 200 g.ha⁻¹, o que foi considerado um resultado promissor, tendo em vista que a cultura do feijão-caupi atualmente encontra-se em expansão no cenário agrícola nacional. Nos testes de *Southern blot*, *northern blot* e *dot blot* foi confirmada a integração dos transgenes no genoma das linhagens, assim como a presença dos pequenos RNA interferentes, o que tem relação direta com a alta tolerância apresentada para os vírus. A análise da progênie realizada pelo teste qui-quadrado não demonstrou padrão de segregação Mendeliana na geração F₁. Isso pode ser explicado devido à ocorrência de quimerismos nos transformantes primários (F₀). Os resultados obtidos sugerem a possibilidade de utilização das melhores linhagens GM em experimentos em nível de campo visando selecionar genótipos promissores que possam fazer parte de programas de melhoramento da cultura.

PALAVRAS-CHAVES: feijão-caupi, transformação genética, *Cowpea aphid-borne mosaic virus*, *Cowpea severe mosaic virus*, RNA interferente.

Abstract

Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.), known as *feijão-de-corda*, *feijão-verde*, or *feijão macassar* and *feijão-de-praia* in the North and Northeastern regions of Brazil, is an important crop for human nutrition. Besides serving as a natural source of protein and energy, it is rich in vitamins and minerals. Although it is a widespread crop which can be grown in areas of extreme climatic and environmental conditions, it is confronted with certain problems like pests and diseases among others. Among diseases that devastate the crop are those caused by *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) and *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), which together may cause 100% losses in production. This work sought to develop a strategy using RNA interference to generate genetically modified (GM) cowpea plants which are resistant to CSMV and CABMV. Fifteen (15) GM lines were obtained, of which 14 were tested for resistance against the viruses. While some of the lines showed high degree of resistance without any alteration in seed pod development and seed germination, control plants died soon after inoculation with the viruses. The GM lines were also tolerant to the herbicide imazapyr at a concentration of up to 200 g/ha, showing potential in the production system of cowpea given the continuous nationwide expansion of the crop. Southern blot analysis confirmed the integration of the transgenes inserted in the genome of the lines. We also detected small interfering RNAs (siRNAs) responsible for gene silencing of the viruses and thus conferring resistance to the plant. Progeny analysis using chi-square test did not show Mendelian segregation in F₁ generation. This may be attributable to the possible existence of chimeras in the primary transformants (F₀). These results may be applied in field experiments using superior lines developed here for breeding programs involving the crop.

Keywords: cowpea, genetic transformation, *Cowpea aphid-borne mosaic virus*, *Cowpea severe mosaic virus*, RNA interference.

CAPÍTULO I

Engenharia Genética do feijão-caupi: Uma revisão

1. Introdução

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) é conhecido no Nordeste Brasileiro como feijão-de-corda, feijão-verde, feijão-caupi, fradinho ou feijão macassar. Ademais, na região Norte é também conhecido como feijão-de-praia. É uma planta pertencente à família Fabaceae, muito importante na alimentação humana por ser fonte natural de proteínas, calorias, vitaminas e minerais. É uma cultura estreitamente relacionada com as atividades de subsistência e de significativa importância socioeconômica. Pode ser consumido verde ou seco, sendo a última modalidade a preferida pela maioria da população. No Nordeste Brasileiro entra na constituição de pratos típicos da culinária, tais como abará (acarajé) e baião de dois (FREIRE FILHO *et al.*, 2011).

O feijão-caupi é uma das espécies graníferas mais amplamente adaptada, versátil e nutritiva, constituindo excelente fonte proteica para alimentação humana ou animal por apresentar todos os aminoácidos essenciais, e além do mais é fonte de vitaminas, sais minerais e fibras. O feijão-caupi é um dos alimentos mais consumidos nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, e além do elevado valor nutricional também é gerador de renda especialmente para o pequeno produtor nordestino (ROCHA, 2009).

É pouco exigente em condições edafoclimáticas, adapta-se a solos de baixa fertilidade natural, devido à sua grande capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico, em função da simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium*, é bastante utilizada como adubação verde.

A ampla variabilidade genética desta cultura permite que seja usada em diferentes sistemas de produção, tradicionais e modernos. A importância do feijão-caupi no contexto da agricultura nordestina é evidenciada por sua ampla disseminação na região, sendo cultivado em praticamente todos os municípios do semiárido (BARRETO *et al.*, 2001).

Atualmente o cultivo do feijão-caupi tem despertado o interesse de grandes produtores do Centro-Oeste, onde a área cultivada tem se expandido principalmente como forma de safrinha logo após o cultivo da soja ou arroz (FREIRE FILHO *et al.*, 2008), em função do desenvolvimento de cultivares que possibilitam o cultivo mecanizado.

Apesar da enorme importância social para o país, quando comparada com soja e a ervilha, o feijão-caupi é uma cultura relativamente pouco explorada e pouco estudada (EHLERS & HALL, 1997; FREIRE FILHO *et al.*, 2011). Contudo, descobertas científicas recentes em melhoramento genético avançam para a descoberta de novas cultivares, sobretudo de porte ereto e mais precoces, as quais possibilitem colheita mecanizada, tratos culturais mais simples e a redução da aplicação de defensivos (FREIRE FILHO *et al.*, 2011). Estes novos conhecimentos, formam uma base sob a qual o melhoramento genético desta cultura poderá ser feito de forma a obter cultivares melhor adaptadas às exigências de cultivo e mercado. Dentre essas exigências, citam-se: resistência a pragas e doenças, maior conservação de pós-colheita, porte da planta resistente ao acamamento, possibilidade de mecanização da colheita e maior valor nutricional.

Na década de 1980 o Brasil era o segundo maior produtor de feijão-caupi, contribuindo com 26% da produção mundial e 82% da produção do continente americano (WATT *et al.*, 1987). Desde então, houve gradativa queda na produção, colocando o Brasil na terceira posição (SINGH *et al.*, 2000), ficando o cultivo em algumas regiões restrito à agricultura de subsistência. Segundo dados da CONAB (2012), a área cultivada com feijão-caupi no Brasil atualmente atinge 1,3 milhões de hectares com a produção de 480 mil toneladas.

O feijão-caupi é uma leguminosa anual, herbácea, produz frutos do tipo legume e, dependendo da variedade, pode apresentar variação na altura da planta. As raízes podem atingir até dois metros de profundidade no solo, o que auxilia a planta a resistir à seca. No

Brasil, trata-se do único tipo de feijão capaz de sobreviver com sucesso tanto na região Norte, onde a umidade é alta e o solo é argiloso, como na Nordeste, onde o clima é seco, e o solo é arenoso.

Em países da América Central, leste e sul da África, as estatísticas de produção incluem o feijão-caupi e o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) como uma única cultura (TIMKO *et al.*, 2000), o que de certa maneira gera dificuldade na estimativa da real área plantada dessa cultura.

Dados disponíveis na FAO (2011) apresentam a produção mundial de feijão-caupi girando em torno de 5,5 milhões de toneladas de grãos em uma área de 10,5 milhões de hectares. Destacam-se entre os maiores produtores a Nigéria, o Niger e o Brasil, respectivamente, os quais representam 84,1% da área e, 70,9% da produção mundial dessa cultura.

Em média, a produtividade do feijão-caupi (130-500 kg.ha⁻¹) é menor que a do feijão comum (565-630 kg.ha⁻¹) em outras regiões brasileiras (FREIRE FILHO *et al.*, 2011). Isto se deve ao cultivo em áreas pouco férteis e ao baixo nível de tecnologia empregado. Entretanto, já foram obtidos, experimentalmente, produtividade de grãos acima de 3 t.ha⁻¹ (BEZERRA, 1997), tendendo para que o potencial genético ultrapasse 6 t.ha⁻¹.

No Brasil, historicamente a produção de feijão-caupi concentra-se nas regiões Nordeste e Norte do país apresentando cerca de 1,3 milhões de hectares de área plantada, com produção de 480 mil toneladas e produtividade de 366 Kg.ha⁻¹, sendo o Ceará o maior produtor nacional, com estimativa de 20% da produção brasileira (CONAB, 2012).

Em áreas férteis ou irrigadas, com alto potencial produtivo, o feijão-caupi tem sido substituído por outras culturas como a cana-de-açúcar, fruteiras ou plantas forrageiras, resultando em um déficit de produção e no aumento de preços (MAY *et al.*, 1988, FREIRE FILHO *et al.*, 2005).

Finalmente, a cultura se destaca por sua importância econômica e social. Por exemplo, apenas no estado do Ceará, seu cultivo era responsável por cerca de 2,5 milhões de postos de trabalho. Constitui-se ainda em importante fonte de proteínas para os agricultores de baixo poder aquisitivo, contribuindo com 31% da proteína consumida no nordeste. Na sua composição encontram-se 24% de proteínas e 340 calorias para cada 100 g de sementes. Estes valores são superiores aos encontrados na farinha de mandioca, na carne e no ovo (FREIRE FILHO *et al.*, 2011).

Apesar da rusticidade da cultura, vários são os patógenos e as pragas que afetam a produção do feijão-caupi, incluindo bactérias, fungos, nematóides e predação por insetos (especialmente na fase pós-colheita). Algumas doenças limitam a produção de feijão-caupi, no nordeste brasileiro, especialmente as infecções provocadas por vírus, como o *Cowpea aphid-borne mosaic virus (Potyvirus)*. E encontra-se presente em todas as regiões produtoras de feijão-caupi, seguido pelo e o *Cowpea severe mosaic virus (Comovirus)*, pela severidade. Depois da infecção pode ocorrer redução de 60 a 80% da produtividade em cultivares mais susceptíveis, o que tem ocorrido predominantemente nas variedades tradicionalmente cultivadas (PIO RIBEIRO *et al.*, 1997; FREIRE FILHO *et al.*, 1999; 2005).

Embora existam programas que vêm tentando minimizar os problemas decorrentes das doenças que acometem o feijão-caupi, estes têm se limitado a metodologias convencionais de melhoramento genético e necessitariam de um impulso visando aumentar sua eficiência (SINGH *et al.*, 2000, 2002). Os genótipos que apresentam fonte de resistência as principais doenças frequentemente apresentam baixa produtividade, além de cor, tamanho e dureza dos grãos que fogem do padrão comercial (BARRETO *et al.*, 2001). Tal fator limitante poderia ser minimizado de forma complementar com o uso de ferramentas da biotecnologia moderna, propiciando ao feijão-caupi condições de competitividade e características que atendam às necessidades comerciais internacionais (TIMKO, 2000).

Para realizar melhoramento com a ferramenta da engenharia genética é fundamental que seja desenvolvido um sistema de cultura de tecidos e de regeneração que seja eficiente (ARAGÃO & CAMPOS, 2007). Recentemente foi estabelecido um sistema de transformação genética de feijão-caupi no Laboratório de Transferência e Expressão de Genes da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (IVO *et al.*, 2008) que se baseia na transformação genética de meristemas apicais. A otimização do referido sistema de transformação, com frequência adequada para geração de eventos-elite que possam ser introduzidos em programas de melhoramento genético, possibilitará a introdução de genes de interesse agrônômico no feijão-caupi.

Trabalhos recentes relatam o sucesso na obtenção de plantas resistentes a viroses com estratégias baseadas em RNA interferente, tendo sido geradas linhagens que já foram introduzidas em programas de melhoramento genético (BONFIM *et al.*, 2007).

1.1. Revisão de Literatura

O centro de origem do feijão-caupi é bastante controverso, autores como STEELE & MEHRA (1980) e NG & MARÉCHAL (1997) citam o oeste do continente africano, mais especificamente da Nigéria como sendo o mais provável local de origem dessa espécie. Contudo, estudos realizados por PADULOSI & NG (1997) indicam que a origem mais provável seja a região de Trasvaal, na África do Sul.

Segundo GANDAVO (2002), desde 1568 existem relatos da existência de diversos tipos de feijões no Brasil sendo cultivados na Bahia. É muito provável que dentre esses feijões existissem cultivares de feijão-caupi. O mesmo autor cita que nessa época, historicamente existia uma rota de comércio entre o Brasil e o Oeste da África, tendo ocorrido comercialização de feijão-caupi nesse período. É provável ainda, que o feijão-caupi tenha sido introduzido na América do Sul no período colonial, trazido pelos espanhóis e

portugueses para suas colônias e posteriormente introduzido na região litorânea da Bahia, e dessa região tenha se propagado atingindo todo território brasileiro (ARAÚJO & WATT, 1988, FREIRE FILHO *et al.*, 1999). E dessa forma, tornou-se um componente extremamente importante no cardápio do brasileiro, sobretudo do nordestino que tem no feijão-caupi uma fonte de proteína. Recentemente a produção dessa cultura tem se expandido para as regiões Norte e Centro-Oeste do Brasil, e tem demonstrado potencial para exportação principalmente para países como Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Portugal, Bélgica, Argélia, Egito, Gana, Índia e Turquia (FREIRE FILHO *et al.*, 2009). Nesse sentido, é de grande importância o desenvolvimento de metodologias que possibilitem a obtenção de cultivares mais competitivas para os mercados nacional e internacional.

FREIRE FILHO *et al.*, (2005) referem-se ao feijão-caupi como pertencente às seguintes classificação taxonômica, conforme apresentado na tabela 1.1.

Tabela 1.1. Classificação Botânica do feijão-caupi. Adaptado de FREIRE FILHO *et al.*, (2011).

Classificação botânica de <i>Vigna unguiculata</i> L.	
Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Fabales
Família	Fabaceae
Subfamília	Faboideae
Tribo	Phaseolae
Subtribo	Phaseolina
Gênero	<i>Vigna</i>
Espécie	<i>Vigna unguiculata</i>
N. científico	<i>Vigna unguiculata</i> L. Walp

1.2. Aspectos Botânicos

As sementes de feijão-caupi, dependendo da temperatura, após o plantio emergem por volta de 2 a 3 dias, sendo bem adaptadas a diferentes condições edafoclimáticas, não sendo muito exigentes em condições de fertilidade de solos e clima. Por ser uma planta de metabolismo C3, a capacidade fotossintética máxima de suas folhas é obtida a partir do 20º dia após a formação (SUMMERFIELD *et al.*, 1985). FREIRE FILHO *et al.*, (2005) relatam que, dependendo da cultivar o ciclo da planta pode variar em média de 60 a 90 dias após a semeadura, tendo obtido maior destaque para as cultivares classificadas como ciclo superprecoce (60 dias após a semeadura), precoce (61 a 70 dias) e médio-precoce (71 a 80 dias).

As folhas do feijão-caupi são trifoliadas com estipulas na base do pecíolo, com os dois folíolos laterais oblíquos em relação ao central. Apresenta inflorescências formadas a partir do eixo central, consistindo de um racemo modificado contendo de seis a oito pares de gemas florais que são dispostas alternadamente. Apresenta flores perfeitas, zigomorfas e geralmente são distribuídas aos pares no racemo, mais precisamente na extremidade do pedúnculo, o qual é desenvolvido a partir da axila da folha. Apresentam cálice do tipo pentâmero, persistente e gamossépalo, apresentando coloração que pode ir do verde ao roxo. A corola também é pentâmera e dialipétala, a maior pétala é denominada estandarte sendo a única pétala que se abre completamente na antese, localiza-se na região posterior da flor, as outras quatro pétalas continuam na mesma posição que ocupavam na gema. As pétalas variam na coloração podendo ser totalmente brancas ou roxas. As flores apresentam dez estames cada uma, dos quais nove estão unidos uns aos outros, sendo um livre. O carpelo apresenta estigma encurvado e úmido que facilita a aderência dos grãos de pólen. O ovário é estreito e alongado, com os óvulos distribuídos em linha, o que explica o comprimento geralmente extenso da vagem. As flores abrem-se apenas nas primeiras horas da manhã (por volta de 5:00 h), não permitindo que a polinização por parte de insetos ocorra facilmente. O comprimento das vagens depende da cultivar, para a cultivar Novaera o comprimento médio é de 15 cm (BEZERRA, 1997; FREIRE FILHO *et al.*, 2011).

2. Principais Viroses da Cultura do Feijão-Caupi

São várias as doenças que afetam a cultura do feijão-caupi, sendo as viroses as que mais limitam a sua produtividade (FREIRE FILHO *et al.*, 2011). Em vários lugares do mundo já foram identificadas mais de 20 espécies de vírus que podem infectar o feijão-caupi. Dentre as viroses mais importantes da cultura destacam-se o *Cowpea severe mosaic virus* CPSMV pela sua severidade que pode levar a perdas de aproximadamente 80% da

produção e o *Cowpea aphid-borne mosaic virus*, CABMV, que tem importância devido à sua ampla ocorrência (FREIRE FILHO *et al.*, 2011).

2.1. *Cowpea severe mosaic virus* CPSMV

Segundo PEREZ & CORTÉZ-MONLLOR (1970), o primeiro relato da ocorrência do CPSMV foi feito nos Estados Unidos da América nos estados de Arkansas, Indiana e Lousiana. O vírus CPSMV pertence à família *Secoviridae* e ao gênero *Comovirus*, apresenta genoma com 9,73 kb, é um vírus de RNA, encontra-se dividido em duas moléculas de hélice simples, a primeira de 6,0 kb e a segunda de 3,73 kb e ainda a região *VPg* e *Poly A*. Para que ocorra a infecção ambas as moléculas são necessárias (BRADSHAW *et al.*, 2011). A Figura 1.1 representa a estrutura das duas partículas do CPSMV.

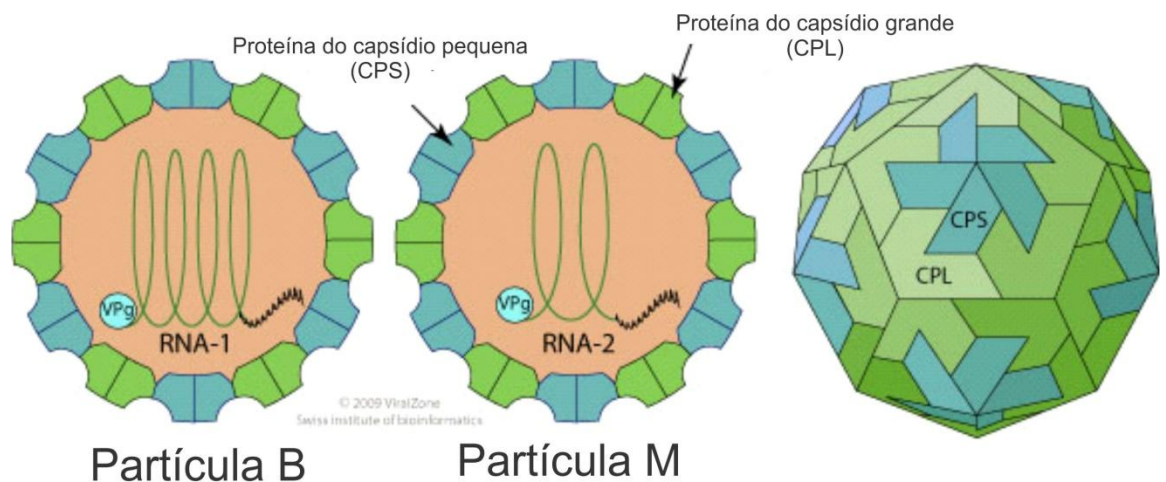


Figura 1.1. Representação da estrutura das duas partículas do CPSMV, representando o genoma bipartido em duas partículas isométricas comuns aos vírus do gênero *Comovirus*. As partículas são constituídas por duas proteínas capsidiais, uma maior (37 KDa) e outra menor (23 KDa). Disponível em: http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/298.html.

O *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) encontra-se disseminado e apresenta difícil controle devido à grande variedade de hospedeiros e à numerosa população de vetores, a maioria deles dos gêneros *Cerotoma* e *Diabrotica* (FREIRE FILHO *et al.*, 1999). Sem controle, a doença frequentemente alcança dimensões epidêmicas causando grandes prejuízos econômicos (RAJNAUTH *et al.*, 1989). Medidas de prevenção geralmente envolvem a aplicação semanal de inseticidas para controlar a população de vetores, reduzindo a disseminação do vírus. Este método, além de dispendioso, é prejudicial ao meio ambiente e pouco efetivo na estação chuvosa, quando as plantações estão em fase de crescimento (UMAHARAN *et al.*, 1997). Por conta da ampla distribuição do vírus nas regiões de plantio e dos diferentes tipos de hospedeiros naturais existentes no Brasil, a identificação de fontes de resistência bem como sua incorporação às cultivares produtivas está entre as maiores preocupações dos pesquisadores que trabalham com o melhoramento genético do feijão-caupi (FREIRE FILHO *et al.*, 2011).

A transmissão dessa virose é feita principalmente pelas larvas e insetos adultos de *Cerotoma arcuata* (Oliv.), praga conhecida vulgarmente como vaquinha, pertencente à família dos crisomelídeos (COSTA & BATISTA, 1979; TEIXEIRA & FRANCO, 2007). Em ensaios controlados, LIMA & GONÇALVES (1980) verificaram que o *Chalcodermus bimaculatus* (Fiedler), também conhecido como manhoso (família *Curculionidae*), conseguiu transmitir o CPSMV de plantas infectadas para plantas sadias.

Os sintomas do CPSMV surgem geralmente de 3 a 4 dias após a infecção, caso ocorra em plantas juvenis são drásticos e visíveis em todas as partes da planta, podendo causar necrose do meristema apical, morte dos brotos terminais, abscisão das folhas, resultando no impedimento da formação de grãos. Em folhas infectadas são observadas manchas cloróticas e necróticas, distorções, bolhosidades, clareamento da nervura, redução da lâmina foliar, necrose sistêmica, podendo levar à morte da planta (Figura 1.2).



Figura 1.2. Planta de feijão-caupi apresentando bolhosidades, sintoma típico do CPSMV. Fonte: Agência de informação da Embrapa. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/feijao-caupi/arvore/CONTAG01_62_510200683537.html.

2.2. *Cawpea aphid-borne mosaic virus* CABMV

O *Cawpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) apresenta genoma de RNA fita simples, ou seja, um único tipo de proteína capsidial e mede cerca de 11 x 680 nm a 11 x 900 nm, pertencente à família *Potyviridae* (ZERBINE & MACIEL-ZAMBOLIM, 1999).

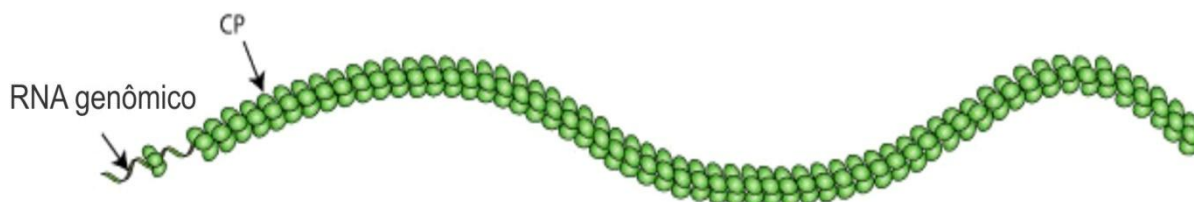


Figura 1.3. Representação da estrutura da partícula dos *Potyvirus*, representando a organização da partícula alongada e flexuosa. O genoma apresenta aproximadamente 2000 cópias da proteína capsidial com cerca de 34 KDa. Disponível em: http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/50.html.

Economicamente, a família *Potyviridae* é a família mais importante dentre as que infectam plantas, causando danos que podem atingir desde plantas de clima tropical até as de clima temperado, mono e dicotiledôneas. Essa família de vírus, também pode acarretar perdas significativas em várias culturas, como por exemplo, no mamoeiro pelos danos oriundos do *Papaya ringspot virus* (PRSV), no feijoeiro comum pelo *Bean common mosaic*

virus (BCMV) e *Bean common mosaic necrosis virus* (BCMNV) e na alface pelo *Lettuce mosaic virus* (LMV) (ZERBINI & MACIEL-ZAMBOLIM, 1999).

No Brasil, dentre os potyvírus de maior importância econômica encontra-se o *Cawpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) que infecta várias espécies da família *Fabaceae* como exemplo, o feijão-caupi, o feijão comum e a fava, além de ser o principal vírus do maracujazeiro, causando a doença conhecida como endurecimento dos frutos. Os sintomas mais comuns em plantas de feijão-caupi infectadas por CABMV são o mosaico intenso no limbo foliar, formado por áreas verdes normais entremeadas por áreas cloróticas, faixas verde-escuras nas nervuras, distorção das folhas e redução mais ou menos acentuada do crescimento das plantas. Dependendo da interação entre cultivar e estirpe, bem como da época de início da infecção, perdas elevadas na produtividade têm sido relatadas em condições de campo e casa de vegetação podendo variar de 50 até 80% (PIO RIBEIRO *et al.*, 1997, BARBOSA *et al.*, 2008).

A transmissão do vírus pode ocorrer de forma mecânica de plantas infectadas para plantas saudáveis, contudo são os afídeos os principais vetores naturais desse vírus, sendo o principal representante o *Aphis craccivora* Koch (ZERBINI & MACIEL-ZAMBOLIM, 2000).

Além do Brasil, o CABMV tem sido relatado em diferentes continentes em países como Estados Unidos, Itália, Holanda, Austrália, Japão, Filipinas, China, Marrocos e Zâmbia (PIO RIBEIRO *et al.*, 1997). A Figura 1.3 apresenta a representação da estrutura da partícula dos vírus do gênero *Potyvirus*.

O CABMV foi primeiramente relatado em feijão-caupi na Itália na década de 1960 (LOVISOLO & CONTI, 1966), posteriormente sendo identificado na Nigéria desde a década de 1970 (LAPIDO, 1976) onde causa grandes prejuízos econômicos.

Em infecções ocasionadas por potyvírus ocorre a formação de estruturas denominadas inclusões, que são oriundas da agregação de proteínas produzidas pelo vírus no interior da célula hospedeira. A capacidade de originar inclusões é uma característica típica dos potyvírus.

3. Melhoramento Genético Clássico do Feijão-Caupi

O feijão-caupi é uma planta diploide com $n = 22$ cromossomos (EHLERS & HALL, 1997) que totalizam aproximadamente 620 megabases de comprimento de genoma nuclear, o que o coloca como um dos menores genomas dentre as *Fabaceae* e plantas vasculares em geral (CHEN *et al.*, 2007).

O feijão-caupi é uma planta autógama, com aproximadamente 99% de autofecundação apresentando na mesma flor o órgão feminino e o órgão masculino, que são protegidos por pétalas, apresentando ainda o fenômeno da cleistogamia. Por essa razão, as flores do feijão-caupi ao se abrirem nas primeiras horas da manhã já estão polinizadas, por conseguinte é necessário realizar emasculação antes da abertura das anteras para realizar o cruzamento entre parentais (FREIRE FILHO *et al.*, 2005).

O feijão-caupi apresenta uma taxa de alogamia pequena, com cerca de 0,8% (TÉOFILO *et al.*, 1999; SOUSA *et al.*, 2006). As pesquisas realizadas por ROCHA *et al.* (2001) sinalizam que a alogamia está relacionada com os insetos, no caso abelhas que visitam as flores do feijão-caupi.

Embora as taxas de cruzamento natural sejam baixas, o melhoramento convencional deve primar por isolar os genótipos, visando preservar a pureza genética dos mesmos para uso em programas de melhoramento genético (TÉOFILO *et al.*, 1999).

O Programa de Melhoramento Genético do Feijão-caupi foi iniciado na Embrapa Arroz e Feijão, na década de 1970, em parceria com outras unidades da Embrapa e

instituições de pesquisa (WAAT *et al.*, 1987; FREIRE FILHO *et al.*, 2005). Posteriormente, na década de 1990, o programa foi transferido para a Embrapa Meio-Norte onde segue até então, desenvolvendo cultivares que visam elevar a produtividade, com melhor qualidade de grãos e palatabilidade, e, sobretudo resistentes a pragas e doenças. Esse programa já lançou cultivares de feijão-caupi para as regiões Norte e Nordeste do Brasil com características que abrangem alta produtividade, resistência e tolerância a pragas e doenças, plantas com arquitetura que possibilite a mecanização, dentre outras (BERTINI *et al.*, 2009).

Segundo FREIRE FILHO *et al.* (2005), no processo de obtenção de novas cultivares, são selecionados nos bancos de germoplasma da Embrapa ou das Instituições parceiras os acessos utilizados como progenitores, possuindo características desejáveis para formação da população segregante. Esses são cruzados para a obtenção da população básica F_1 , nessa fase ocorre colheita em *bulk*, que consiste em colher uma única vagem por planta. Na etapa seguinte ocorre o avanço de geração, que pode chegar até a geração F_6 . Nessa fase descartam-se genótipos com características indesejáveis. Posteriormente ocorrem os testes para avaliar os caracteres desejados e, após selecionar as melhores linhagens são realizados testes de produtividade para posterior produção de sementes genéticas e finalmente o lançamento da cultivar (Figura 1.4).

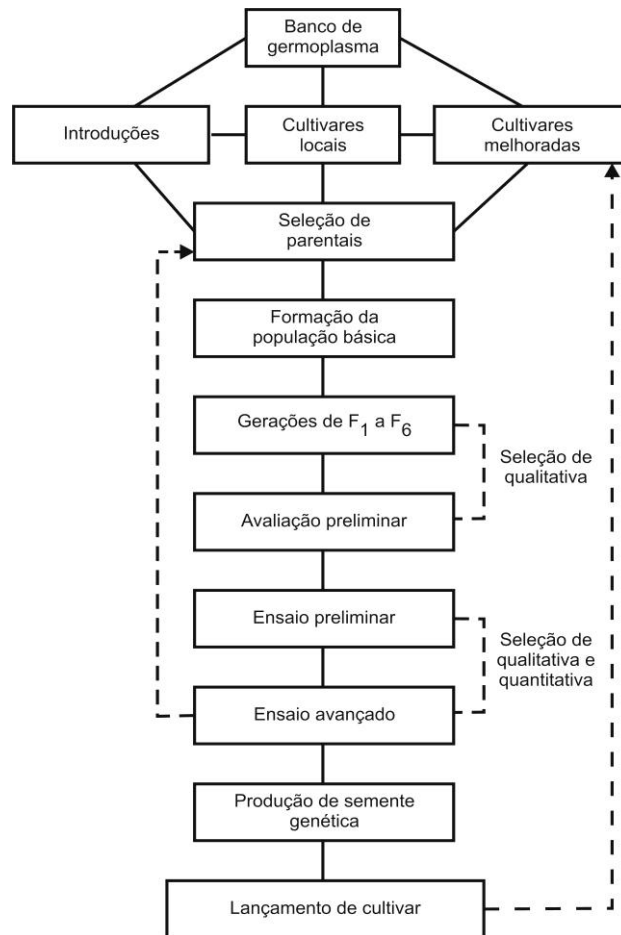


Figura 1.4. Esquema representando o processo de obtenção de uma nova cultivar de feijão-caupi via cruzamento. Adaptado de FREIRE FILHO *et al.* (2005).

O Programa de Melhoramento Genético do Feijão-caupi tem reunido esforços de diversas instituições de pesquisas e com isso periodicamente tem lançado novas cultivares, mais produtivas e melhores adaptadas ao plantio mecanizado, como por exemplo, a BRS Novaera. Contudo, essas novas cultivares, apesar dos excelentes caracteres agronômicos, não apresentam alta resistência às principais viroses que acometem o cultivo de feijão-caupi no Brasil, no caso o CPSMV e o CABMV.

4. RNA interferente (RNAi)

O mecanismo de RNAi ou silenciamento de genes é uma estratégia antiviral naturalmente utilizada em plantas e outras espécies como nematóides e fungos. O silenciamento gênico evoluiu provavelmente para regular a expressão de genes anormais, bem como proteger as células dos vírus (MOREL *et al.*, 2000).

O RNA está envolvido em dois tipos de silenciamento, o silenciamento gênico pós-transcricional e o transcricional. No primeiro, ocorre a degradação no citoplasma do mRNA homólogo, o que leva à não tradução. Já no segundo tipo de silenciamento, ocorre o bloqueio na transcrição, induzido por um RNA anti-senso que promoveria a metilação na região promotora, dessa forma não ocorre a tradução (ELBASHIR *et al.*, 2001; VENDRUSCOLO, 2003).

A interferência por RNA foi primeiramente descrita na década de 1990 em plantas de petúnia geneticamente modificadas para superexpressar genes da via de síntese de antocianinas. As plantas geradas apresentavam flores brancas em decorrência da inibição da síntese do pigmento por silenciamento pelo transgene do gene endógeno. Esse mecanismo ficou então conhecido como cossupressão (NAPOLI *et al.*, 1990). FIRE *et al.* (1998) publicaram um trabalho sobre silenciamento gênico via RNA interferente em *C. elegans*, elucidando o mecanismo. Graças a esse estudo os pesquisadores Andrew Z. Fire e Craig C. Mello ganharam o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia no ano de 2006 (FRANÇA *et al.*, 2010).

O mecanismo de silenciamento por RNAi ocorre em vários eucariontes e são envolvidos nesse processo os dsRNA (*double stranded* RNA; RNA de dupla fita), que podem ser classificados em *micro* RNAs (miRNA), *short interfering* RNAs (siRNAs) e *short hairpin* RNAs (shRNA). Os *micro* RNAs também são chamados de pequenos RNAs,

são endógenos, apresentam cerca de 25 nucleotídeos e atuam no silenciamento pós-transcricional. Os siRNAs são moléculas sintéticas de dupla fita de RNA com cerca de 19 a 30 pb, que atuam mediante pareamento da sequência complementar do RNA mensageiro alvo, o que causa sua degradação com consequente ausência de expressão do gene. Os shRNAs são RNAs de dupla fita que apresentam estrutura semelhante a dos pequenos RNAs, podem ser sintetizados exogenamente e introduzidos na célula por meio de vetores, resultado da expressão de transgenes ou resultantes da expressão (ou genoma) de genes virais (FRANÇA *et al.*, 2010).

O presente estudo foi baseado no mecanismo dos pequenos RNAs, que podem ser gerados pela expressão de transgenes com estrutura do tipo *intron-hairpin* e que tem a capacidade de inibir a expressão de certos genes de forma pós-transcricional. Nesse processo, moléculas de RNA fita-dupla (dsRNA) são clivadas pela ribonuclease DICER em estruturas denominadas de pequenos RNA interferentes (siRNA), que apresentam de 21 a 25 nucleotídeos incluindo os fragmentos senso e antisenso da sequência silenciada (ELBASHIR *et al.*, 2001). Os siRNAs são incorporados no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC, *RNA induced silencing complex*) que é iniciado a partir da extremidade 5' (KRETSCHMER-KAZEMI FAR & SCZAKIEL, 2003). A RISC utiliza a fita antisenso ou senso do siRNA para encontrar e, posteriormente, degradar o RNA mensageiro alvo (HANNON, 2002). A presença de RNA de fita dupla (dsRNA) na célula ativa o complexo proteico DICER que cliva-o em pequenos fragmentos (*small interfering RNA* - siRNA). Esses fragmentos se associam a outro complexo enzimático (RISC) que os direcionam para outras moléculas de RNA complementares, e quando houver homologia total clivará também esta fita complementar, conforme apresentado na Figura 1.5.

O mecanismo de RNAi tem sido largamente utilizado em trabalhos de obtenção de plantas resistentes a doenças, sendo recentemente obtida uma planta de feijão comum resistente ao *Bean golden mosaic virus* (BGMV) (BONFIM *et al.*, 2007).

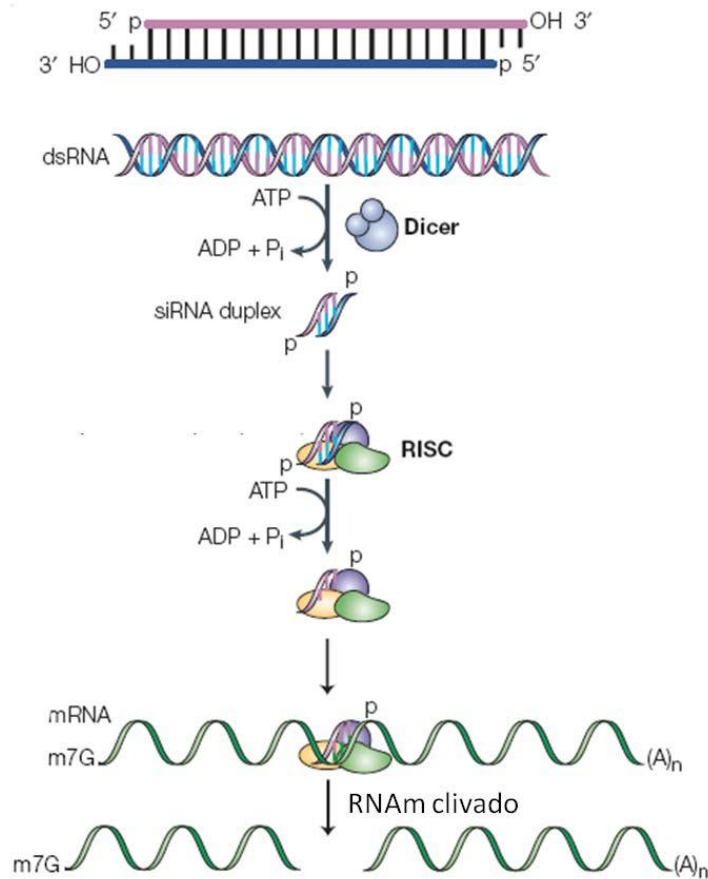


Figura 1.5. Modelo do mecanismo de RNA interferente. A presença de RNA de fita dupla (dsRNA) na célula ativa o complexo proteico DICER que cliva-o em pequenos fragmentos (*small interfering* RNA - siRNA). Esses fragmentos se associam a outro complexo enzimático (RISC) que os direcionam para outras moléculas de RNA complementares, e quando houver homologia total clivará também esta fita complementar. Adaptado de DYKXHOORN *et al.*(2003).

5. Métodos de Transformação Genética em Plantas

A transformação genética é conceituada como sendo a transferência controlada de genes para o genoma de um organismo vivo utilizando métodos indiretos ou diretos (TORRES *et al.*, 2000). Plantas transgênicas ou geneticamente modificadas apresentam em seu genoma genes (transgenes) que foram obtidos por técnicas de engenharia genética. Essa técnica possibilita a inativação ou silenciamento de genes indesejáveis, ou ainda a modificação de genes que exercem papel em rotas metabólicas da própria planta visando melhorar características agronômicas como, por exemplo, aumento do valor nutricional ou tolerância a estresse hídrico.

A forma indireta de transformação utiliza um vetor para transferência do DNA, no caso a *Agrobacterium spp.* Já as diretas são aquelas que transferem o DNA de interesse diretamente sem mediação de vetores, nesse grupo tem-se a eletroporação e a biobalística ou bombardeamento (BRASILEIRO & CARNEIRO, 1998).

A utilização da bactéria do gênero *Agrobacterium* como vetor natural de transformação genética de plantas, ocorreu em função do desenvolvimento de vetores binários e sua introdução em linhagens desarmadas da referida bactéria. Os vetores binários são plasmídios bacterianos nos quais foram clonados genes de interesse agrônomo (ARAGÃO & RECH, 1998).

A transformação via *Agrobacterium* consiste na utilização de linhagens desarmadas, que não causa doença, da bactéria para intermediar a transferência do DNA de interesse. Nesse processo o material vegetal a ser transformado (explante) sofre microferimentos por onde a bactéria que contém o gene de interesse penetra. Ao ter contato com a célula vegetal, a bactéria reconhece regiões de virulência e ocorre a transferência do DNA. Essa técnica é considerada a mais antiga técnica de transformação de plantas, apresenta alta eficiência de

transformação, baixo custo operacional e relativa simplicidade dos protocolos utilizados (BRASILEIRO & LACORTE, 2000).

Apesar de ser uma técnica relativamente simples, a utilização de bactérias tem como forte limitação o tipo de hospedeiro e o uso de antibiótico como agente de seleção, o que restringe sua utilização a um número reduzido de espécies vegetais.

Outro método é a transformação genética de plantas usando eletroporação, que foi inicialmente proposto para transformação de cereais, e surgiu como alternativa ao método de *Agrobacterium*. Na eletroporação, protoplastos são submetidos a pulsos elétricos curtos de alta voltagem que alteram momentaneamente a estrutura da membrana plasmática, induzindo a formação de poros ao longo da sua superfície. Esse processo aumenta a permeabilidade da membrana possibilitando a entrada do DNA de interesse. A técnica tem como limitação a obtenção de protoplastos e a regeneração de material transformado (ANDRADE, 2003).

Na década de 1980 surgiu a técnica de bombardeamento de partículas, que foi descrita inicialmente por SANFORD *et al.* (1987) na Universidade de Cornell. Essa técnica consiste na introdução de material genético no genoma nuclear de plantas superiores, com a utilização de microprojéteis (micropartículas) envoltos em DNA com velocidade suficiente para romper e introduzir o DNA dentro da célula vegetal. Na Figura 1.6 segue o equipamento de bombardeamento desenvolvido no LTG na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.



Figura 1.6. Equipamento de biobalística desenvolvido para acelerar micropartículas carreadoras de material genético. Para a aceleração dessas partículas é usada uma descarga de gás hélio, retido em alta pressão.

O equipamento é composto basicamente por uma câmara de pressão, solenóide, agulha e regulador de pressão do gás hélio. Esse conjunto é conectado a uma bomba de vácuo e ao cilindro de gás hélio. Para a utilização desse sistema de transformação, são utilizadas micropartículas de tungstênio M10 (0,8 μm de diâmetro) previamente tratadas, envoltas no DNA (vetor de transformação) a ser introduzido no genoma da planta.

No processo de bombardeamento, as micropartículas são depositadas em uma membrana carreadora e na câmara pressurizada do acelerador de partículas (*gun*) há liberação de uma onda de choque sob alta pressão de gás hélio, ocorrendo formação de uma onda de choque, a solenóide é ativada fazendo com que haja a energização e deslocamento da agulha que rompe a membrana contendo as micropartículas envoltas no DNA. Essas, por sua vez, são carreadas em direção do tecido vegetal a ser transformado. Dessa maneira, as micropartículas penetram a parede e a membrana celular de maneira não-letal, alojando-se nas organelas celulares. Posteriormente o líquido celular separa as micropartículas do DNA recém introduzido (RECH & ARAGÃO, 1998).

A transformação genética via biobalística tem a vantagem de transformar células e tecidos de forma direta, simples e relativamente rápida, podendo ser empregada para transferência de genes a espécies em que os demais métodos são falhos (SANFORD, 1990).

6. Meristemas Apicais na Transformação Genética

O termo meristema vem da palavra grega *meristos* que significa dividir. No vegetal adulto algumas células preservam a sua capacidade embrionária, ou seja, mantêm sua capacidade de divisão e multiplicação, sendo denominados tecidos embrionários ou meristemáticos. Graças a esta alta capacidade de divisão e ao fato de estarem continuamente adicionando novas células ao corpo vegetal, os meristemas são os tecidos responsáveis pelo crescimento contínuo da planta ao longo da sua vida. (APEZZATO DA GLÓRIA & CARMELLO GUERREIRO, 2003).

Na transformação de plantas por biobalística é preferível que sejam utilizadas regiões meristemáticas, mais especificamente meristemas apicais para geração de plantas transformadas. Esses meristemas, uma vez transformados e selecionados originam uma nova planta. Na década de 1980 foi gerada a primeira planta transformada de soja oriunda de transformação via biobalística de meristema apical (MCCABE *et al.*, 1988).

A região apical de meristemas apicais do feijão, e nesse grupo inclui-se o feijão-caupi, é composta pelo meristema apical, primórdios foliares e folhas primárias. Algumas cultivares apresentam os meristemas protegidos pelos primórdios foliares, o que de certa maneira dificulta sua transformação, uma vez que é necessário expor completamente o meristema por ocasião do bombardeamento (ARAGÃO & RECH, 1997; BONFIM *et al.*, 2007). E esse processo pode representar um risco de danificar o meristema apical, inviabilizando essa região e, conseqüentemente, refletindo na baixa eficiência de transformação.

O feijão-caupi está no grupo que apresenta o meristema protegido pelos primórdios foliares e folhas primárias. Contudo as primeiras plantas transformadas de feijão-caupi foram geradas a partir de meristemas apicais após a remoção dos primórdios foliares e das folhas primárias (IVO *et al.*, 2008).

A transformação genética por meio de biobalística para meristemas apicais tem se mostrado bastante eficiente, no caso de soja a eficiência chega a 0,8%, em algodão varia em torno de 0,7% (ARAGÃO *et al.*, 2005), entende-se eficiência como sendo o número de plantas transformadas obtidas pelo número de embriões (meristemas) utilizados.

7. Transformação Genética do Feijão-Caupi

O melhoramento clássico tem alcançado avanços significativos no desenvolvimento de novas cultivares de feijão-caupi com maior produtividade e adaptadas as diferentes regiões. No entanto, há muito interesse em se associar isso às ferramentas que envolvem engenharia genética (POPELKA *et al.*, 2006). Por essa razão, o feijão-caupi tem sido alvo de inúmeras tentativas de transformação genética visando à introdução de genes que confirmem melhores características agrônômicas, possibilitando o desenvolvimento de cultivares mais produtivas e melhor adaptadas às condições adversas de clima, solo e patógenos, sobretudo vírus. Os primeiros trabalhos nesse sentido foram realizados na década de 1980 buscando a obtenção de plantas geneticamente modificadas de feijão-caupi que conseguissem expressar fragmentos do RNA do CPSMV. Nesse caso, foi utilizada transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* e o resultado foi a obtenção de *calus* transgênicos (GARCIA *et al.*, 1986). Posteriormente, outros trabalhos foram realizados na mesma linha de transformação mediada por *A. tumefaciens* com utilização de cotilédones e discos foliares como fonte de explantes, ainda obtendo apenas *calus* e brotos transgênicos (PENZA *et al.*, 1991; AKELLA & LURQUIN, 1993; RAVENDAR & IGNACIMUTHU, 2010).

A estratégia de transformação por meio de bactérias (*A. tumefaciens*) tem como gargalo a falta de protocolos de cultura de tecidos que consigam regenerar as partes transformadas e obter novas plantas (ARAGÃO & CAMPOS, 2007). Somente na década de 1990 foi possível obter regeneração de brotos transgênicos e a obtenção da primeira planta de feijão-caupi com gene que confere resistência à higromicina, contudo, sem produção de descendência (MUTHUKUMAR *et al.*, 1996). Os trabalhos com *Agrobacterium* continuaram ao longo dos anos, e foi obtida regeneração de uma planta transformada geneticamente a partir de 1.000 explantes inoculados (PEPELKA *et al.*, 2006).

A transformação genética mediada por *Agrobacterium* apresenta como uma das desvantagens a utilização de micro enxertia para que os brotos regenerados possam ter raízes, que certamente limita essa técnica para espécies que já tenham protocolo de micro enxertia estabelecido, o que não é o caso de feijão-caupi. Esses resultados demonstram que a utilização de bactérias mediando a introdução de genes no feijão-caupi apresenta baixa eficiência de transformação, tornando-se um método extremamente dispendioso.

Ante a essa panorâmica, grupos de pesquisadores de vários centros que trabalham com feijão-caupi têm buscado novos sistemas de transformação genética que fujam da necessidade de utilização de antibióticos como agente seletivo e que consigam taxas maiores de transformação e geração de progênie com padrão Mendeliano. Nesse contexto, a transformação mediada por biobalística, encontrou campo promissor, e foi obtida por esse método a primeira planta de feijão-caupi contendo o gene repórter *gus* com produção de progênie, contudo não seguindo o padrão de herança Mendeliana (IKEA *et al.*, 2003).

Entre os trabalhos realizados pelo grupo do Dr. Francisco Aragão, na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, foi desenvolvido um protocolo de transformação genética do feijão-caupi mediado por biobalística, sem uso de antibióticos e tendo como agente de seleção das plantas geneticamente modificadas o herbicida imazapyr. Nesse

trabalho, foi introduzido no feijão-caupi o gene repórter *gus*, e utilizados como explantes meristemas apicais de embriões zigóticos. Esse protocolo apresentou alta eficiência na obtenção de plantas geneticamente modificadas de feijão-caupi mantendo o padrão de herança mendeliana (IVO *et al.*, 2008). O mesmo grupo segue desenvolvendo trabalhos na linha de obtenção de plantas tolerantes a herbicidas, resistentes a viroses, insetos e incremento do valor nutricional, apresentando resultados promissores (CITADIN, 2011).

8. Hipótese

Por meio da técnica de RNA interferente é possível a obtenção de plantas de feijão-caupi resistentes ao CPSMV e CABMV, e ao herbicida imazapyr.

9. Objetivos

9.1. Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo a utilização da estratégia de interferência de RNA para obtenção de feijão-caupi geneticamente modificado (GM) resistente ao *Cowpea aphid-borne mosaic virus (Potyvirus)*, ao *Cowpea severe mosaic virus (Comovirus)* e ao herbicida imazapyr.

9.2. Objetivos Específicos

1. Construção de um vetor de transformação genética de feijão-caupi baseado na estratégia de interferência de RNA.
2. Obtenção de plantas geneticamente modificadas (GM) de feijão-caupi, selecionadas com o herbicida imazapyr.

3. Caracterização molecular parcial de plantas GM obtidas.
4. Avaliação da resistência das linhagens GM geradas ao *Cowpea aphid-borne mosaic vírus*, ao *Cowpea severe mosaic vírus* e ao herbicida imazapyr.

Referências Bibliográficas

ANDRADE, S. R. M. de. **Transformação de Plantas**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003, 28p. (Documentos/Embrapa Cerrados, ISS 1517-5111;102).

APEZZATO DA GLÓRIA, B. & CARMELLO GUERREIRO, S.M. **Anatomia Vegetal**. Ed. UFV – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003, 438 p.

ARAGÃO, F. J. L.; VIANNA, G. R.; CARVALHEIRA, S.; RECH, E. L. Germ line genetic transformation in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by selection of transgenic meristematic cells with a herbicide molecule. **Plant Science**, v. 168, p. 1227-1233, 2005.

ARAGÃO, F. J. L. & RECH, E. L. Morphological factors influencing recovery of transgenic bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) of a carioca cultivar. **International Journal of Plant Sciences**, v. 158, p.157-167, 1997.

ARAGÃO, F. J. L. & RECH, E. L. Isolamento de Vetores para Transformação Direta. In: BRASILEIRO, A. C. M. & CARNEIRO, V. T.C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa Cenargen, 1998, p. 17-33.

ARAGÃO, F. J. L. & CAMPOS, F. A. P. Common Bean and Cowpea. In: **Biotechnology in Agricultura and Forestry**, v. 59 (E. C. Pua; M. R. Davey, Eds). Berlin, pp. 263-267, 2007.

ARAÚJO, J.P.P. & WAAT, E. E. **O Caupi no Brasil**. Brasília: Embrapa-CNPAP, 1988, 722p.

AKELLA, V. & LURQUIN, P. F. Expression in cowpea seedlings of chimeric transgenes after electroporation into seed-derived embryos. **Plant Cell Rep**, v. 12, p. 110-117, 1993.

BARBOSA, P. K. A.; *et al.* Análise transcricional de *Vigna unguiculata* infectada por *Potyvirus* (CABMV) através de LongSAGE. In: **Congresso Brasileiro de Genética**, Salvador-BA, p. 246, 2008.

BARRETO, P. D.; *et al.* Reação de genótipos de *Vigna unguiculata* à sarna e efeito da doença sobre componentes de produção. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p.5-9, 2001.

BERTINI, C. H. C. de M.; TÉOFILO, E. M. & DIAS, F. T. C. Divergência genética entre acessos de feijão-caupi do banco de germoplasma da UFC. **Ciência Agrônômica**, v. 40, n. 1, p. 99-105, 2009.

BEZERRA, A. A. de C. **Variabilidade e diversidade genética em caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp.) precoce, de crescimento determinado e porte ereto e semi-ereto**. Recife: Mestrado em Melhoramento Genético, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1997, 105p. Dissertação de Mestrado.

BRADSHAW, J.D.; *et al.* Landscape epidemiology of *Bean pod mottle* comovirus: molecular evidence of heterogeneous sources. **Arch. Virol.**, v. 156, p. 1615-1619, 2011.

BRASILEIRO, A. C. M & LACORTE, C. *Agrobacterium*: um sistema natural de transferência de genes para plantas. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 15, p. 12-15, 2000.

BRASILEIRO, A. C. M. & CARNEIRO, V. T. C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa Cenargen, 1998, p. 51-64.

BONFIM, K.; *et al.* 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.

CHEN, X.; LAUDEMAN, T. W.; RUSHTON, P. J.; SPRAGGINS, T. A.; TIMKO, M. P. CGKB: an annotation knowledge base for cowpea (*Vigna unguiculata* L.) methylation filtered genomic genespace sequences. **BMC Bioinformatics**, v. 8, p. 129-138, 2007.

CITADIN, C.T. **Expressão de genes de características agronômicas em feijão-caupi**. Brasília: Instituto de Ciências Biológicas, Dep. de Biologia Celular, Universidade de Brasília, 2011, 116 p. Tese de Doutorado.

Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). 2012. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2011/2012- Décimo Levantamento. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_10_17_16_09_58_boletim_graos_-_julho_2012.pdf. Acesso em: 10/02/2013.

COSTA, C. L. & BATISTA, M. de F. Viroses transmitidas por Coleópteros no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.4, n. 2, p.177-179, 1979.

DYKXHOORN, D. M.; NOVINA, C. D.; SHARP, P. A. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol**, v. 4. p. 457-467, 2003.

EHLERS, J. D. & HALL A. E. Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Field Crops Research**, v. 53, p. 187-204, 1997.

ELBASHIR, S. M.; HARBORTH, J.; LENDECKEL, W.; YALCIN, A.; WEBER, K.; TUSCHL, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. **Nature**, v. 411, p. 494-498, 2001.

FAO 2011. FAOSTAT. Crops. Cow peãs dry. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567+ancor>.

FIRE, A.; XU, S. Q.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E.; MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, p. 806-811, 1998.

FRANÇA, N. R de; JÚNIOR, D. M.; LIMA, A. B.; PUCCI, F. V. C.; ANDRADE, L. E. C.; SILVA, N. P. Interferência por RNA: Uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. **Rev Bras Reumatolol**, v. 5, n.6, p. 695-709, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbr/v50n6/v50n6a08.pdf>. Data do acesso: 25/02/2013.

FREIRE FILHO *et al.* **Feijão-caupi no Brasil:Produção, Melhoramento Genético, Avanços e Desafios**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011, 84p.

FREIRE FILHO, F. R.; ROCHA, M. M.; RIBEIRO, V. Q.; DAMASCENO SILVA, K. J.; NOGUEIRA, M. S. R. Melhoramento genético e potencialidades do feijão-caupi no Brasil. *In: CONGRESSO NACIONAL DE FEIJÃO-CAUPI, 2*, Belém. Da agricultura de subsistência ao agronegócio: Anais. Belém/PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2009, p. 120-135. CD ROM.

FREIRE FILHO, F. R.; ROCHA, M. de M.; RIBEIRO, V. Q.; SITTOLIN, I. N. **Avanços e Perspectivas da Cultura do Feijão-Caupi**. *In: ALBUQUERQUE, A.C.S.; SILVA, A. G.*

(Ed.) Agricultura Tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, v.1, p. 235-250, 2008.

FREIRE FILHO *et al.* **Feijão-caupi: avanços tecnológicos.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005, 519p.

FREIRE FILHO, F. R., *et al.* **Melhoramento genético do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) na região nordeste.** In: Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste Brasileiro. EMBRAPA, CPATSA, Petrolina, 1999.

FRANÇA, N. R. de; JUNIOR, M. D; LIMA, A.B; PUCCI, F. V. C; ANDRADE, L. E. C; SILVA, N. P. Interferência por RNA: Uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 6. p. 695-709, 2010.

GANDAVO, P. de M. **Tratado da terra do Brasil. Tratado Segundo. Das coisas que são gerais por toda Costa do Brasil. Capítulo Quarto. Dos mantimentos da terra.** [Rio de Janeiro] 2002: Ministério da Cultura. Fundação Biblioteca Nacional. Departamento Nacional do Livro. Criado em: 10 jun. 2002. Disponível em: http://objdigital.bn.br/Acervo_Digital/livros_eletronicos/tratado.pdf. Acesso em: 06/06/2011.

GARCIA, J. A.; HILLE, J. & GOLDBACH, R. Transformation of cowpea (*Vigna unguiculata*) with a full-length DNA copy of cowpea mosaic virus m-RNA. **Plant Science**, v. 48, p. 89-98, 1986.

HANNON, G. J. RNA interference. **Nature**, v. 418, p. 244 -251, 2002.

IKEA, J.; INGELBRECHT, I.; UWAIFO, A.; THOTTAPPILLY, G. Stable gene transformation in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) using particle gun method. **Afr. J. Biotechnol**, v. 2, p. 211-218, 2003.

IVO, N. L.; *et al.* Biolistic-mediated genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata*) and stable Mendelian inheritance of transgenes. **Plant Cell Rep**, v. 27, p. 1475-1483, 2008.

KRETSCHMER-KAZEMI FAR R. & SCZAKIEL G. The activity of siRNA in mammalian cells related to structural target accessibility: a comparison with antisenseoligonucleotides. **Nucleic Acids Res**, p. 4417-4424, 2003.

LAPIDO, J. L. A vein-banding strain of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* in Nigeria. **Nigeria Journal of Science**, v. 10, n. 1-2, p. 77-78, 1976.

LIMA, J. A. A. & GONÇALVES, M. F. B. Transmissibilidade de “cowpea mosaic virus” pelo manhoso *Chalcodermus bimaculatus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 5, n. 3, p. 414, 1980.

LOVISOLO, O.; CONTI, M. Identification of an aphid-transmitted *Cowpea mosaic virus*. Netherlands. **Journal of Plant Pathology**, v. 72, p. 265-269, 1966.

MAY, P. H.; *et al.* **Cowpea production and economic importante in Brazil**. In: Cowpea Research in Brazil (Watt, E. E. and Arújo, J. P. P. de). IITA, EMBRAPA, Brasília, 1988, p. 31-62.

MOREL, J.; MOURRAIN. P.; BECLIN. C.; VAUCHERET. H. DNA methylation and chromatin structure affect transcriptional and posttranscriptional transgene silencing in Arabidopsis. **Current Biology**, v. 10, p. 1591-1594, 2000.

MUTHUKUMAR, B.; MARIAMMA, M.; VELUTHAMBI, K.; GNANAM, A. Genetic transformation of cotyledon explants of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Rep**, v. 15. p. 980-985, 1996.

MCCABE, D. E., SWAIN, W. F., MARTINELLI, B. J. & CHRISTOU, P. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. **BioTechnology**, n. 6, p. 923-926, 1988.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible cosuppression of homologous genes in trans. **The Plant Cell**, v. 2, p. 279-289, 1990.

NG, N. Q. & MARÉCHAL, R. Cowpea taxonomy, origin germplasm. In: Sinch, S. R; Rachie, K. O. (Ed.). **Cowpea research, production and utilization**. Chichester: John Wiley, 1997, p. 11-21.

PADULOSI, S. & NG, N. Q. Origin taxonomy, and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: SING, B, B.; MOHAN, R.; DASHIELL, K. E.; JACKAL, L. E. N. (Ed.). **Advences in Cowpea Reseach**. Tsukuba:IITA:JIRCAS, 1997. P.1-12.

PEREZ, J. E. & CORTÉZ-MONLLOR, A. A. A mosaic virus of cowpea from Puerto Rico. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, v. 54, p.212-216, 1970.

PENZA, R.; LURQUIN, P. F.; FILIPPONE, E. Gene transfer by co-cultivation of mature embryos with *Agrobacterium tumefaciens*: application to cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Journal Plant Physiol**, v. 138. p. 39-43, 1991.

PIO RIBEIRO, G. *et al.* **Doenças do caupi** (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. *In*: Kimari, H., Amorim, L., Bergamin Filho, A., Camargo, L. E. A.; Rezende, J. A. M. (Eds.) Manual de Fitopatologia, v. 2: Doenças das Plantas Cultivadas. Ed. Ceres Ltda., São Paulo, 1997, p. 233-244.

PEPELKA, J.C., GOLLASCH, S., MOORE, A., MOLVIG, L., HIGGINS, T. J. V. Genetic Transformation of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) and stable transmission of the transgenes to progeny. **Plant Cell Report**, v. 26. p. 304-312, 2006.

RAJNAUTH, G. L. *et al.* Major field vector of cowpea severe mosaic virus in Trinidad. **Tropical Agricultura**, v. 66, n. 3, p. 221-224, 1989.

RAVENDAR, S. & IGNACIMUTHU, S. Improved *Agrobacterium* mediated transformation in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Asian J. Plant Sci**, v. 9, p. 256-263, 2010.

RECH, E. L. & ARAGÃO, F. J. L. Biobalística. *In*: BRASILEIRO, A. C. M. & CARNEIRO, V. T.C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa Cenargen, 1998, p. 51-64.

ROCHA, F. M. R. da; MOUSINHO, S. F.; FREIRE FILHO, F. R.; SILVA, S. M. de S.; BEZERRA, A. A. de C. Aspectos da biologia floral do caupi *Vigna unguiculata* L. Walp. *In*: **REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE CAUPI**, 5, 2001, Teresina. **Avanços tecnológicos no feijão-caupi**: anais. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2001, p.27-29. (Documentos).

ROCHA, M. M. O feijão-caupi para consumo na forma de feijão fresco. **Agrosoft**, 2009. Disponível em: www.agrosoft.org.br/agropag/212374.htm. Acesso em: 10/12/2012.

SANFORD, J. C. Biolistic Plant Transformation. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 79, p. 206-209, 1990.

SANFORD, J. C.; KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells tissues using a particle bombardment process. **Particle Science Technology**, v.5, p. 27-37, 1987.

SINGH, B. B., *et al.* Recent progress in cowpea breeding. *In*: Fatokun, C. A., Tarawali, S. A., Sing, B. B., Kormawa, REC. and Tamò, M. (Eds.) Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production. **Proceedings of the World Cowpea Conference III held at the Internacional Institute of Tropical Agricultura (IITA)** Ibadan, Nigeria, 2000, p. 185-195.

SINGH, B. B., *et al.* Recent progress in cowpea breeding, p. 22-40, 2002. *In*: C. A. Fatokun *et al.* (ed) Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production. IITA, Ibadan, Nigeria. Watt, E. E., *et al.* Cowpea germplasm collection and evaluation in Brazil. *In*: **Cowpea research in Brazil** (Watt, E. E. and Araújo, P. P. de). IITA, EMBRAPA, Brasília (1988).

SOUSA, I. da S.; FREIRE FILHO, F. R.; LOPES, A. C. de A.; ROCHA, M. de M.; RIBEIRO, V. Q.; GOMES, R. L. F.; RÊGO, M. de S. C. Determinação da taxa de fecundação cruzada em feijão-caupi [*Vigna unguiculata* L. (Walp)]. *In*: Congresso Nacional de feijão-caupi e VI Reunião Nacional de Feijão-caupi, 2006. **Anais**. [CD-ROM]. Teresina: Embrapa Meio-Norte.

SUMMERFIELD, *et al.* The physiology of cowpea. *In*: Sing, S. R.; Rachie, K. O. (Ed.). Cowpea research, production and utilization. Great Britain: A. **Wiley-Interscience Publication**, 1985, p.65-102.

STEELE, W. M. & MEHRA, K. L. Structure, evolution and adaptation to farming system and inveronment in *Vigna*. *In*: **Summerfield**, D. R; Bunting, A. H. (Ed.) Advances in legume science. England: Royal Botanic Gardens, p. 459-468, 1980.

TEIXEIRA, M, F. & FRANCO, A, A. Infestação por de larvas *Cerotoma arcuata* (Olivier) (Coleoptera: Chrysomelidae) em nódulos de feijoeiro em cultivo com cobertura morta ou em consórcio com milho ou com caupi. **Cienc. Rural [online]**, v. 37, n. 6, p. 1529-1535, 2007.

ISSN 0103-8478. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782007000600004>. Acesso em: 20/12/2012.

TÉOFILO, E. M.; MAMEDE, F. B.; SOMBRA, N. S. Hibridação natural em feijão-caupi. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 4, p. 1011-1012, 1999.

TIMKO, M. P. Molecular cloning in cowpea: perspectivas on the status of genome characterization and gene isolation for crop improvement. *In*: Fatokun, C. A. Tarawali, S. A. Sing, B. B., Kormawa, P. M. and Tamò, M. (Eds). Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production. Proceedings of the World Cowpea Conference **III held at the Internacional Institute of Tropical Agricultura** (IITA), Ibadan, Nigeria, 2000, pp. 197-212.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. A. S.; BRÍGIDO, M. M.; ROMANO, E. **Glossário de Biotecnologia Vegetal**. Brasília: Embrapa-CNPQ, 2000, p. 128.

UMAHARAN, P. *et al.* Resistant to cowpea severe mosaic virus, determined by three dosage dependent genes in *Vigna unguiculata* L. Walp. **Euphytica**, v. 95, n. 1, p. 49-55, 1997.

VENDRUSCOLO, E. C. G. Silenciamento gênico e transgênicos. **Revista Biotecnologia Ciência & desenvolvimento**, ed.31, p. 8-13, 2003.

WATT, E. E.; ZIMMERMANN, F. J. P.; Fonseca, J. R.; Freire, M. S. Coleções de germoplasma de caupi: conservação e avaliação no Brasil. *In*: Araújo, J. P. P. de; Watt, E. E. (Org.). **O Caupi no Brasil**. Brasília: Embrapa-CNPQ; 1987, Ibadan, IITA, p. 234-248.

ZARBINI, F. M. & MACIEL-ZAMBOLIM, E. **A família Potyviridae- Parte II**. Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo, 2000, v. 8, p. 225-265.

ZARBINI, F. M. & MACIEL-ZAMBOLIM, E. **A família Potyviridae- Parte I**. Revisão Anual de patologia de Plantas (RAPP), 1999, v.7, p.1-66.

*Construção do Vetor do Tipo Intron-Haipin (RNAi) Visando Resistência à Viroses
do Feijão-caupi*

1. Introdução

A engenharia genética tem possibilitado a utilização de mecanismos para obtenção de plantas geneticamente modificadas com resistência a patógenos (ANDRADE, 2003; ARAGÃO, 2002). A hipótese de que é possível obter resistência a um patógeno com a introdução de sequências do próprio patógeno foi estabelecida no trabalho de SANFORD & JOHNSTON (1985), e esse tipo de resistência foi denominada resistência derivada do patógeno (RDP). Considerando que muitas doenças que acometem as plantas são causadas por vírus, e que estes apresentam na sua maioria estrutura simples, o conceito de RDP pode ser utilizado para o desenvolvimento de estratégias para obtenção de plantas resistentes a essas doenças. Nesse sentido, plantas contendo partes de sequências do genoma viral podem conferir resistência ao vírus do qual as sequências foram derivadas (GRUMET, 1990). Nessa linha de pesquisa, o primeiro relato foi feito em plantas de *Nicotiana tabacum* L., expressando o capsídeo do *Tobacco mosaic virus* (POWELL *et al.*, 1986).

Desde então, outros trabalhos tem surgido nesta mesma linha, e mais especificamente com soja e feijão foram desenvolvidas plantas geneticamente modificadas com base no uso da proteína capsidial do vírus do mosaico dourado do feijão comum, *Bean golden mosaic virus* - BGMV (ARAGÃO & CAMPOS, 2007; ARAGÃO & FARIA, 2009). Plantas GM de soja, engenheiradas com a técnica de RNA interferente, demonstraram alta resistência à infecção simultânea de múltiplos vírus (ZHANG *et al.*, 2011). Foi relatada a obtenção de plantas GM contendo sequências do gene do capsídeo do *Bean pod mottle virus* (BPMV) e do *Soybean dwarf virus* (SbDV), essas plantas quando testadas no campo, apresentaram alta resistência aos referidos vírus (REDDY *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2001; TOUGOW *et al.*, 2006).

Além de sequências da capa protéica outros genes virais têm sido utilizados nas estratégias de RDP, tais como: genes associados à replicação do vírus ou replicase e genes

expressando proteínas de movimento (ARAGÃO, 2002). Entretanto, nem sempre a planta GM obtida por essa estratégia mantém a resistência em inoculações com altas concentrações do patógeno (SANJAYA *et al.*, 2005).

A literatura relata dois tipos de RDP, sendo os que necessitam da expressão da proteína do transgene (*protein-mediated resistance*), e os que apenas requerem a transcrição do transgene (*RNA-mediated resistance*) (RITZENTHALER, 2005). No primeiro caso é preciso que ocorra a síntese da proteína codificada pelo transgene, podendo a resistência ser funcional ou não, ou ainda os sintomas da doença serem manifestados tardiamente. O segundo tipo de RDP é conferida graças à degradação de sequências do RNA do vírus por sequências do transgene, conferindo alto nível de resistência ou imunidade à doença (TEPFER, 2002). Este processo relaciona-se ao mecanismo de silenciamento pós-transcricional que resulta na degradação no citoplasma do mRNA viral pelo mRNA do transgene (HIGGINS *et al.*, 2004).

A geração de plantas GM que contenham a inserção de sequências do genoma do vírus na forma de repetições invertidas (*hairpin* RNA ou ihpRNA) ou um RNA fita dupla (dsRNA), é uma estratégia que tem elevada chance de gerar resistência de plantas a vírus (WATERHOUSE *et al.*, 1998). Em plantas GM esse mecanismo pode ser acionado com uso de vetores senso ou antisenso do transgene, ambas as formas conferem resistência ou imunidade ao vírus (BRUUN-RASMUSSEN *et al.*, 2007). Entretanto, a expressão de sequência senso ou antisenso do mesmo gene originando um “grampo” de RNA de fita dupla (dsRNA) confere maior silenciamento se comparado à mesma expressão isoladamente (WATHERHOUSE & HELLIWEL, 2003). A utilização de construções do tipo *intron-hairpin* (ihpRNA) para a produção direta de dsRNA pode induzir de forma mais eficiente o silenciamento gênico e a obtenção de plantas resistentes à viroses. Nesse caso, a estrutura ihpRNA pode aumentar a eficiência na formação do dsRNA, o que conseqüentemente vai

induzir o silenciamento gerando imunidade da planta ao vírus (WESLEY *et al.*, 2001). Os ihpRNAs não são traduzíveis, contudo, são cortados em pequenos siRNAs que são incorporados ao complexo RISC, onde servirão de guias para o processo de degradação do vírus (EAMENS *et al.*, 2008). A eficiência em termos de resistência das linhagens geradas pela estratégia de ihp RNA gira em torno de 90% (SMITH *et al.*, 2000; WATERHOUSE *et al.*, 1998). Essa estratégia possibilita a obtenção de plantas GM resistentes a um grande número de vírus de RNA (KALANTIDIS *et al.*, 2002; HILY *et al.*, 2005).

Recentemente foi liberado o plantio da cultivar de feijão comum resistente ao mosaico dourado, contendo um vetor ihpRNA ou RNA interferente que contém parte do gene que codifica a proteína capsidial do BGMV (BONFIM *et al.*, 2007; ARAGÃO & FARIA, 2009). Nesse sentido, buscou-se a construção de um vetor do tipo ihpRNA visando obtenção de resistência a viros em feijão-caupi.

2. Material e Métodos

2.1. Construção do vetor

O vetor utilizado para a transformação de feijão-caupi foi construído a partir do alinhamento das sequências do gene da capa protéica de várias estirpes/isolados do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (*Potyvirus*) e do gene 32K RNA1 do *Cowpea severe mosaic virus* (*Comovirus*) depositadas no *GenBank* (NCBI). As sequências escolhidas apresentavam cerca de 400 a 600 pb e foram ligadas. Após a adição dos sítios apropriados para enzimas de restrição utilizadas durante o processo de clonagem, as sequências foram quimicamente sintetizadas. Os fragmentos sintetizados foram clonados no vetor *BlueScriptSK* e sequenciado usando os primers universais M13 e T7 sequenciador automático (ABI Prism1 3700). O vetor *BlueScriptSK* foi linearizado com a enzima BamHI (Biolabs) e posteriormente inseridos no vetor pSIU (TINOCO & ARAGÃO, 2005, TINOCO *et al.*, 2010) para gerar o cassete interferente (hpRNAi). O cassete de interferência foi clonado no

sítio de NotI e SmaI do vetor pAC321, o qual contém o gene *ahas* (que confere resistência ao herbicida imazapyr) de *Arabidopsis thaliana* (ARAGÃO, 2002; RECH *et al.*, 2008), gerando o vetor usado para transformação de feijão-caupi que recebeu a denominação de pSIUCSMVCABMV (Figura 07). Todas as clonagens foram realizadas utilizando bactéria da cepa XL1 blue.

Para a clonagem foi utilizado o método denominado de eletroporação, que consiste em um processo físico, que por meio de um pulso elétrico possibilita a permeabilização transitória da membrana celular da bactéria, permitindo a introdução de fragmentos de DNA de interesse. No processo foram utilizados 45 µL de bactéria adicionada de 1 µL do fragmento ou vetor a ser clonado (introduzido na bactéria). Após a eletroporação foram adicionados à bactéria 1 mL de meio LB e essa solução foi mantida sob incubação por 60 minutos à temperatura de 37 °C. Ao final da incubação a solução foi plaqueada em meio LB contendo ampicilina 500 mg/L e mantido a 37 °C durante 16-18 h, após incubação foram selecionadas colônias isoladas para realização de mini-prep (extração de DNA bacteriano). O DNA extraído foi digerido com as enzimas de restrição BamHI, SacI para confirmação do vetor. A Figura 2.1. apresenta a estratégia para construção do vetor usado no estudo.

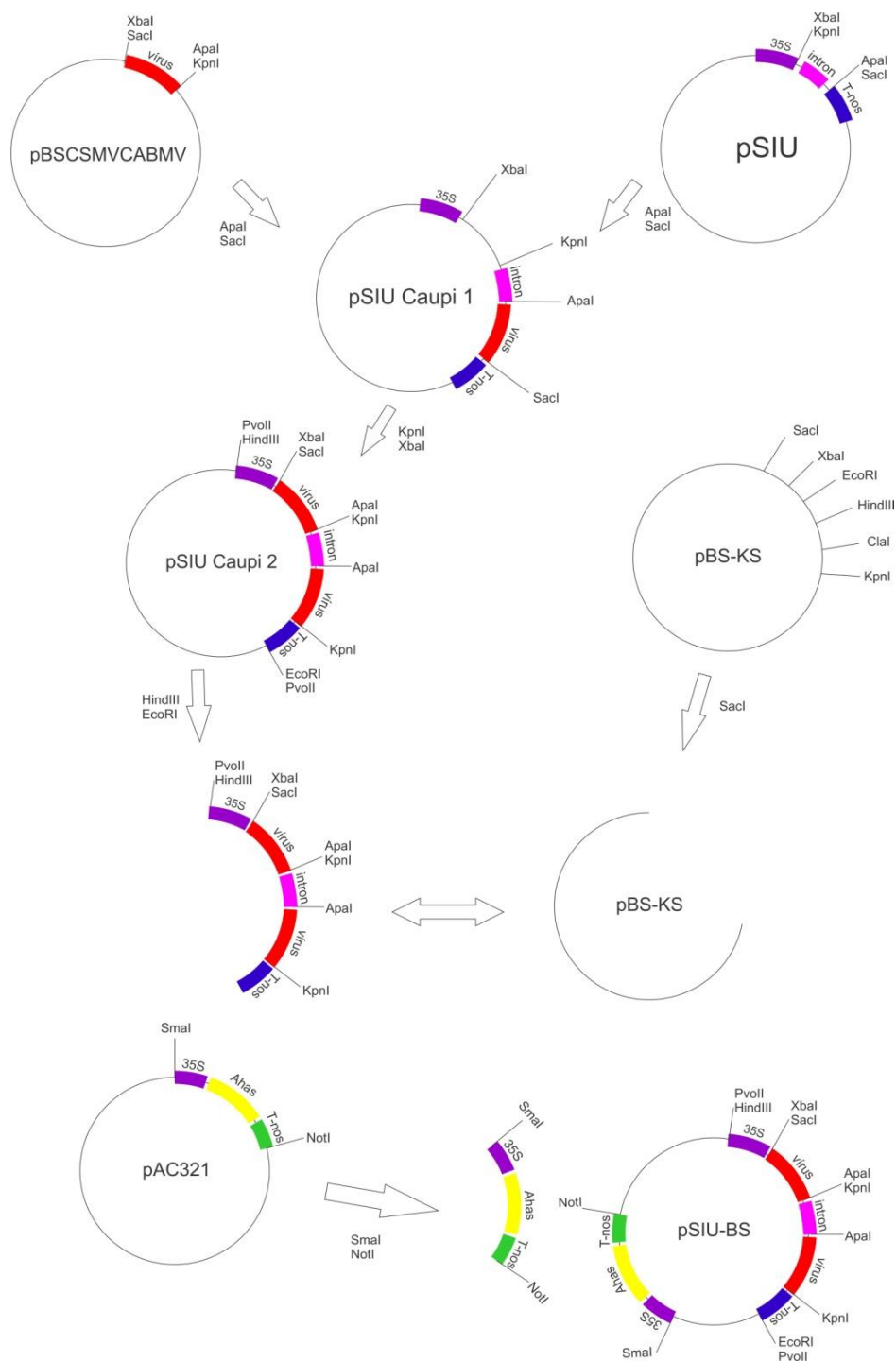


Figura 2.1. Estratégia para construção do vetor pSIUCSMVCABM. O intron AtMS foi removido do vetor pBSCSMVCABMV com ApaI e SacI e posteriormente clonado no vetor pSIU com as mesmas enzimas originando o vetor pSIUCAUPI 1, este por sua vez foi clonado no sentido sense e antisense com KpnI e XbaI, originando o vetor pSIUCAUPI 2, um fragmento de 3.1 Kb foi retirado com HindIII e EcoRI e clonado com as mesmas enzimas no vetor pBLUESCRIPTIIKS originando o pSIUBSK que foi clonado com SmaI e NotI no fragmento de 5.7 Kb originado do vetor pAC321 gerando o vetor pSIUCSMVCABMV. A região assinalada como “vírus” corresponde à fusão de um fragmento do gene da capa proteica do CABMV e do gene 32K do CPSMV (mais detalhes na Figura 2.3).

2.2. Construção do Vetor para Transformação Genética

No processo de construção do vetor foram obtidos três clones com o padrão de bandas esperado, e após confirmação com as enzimas de restrição BamHI e SacI, foi escolhido o clone 01 para ser usado como pré-inóculo para a extração de DNA (Clonagem do vetor). No processo de clonagem do vetor foram inoculados 500 µL do clone 01 em 500 mL de meio LB suplementado com 500 µL de ampicilina (500 mg/L). O inóculo foi incubado e mantido a 37° C por cerca de 14-16 horas (*over night*), sob agitação de 160-180 rpm, nesse intervalo de tempo as bactérias multiplicaram-se, conseqüentemente multiplicando o DNA, que nesse caso continha o vetor pSIUCSMVCABMV.

Após o período de incubação foi seguido o protocolo desenvolvido no Laboratório de Transformação Genética da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia para extração em grande quantidade de DNA bacteriano.

O protocolo de extração consistiu das seguintes etapas:

1) Após incubação, o inóculo foi distribuído em 2 frascos do tipo centrífuga com capacidade de 250 mL cada frasco. A solução foi centrifugada durante 10 minutos à 5.000 rpm e temperatura de 4 °C, na centrífuga do tipo Ependdorf Centrifuge 5810R. O *pellet* ou sedimento formado em cada frasco foi ressuscitado em 12.5 mL de Solução L, formando uma solução esbranquiçada.

2) A solução foi transferida em quantidades iguais para 4 tubos do tipo Corex®, no caso 3.125 mL por tubo Corex®, e novamente centrifugada à mesma rotação, tempo e temperatura. Em seguida o material sobrenadante foi descartado e ao *pellet* formado foram adicionados 3,0 mL da Solução I por tubo Corex® para ressuscitar o *pellet* formado. Posteriormente, em cada tubo, foram adicionados 3,0 mL da Solução I suplementada com 6 mg de lisozima. A solução foi mantida sob incubação por cerca de 25 minutos à temperatura ambiente.

3) Após a incubação foram adicionados 12 mL da Solução II por Corex®, e após misturar delicadamente, o material foi incubado em gelo por cerca de 10 minutos. Imediatamente, foram adicionados 9 mL da Solução III por corex®, e novamente incubados de 10-20 minutos à temperatura ambiente.

4) Após a incubação, o material foi centrifugado durante 60 minutos à 10.000 rpm e temperatura de 4 °C. Em seguida o sobrenadante foi descartado e foram adicionados cerca de 30 mL de isopropanol por Corex®, em seguida o material foi mantido em repouso por 20 minutos, posteriormente centrifugado por 30 minutos a 10.000 rpm e temperatura de 4 °C. O *pellet* formado foi ressuscitado em TE, sendo usado 1 mL de TE por Corex®.

5) O material foi transferido para tubos do tipo Ependorf® com capacidade de 2 mL, em cada tubo foram colocados 500 µL do material que foi tratado com 30 µL de RNase A (100 mg/mL), e mantido sob incubação a 37 °C durante 30 minutos. Em seguida, para precipitar o DNA foram utilizados NaCl 100 mM e SDS 1.5%. Posteriormente, procedeu-se a limpeza do RNA, adicionando-se clorofane e clorofil individualmente, adicionando o volume de 500 µL de cada reagente por tubo Ependorf® seguido de centrifugação a 14.000 rpm durante 5 minutos à temperatura ambiente. Nessa etapa, houve a formação de uma fase clara, que foi recuperada e novamente precipitada por 30 minutos com NaCL 20 mM e 60 µL de isopropanol.

6) Finalmente, após a precipitação o material foi centrifugado durante 30 minutos a 14.000 rpm e o *pellet* obtido foi lavado com etanol 70% e ressuscitado em água do tipo Milli-Q previamente esterilizada.

Ao final do protocolo de extração de DNA o material foi quantificado em equipamento do tipo Nanodrop, e foram obtidos 5.197 ng/µL de DNA. Esse resultado equivale a cerca de 5 µg/ µL de DNA, o que é considerado uma boa quantidade, visto que para ser utilizado em experimentos de transformação via biobalística o protocolo de

transformação recomenda o volume de 5-8 μL de DNA na concentração de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (BRASILEIRO & CARNEIRO, 1998).

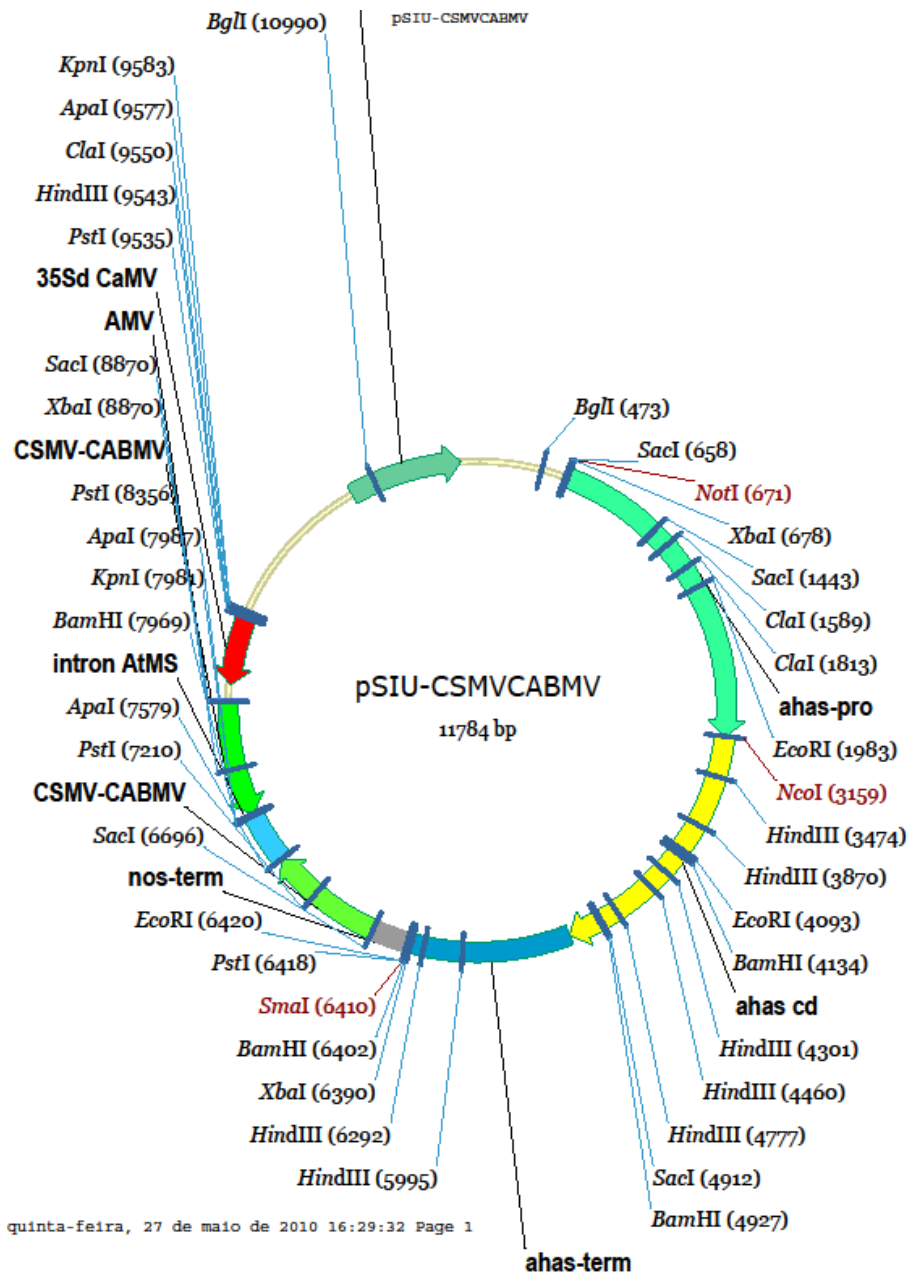
Depois de ajustado por diluição para a concentração de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, e visando confirmar a integridade do vetor pSIUCSMVCABMV, três alíquotas do DNA foram novamente digeridas com a enzima de restrição SacI e foi confirmado o padrão de bandas esperado.

Para clivar o sítio da ampicilina o vetor utilizado nos experimentos de transformação foi digerido com a enzima de restrição Bgl I.

3. Resultados e Discussão

Foi construindo um vetor apresentando 11.784 pb para expressar um dsRNA na forma de grampo (*hairpin*) contendo um fragmento do gene CP do CABMB e do gene 32K do CPSMV-RNA1, conforme apresentado nas Figuras 2.2 e 2.3, que representam, respectivamente, o vetor final obtido com seus sítios de restrições e o esquema mostrando estrutura genética e organização gênica do CABMV e CPSMV. Convém ressaltar que no cassete de interferência as regiões a serem transcritas estão sob o controle do promotor 35S do *Cauliflower mosaic virus* e uma sequência *enhancer* do *Alfalfa mosaic virus*. Esse promotor leva a níveis de transcrição 10 vezes superiores ao do 35CaMV simples (DATLA *et al.*, 1993). Isso é importante para permitir que haja uma alta concentração de siRNA na célula hospedeira. Uma grande quantidade de siRNA bloqueia a expressão dos genes virais de forma efetiva, evitando “vazamentos”, que poderiam levar a sintomas severos, mesmo que de forma tardia. Com esse vetor, objetivou-se o silenciamento ou interferência mediada por RNAi do *Cowpea aphid-borne mosaic virus (Potyvirus)* e *Cowpea severe mosaic virus (Comovirus)*. A literatura relata que a utilização desse tipo de construção para a obtenção de plantas GM tem revelado alta eficiência na obtenção de linhagens resistentes a infecções

causadas por vírus, sobretudo os que apresentam genoma de RNA (KALANTIDIS *et al.*, 2002; BONFIM *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2011). Tem-se observado que vetores do tipo *intron-haipin* (com os fragmentos intercalados por um intron) são mais eficientes que os vetores que contêm espaçadores substituindo os introns (ZHANG *et al.*, 2011).



quinta-feira, 27 de maio de 2010 16:29:32 Page 1

Figura 2.2. Vetor final pSIUCSMVCABMV usado na transformação via biobalística de meristemas apicais de feijão-caupi. Os sítios únicos estão marcados em vermelho.

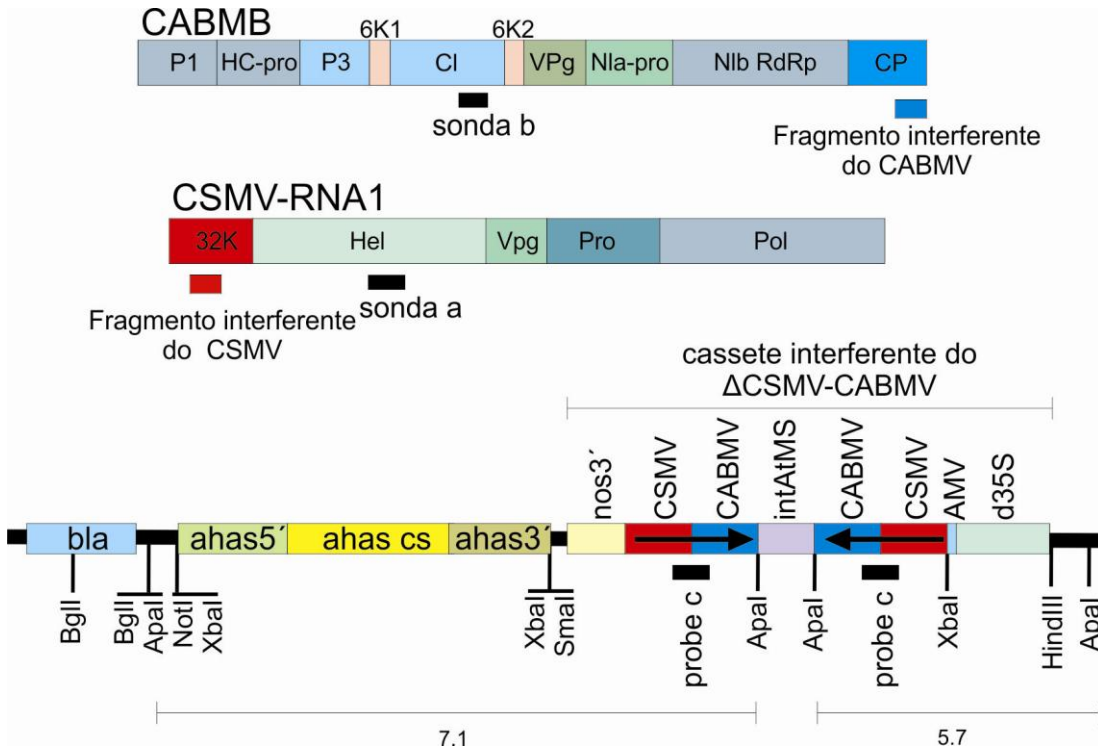


Figura 2.3. Estrutura genética e organização gênica do CABMV e CSMV. O fragmento do genes *CP* (capa proteína) do CABMV e um fragmento do gene da proteína 32K do CSMV foram utilizados para fazer a construção do tipo *intron-hairpin* usada na transformação genética do feijão-caupi. A construção contém ainda o gene *ahas*, que confere tolerância aos herbicidas da classe das imidazolinonas. As sonda “a” e “b” foram usadas nos ensaios de *northern blot* e a sonda “c” foi utilizada nas análises de *Southern blot*.

4. Conclusão

Por meio do alinhamento de sequências de genes do CSMV e CABMV foi possível a construção do vetor de transformação genética denominado de pSIUCSMVCABMV, sendo usado na obtenção de plantas GM de feijão-caupi que apresentam o gene de resistência ao *Cowpea severe mosaic virus* (CSMV) e o do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV).

Referências Bibliográficas

ANDRADE, S. R. M. de. **Transformação de Plantas**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003, 28p. (Documentos/Embrapa Cerrados, ISS 1517-5111;102).

ARAGÃO, F. J. L. & CAMPOS, F. A. P. Common Bean and Cowpea. *In: **Biotechnology in Agricultura and Forestry***, v. 59 (E. C. Pua; M. R. Davey, Eds). Berlin, 2007, pp. 263-267.

ARAGÃO, F. J. L. & FARIA, J. C. First transgenic geminivirus-resistant plant in the field. **Nature Biotechnology**, v. 27, p. 1086-1088, 2009.

ARAGÃO, F. J. L. Development of transgenic methods toward producing transgenic plants. *In: M. Iwanaga (Ed.) **Genetic Engineering of Crop Plants for Abiotic Stress***. JIRCAS, Tsucuba, Japão, 2002, pp. 35-42.

BRASILEIRO, A. C. M. & CARNEIRO, V. T.C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa Cenargen, 1998, p. 51-64.

BRUUN-RASMUSSEN, M.; MADSEN, C. T.; JESSING, S.; ALBRECHTSEN, M. Stability of barley strip mosaic virus-induced gene silencing in barley. **Mol. Plant Microbe Interactions**, v. 20, n. 11, p. 1323-1331, 2007.

BONFIM, K.; *et al.* 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.

DATLA, R. S. S.; BEKKAOUI, F.; HAMMERLINDL, J. K.; PILATE, G.; DUNSTAN, D. I.; CROSBY, W. L. Improved high-level constitutive foreign gene expression in plants using an AMV RNA4 untranslated leader sequence. **Plant Sci**, n. 94, p. 139-149; 1993.

EAMENS, A.; WANG, M.; SMITH, N. A.; WATERHOUSE, P. M. RNA silencing in plants: yesterday, today and tomorrow. **Plant Physiology**, v. 147, p. 456-468, 2008.

GRUMET, R. Genetically engineered plant virus resistance. **HortScienc**, v. 25, n. 5, p. 508-513, 1990.

HIGGINS, C. M.; HALL, R. M.; MITTER, N.; CRUICKSHANK, A.; DIETZGEN, R. G. Peanut strip potyvirus resistance in peanut (*Arachis hypogaea* L.) plants carrying viral coat protein gene sequences. **Transgenic Research**, London, v. 13, p. 59-67, 2004.

HILY, J. M.; SCORZA, R.; WEBB, K.; RAVELONANDRO, M. Accumulation of the long class of si RNA is associated with resistance to *plum pox virus* in a transgenic wood perennial plum tree. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 18, p. 794-799, 2005.

KALANTIDIS, K.; PSARADAKIS, S.; TABLE, M.; TSAGRIS, M. The occurrence of CMV-specific short RNAs in transgenic tobacco expressing virus derived double-stranded RNA is indicative of resistance to the virus. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 15, p.826-833, 2002.

POWELL, P. A.; NELSON, R. S.; HOFFMANN, B. D. N.; ROGERS, S. G.; FRALEY, R. T.; BEACHY, R. N. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. **Science**, v. 232, p. 738-743, 1986.

REDDY, M. S. C.; GHABRIAL, S. A.; REDMOND, C. T.; DINKIS, R. D.; COLLINS, G. B. Resistance to bean pod mottle virus in transgenic soy-bean lines expressing the capsid polyprotein. **Phytopathology**, v. 91, p. 831-838, 2001.

RECH, E. L. F.; VIANNA, G. R.; ARAGÃO, F. J. L. High-efficiency transformation by biolistic of soybean, common bean and cotton transgenic plants. **Nature**, v. 3. p. 410-418, 2008.

RITZENTHALER, C. Resistance to plant viruses: old issue, new answers? **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 16, p. 118-122, 2005.

SANFORD, J. C. & JOHNSTON, S. A. The concept of parasite-derived resistance-deriving resistance genes from the parasite's own genome. **Journal of Theoretical Biology**, v. 113, p. 395-405, 1985.

SANJAYA, V. V. S.; PRASAD, V.; KIRTHI, N.; MAIYA, S.P.; SAVITHRI, H. S.; LAKSHMISITA, G. Development of cotton transgenic with antisense AV2 gene for resistance against cotton leaf curl virus (CLCuD) via *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, p. 55-63, 2005.

SMITH, N. A.; SINGH, S. P.; WANG, M. B.; STOUTJESDIJK, P. A.; GREEN, A. G.; WATERHOUSE, P. M. Total silencing by intron-spliced harpin RNAs. **Nature**, v. 407, p. 319-320, 2000.

TEPFER, M. Risk assessment of vírus-resistant transgenic plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, 2002, v. 40, p. 467-491.

TINOCO, M. L. P. & ARAGÃO, F. J. L. **Silenciamento da expressão de genes marcadores em plantas transgênicas através de mutação induzida de RNA interferente**. Brasília/DF: Instituto de Ciências Biológicas, Dep. de Biologia Celular, Universidade de Brasília, 2005, 65p. Dissertação de Mestrado.

TINOCO, M. L. P.; DIAS, B. B. A.; DALL'QASTTA, R. C.; PAMPHILE, J. A.; ARAGÃO, F. J. L. *In vivo* trans-specific gene silencing in fungal cells by in plant expression of a double-stranded RNA. **BMC Biology**, p. 8-27, 2010.

TOUGOW, M.; FURUTANI, N.; YAMAGISHI, N.; SHIZUKAWA, Y.; TAKAHATA, Y.; HIDAKE, S. Development of resistant transgenic soybeans with inverted repeat-coat protein genes of *Soybean dwarf virus*. **Plant Cell Rep**, v. 25, p. 1213-1218, 2006.

WANG, X.; EGGENBERGER, A. L.; NUTTER JR, F. W.; COLINA, J. H. Pathogen-derived transgenic resistance to *Soybean mosaic virus* in soybean. **Molecular Breeding**, v. 8, p. 119-127, 2001.

WATERHOUSE, P. M. & HELLIWEL, C. A. Exploring plant genomes by RNA induced gene silencing. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 4, p. 29-38, 2003.

WATERHOUSE, P. M.; GRAHAM, M. W.; WANG, M. B. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 95, p. 13959-13964, 1998.

WESLEY, S. V.; HELLIWELL, C. A.; SMITH, N. A.; WANG, M.; ROUSE, D. T.; LIU, Q.; GOODING, P. S.; SINGH, S. P.; ABBOT, D.; STOUTJESDIJK, P. A.; ROBINSON, S. P.; GLEAVE, A. P.; GREEN, A. G.; WATERHOUSE, P. M. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. **The Plant Journal**, Oxford, v. 27, p. 581-590, 2001.

ZHANG, X.; SATO, S.; VÓS, X.; DORRANCE, A. E.; MORRIS, T. J.; CLEMENTE, T. E.; QU, F. Robust RNAi-based resistance to mixed infection of three viruses in soybean plants expressing separate short hairpins from a single transgene. **Phytopathology**, v. 101, p. 1264-1269, 2011.

Transformação Genética, Análise das Plantas Geneticamente Modificadas de feijão-caupi, Desafio com o CPSMV e CABMV

1. Introdução

O objetivo da engenharia genética em plantas é introduzir genes de interesse agronômico, tais como resistência a pragas e doenças, tolerância a condições de estresse ambiental, melhoria nutricional. Uma planta geneticamente modificada (GM) pode ser definida como sendo aquela que teve seu material genético alterado com uso da tecnologia de DNA recombinante (BRASILEIRO & CARNEIRO, 1998; TORRES *et al.*, 2000; ARAGÃO & FARIA, 2009). Nesse caso, ocorre alteração do genoma da planta e tal alteração geralmente é transmitida para as gerações futuras.

A combinação de técnicas de cultivo *in vitro*, biologia molecular e transferência exógena de genes representa uma valiosa ferramenta para o melhoramento genético de plantas, uma vez que possibilita a introdução de genes de interesse agronômico e alimentar. Nesse sentido, não apenas genes vegetais podem ser introduzidos em plantas, mas também genes de animais e microrganismos podem ser introduzidos de maneira controlada em um genoma vegetal, de forma independente da fertilização para obtenção de protocolos de transformação genética visando à obtenção de linhagens-elite (GANDER *et al.*, 1996; ANDRADE, 2003, ARAGÃO *et al.*, 2000). Contudo, um protocolo de transformação genética só pode ser considerado confiável se permitir transformar, regenerar e transferir os transgenes de forma estável e eficiente para a progênie.

As etapas para obtenção de uma planta GM consistem na identificação do gene de interesse, seu posterior isolamento e clonagem, introdução no tecido vegetal, seleção das células GM, regeneração de plantas, análises moleculares e finalmente testes a nível de casa de vegetação e campo das linhagens obtidas (ANDRADE, 2003).

A Lei de Biossegurança (Lei n.º 11.105, de 24/3/2005) estabeleceu a criação da CTNBio, uma instância colegiada multidisciplinar, formada por personalidades de notório saber em diferentes áreas, cuja finalidade é prestar apoio técnico consultivo e

assessoramento ao Governo Federal na formulação, atualização e implementação da Política Nacional de Biossegurança relativa a organismos geneticamente modificados (OGMs). Essa comissão regulamenta a manipulação, cultivo, transporte, comercialização, consumo, liberação e descarte de OGMs, visando proteger a vida, saúde e bem estar do homem, animais e meio ambiente (<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/2.html>).

No Brasil, as linhagens-elites obtidas via protocolos de transformação genética precisam de aprovação da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) para serem testadas a nível de campo. Dentre os requisitos para estabelecer a segurança de produtos GM, são avaliados aspectos como: potencial alergênico da nova proteína expressa (caso exista), termoestabilidade, digestibilidade no meio gástrico, análise bioquímica de taxas de glicolização, análise das sequências de aminoácidos da nova proteína em comparação à de alergênicos convencionais, toxicidade da proteína expressa pelo gene introduzido, efeitos secundários da inserção do gene e risco de possíveis mutações. Além disso, impactos sobre a macro e micro fauna, microrganismos e diversos fatores ambientais devem ser estudados (CTNBio, Resolução Normativa N.º 5; <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/11444.html>).

Em nível mundial, são muitos os exemplos de plantas GM liberadas para cultivo comercial com genes de resistência a insetos, pragas e tolerância a herbicidas. No Brasil plantas GM ocupam atualmente uma área de 36,6 milhões de hectares (www.isaaa.org) e um dos mais recentes eventos foi a liberação do feijão-comum resistente ao mosaico dourado (BONFIM *et al.*, 2007; ARAGÃO & FARIA 2009).

Culturas de grande expressividade no cenário agrícola são geralmente alvo de estudos de melhoramento genético, e o feijão-caupi encontra-se incluído nesse grupo.

É notório que nos últimos anos o feijão-caupi deixou de ser visto apenas como uma cultura de subsistência do sertanejo nordestino, e o seu cultivo passou a despertar o interesse

de agricultores que praticam agricultura empresarial, sobretudo na Região Centro-Oeste do Brasil. Essa agricultura explora grandes áreas com utilização de sistema mecanizado. Esse contexto gera a demanda por cultivares de feijão-caupi melhor adaptadas (arquitetura da planta) que permitam o emprego da mecanização (FREIRE FILHO *et al.*, 2008), sobretudo no referente aos tratos culturais e controle de pragas, doenças e plantas invasoras.

A incidência de viroses representa um importante gargalo para o cultivo de feijão-caupi, sobretudo aquelas causadas por *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) e o *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), que podem levar a perdas drásticas nas lavouras infectadas. Nesse contexto, os grupos de pesquisa têm se dedicado na busca por plantas resistentes a essas viroses. A transgenia surge como uma alternativa de certa forma mais rápida e eficiente na obtenção desse objetivo. E nesse sentido, estratégias que utilizam RNA interferente conseguem obter um elevado nível de resistência a vírus, podendo chegar à imunidade (WATERHOUSE *et al.*, 2001). Espera-se que, a exemplo do ocorrido com o feijão comum, em breve seja desenvolvida e aprovada comercialmente uma cultivar de feijão-caupi resistente a vírus.

2. Material e Métodos

2.1. Transformação Genética do Feijão-Caupi Mediada pelo Processo Biobalístico

A geração de plantas geneticamente modificadas (GM) de feijão-caupi tem sido realizada segundo protocolo desenvolvido pela Embrapa que utiliza a técnica de biobalística (IVO *et al.*, 2008). Esse protocolo utiliza como explantes (material que após a transformação genética vai gerar a planta geneticamente modificada), meristemas apicais de embriões zigóticos de feijão-caupi. Para obtenção desses explantes a qualidade das sementes é de vital importância. Portanto, as sementes utilizadas nos trabalhos de transformação

genética devem ser produzidas sob as melhores condições possíveis, preferencialmente em casa de vegetação.

As sementes utilizadas nesse estudo foram produzidas em condições controladas de casa de vegetação, recebendo o manejo recomendado pela Embrapa Meio-Norte para a cultura do feijão-caupi para a cultivar BRS Novaera, desenvolvida pela Embrapa. Para produção das sementes foram utilizados vasos com capacidade de 10 Kg contendo substrato composto por terra e plantmax® (1:1). Em cada vaso foram semeadas 2 sementes, estes foram mantidos em condições de casa de vegetação até o final do ciclo que durou cerca de 70 dias, do plantio até a coleta das sementes. As sementes obtidas mantiveram o padrão característico da cultivar conforme apresentado na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Características da Cultivar BRS Novaera. Adaptado de: BRS Novaera (2007), folder da Embrapa criado para o lançamento comercial da cultivar.

Cultivar BRS Novaera	
Hábito de Crescimento	Indeterminado
Porte	Semiereto
Tipo e Folha (folíolo central)	Semi-lanceolada
Cor da Flor	Branca
Cor da Vagem imatura	Verde
Cor da Vagem em Maturidade fisiológica e na Colheita	Amarelo-claro
Comprimento médio da vagem	15 cm
Número médio de Grãos por Vagem	10
Nível de inserção das vagens	Acima da Folhagem
Número de dias para a floração plena	41 dias
Ciclo	65 - 70 dias
Características da Semente	
Forma da Semente	Reniforme
Cor do tegumento	Branca
Tipo de Tegumento	Rugoso
Tegumento quanto ao Brilho	Sem Brilho
Cor do anel do hilo	Marrom
Cor do halo	Sem halo
Peso médio de 100 Grãos	20 gramas
Classe Comercial	Branco
Sub-classe Comercial	Branção

As sementes produzidas foram utilizadas como fonte de explantes nos experimentos de transformação genética (Figura 3.1-A). Essas sementes foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar (capela) usando solução de etanol 70% durante um minuto, seguido por hipoclorito de sódio a 1% durante 20 minutos sob agitação eventual, e posteriormente enxaguadas três vezes com água destilada estéril e embebidas por um período de 14-16 h.

Em câmara de fluxo laminar e sob microscópio estereoscópico (modelo Zeiss Stemi 2000), o eixo embrionário foi isolado da semente (tecido de reserva) e o meristema apical exposto por meio da retirada das folhas primárias e dos primórdios foliares, sendo que essa estrutura recebeu a denominação de explante (Figuras 3.1-B, 3.1-C, 3.1-D, 3.1-E). Os explantes foram posicionados com a região apical voltada para cima imediatamente antes do bombardeamento em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com 0,8% de fitagel Sigma® (Figura 3.1-F).

O processo de bombardeamento foi conduzido segundo protocolo descrito por Aragão *et al.* (1996) com uso do acelerador de partículas (*gene gun*) (Figura 3.1-G, 3.1-H) com os seguintes parâmetros físicos:

⇒ Umidade relativa no laboratório igual ou menor que 50%;

⇒ Distância entre a câmara de gás (gerador da onda de choque) e a membrana carreadora contendo as micropartículas envoltas em DNA foi de 8 mm;

⇒ Distância entre a tela de retenção e o explante 80 mm;

⇒ Pressão do vácuo 27 polegadas de Hg;

⇒ Pressão do gás Hélio 1.200 psi (1 kgf/cm² = 14,22 psi).

Para os experimentos de bombardeamento, o vetor pSIUCSMVCABMV foi linearizado por digestão com a enzima BglII para inativar o sítio de resistência ao antibiótico ampicilina presente no vetor de transformação.

Após cada experimento de bombardeamento os explantes, (embriões bombardeados) foram transferidos para frascos contendo cerca de 30 mL meio de cultura do tipo MS suplementado com 44,3 µM de 6-benzylaminopurina (BAP) e 300 ηM do herbicida imazapyr, esse último usado para selecionar os transformantes, e mantidos em condição de fotoperíodo de 16h a 24± 2 °C até o aparecimento de brotos e raiz, no caso formação de plântulas aptas a serem analisadas (Figura 3.1-I). O surgimento dessas estruturas ocorreu

com cerca de 8 a 10 semanas após o bombardeamento. Cada plântula originada foi denominada T_0 , e recebeu um número distinto no momento da análise via PCR. Essas plantas foram aclimatadas individualmente em casa de vegetação (Figura 3.1-J), e posteriormente mantidas em condições de umidade controlada (Figuras 3.1-K e 3.1-L) visando a produção de sementes e plantas para os desafios contra CPSMV e CABMV.

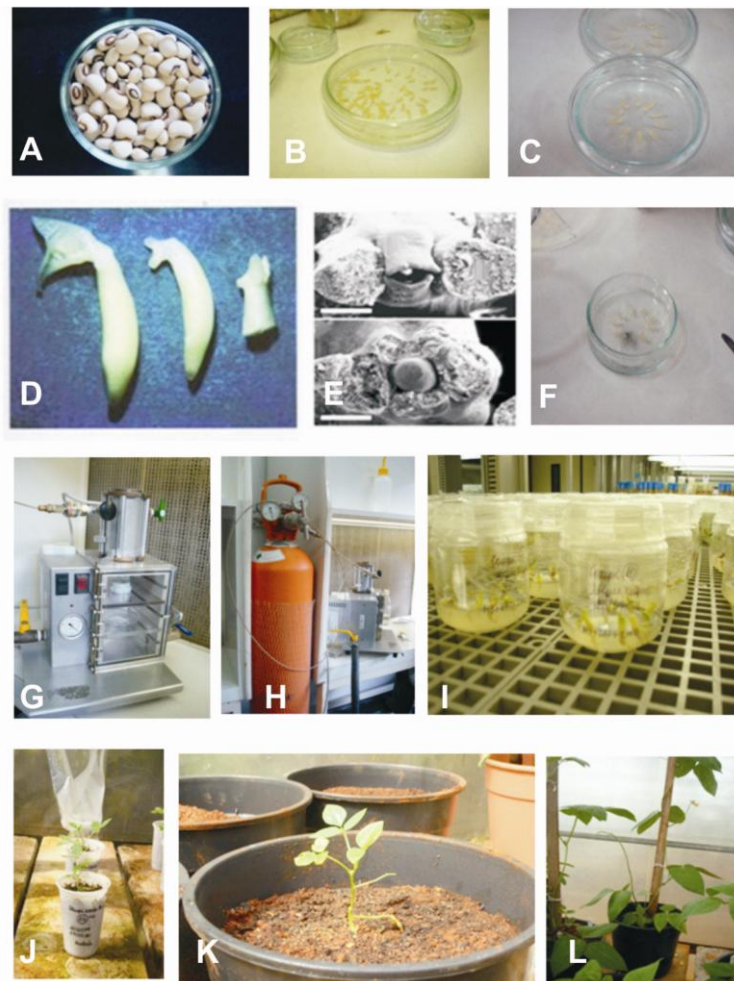


Figura 3.1. Sequência de etapas do experimento de transformação genética até o desenvolvimento em casa de vegetação das plantas T_0 de feijão-caupi. Onde **A**: sementes da cultivar BRS Novaera usadas para extração de embriões; **B** e **C**: embriões recém extraídos e posicionados em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962); **D** e **E**: fotos dos embriões antes e após a exposição do maristema apical; **F**: embriões após experimento de bombardeamento; **G** e **H**: equipamento utilizado no experimento de bombardeamento; **I**: embriões após o bombardeamento e transferidos para meio de seleção; **J**: planta positiva T_0 recém aclimatada; **K** e **L**: desenvolvimento das plantas T_0 em casa de vegetação.

2.2. Detecção de Transgenes em Linhagens GM por PCR

A técnica da PCR ou reação de polimerase em cadeia (*Polymerase Chain Reaction*) consiste em produzir em condições *in vitro* (termociclador) grandes quantidades de um fragmento específico de DNA, de tamanho e sequência definidos, partindo de uma quantidade molde de ácido nucléico. O número de fragmentos amplificados é duplicado a cada ciclo da reação, logo, é um processo exponencial. A reação de amplificação é catalizada pela enzima DNA polimerase que alonga um pequeno fragmento de DNA de fita simples, o *primer*, quando este está ligado a uma fita molde de DNA. Uma PCR pode apresentar de 30 a 40 ciclos que são divididos em 3 fases (desnaturação, anelamento e alongamento). A fase de desnaturação é caracterizada pela separação da fita dupla de DNA, ocorre com a temperatura em torno de 95 °C; a fase de anelamento corresponde à marcação pelos *primers* da sequência alvo que será amplificada, essa etapa ocorre à temperatura mais baixa, geralmente de 40-60 °C; e a fase de alongamento em que a enzima *taq* polimerase replica a cadeia de DNA, essa fase ocorre com temperatura na faixa de 70-75°C. O resultado da PCR pode ser visualizado por meio de eletroforese em gel de agarose (GAMA, 1998).

Nesse estudo, para a PCR o DNA genômico das plantas de feijão-caupi alongadas *in vitro* foi extraído de folhas usando o *kit* de extração de DNA da Sigma® (Extract-N-Amp™ PCR Kits). O método consistiu na utilização de um disco foliar de aproximadamente 0.2 × 0.2 mm de diâmetro, o material vegetal foi mantido em contato com 20µL do tampão de extração por 10 minutos a temperatura de 100°C, em seguida foram adicionados 20µL do tampão de diluição. Para a reação da PCR foi utilizado o tampão do Kit de extração de DNA da Sigma no volume final de 20µL, foram utilizados 10µL de tampão, 0,2µM do *primer* Caupi 1, 0,2µM do *primer* Caupi 2, cerca de 10ng/µL × 4.0µL do DNA extraído (cerca de 20ng/µL), o volume final foi ajustado com água estéril do tipo Milli-Q para o volume final. A reação de amplificação foi realizada usando o termociclador PTC-100 *Thermal Cycler*

(M.J. Research, Inc.), seguindo o programa Ahas com desnaturação a 95°C por 5 min, totalizando 35 ciclos de amplificação (95°C por 1 min, 55°C por 1 min, 73°C por 1 min) e 73°C por 7 min, sendo mantido a 4 °C após o término da reação. O produto da reação da PCR foi analisado em gel de agarose 1% (w/v), contendo brometo de etídio (0,5µg/L), a eletroforese foi feita durante cerca de 60 minutos por 60-90V e o produto foi visualizado em transiluminador UV. O DNA das plantas não transformadas foi usado como controle negativo.

Posteriormente houve confirmação da PCR das plantas T₀ pelo método CTAB (SAMBROOK *et al.*, 1989). O DNA extraído foi suspenso em água estéril do tipo Milli-Q para uma concentração final de 5ng/µL×2.0µL do DNA genômico extraído, aproximadamente 10ng, foi usado para a PCR. A amplificação por PCR foi feita no volume final de 25µL contendo 0,2µM de cada *primer*, 1,5 unidades de Taq DNA *polymerase* (Amersham Pharmacia Biotech), 0,25µM de dNTPs mix, 1,25 mM de Mg Cl₂, 500mM KCl e 200mM Tris-HCl (pH 8.4).

2.3. Aclimação das Plantas GM

A aclimação é uma etapa necessária em todos os protocolos que envolvem cultura de tecidos vegetais, e consiste em transferir a planta da condição *in vitro* para *ex vitro*, esse processo permite a adaptação às condições de baixa umidade, intensidade luminosa e oscilação de temperatura (VANHUYLLENBROECK & DEBERGH, 1996). Inicialmente, as plantas são aclimatadas em casa de vegetação com condições parcialmente controladas, à proporção que a planta se desenvolve as condições são mantidas bem próximas às do meio ambiente.

As plantas confirmadas positivas em PCR foram adequadamente identificadas como linhagem T₀ usando um número de identificação seguido do nome do vetor de transformação.

A aclimação foi feita no momento em que, cada planta, atingiu cerca de 5 cm de altura, contendo pelo menos 2 pares de folhas e raízes bem formadas. As plantas foram retiradas do cultivo *in vitro* e acondicionadas em copo previamente perfurado de polietileno com capacidade de 300 mL, contendo mistura de 1:1 de substrato do tipo vermiculita e solo previamente corrigido e adubado.

Visando diminuir o estresse dos primeiros 15 dias pós-cultivo *in vitro*, evitar desidratação e morte, as plantas foram mantidas envoltas em saco de polietileno transparente e acondicionadas em casa de vegetação com microaspersão controlada por temporizador a cada 30 minutos. Ao final dos 15 dias, o saco de polietileno foi removido e as plantas foram transferidas para casa de vegetação sem aspersão, mantidas individualmente em vasos com capacidade de 5 L.

2.4. Análise de *Southern blot*

A técnica de *Southern blot* permite detectar, com uso de radioisótopos se sequências de DNA exógeno foram integradas no DNA genômico. A técnica foi inicialmente descrita por Edwim Southern na década de 1970 e segue sendo empregada em estudos de integração de DNA (SOUTHERN, 1975). A utilização dessa técnica é extremamente importante em experimentos de transformação genética por ser considerada uma prova molecular da integração de genes exógenos no genoma vegetal.

2.4.1. Extração do DNA Genômico, Digestão Enzimática e Transferência para Membrana

Embora tenham sido confirmadas por PCR 15 plantas positivas contendo os genes presentes no vetor pSIUCSMVCABMV, apenas as plantas linhagens 12, 21, 39, 52, 59, 71, 72, 68, 99, 110, 112 e 119 foram analisadas via *Southern blot*. Essa análise foi realizada com utilização de DNA genômico extraído de cada planta T₀ e de uma planta controle negativo da cultivar BRS Novaera.

O DNA genômico foi extraído de folhas jovens da planta controle e das plantas GM conforme método descrito por MURRAY & THOMPSON, (1980) com algumas adaptações. Para a extração do DNA coletaram-se 500 mg de tecido foliar fresco e juvenil de uma planta de cada linhagem GM e de uma planta controle (planta da cultivar BRS Novaera não transformada). As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz com pistilo até a obtenção de um pó fino. O macerado de cada planta foi transferido para tubos do tipo Falcon® com capacidade para 15 mL contendo 5 mL de tampão de extração pré-aquecido a 60° C e suplementado com 50 mg de polivinilpirrolidona (PVP). Os tubos foram invertidos cuidadosamente para misturar o macerado à solução e mantido sob incubação à temperatura ambiente por um período de 30-60 minutos. Posteriormente foram acrescentados a cada tubo 6 mL da solução de clorofórmio-octanol na proporção de 24:1, e novamente os tubos foram invertidos até ser obtida uma emulsão. Em seguida os tubos foram centrifugados por 20 minutos à 3000 rpm à temperatura ambiente. Ao final da centrifugação, a fase sobrenadante foi transferida para novos tubos, e o procedimento do clorofórmio-octanol foi repetido. Em seguida, os tubos foram novamente centrifugados repetindo-se o processo. Ao sobrenadante, foram adicionados ½ do volume da fase aquosa de NaCl 5M, e 2 vezes o volume da fase aquosa de etanol 95% (pré resfriado a -20° C). Os tubos foram invertidos e mantidos à -20°C durante 10 minutos, para nova

centrifugação por 6 minutos, descartando-se o sobrenadante. O *pellet* formado em cada tubo foi lavado com etanol 70% resfriado a 4° C, e posteriormente ressuspensionado com 300 µL de solução TE, transferido novamente para tubos do tipo Ependorf e tratado com 3 µL de Rnase A (10 mg/mL), mantidos sob incubação por 30 minutos à 37 °C. Em seguida cada tubo recebeu 3 µL de proteinase K (1mg/mL) e novamente foram incubados à 37 °C. Ao final da incubação, foram adicionados 150 µL de fenol e 150 µL de clorofórmio em cada tubo, estes foram levados ao *vortex* com posterior centrifugação à 14000 rpm durante 10 minutos. Depois, a fase superior foi transferida para novo tubo Ependorf e foi adicionado a cada tubo 1/10 do seu volume de acetato de sódio 2 M e 2 volumes de etanol absoluto, e os tubos foram mantidos à -80 °C durante 60 minutos. Após a incubação os tubos foram centrifugados à 14000 rpm durante 10 minutos. O DNA formou um *pellet*, que foi lavado com etanol 70% e ressuspensionado em 100 µL de TE por tubo.

A concentração do DNA foi determinada com o uso do equipamento Nanodrop, e a integridade do DNA foi estimada aplicando uma alíquota das amostras em gel de agarose com posterior visualização em transiluminador UV .

Aproximadamente 50 µg de cada amostra de DNA genômico foram digeridos com a enzima de restrição XbaI *overnight* a 37 °C, fracionado em gel de agarose 1%, transferidos por capilaridade para membrana de nylon Hybond N⁺ (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) e fixados em forno a 80 °C durante 2 horas.

2.4.2. Hibridização Com Sonda dos Vírus, Lavagens e Exposição da Membrana

A membrana foi pré-hibridizada a 55 °C em 15 mL da solução Express *Hyb Hybridization Solution* (Clontech). A hibridização foi realizada usando um *random prime* (Ready-to-Go TM Kit Pharmacia Biotech, UK) α^{32P}-dCTP e como sonda foi usado o fragmento *intron* recuperado após reação de

PCR do vetor de transformação pSIUCSMVCABMV com os *primers* específicos Caupi 1 (5'-CAGTGTGCCTCTCAGTGTTC-3') e Caupi 2 (5'-GATGGTAAGATGATGCTGGCTA-3'), conforme apresentado na Figura 3.2.

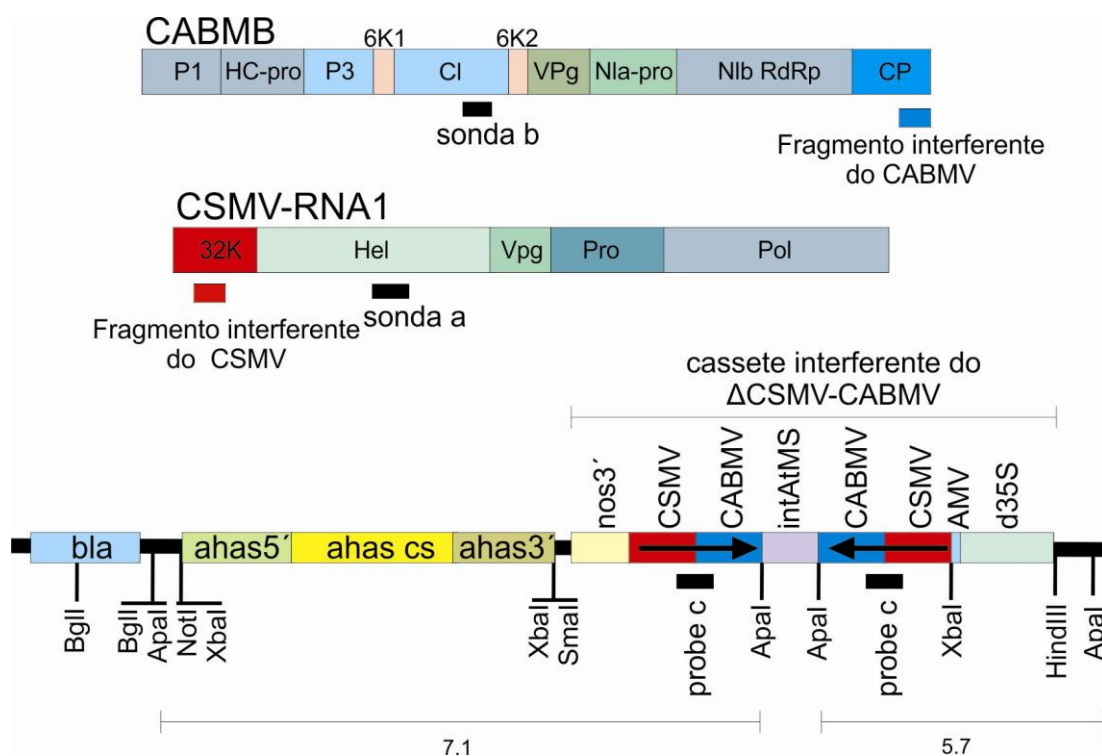


Figura 3.2. Esquema mostrando estrutura genética e organização gênica dos vírus. O fragmento do genes CP (capa proteína) do CABMV e um fragmento do gene da proteína 32K do CSMV foram utilizados para fazer a construção do tipo *intron-hairpin* usada na transformação genética do feijão-caupi. A construção contém ainda o gene *ahas*, que confere tolerância aos herbicidas da classe das imidazolinonas. As sonda "a" e "b" foram usadas nos ensaios de *northern blot* e a sonda "c" foi utilizada nas análises de *Southern blot*.

Foram feitas duas lavagens em tampão SSPE 2X, SDS 0,1% a temperatura ambiente; uma lavagem em tampão SSPE 1X, SDS 0,1% a 55°C e outra em tampão SSPE 0,1X, SDS 0,1%. A membrana foi exposta por cerca de 24 horas em Image Plate (Fujifilm), para posterior visualização das bandas no equipamento Fluorescent Image (FLA-3000/Fujifilm).

2.5. Análise de *northern blot*

A técnica de *northern blot* é similar à de *Southern blot* sendo utilizada para determinar RNAs específicos ou pequenos RNAs. Com essa técnica é possível determinar a quantidade e o tamanho de RNAs específicos, presentes em preparações de RNA total. Dessa forma, é possível visualizar a ocorrência de transcrição do gene no genoma da planta.

Nessa análise foram usados os procedimentos segundo BONFIM *et al.*, (2007), sendo que as plantas usadas não estavam infectadas com os vírus. Para esse teste foi utilizado RNA extraído com Trizol.

2.5.1. Extração do RNA com uso de Trizol® (Invitrogen)

Para esse procedimento, cerca de 400 mg de folhas jovens de 9 plantas T₁ de e de uma planta controle negativo da cultivar BRS Novaera foram coletadas e imediatamente envoltas em papel alumínio e acondicionadas em recipiente contendo N₂ líquido. Em seguida com auxílio de almofariz e pistilo as folhas foram maceradas com N₂ líquido e transferidas para tubos do tipo Falcon® contendo 4 mL de Trizol® (Invitrogen). Para misturar, o tubo foi invertido delicadamente e, em seguida, mantido sob incubação durante 5 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio para cada 1 mL de trizol, totalizando 0,8 mL por tubo. O material foi então homogeneizado e mantido sob incubação durante 3 minutos à temperatura ambiente, seguindo de centrifugação à 4 °C durante 15 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi recuperado e transferido para novo tubo e a ele foram adicionados 2 mL de isopropanol. As amostras foram incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas à 10 rpm na temperatura de 4 °C. O *pellet* formado

foi lavado com etanol 75% e depois de seco foi ressuspensionado com cerca de 200 µL de água MilliQ estéril.

2.5.2. Preparação, Hibridização, Lavagem e Exposição da Membrana

Cerca de 50 µg do RNA total extraído de cada planta foram aplicados em gel 20% PAGE 1x Tris-borate-EDTA (TBE) contendo 7M de uréia, três óligos foram usados como marcador molecular (18, 24 e 36 nucleotídeos). O gel foi corado em 1X TBE contendo brometo de etídeo (0.5 µg/ml), e fotografado para verificar a visualização dos tRNAs e 5S rRNA. O RNA foi transferido por *eletroblot* para membrana Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) durante 4 horas, e fixado em equipamento UV *cross-linking*. A membrana foi pré-hibridizada a 45 °C em tampão de hibridização (0,5 M Na₂HPO₄, 1mM EDTA, 1% BSA e 7% SDS) em um volume final de 25mL. A hibridização foi feita usando o *random primed DNA labeling kit* (Ready-to-Go™ Kit Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) α^{32P}-dCTP e como sonda foi usado o fragmento de (600pb) recuperado após PCR do pSIUCSMVCABMV com os *primers* específicos Caupi 1 (5'-CAGTGTGCCTCTCAGTGTTC-3') e Caupi 2 (5'-GATGGTAAGATGATGCTGGCTA-3') pSIUCSMVCABMV. Foram realizadas duas lavagens de 10 minutos cada a 5 °C em tampão SSC 2X, SDS 0,1%.

A membrana foi exposta por cerca de 18 horas em filme *Image Plate* (Fujifilm), para posterior visualização das bandas no equipamento Fluorescent Image (FLA-3000/Fujifilm).

2.6. Análise de *Dot blot*

Para esse teste foi utilizado o RNA total das linhagens 12, 52, 68, 71, 72 e 112 de pSIUCSMVCABMV da terceira geração (T₃) e uma planta controle negativo da cultivar BRS Novaera. Foram semeadas, em casa de vegetação, 20 sementes de cada linhagem e 20

sementes do controle negativo BRS Novaera. Após 10 dias da semeadura foram coletadas folhas de todas as plantas e em seguida, realizada a inoculação mecânica com os vírus CABMV e CPSMV.

Foram coletadas folhas das plantas após o surgimento de sintomas e foi realizada a extração de RNA total de aproximadamente 400mg de folhas inoculadas e não inoculadas com os vírus CABMV e CPSMV, o protocolo de extração foi o mesmo descrito para a análise de *northern blot*. Foram utilizados cerca de 60 ng de cada amostra de RNA, cada amostra foi tratada previamente com SSC 20X, formaldeído 37% e incubada a 60°C durante 30 minutos, esse procedimento tem como objetivo preservar a integridade do RNA. Após o preparo, as amostras foram transferidas manualmente para membrana do tipo Hybond-N+ (Amershan Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK), fixada em equipamento UV *cross-linking* e hibridizada com sonda do fragmento dos vírus obtido via PCR conforme descrição para o *northern blot*.

As amostras foram identificadas por números sendo o primeiro o controle negativo cultivar BRS Novaera, os demais as triplicatas das linhagens GM de feijão-caupi pSIUCSMVCABMV, onde: 1 (controle), 2 (68A), 3 (68B), 4 (68C), 5 (71A), 6 (72B), 7 (72C), 8 (12A), 9 (12B), 10 (12C), 11 (72A), 12 (72B), 13 (72C), 14 (52A), 15 (52B), 16 (52C), 17 (112A), 18 (112B) e 19 (112C).

2.7. Teste de Progênie

As progênies foram analisadas via PCR com o objetivo de verificar se o transgene estava segregando no padrão mendeliano. Foram germinadas em média 20 sementes de cada uma das 14 linhagens T₀ que obtiveram padrão de germinação das sementes semelhante ao padrão da planta controle. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e receberam os

tratos culturais conforme as recomendações da Embrapa Meio Norte para cultivo de feijão-caupi.

Cada planta filha foi identificada como T₁ seguido do número correspondente da planta mãe, ou seja, planta T₀ (para a planta obtida via transformação genética) e T₁ (para a primeira geração obtida a partir das plantas T₀), e dessa forma as linhagens receberam a denominação T₁ 12, T₁ 21 até a T₁ 119.

Para verificar se o padrão de segregação dos transgenes era Mendeliano, foi realizado o teste qui-quadrado. Teste de qui-quadrado com correção de Yates foi usado quando havia ocorrência menor que 5 indivíduos em uma determinada categoria, sendo testada a frequência esperada de 3:1.

Para o teste qui-quadrado foi utilizada a seguinte fórmula:

$X^2 = \sum [(F_o - F_e)^2 / F_e]$, onde:

F_o → frequência observada para cada classe;

F_e → frequência esperada para cada classe com base na proporção de Mendel para um locus

2.8. Desafio das Linhagens GM com o CPSMV e CABMV e Obtenção de Dados Agronômicos (Germinação e Peso de Sementes)

Os isolados dos vírus foram oriundos da Universidade Federal do Ceará (UFC). O material foi replicado em plantas negativas da cultivar Novaera e mantidos em casa de vegetação.

Plantas filhas T₁ e T₂ (primeira e segunda geração obtidas a partir de plantas T₀) das 14 linhagens T₀ obtidas, após serem confirmadas positivas por meio da PCR para o gene de resistência aos vírus do CPSMV e CABMV, foram inoculadas mecanicamente com os isolados dos referidos vírus, e avaliadas quanto ao aparecimento de sintomas, produção de sementes e presença de vírus.

Inicialmente, foi realizado um desafio mais severo, no qual foram testadas plantas com idade de 7 dias após a germinação das 14 linhagens obtidas. Para cada 20 plantas T₁ das linhagens GM foram inoculadas 8 plantas controle negativo da cultivar Novaera e ainda 10 plantas foram mantidas como testemunhas sem inoculação com mesma idade das plantas T₁.

Por se tratar de dois vírus de RNA, que são sabidamente sensíveis às variações climáticas, sobretudo de temperatura, os ensaios foram conduzidos nas horas mais frescas, ou seja, início ou final do dia, uma vez que altas temperaturas podem interferir negativamente na inoculação (NOGUEIRA, 2007).

O protocolo severo de inoculação consistiu no polvilhamento de todas as folhas das plantas a serem inoculadas com abrasivo do tipo carborundum 600 mesh, em seguida cerca de 1000 mg de folha infectada com os vírus CPSMV e CABMV foi macerada em almofariz mantido sob refrigeração, em presença de 50 mL de tampão fosfato a 0,1 M pH 7,0 previamente resfriado (NOGUEIRA, 2007). A inoculação foi realizada por meio da fricção do extrato foliar obtido via maceração de plantas infectadas pelos vírus no tampão, conforme apresentado na Figura 3.3 em “A” e “B”.

Para o protocolo de inoculação com maior diluição dos vírus foram utilizados os mesmos parâmetros citados para o desafio severo, com exceção do volume de tampão que foi aumentado para 100 mL.

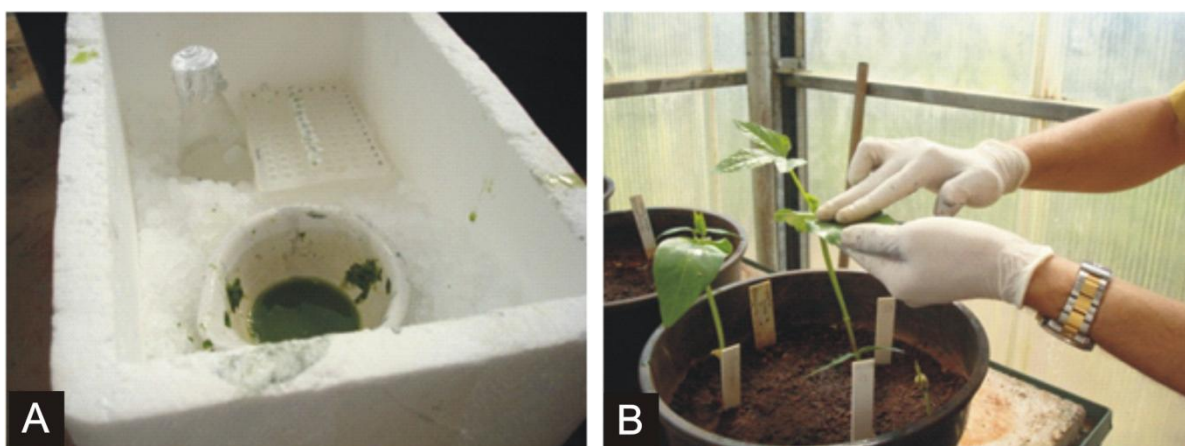


Figura 3.3. Inoculação das plantas com o CPSMV e CABMV. A: Folhas infectadas com os isolados de CPSMV e CABMV em tampão fosfato e B: inoculação dos vírus em plantas de feijão-caupi.

3. Resultados e Discussão

3.1. Transformação genética

Foram realizados 12 experimentos de bombardeamento, sendo utilizados, em média 120 embriões de feijão-caupi em cada experimento, totalizando 1440 embriões (explantes) bombardeados. Ao final dos experimentos 119 plantas entre positivas e escapes, haviam regenerado em meio de seleção. Contudo, após análise via PCR foram confirmadas apenas 15 das plantas como GM, conforme apresentado na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Experimentos de transformação genética do feijão-caupi com o vetor pSIUCSMVCABMV.

Experimento	Concentração de Imazapyr (nM)	Explantes	Plântulas	Plantas Positivas*
1	250	120	16	1
2	250	120	12	0
3	250	120	16	2
4	250	120	12	1
5	250	120	13	1
6	300	120	6	1
7	300	120	8	2
8	300	120	9	2
9	300	120	6	1
10	300	120	8	1
11	300	120	6	2
12	300	120	7	1

* Numero baseado em análises por PCR para os transgenes presentes no vetor pSIUCSMVCABMV inserido nas linhagens GM de feijão-caupi.

Em cada um dos 12 experimentos de bombardeamento, foi obtida pelo menos uma planta GM, com exceção ao experimento nº 2 que, apesar do elevado número de plantas avaliadas via PCR (12 plantas), não foi obtida qualquer planta GM.

Nos cinco primeiros experimentos foi utilizada a concentração de 250 η M do herbicida imazapyr como agente de seleção, e foi observado surgimento de um número elevado de escapes. São chamadas de escapes as plantas regeneradas apesar do efeito do agente seletivo, contudo, ao serem analisadas molecularmente se mostram não-GM. Esse

tipo de planta surge geralmente quando a concentração do agente seletivo é semi-letal, sendo necessário aumentar a concentração para sanar o problema.

Nos experimentos de 6 a 12 a concentração de imazapyr foi aumentada para 300 η M e os escapes foram consideravelmente reduzidos, conforme demonstrado na Tabela 3.2 acima.

3.2. Detecção de Plantas GM por meio da PCR

A manipulação do DNA pode ser considerada uma importante ferramenta para o melhoramento vegetal. Contudo, fatores como a integração do DNA no genoma hospedeiro, expressão, herança, estabilidade do DNA, problemas de regeneração do explante são fatores que podem interferir no processo de obtenção de plantas geneticamente transformadas (ARAGÃO *et al.*, 2000; ANDRADE, 2003).

A primeira análise molecular feita para confirmar que as plantas GM continham os transgenes foi realizada por PCR. Essa análise foi feita usando um par de *primers* específicos para detectar o transgene de interesse, Caupi 1 e Caupi 2 amplificando um fragmento de 560 pb, conforme apresentado na Figura 3.4.

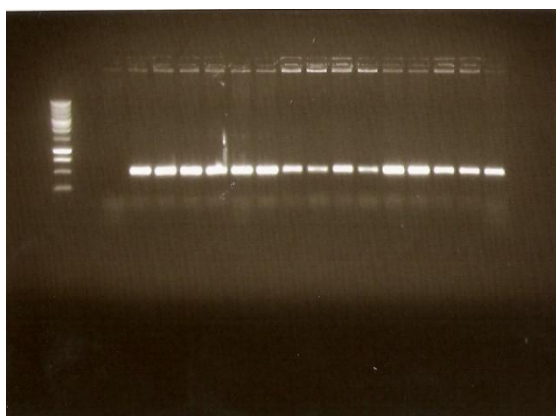


Figura 3.4. Eletroforese das plantas mães (T_0) de feijão-caupi pSIUCSMVCABMV após PCR com os primeres Caupi 1 e Caupi 2. Da esquerda para direita, linha 1: 1KB, linhas 2 e 3: Branco, Controle negativo, linhas 3 a 16: plantas 12, 21, 39, 52, 59, 68, 71, 72, 99, 101, 106, 110, 112, 118 e 119.

O resultado da PCR demonstrou que o DNA exógeno ou transgene foi eficientemente integrado ao genoma das plantas T₀, sendo que vários trabalhos descritos na literatura corroboram com esse achado, uma vez que é esperada tal integração (ARAGÃO *et al.*, 2000; IVO *et al.*, 2008; CITADIN, 2011).

Após análise de PCR foram confirmadas 15 plantas positivas, que foram aclimatadas em casa de vegetação com condições de umidade e temperatura controladas. Essas plantas receberam a denominação de linhagens T₀ ou plantas mães identificadas como T₀: 12, 21, 39, 52, 59, 68, 71, 72, 99, 101, 106, 110, 112, 118 e 119 pSIUCSMVCABMV.

Considerando o número de embriões inicialmente bombardeados e o número de plantas GM obtidas, pode-se chegar a uma eficiência de transformação de 1,04%. Eficiência de transformação é entendida como sendo o resultado obtido da divisão do número de plantas positivas obtidas pelo número total de explantes utilizados ao longo dos trabalhos de bombardeamento multiplicado por 100, no caso:

$$ET = \text{NPT}/\text{NEB} \times 100, \text{ logo } ET = 15/1440 \times 100$$

Onde:

ET: Eficiência de transformação;

NPT: Número de plantas transformadas

NEB: Número de embriões bombardeados.

Ivo *et al.* (2008) em seu trabalho obtiveram uma eficiência de 0,9 e, apesar da obtenção de 15 plantas confirmadas via PCR, foi obtido um número elevado de escapes. Os mesmos autores obtiveram eficiência de transformação equivalente à observada nesse trabalho e também verificou que mais de 60% das plantas regeneradas em meio de seleção eram escapes. Esses dados sugerem que o elevado número de escapes obtidos pode ter ocorrido em função da inadequada concentração do agente seletivo, o herbicida imazapyr. No entanto, ARAGÃO *et al.* (2000) observaram que, em soja, quando a concentração do

agente seletivo imazapyr é aumentada, há uma diminuição significativa no número de plantas escapes, porém isso é também acompanhado de uma diminuição marcante na frequência de transformação. Dessa forma, pode ser mais valioso conviver com um número maior de plantas negativas, desde que isso aumente a possibilidade de obtenção de plantas GM.

Outros trabalhos com transformação genética de feijão-caupi têm obtido baixa regeneração, sobretudo com o sistema de *Agrobacterium*, que apesar de obter plantas transformadas não conseguiu obtenção de progênie (MUTHUKUMAR *et al.*, 1996), e, quando obtidas não se manteve o padrão de herança mendeliana (IKEA *et al.*, 2003).

3.3. Aclimação das Plantas GM

As plantas GM resistiram à aclimação e não foram observadas anormalidades no seu crescimento e desenvolvimento nos primeiros 15 dias de cultivo em casa de vegetação. Essas plantas cresceram como o esperado para o cultivo em casa de vegetação e produziram sementes normais, com exceção da linhagem T₀ 101, que demonstrou fenótipo atípico para o feijão-caupi, conforme apresenta a Figura 3.5-A. A referida planta apresentou folhas com tamanho menor, caule com aspecto pouco lignificado se comparada com as outras linhagens GM e as plantas não transformadas, como apresentado na Figura 3.5-B.

É provável que o padrão atípico apresentado pela linhagem T₀ 101 esteja relacionado com o número de cópias do transgene inserido no genoma da planta. Contudo pouco se pode relatar acerca desse tema, pois não foram encontrados relatos na literatura de plantas oriundas da transgenia que apresentassem padrão atípico de desenvolvimento. Fenótipos modificados podem estar relacionados a variações somaclonais e não à presença dos transgenes. Um trabalho adicional deverá ser realizado com os segregantes para demonstrar se os transgenes estariam associados ao fenótipo observado nessa linhagem.

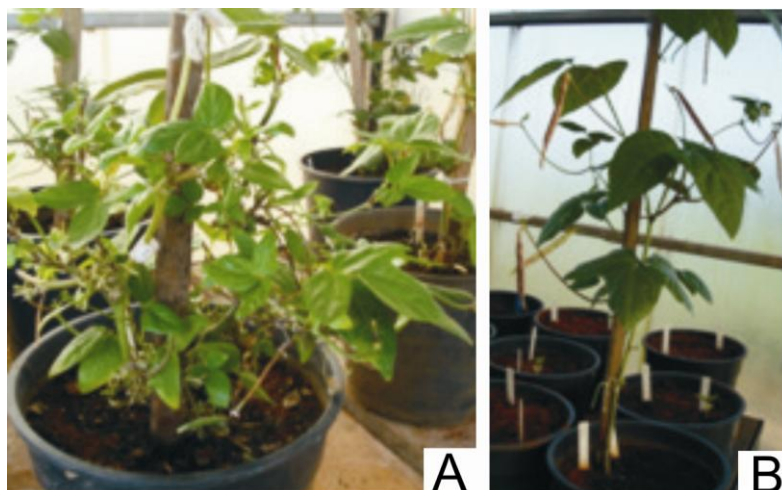


Figura 3.5. Comparação da linhagem com padrão atípico de desenvolvimento e uma linhagem com padrão normal, onde: A- planta da linhagem T₀ 101 GM e B- planta da Linhagem T₀ 12 GM, ambas com 80 dias após a aclimação.

Todas as linhagens produziram vagens e sementes com padrão morfológico idêntico às plantas não transformadas, exceto a linhagem T₀101 que atipicamente produziu apenas uma vagem contendo 3 sementes, não sendo usada nos testes para os vírus.

3.4. Southern blot

Uma planta geneticamente modificada pode ser definida como sendo aquela que teve seu material genético alterado pela introdução de um ou mais transgenes. Tal alteração geralmente é transmitida às gerações futuras. Muitos métodos são descritos na literatura para determinar se o transgene (gene exógeno) foi integrado ao genoma da planta transformada, e cada método tem sua própria especificidade. Usualmente, para verificar se o gene foi completamente inserido e se este está integrado ao genoma da planta transgênica, são realizados testes como o de *Southern blot*.

Os resultados obtidos na análise de *Southern blot* permitiram confirmar a integração do cassete de expressão para silenciamento dos vírus CPSMV e CABMV, e ainda

demonstrou que as linhagens GM apresentam o transgene íntegro. Esses dados têm uma correlação positiva com o alto grau de resistência verificado nas linhagens inoculadas com os vírus.

A enzima de restrição XbaI corta o vetor em dois sítios, o que permite mostrar que o vetor foi inserido integralmente, e as bandas encontradas conferem com o padrão esperado com cerca de 7 kb. Em algumas linhagens, os resultados sugerem que mais de uma cópia dos transgenes tenha sido integrada ao genoma da planta conforme mostra a Figura 3.6.

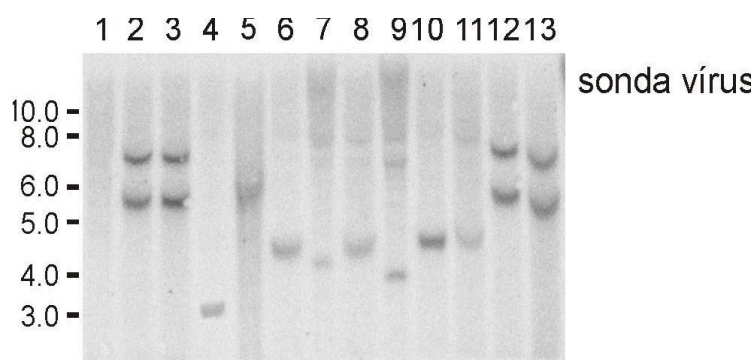


Figura 3.6. Southern blot de plantas GM resistentes ao CPSMV e CABMV. Onde linha 1 é o controle, linhas de 2 a 13: linhagens 12, 21, 39, 52, 59, 71, 72, 68, 99, 110, 112 e 119. Os números à esquerda referem-se ao marcador molecular em Kb.

3.5. Northern blot

A resistência das plantas GM tem relação direta com a presença dos siRNAs (BONFIM *et al.*, 2007; ARAGÃO & FARIA, 2009), e no caso do presente estudo esse padrão não foi observado, o que sugere uma relação direta entre a resistência das linhagens e a homozigose apresentada a partir da F₂, ou seja, quando as linhagens têm maior nível de expressão do transgene.

Contudo, foi constatada a presença dos siRNAs em níveis semelhantes nas plantas das linhagens 12, 71, 72 e 68 de pSIUCSMVCABMV conforme mostra a Figura 3.7.

Nas linhagens em homozigose, são os siRNAs que atuam como iniciadores para transformar o mRNA alvo em dsRNA. E então, o dsRNA é degradado pelo complexo

DICER gerando novos siRNAs em um ciclo de síntese e degradação de dsRNA que gera a resistência (GORDON & WATERHOUSE, 2007).

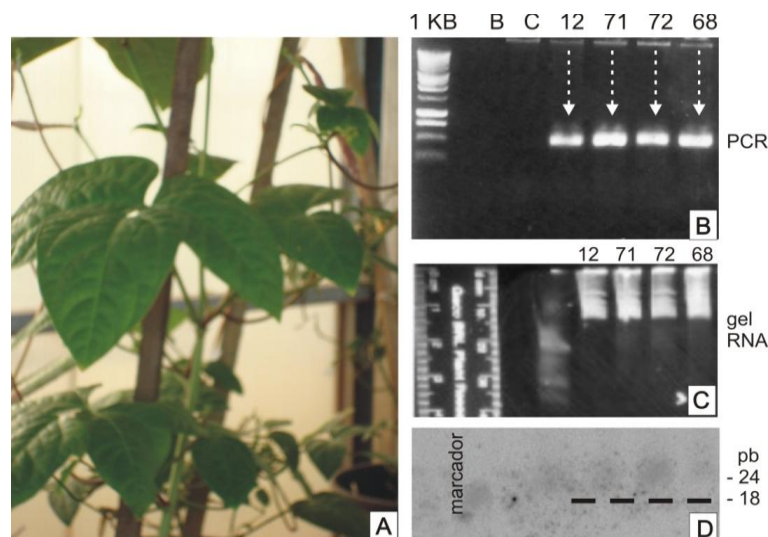


Figura 3.7. Interferência genética após inoculação com os vírus CPSMV e CABMV expressando siRNA em planta GM de feijão-caupi. Onde: “A”: planta da linhagem 12 de pSIUCSMVCABMV; “B”: PCR de 4 linhagens usadas no *northern blot*, da esquerda para direita linha 1 marcador 1Kb, linhas 2 e 3: branco e controle negativo, linhas de 3 a 6 plantas das linhagens 12, 71, 72 e 68 GM. “C”: gel do RNA das linhagens usado no teste. “D”: Detecção dos pequenos RNAs interferentes.

3.6. Dot blot

Para esse teste foram selecionadas as seis linhagens que apresentaram melhor desenvolvimento vegetativo após os primeiros testes de inoculação severa com os vírus CABMV e CPSMV. Essas linhagens foram a pSIUCSMVCABMV 12, 52, 68, 71, 72 e 112, todas em triplicata da geração T₃. Conforme observado na Figura 3.8 tanto para a inoculação com o CPSMV e o CABMV não foram detectados RNAs virais nas linhagens dos números 9 e 17, que correspondem as linhagens 12 e 112 pSIUCSMVCABMV. Esses resultados sugerem que existe resistência nessas linhagens, uma vez que a resistência é expressa pela redução da acumulação dos vírus nas linhagens após a inoculação (INOUE-NAGATA *et al.*,

2007). A resistência foi observada apenas em plantas cujos transgenes estavam em homozigose. De forma semelhante, BONFIM *et al.* (2007) observaram que plantas de feijão GM eram imunes quando submetidos à altas pressões de inóculo apenas quando os transgenes estavam em homozigose.

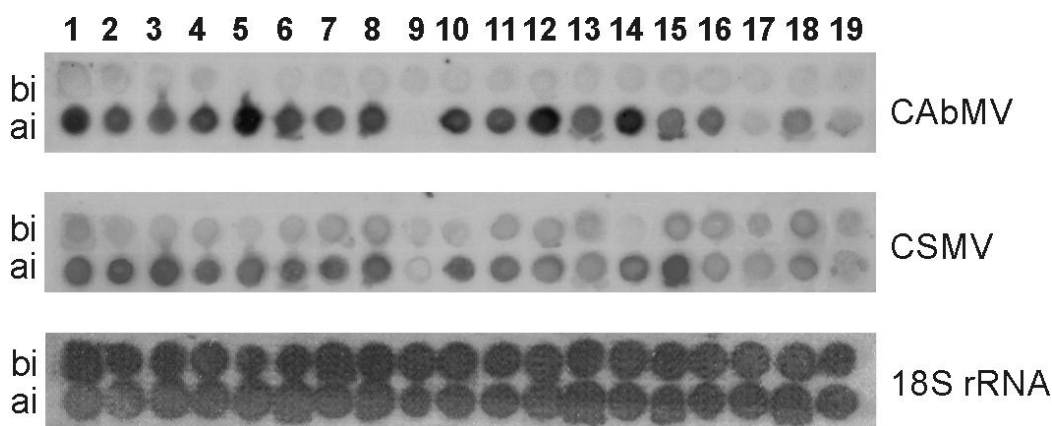


Figura 3.8. Análise de *Dot blot* onde: bi significa *before inoculation* (antes da inoculação); ai significa *after inoculation* (depois da inoculação) e os números de 1 a 19 são linhagens testadas em triplicata.

3.7. Teste de Progênie

Um protocolo de transformação genética só pode ser considerado eficiente se permitir transformar, regenerar e transferir de forma eficiente para a progênie o transgene exógeno. Logo, de nada adianta obter uma linhagem-elite se esse processo não permitir a transmissão de tais caracteres às gerações seguintes.

A literatura relata que, a maioria de genes exógenos introduzidos pelo processo de biobalística são geralmente transferidos para as gerações seguintes (CHRISTOU *et al.*, 1989; MCCABE & MARTINELL, 1993 e ARAGÃO *et al.*, 2000). No entanto, também são observados casos em que os transgenes não são transferidos para a progênie (ARAGÃO *et al.*, 2000). Em alguns casos isso tem sido atribuído à transformação quimérica (CHRISTOU *et al.*, 1989; MCCABE & MARTINELL, 1993). Nesses casos, em geral apenas as células da

epiderme contém os transgenes. Como as células germinativas não são geradas desse tipo celular, a presença dos transgenes não é observada nos embriões.

A Tabela 3.3 apresenta os resultados do teste qui-quadrado realizado na frequência esperada 3:1 com probabilidade $n = 1$. Os resultados verificados não sugerem padrão mendeliano de segregação na maioria das linhagens GM.

Tabela 3.3. Análise via PCR das plantas T₁ de pSIUCSMVCABMV, indicando número de plantas analisadas e positivas bem como o teste qui-quadrado.

Linhagem	Positivas	Negativas	X ²	P
12	17	3	1,06	0,30
21	9	31	58,8	0
39	6	14	21,6	0
52	1	19	50,46	0
59	12	8	2,4	0,12
68	12	8	2,4	0,12
71	14	6	0,26	0,60
72	1	19	50,46	0
99	5	55	142,2	0
106	2	48	132,56	0
110	2	18	43,4	0
112	3	17	36,86	0
118	4	16	30,86	0
119	12	8	2,4	0,12
Controle	0	20	58,06	0

Convém ressaltar que estes resultados foram observados apenas na geração T₁, o que muito provavelmente pode relacionar-se com quimerismo nas plantas T₀. Nesse caso, parte da planta é GM e a outra não, o que gera sementes GM e não-GM em função da região da planta onde a semente é gerada. Pode, ainda ter ocorrido misturas nas sementes ocasionando padrão aparentemente anormal de segregação. Uma vez selecionada apenas linhagens GM, nas demais gerações foi observado o padrão mendeliano de segregação.

3.8. Desafio com os Vírus e Dados Agronômicos (Germinação e Peso de Sementes)

No desafio ou teste realizado com alta estringência, as linhagens de pSIUCSMVCABM 12 e 112 não apresentaram nenhum sintoma dos vírus após a inoculação. Contudo, as plantas das linhagens pSIUCSMVCABMV 21, 39, 52, 59, 68, 71, 72, 99, 106, 110, 118 e 119 apresentaram sintomas brandos apenas do CPSMV, esses sintomas surgiram após 15 dias de inoculação.

Entretanto, esses sintomas desapareceram das plantas das linhagens 21, 52, 68, 71, 72 e 119 à medida que as plantas se desenvolviam e emitiam folhas novas, o que não foi observado nas plantas das linhagens 99, 106, 110 e 118 que continuaram a manifestar sintomas suaves do CPSMV. As plantas do controle negativo apresentaram sintomas acentuados das viroses 4 dias após a inoculação (dai), o que levou essas plantas a morte em 15 dias.

No desafio usando maior diluição dos vírus, os sintomas surgiram no controle negativo de forma bem intensa 4 dai, e nas linhagens transformadas os sintomas foram quase imperceptíveis sendo observados sintomas leves ao final de 10 dai nas linhagens 68, 71 e 72 pSIUCSMVCAMBVMV e nenhum sintoma nas linhagens 12, 52 e 112 pSIUCSMVCAMBVMV. Mesmo nas linhagens com sintomas as plantas apresentaram padrão normal de crescimento. A Figura 3.9 mostra plantas das linhagens transformadas, inoculadas e o controle negativo. A utilização de construções contendo fragmentos virais em plantas GM pode gerar resistência, contudo, nem todas as plantas podem apresentar esse padrão e é possível o surgimento de sintomas (ARAGÃO & FARIA, 2009).

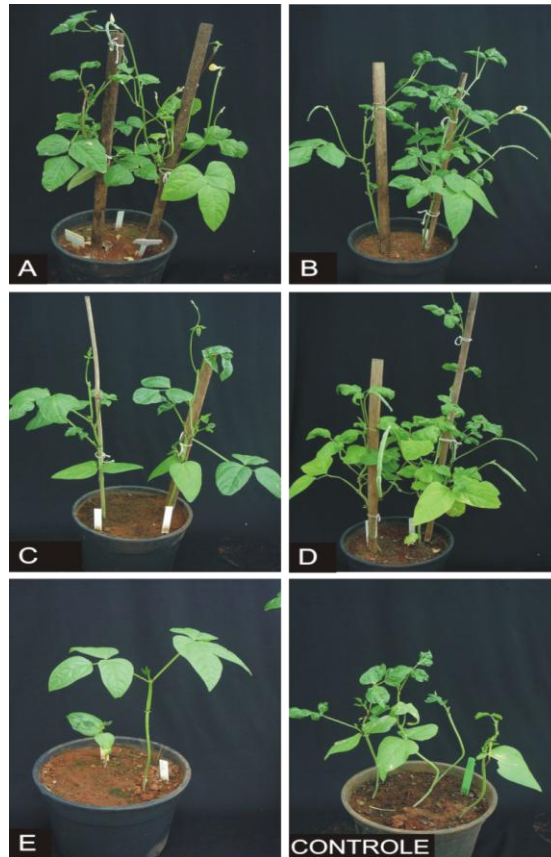


Figura 3.9. Plantas GM inoculadas com os vírus CPSMV e CABMV, onde: A, B, C, D e E (linhagens transformadas geneticamente) e o Controle são plantas não transformadas.

Embora na inoculação severa as plantas transformadas geneticamente tenham apresentado sintomas do CPSMV, todas as plantas mantiveram padrão normal de crescimento e produtividade, o que não foi observado nas plantas controle. Ao longo do período avaliativo não foi observado sintoma específico do CABMV em nenhuma planta inoculada.

Esses resultados são considerados incentivadores, considerando que, segundo (FREIRE FILHO *et al.*, 2005) as plantas infectadas pelos vírus CABMV e CPSMV não apresentam produtividade significativa.

Outro aspecto é que a proteção contra viroses mediada por RNA interferente é geralmente eficiente em vírus que apresentam sequências altamente relacionadas, ou seja, com grande similaridade (BAULCOMBE, 1996), portanto em infecções causadas por vírus

distintos com sequências pouco relacionadas poderá ocorrer quebra da resistência mediada pelo RNA interferente. Isso ocorre porque o silenciamento será atenuado pelo supressor de silenciamento do vírus não similar (NIU *et al.*, 2006), e nesse caso as plantas transformadas poderão apresentar sintomas atenuados das viroses como os sintomas verificados nas plantas de pSIUCSMVCABMV. Essas linhagens foram inoculadas com dois vírus distintos, e pode ter ocorrido de um dos vírus ter suprimido parcialmente o mecanismo de defesa mediado por RNA interferente (PRUSS *et al.*, 1997).

Convém ressaltar que na natureza o vírus é transmitido por inseto e que a inoculação mecânica representa uma quantidade em demasia do patógeno. Assim, há a necessidade futura de se testar essas plantas em condição de campo com inoculação natural de ambos os vírus.

As plantas inoculadas de maneira severa, mesmo apresentando sintomas das viroses, produziram sementes com padrão igual ao de plantas não inoculadas com os vírus, o que sugere que os vírus não interferiram na fisiologia de desenvolvimento das plantas apesar da infecção conforme Figura 3.10.

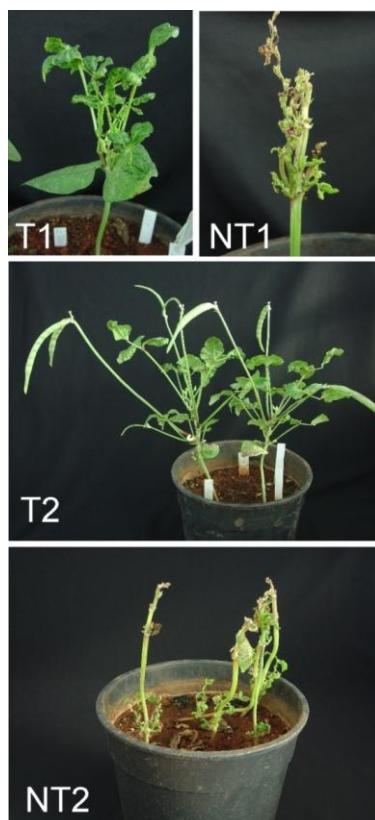


Figura 3.10. Plantas GM de feijão-caupi inoculadas de maneira severa, onde: T1 e T2 são linhagens transformadas e NT1 e NT2 são os controles negativos.

Foram coletadas sementes de todas as linhagens, e para comprovar a viabilidade dessas linhagens foram realizados testes de germinação e peso das sementes. Para o teste de germinação foram usadas 20 sementes, e para o teste de peso seco foram utilizadas 100 sementes de cada linhagem, também foram usadas como controle sementes da cultivar BRS Novaera, conforme demonstrado nas Figuras 3.11 e 3.12.

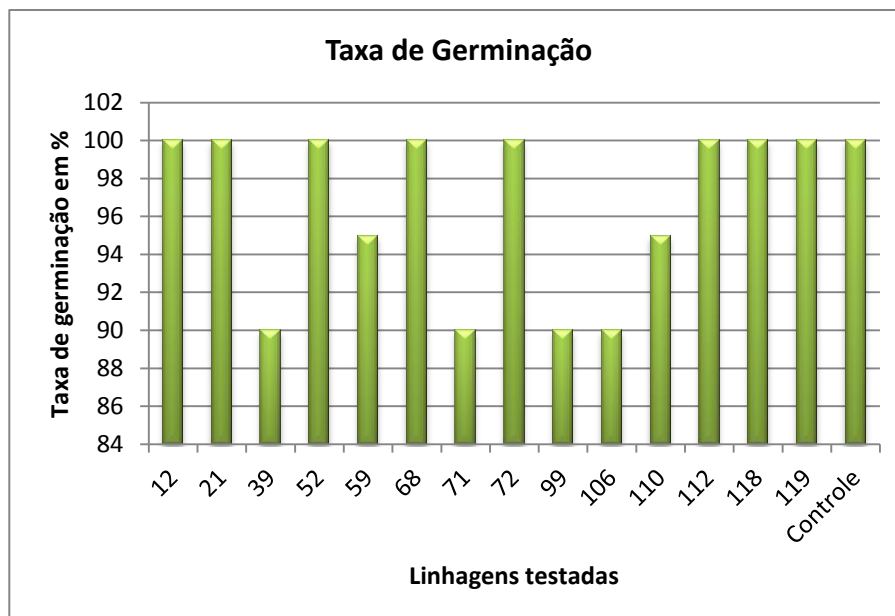


Figura 3.11. Teste de germinação das sementes obtidas das plantas GM inoculadas com os vírus CPSMV e CABMV e controle não inoculado.

A taxa de germinação nas sementes oriundas das plantas GM foi acima de 90%, o que pode ser considerado um resultado de alta viabilidade dessas sementes. Esse resultado também sugere que os vírus não interferiram na sua fisiologia de germinação, uma vez que maioria das plantas GM obtiveram germinação e peso de sementes bem próximos aos das plantas controle, com exceção das linhagens pSIUCSMVCABMV 71 e 72 que tiveram peso inferior, mas com padrão de germinação semelhante ao controle, conforme apresentado na Figura 3.13.

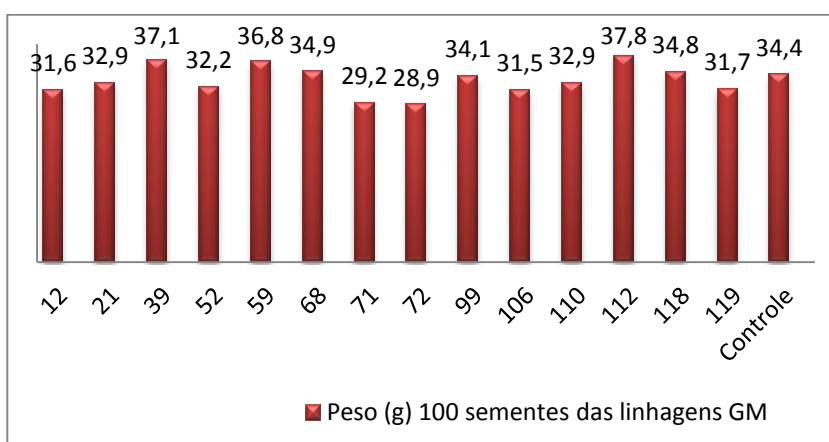


Figura 3.12. Peso das sementes oriundas das plantas GM inoculadas com os vírus CPSMV e CABMV.

4. Conclusões

No presente trabalho foram obtidas 15 plantas GM de feijão-caupi que apresentam o gene de resistência ao *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) e o do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV).

Para feijão-caupi, o processo de biobalística demonstrou ser um método eficiente na geração de plantas GM, proporcionando elevada eficiência de transformação. Esse trabalho demonstrou que esse método tem robustez suficiente para geração de eventos-elite que possam ser introduzidos em programas de melhoramento genético do feijão-caupi.

As plantas GM foram desafiadas mecanicamente com os vírus CPSMV e CABMV e foi verificada resistência das linhagens GM 12 e 112. E nas condições de inoculação severa foi verificada alta tolerância das linhagens GM testadas.

As análises moleculares de *S. blot* e *N. blot* demonstraram que o cassete foi totalmente integrado ao genoma das linhagens, bem como comprovou a presença dos siRNAs.

As avaliações agronômicas demonstraram que as plantas GM apresentaram padrão de produção, germinação e desenvolvimento de sementes similar às plantas controle.

Referências Bibliográficas

ANDRADE, S. R. M. de. **Transformação de Plantas**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003, 28p. (Documentos/Embrapa Cerrados, ISS 1517-5111;102).

ARAGÃO, F, J, L. & FARIA, J, C. First transgenic geminivirus-resistant plant in the field. **Nature Biotechnology**, v.27, n. 12, p. 1086-1088, 2009.

ARAGÃO, F. J. L.; SAROKIN, L.; VIANNA, G. R.; RECH, E. L. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine Max* (L.) Merrill] plants at a high frequency. **Theor. Appl. Genet.**, n. 101, p. 1-6, 2000.

ARAGÃO, F. J. L ; BARROS, L. ; BRASILEIRO, A. C. M. ; RIBEIRO, S. G. ; SMITH, F. D.; SANFORD, J. C. ; FARIA, J. C ; RECH, E. L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 93, p. 142-150, 1996.

BAULCOMBE, D. C. Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. **The Plant Cell**, v. 8, 1833-1844, 1996.

BONFIM, K.; *et al.* 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.

BRASILEIRO, A. C. M. & CARNEIRO, V. T.C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa Cenargen, p. 51-64, 1998.

CHRISTOU, P.; SWAIN, W. F.; YANG, N.S.; MCCABE, D. E. Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants. **Proc. Natl. Acad. Sci, USA**, v. 86, p. 7500-7504, 1989.

CITADIN, C. T. **Expressão de genes de características agronômicas em feijão-caupi**. Brasília: Instituto de Ciências Biológicas, Dep. de Biologia Celular, Universidade de Brasília, 2011, 116 p. Tese de Doutorado.

BRS NOVAERA: Cultivar de feijão-caupi de porte semiereto. Belém/PA: Embrapa Amazônia Oriental; Teresina/PI: Embrapa Meio-Norte, 2007, Folder.

FREIRE FILHO, F. R.; ROCHA, M. de M.; RIBEIRO, V. Q.; SITTOLIN, I.N. **Avanços e Perspectivas da Cultura do Feijão-Caupi**. In: ALBUQUERQUE, A.C.S.; SILVA, A.G. (Ed.) Agricultura Tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008, v.1, p. 235-250.

FREIRE FILHO *et al.* **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005, 519p.

GAMA, M. I. C. S. Identificação de plantas transgênicas por PCR. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Ed.). **Manual de Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1998, p. 1795-189.

GANDER, E. S., MARCELINO, L. H., ZUMSTEIN, P. **Biotecnologia para pedestres**. Brasília: Embrapa-SPI, 1996, 66p.

GORDON, K. H. J. & WATERHOUSE, P. M. RNAi for insect-proof plants. **Nature Biotechnol**, v.25, p.1231-1232, 2007.

IKEA, J.; INGELBRECHT, I.; UWAIFO, A.; THOTTAPPILLY, G. Stable gene transformation in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) using particle gun method. **Afr. J. Biotechnol**. v. 2. p. 211-218, 2003.

INOUE-NAGATA, A. K.; NAGATA, T.; ÁVILA, A. C.; GIORDANO, L. B. Um método de inoculação de confiança para as linhagens de rastreio begemovírus *Lycopersicon esculentum*. **Hort. Bras**, Brasília, v. 25, n. 3, 2007. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102. Acesso em 10/02/2013.

IVO, N. L.; *et al.* Biolistic-mediated genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata*) and stable Mendelian inheritance of transgenes. **Plant Cell Rep**, v. 27, p. 1475-1483, 2008.

MCCABE, D. E. & MARTINELL, B. J. Transformation of elite cotton cultivars via particle bombardment of meristems, **Biotchnology**, v. 11, p.596-598, 1993.

MURRAY, M. G. & THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant molecular DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 8, n. 19, p. 4321-4325, 1980.

MUTHUKUMAR, B.; MARIAMMA, M.; VELUTHAMBI, K.; GNANAM, A. Genetic transformation of cotyledon explants of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Rep**, v. 15. p. 980-985, 1996.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tabacco tissue cultures. **Phisicologia Plantarum**, Capenhagen, v.15. 473-497, 1962.

NOGUEIRA, M. S. R. **Diferenciação molecular de sorotipos virais e estudo da resistência ao Cowpea severe mosaic virus e Cowpea aphid-borne mosaic virus em caupi**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007, 80 p.

NIU, Q. W.; *et al.* Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance. **Nat. Biotechnol**, v. 24, n.11, p. 1420-1428, 2006.

Presidência da República do Brasil. Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurpidicos. **Lei n.º 11.105, de 24 de março de 2005**. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/111105.htm. Acesso em 20/12/2012.

PRUSS, G.; *et al.* Plant viral synergism: The potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous virus. **Plant Cell**, v. 9, p. 859-868, 1997.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, v. 98, p. 503-517, 1975.

SAMBROOK, J. FRITSCH. & MANIATIS, E. F. T. Molecular cloning: a laboratory manual, Second Edition edn. Cold Spring Harbor laboratory press, USA, 1989.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. A. S.; BRÍGIDO, M. M.; ROMANO, E. **Glossário de Biotecnologia Vegetal**. Brasília: Embrapa-CNPQ, 2000, p. 128.

VANHUYLENBROECK, J. M. & DEBERGH, P. C. Physiological aspects in acclimatization of micropropagated plantlets. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 136-141, 1996.

WATERHOUSE, P. M. W.; WANG, M. B.; LOUGHT, T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. **Nature**, v. 411, p. 834-842, 2001.

*Avaliação das Linhagens de feijão-caupi GM para Tolerância ao
Herbicida Imazapyr*

1. Introdução

Atualmente o cultivo do feijão-caupi tem despertado o interesse de grandes produtores, expandindo-se para a região Centro-Oeste do Brasil. Nesse caso, é incorporado aos arranjos produtivos como safrinha após o cultivo de soja e do arroz, e, em algumas regiões o feijão-caupi já é tido como cultura principal (FREIRE FILHO *et al.*, 2011; CITADIM, 2011). Com isso problemas de controle de pragas, doenças e plantas invasoras tem despertado a atenção dos centros de pesquisa.

Segundo dados da CONAB (2012), a área cultivada com feijão-caupi no Brasil atinge 1,3 milhões de hectares com a produção de 480 mil toneladas, mantendo a produtividade em torno de 366 Kg.ha⁻¹. Essa produtividade é considerada muito baixa, uma vez que a referida cultura pode obter produtividade de até 3 t.ha⁻¹ (BEZERRA, 1997). Vários fatores podem interferir na baixa produtividade do feijão-caupi, tais como falta um pacote adequado de manejo, o ataque de pragas e doenças e infestação por plantas invasoras (FREIRE FILHO *et al.*, 2008).

As plantas invasoras para a cultura do feijão-caupi podem representar um dos fatores que limitam o desenvolvimento da cultura, uma vez que competem por luz, nutrientes e água, levando a uma drástica redução da produtividade e aumento dos custos de produção. Quando não controladas podem levar a redução de até 90% do rendimento dos grãos do feijão-caupi (MATOS *et al.*, 1991). É considerado como período crítico de competição das plantas invasoras da germinação até o 36^a dia de cultivo. Na maioria das cultivares o ciclo dura em torno de 60 a 80 dias (EMBRAPA, 2003), daí a infestação de invasoras nos primeiros dias do ciclo da cultura pode levar à redução do desenvolvimento e crescimento das plantas. Convém ressaltar que as folhas do feijão-caupi são emitidas de nós presentes no caule da planta, e que quando ocorre redução da altura da planta é provável que o número de

folhas emitidas seja reduzido, o que certamente refletirá na fotossintetização e posterior produtividade da planta (SILVA & SILVA, 2007).

O objetivo da engenharia genética em plantas é introduzir genes de interesse agrônomo, tais como resistência a pragas e doenças, tolerância a condições de estresse ambiental, melhoria nutricional, dentre outros. Nesse sentido, a obtenção de plantas de feijão-caupi tolerantes a herbicida pode representar uma ferramenta útil no manejo de plantas invasoras dessa cultura.

1.1. O imazapyr

O imazapyr pertence ao grupo químico denominado imidazolinas (ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolina-2-ilo)), sendo considerado um herbicida de amplo espectro de ação, e além de ser utilizado na atividade agrícola propriamente dita, também é utilizado na manutenção de ferrovias, oleodutos, rodovias, aeroportos, campos de futebol dentre outros (RODRIGUES & ALMEIDA, 2005).

O mecanismo de ação do imazapyr é caracterizado pela inibição da enzima acetohidróxido sintase, ou AHAS, que é uma enzima encontrada somente no reino vegetal e que é parte da via de síntese de três aminoácidos essenciais: isoleucina, leucina e valina (TAN *et al.*, 2005). Ao atuar na síntese de aminoácidos o imazapyr interfere na síntese proteica, o que conseqüentemente vai alterar a síntese de DNA e o mecanismo de desenvolvimento celular com morte das células afetadas, particularmente aquelas da região meristemática (RODRIGUES & ALMEIDA, 2005). As plantas tornam-se cloróticas, com desenvolvimento lento e morrem dentro de 1 a 2 semanas após a aplicação do imazapyr. Esse herbicida apresenta ação pré e pós-emergente e pode controlar mono e dicotiledôneas anuais e perenes.

1.2. Plantas Geneticamente Modificadas (GM) Tolerantes a Herbicidas

O uso de herbicidas como agente de seleção mostra-se mais eficiente que o uso de antibióticos, uma vez que o herbicida pode mobilizar-se para o meristema apical (região transformada) e chegar a todas as partes da planta, com isso ocorre menor chance de obtenção de falsos positivos e de plantas quimeras, ou seja, parte plantas com partes transformadas e partes não transformadas.

Em trabalhos de transformação genética realizados com feijão comum, soja e algodão demonstrou-se que a seleção com herbicida é mais eficiente do que a seleção com antibióticos (ARAGÃO *et al.*, 1996; ARAGÃO, 2002; RECH *et al.*, 2008). O uso deste agente de seleção tem demonstrado aumento significativo, cerca de 2 a 3 vezes, na recuperação das plantas transformadas nas culturas de feijão, soja e algodão (RECH *et al.*, 2008).

As culturas GM com tolerância a herbicida são resistentes a herbicidas de aplicação pós-emergência, o que de certa forma, favorece o uso de sistemas de semeadura direta, proporcionando maior conservação de solo, menor contaminação dos mananciais e meio ambiente de modo geral (VIDAL, 1997). Culturas comerciais contendo genes de tolerância ao grupo químico das imidazolinas são consideradas promissoras, uma vez que esse grupo de herbicidas apresenta bom espectro de controle, baixo impacto ambiental, baixa toxicidade para mamíferos, flexibilidade de aplicação e registro em vários países (NEWHOUSE *et al.*, 1991).

Segundo VIANNA *et al.*, 2011, atualmente no Brasil são cultivados mais de 24 milhões de hectares com plantas geneticamente modificadas, desses mais de 17 milhões de hectares são ocupados com soja tolerante ao herbicida glifosinato (soja RR), e em 2009 foi aprovada a comercialização da soja tolerante ao imazapyr (soja CV 127). Portanto, o uso de

plantas transformadas com tolerância a herbicidas já é uma realidade nas lavouras de grãos do Brasil desde 1998.

2. Material e Métodos

Na construção do vetor pSIUCSMVCABMV foi inserida uma região que confere tolerância aos herbicidas da classe das imidazolinonas (ex. imazapyr, imazaquin etc). Isso se deu em vista à necessidade de ter no vetor de transformação uma região que selecionasse as células transformadas. O gene utilizado foi o *Atahas* ou *Ahas* isolado de *A. thaliana* e clonado no vetor pAC321 (RECH *et al.*, 2008). Esse gene codifica a enzima aceto-hidroxiácido sintase mutada. A enzima em questão apresenta uma mutação na posição 653 o que resulta na troca de uma serina por um asparagina, o que resulta no impedimento da ligação inibitória do herbicida (SATHASIVAN *et al.*, 1990).

Sementes das linhagens de pSIUCSMVCABMV foram germinadas em casa de vegetação, analisadas via PCR para o gene *ahas* e cultivadas por 15 dias conforme recomendações para a cultura do feijão-caupi. Para o teste foi utilizado herbicida imazapyr Arsenal (BASF) em concentrações de 100 e 200g.ha⁻¹.

3. Resultados e Discussão

3.1. Avaliação das Linhagens Tolerantes ao Imazapyr

No presente estudo as 15 plantas GM foram positivas ao serem analisadas por PCR para os primers do *ahas* que é o gene de tolerância ao herbicida imazapyr. A Figura 4.1 apresenta a foto do gel de agarose da PCR de 10 plantas GM.

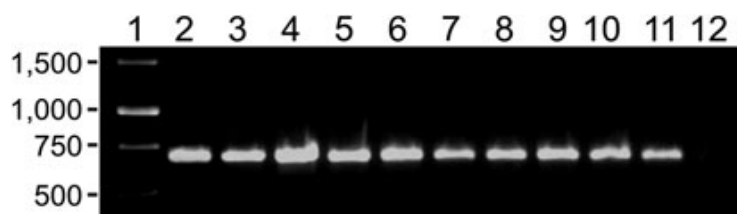


Figura 4.1. Eletroforese das plantas GM após PCR com os primers SojaE1F e SojaE1R, onde: linha 1 representa o marcador 1 kb, linhas de 2 a 11 as linhagens: 12, 21, 39, 52, 59, 71, 99, 110, 112 e 119, linha 12 é o controle negativo.

A Figura 4.1 acima demonstra que apenas as plantas GM apresentaram o padrão esperado, com banda de 680 pb.

Dez plantas de cada uma das 12 linhagens geradas com o vetor foram pulverizadas com o herbicida imazapyr nas concentrações de 100 e 200g.ha⁻¹. Ao final de 2 a 8 semanas do tratamento com imazapyr foi possível observar diferentes níveis de tolerância ao herbicida em todas as linhagens transgênicas. Os sintomas típicos de ação do herbicida, como nervuras avermelhadas e folhas murchas foram verificados em quase todas as linhagens, exceto a linhagem 59, que apresentou tolerância total ao herbicida aplicado nas concentrações de 100 e 200 g.ha⁻¹ de imazapyr (Tabelas 4.2, 4.3 e Figura 4.3). As linhagens 72, 52, 106, 99 e 68 apresentaram plantas mortas após 3 semanas da aplicação de imazapyr com ambas as dosagens utilizadas. Os sintomas também foram diferenciados, além do aparecimento das nervuras avermelhadas, multibrotação após o aparecimento dos primeiros sintomas e recuperação, chegando à fase adulta.

Tabela 4.1. Relação do número de plantas e sintomas apresentados ao final de 30 dias da pulverização com 100g.ha⁻¹ com herbicida imazapyr.

Linhagens	Sobreviveram	Sem Sintomas	Multibrotadas	Mortas
12	10	0	10	0
21	9	1	9	0
39	4	0	0	6
52	0	0	0	10
59	0	10	0	0
68	0	0	0	10
71	0	5	0	5
72	0	0	0	10
99	0	1	0	9
106	0	0	0	10
110	3	0	0	7
119	10	0	8	0

Tabela 4.2. Relação do número de plantas e sintomas apresentados ao final de 30 dias da pulverização com 200g.ha⁻¹ com herbicida imazapyr.

Linhagens	Sobreviveram	Sem Sintomas	Multibrotadas	Mortas
12	10	0	10	0
21	10	0	0	0
39	9	0	0	1
52	0	0	6	4
59	0	10	0	0
68	0	0	0	10
71	5	1	5	4
72	0	0	0	10
99	6	4	0	0
106	8	0	0	2
110	7	0	7	3
119	10	0	0	0

3.2. Análise de *Southern blot*

Para essa análise foi adotado o mesmo protocolo seguido no Capítulo 3 para extração de DNA de 10 plantas GM de feijão-caupi e 1 planta controle. As plantas GM utilizadas foram das linhagens 12, 21, 39, 52, 59, 71, 99, 110, 112, 119 e uma planta controle não transformada.

Foram utilizados cerca de 60 µg de DNA de cada planta digerido com a enzima *Xba*I, separado em gel de agarose 0,8% e transferido para membrana de nylon (Hybond N+, Amersham Pharmacia Biotech). A hibridização foi feita com sonda compreendendo um fragmento da região promotora do gene *ahas* amplificada com os primers SOJAE1F: 5'-CATTGCTTCTGCTATCGACACG-3' e SOJAE1R: 5'-CCTCGGGATTTGATTTTTGGTCCT-3' usando-se o vetor pSIUCSMVCABMV como molde. Na Figura 4.2 é possível verificar o resultado desse teste para as 10 linhagens GM analisadas.

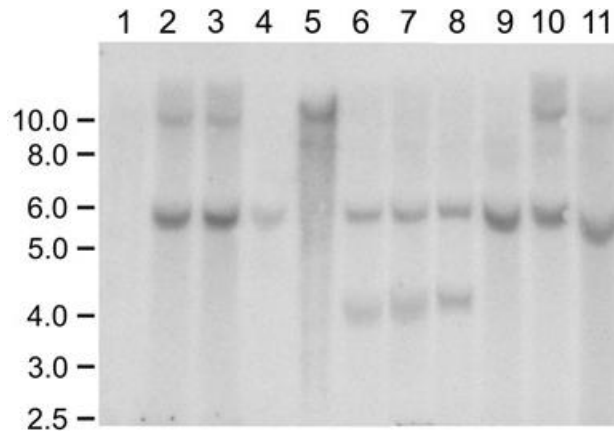


Figura 4.2. Resultado do teste de *S. Blot*, onde a linha 1 representa o controle negativo, as linhas de 2 a 11 representam as linhagens GM 12, 21, 39, 52, 59, 71, 99, 110, 112 e 119. Os números à esquerda referem-se ao marcador molecular em Kb.

Esses resultados demonstram que o transgene do *ahas* foi integrado de forma intacta no genoma de todas as plantas GM, como pode ser verificado pela presença de banda com aproximadamente 6 kb o que coincide com o padrão esperado para a digestão com a enzima *XbaI*.

A Figura 4.3 mostra as plantas GM submetidas a 200 g.ha^{-1} do herbicida imazapyr, foi possível verificar padrão diferente de tolerância entre as linhagens GM. Esse padrão foi demonstrado pelo desenvolvimento lento e nervuras avermelhadas das plantas GM mais sensíveis ao herbicida. Entretanto, nas plantas controle não foi verificada nenhuma tolerância ao imazapyr.

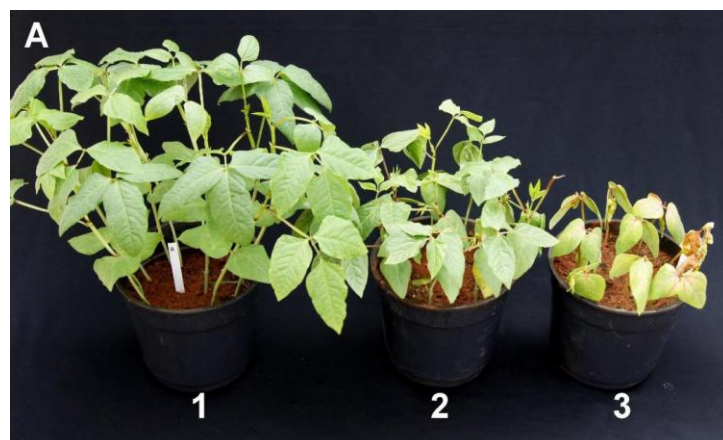


Figura 4.3. Plantas das linhagens GM e Controle. Onde A1: 59, A2: 12 e A3: Controle negativo submetidas a 200 g.ha^{-1} do herbicida imazapyr.

Considerando que o gene de resistência ao imazapyr inserido no feijão-caupi pode ser encontrado naturalmente em algumas plantas que apresentam resistência a esse grupo de herbicidas, e que recentemente foi aprovada a comercialização da soja resistente a esse mesmo grupo de herbicidas, é provável que após serem realizados estudos detalhados de biossegurança com as linhagens que apresentaram os melhores resultados seja possível o lançamento de um produto comercial com resistência a herbicida.

O cultivo do feijão-caupi tem aumentado, sobretudo, na região centro-oeste do Brasil, nesse sentido o desenvolvimento de uma cultivar com resistência a herbicida poderá representar uma alternativa para os produtores no referente ao controle de invasoras dessa cultura.

4. Conclusões

Das linhagens GM obtidas, foi verificado expressivo padrão de tolerância ao herbicida imazapyr. Contudo, sintomas típicos da ação do herbicida, como nervuras avermelhadas e folhas murchas foram verificados em quase todas as linhagens, exceto a linhagem 59, que apresentou tolerância total ao herbicida.

Referências Bibliográficas

ARAGÃO, F. J. L. Development of transgenic methods toward producing transgenic plants. In: M. Iwanaga (Ed.) **Genetic Engineering of Crop Plants for Abiotic Stress**. JIRCAS, Tsucuba, Japão, 2002, p. 35-42.

ARAGÃO, F. J. L. ; BARROS, L. ; BRASILEIRO, A. C. M. ; RIBEIRO, S. G. ; SMITH, F. D.; SANFORD, J. C. ; FARIA, J C ; RECH, E L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris*) co-transformed via particle bombardment. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 93, p. 142-150, 1996.

BEZERRA, A. A. de C. **Variabilidade e diversidade genética em caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp.) precoce, de crescimento determinado e porte ereto e semiereto**. Recife: Mestrado em Melhoramento Genético, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1997, 105p. Dissertação de Mestrado.

CITADIN, C. T. **Expressão de genes de características agronômicas em feijão-caupi**. Brasília: Instituto de Ciências Biológicas, Dep. de Biologia Celular, Universidade de Brasília, 2011, 116 p. Tese de Doutorado.

Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). 2012. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2011/2012- Décimo Levantamento. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_10_17_16_09_58_boletim_graos_-_julho_2012.pdf. Acesso em: 10/02/2013.

EMBRAPA Meio Norte. (2003) Sistema de Cultivo do Feijão-caupi. Sistemas de Produção, 2. Versão Eletrônica. Disponível em: <HTTP://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoCaupi/autores.htm>. Acesso em: 24/01/2013.

FREIRE FILHO *et al.* **Feijão-caupi no Brasil: Produção, Melhoramento Genético, Avanços e Desafios**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011, 84p.

- FREIRE FILHO, F. R.; ROCHA, M. de M.; RIBEIRO, V. Q.; SITTOLIN, I. N. **Avanços e Perspectivas da Cultura do Feijão-Caupi**. In: ALBUQUERQUE, A. C. S.; SILVA, A. G. (Ed.) *Agricultura Tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008, v.1, p. 235-250.
- MATOS, V. P. *et al.* Período crítico de competição entre plantas daninhas e a cultura do caupi. **Pesq. Agrop. Bras.**, v. 26, n.5, p. 737-743, 1991.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15. 473-497, 1962.
- NEWHOUSE, K. E.; SINGH, B.; SHANER, D. Mutations to corn (*Zea mays*) conferring resistance to imidazolinone herbicides. **Theoretical Applied Genetic**, Berlin, v. 83, p. 65-70, 1991.
- RECH, E. L. F., VIANNA, G. R. & ARAGÃO, F. J. L. High-efficiency transformation by biolistic of soybean, common bean and cotton transgenic plants. **Nature**, v. 3. p. 410-418, 2008.
- RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. 5.ed. Londrina: 2005. 592p.
- SAMBROOK, J, FRITSCH, & EF, MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, Second Edition edn. Cold Spring Harbor laboratory press, USA, 1989.
- SATHASIVAN, K.; HAUGHN, G. W.; MURAI, N. Nucleotide sequence of a mutant acetolactate synthase gene from an imidazolinone resistant *Arabidopsis thaliana* var. Columbia, **Nucleic Acids Res**, v. 18, p. 2888, 1990.
- SILVA, A. A. da.; SILVA, J. F. da. (Eds.). *Tópicos em manejo de plantas daninhas*. Viçosa:UFV, 2007, 367 p.
- TAN, S.; EVANS, R. R.; DAHMER, M. L.; SINGH, B. K.; SHANEK, D. L. Imidazolinone-tolerant crops: history current status and future. **Pest Manag Sci**, v. 61, p. 246-257, 2005.

VIANNA, G. R.; ARAGÃO, F. J. L.; RECH, E. L. A minimal DNA cassette as a vector for genetic transformation of soybean (*Glycine max*). **Genet Mol Res**, v.10, p. 382-390, 2011.

VIDAL, R. A. Herbicidas: Mecanismo de ação e resistência de plantas. Porto Alegre: UFRS, 1997, 165p.

Considerações Finais e Perspectivas

Introdução

As viroses do feijão-caupi podem ser consideradas como uma das patologias desafiadoras para o melhoramento genético, uma vez que a fonte de germoplasma com resistência natural é difícil de ser encontrada (com possibilidade de que seja facilmente transferida para vários genótipos) e o avanço do melhoramento genético em termos de cultivares altamente resistentes é ainda incipiente (FREIRE FILHO *et al.*, 2011).

Nesse aspecto, a demanda por técnicas que consigam desenvolver novos genótipos que possam entrar nos programas de melhoramento genético tem sido crescente. A engenharia genética de plantas surge nesse contexto com a proposta de somar conhecimento ao melhoramento convencional.

A combinação de técnicas de cultivo *in vitro*, biologia molecular e transferência exógena de genes representa uma valiosa ferramenta para o melhoramento genético de plantas, uma vez que possibilita a introdução de genes de interesse agrônômico tais como: resistência a pragas e doenças, aumento do valor nutricional, melhor adaptabilidade às condições de clima e solo, dentre outras. Nesse sentido, não apenas genes vegetais podem ser introduzidos em plantas, mas também genes de animais e microrganismos podem ser introduzidos de maneira controlada em um genoma vegetal, de forma independente da fertilização para obtenção de protocolos de transformação genética visando à obtenção de linhagens-elite (GANDER *et al.*, 1996, ARAGÃO *et al.*, 2000; FREIRE FILHO *et al.*, 2005). Existem grupos de pesquisa em países como Austrália, Brasil, Índia e Nigéria que já desenvolveram metodologias para obtenção de plantas GM de feijão-caupi. Esses grupos vêm inserindo genes de interesse agrônômico nessa cultura. O exemplo mais marcante é o de plantas com genes *Bt* resistentes a *Maruca sp* desenvolvidas pelo grupo australiano do CSRIO. Essas plantas já vêm sendo testadas em campo em Porto Rico e países africanos (CITADIM, 2011).

O estudo realizado possibilitou a consolidação do protocolo de transformação genética de feijão-caupi desenvolvido na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia para obtenção de plantas GM com resistência a viroses, e de certa forma lança um leque de possibilidades para utilização da técnica de RNA interferente na obtenção de linhagens resistentes às viroses.

Perspectivas

⇒ Considerando que os desafios com o CSMV e o CABMV foram feitos em casa de vegetação de maneira mecânica, é de grande importância que futuramente sejam realizados testes em nível de campo com inoculação natural dos vírus para consolidar os resultados obtidos em casa de vegetação.

⇒ Cruzamento das melhores linhagens com linhagens comerciais visando obtenção de linhagens-elite resistentes ou altamente tolerantes ao *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (*Potyvirus*) e ao *Cowpea severe mosaic virus* (*Comovirus*), que possam ser introduzidos em programas de melhoramento genético do feijão-caupi.

Referências Bibliográficas

ARAGÃO, F. J. L.; SAROKIN, L.; VIANNA, G. R.; RECH, E. L. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine Max* (L.) Merrill) plants at a high frequency. **Theor. Appl. Genet.**, n. 101, p. 1-6, 2000.

CITADIN, C.T. **Expressão de genes de características agronômicas em feijão-caupi**. Brasília: Instituto de Ciências Biológicas, Dep. de Biologia Celular, Universidade de Brasília, 2011, 116 p. Tese de Doutorado.

FREIRE FILHO *et al.* **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005, 519p.

FREIRE FILHO *et al.* **Feijão-caupi no Brasil: Produção, Melhoramento Genético, Avanços e Desafios**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011, 84p.

GANDER, E. S., MARCELINO, L. H., ZUMSTEIN, P. **Biotecnologia para pedestres**. Brasília: Embrapa-SPI, 1996, 66p.

APÊNDICE

Tabela 1A. Meio para crescimento de bactéria (LB)

Componente (reagente usado)	Quantidade para fazer 1 L em gramas
Triptona	10
Extrato de levedura	5
NaCl	10
Ágar (no caso de meio sólido)	16

Fonte: Brasileiro *et al.*, 1998.

Tabela 2A. Meio MS (MURASHIGE & SKOOG 1962)

Composição	Quantidade em mg/L ⁻¹
MACRONUTRIENTES	
NH ₄ NO ₃	1.650
KNO ₃	1.900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
MICRONUTRIENTES	
ZnSO ₄	8,60
H ₃ BO ₃	6,20
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,30
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
FeEDTA	
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,80
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,30
VITAMINA	
Inositol	100,00
Ácido Nicotínico	0,50
Piridoxina-HCl	0,50
Tiamina-HCl	0,10
Glicina	2,00
SUPLEMENTO ORGÂNICO	
Sacarose	30.000
Ágar ou fitagel	6.000 ou 8.000
pH	5,8

Fonte: Brasileiro *et al.*, 1998.

Tabela 3A. Reguladores de Crescimento e antibiótico

Nome	Nome Comercial	Classe	Peso Molecular	Solvente	Modo de esterilização	Condições de estocagem
BAP	6-benzilaminopurina	Citocinina	225,2	NAOH	Autoclavagem	0 a 5 °C
IMZ	Imazapyr	Herbicida	261,3	H ₂ O	Filtrosterilização	0 a 5 °C
AMP	Ampicilina	Antibiotico		H ₂ O	Filtrosterilização	0 a 5 °C

Fonte: Brasileiro *et al.*, 1998.

Tabela 4A. Soluções usadas na extração de DNA bacteriano

Nome da solução	Componentes	Concentração
SOLUÇÃO L	Tris HCl pH 8,0 EDTA	20 mM 10 mM
SOLUÇÃO I	Tris HCl pH 8,0 EDTA Glucose	25 mM 10 mM 50 mM
SOLUÇÃO II	NaOH SDS	40 mM 20%
SOLUÇÃO III	Acetato de potássio Ácido acético glacial	3 M 2 M
TE	Tris HCl pH 8,0 EDTA	25 mM 10 mM
CLOROFANE	Fenol Clorofórmio Álcool isoamílico	25:24:1
CLOROFIL	Clorofórmio Álcool isoamílico	24:1

Tabela 5A Solução de extração de DNA genômico

Solução	Reagentes	Concentração
Tampão de extração	CTAB NaCl Tris-HCl EDTA β -mercaptoetanol	2% 5M 1M pH 8,0 20 mM 0,2%

Tabela 6A Soluções do *S. blot* e *N. blot*

Solução de Lavagem	Reagentes	Concentração
Solução I	SSC 20X SDS 10%	2X 0,1%
Solução II	SSC 20X SDS 10%	1X 0,1%
Solução III	SSC 20X SDS 10%	0,1X 0,1%

Sequencia do vetor pSIUCSMVCABMV

LOCUS pSIU-CSMVCABMV 11784 bp DNA circular
29-JUN-2009

FEATURES Location/Qualifiers
 misc_feature 677..3159
 /label=ahas-pro
 misc_feature 3160..5173
 /label=ahas\cd
 misc_feature <5174..>6394
 /label=ahas-term
 misc_feature complement(6426..6679)
 /label=nos-term
 misc_feature 6697..7573
 /label=CSMV-CABMV
 misc_feature complement(7988..8864)
 /label=CSMV-CABMV
 misc_feature 7592..7961
 /label=intron\AtMS
 promoter complement(9007..9530)
 /label=35Sd\CaMV
 misc_feature 8878..8915
 /label=AMV
 misc_feature 10796..11656
 /label=ampR

BASE COUNT 3298 a 2416 c 2533 g 3537 t ORIGIN
 1 ctaaattgta agcgttaata ttttgttaaa attcgcgta aatttttgtt aaatcagctc
 61 attttttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga
 121 gatagggttg agtggtgttc cagtttgtaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc
 181 caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc
 241 ctaatcaagt tttttggggt cgaggtgccg taaagcacta aatcggaacc ctaaagggag
 301 cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aaggaagaa
 361 agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac
 421 cacaccgccc gcgcttaatg cgccgctaca gggcgctgcc cattcgccat tcaggctgcg
 481 caactgttgg gaagggcgat cggtgcgggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaggg
 541 gggatgtgct gcaaggcgat taagtgggt aacgccaggg tttcccagt cagcagcttg
 601 taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata cgactcacta tagggcgaat tggagctcca
 661 ccgcggtggc ggccgctcta gattatgtat ttccaacttt cattaacaat ataatcgcat
 721 ataaatgaaa aatcgtttcc aggataatat tttgatgaaa tctcatatta ttgttcgtac
 781 tcggattgat gttgaaggct tgaagcgctt caaattatag accagattat ttaagttttt
 841 cttttgttta ctccatatca atttgatcca ttatactacc taagaaaatt taggtaacat
 901 agaattattt attgttatag taaaaaaaag gaaaaccaca aaaataatct acttttacgt
 961 atatactatt ttcattgacat aagtaattaa gttgtacaac ttttttttaa tgaaaagaga
 1021 gagtaaatat atcatgttca tgtgtagtta cctcgtgaat aaccgacggt tatatagacg
 1081 cctaacaatga attgttcagt tgaagacagt tcaaaacatg tgtttcactc taaaatcctc
 1141 aacaaaaaaa aagtgttaaa atttgtaaac ctctttcaag caaaaaaga aaaagtgtta
 1201 gaatcccaag attctttcat aatccggaat cttggctgaa aacgtataaa agagattgac
 1261 gtagtaacaa ggagtcttgg tatgcttcca tgctttttat ccttttttgt catggaacca
 1321 tgatttgggtt accatttatt atgtaaccga aattttcatt gtaataatga atatttaaat
 1381 ttttagcaaa aaaaaacaaa aaaaaacaag gagtcttgtc ttcgttctca aatttcagag
 1441 ctcttgcaact tttcaagagt tttactttga tgagtggagc atttgtcttt ttagtgttta
 1501 ttttctaaac ttaaaaatagt agcatcaaca tcaactcaatt ataattctta agatgttgta
 1561 gaaaaatatt ttatagatgg aaagtaatcg atattaagac aaataagaaa ccaaacggga
 1621 ctttgtgttc agaccgaatc aaatctgaat tggagaaatt atgggtggagg cgaaagtcaa
 1681 cggaactaaa gtataaaacc aaatgtcaaa aataaaacc aattttcatc cttaaacgaa
 1741 cctgctgaaa ccctaatttc gattaccaat tccgatctaa aaagaagtca tgggaagccat

1801 tgattccgca atcgatcctc tcagagattt cgctaagagc agtggttcgtc tcgtccagcg
1861 ctgtcacaaa cccgatcgca agggtaacgc cttttctcaa aaaaatctca tttccgattt
1921 ttgatctgta gattaggggtt ttctgaaatt ttgatatcat ttgtaattga attgggtatc
1981 agaattcacg aaagtagctg tgcgtacggc gattggattt gtgggtgatgg gattcgttgg
2041 attccttcgty aagctcgttt tcatccaat caacaacatc atcgttggat cttcttagtg
2101 tagtactttc tttacgaggt aattgatctc gcattatata tctacatttt ggttatgta
2161 cttgacatat agtcattgat tcaatagttc tgtaattcc tttaaagatc attttgacta
2221 gaccacattc ttggttcatt cctcaataat ttgtaatcat attgggtgat atagaagtag
2281 attggttata gatcagatag tggaaagactt taggatgaat ttcagctagt tttttttttt
2341 ggcttattgt ctcaaaagat tagtgctttg ctgctccat tgctctccat tgctctgct
2401 ttctgtctcc ttgtatcttt attatatcta ttctcccat gagttttggt tgttctgtat
2461 tcgttcgctc tgggtgcatg gatggagtct ctggtccatg tttctgtaat gcatgttggg
2521 ttgtttcatg caagaaatgc tgagataaac actcatttgt gaaagtttct aaactctgaa
2581 tcgctgctaca ggcaatgctc cgaggagtag gaggagaaga acgaaccaa cgacattatc
2641 agccctttga ggaagctctt agttttgtta ttgtttttgt agccaaattc tccattctta
2701 ttccattttc acttatctct tgttctttat agacctata agttttttat tcatgtatac
2761 aaattatatt gtcatcaaga agtatcttta aaatctaaat ctcaaatcac caggactatg
2821 tttttgtcca attcgtggaa ccaacttgca gcttgtatcc attctcttaa ccaataaaaa
2881 aagaaagaaa gatcaatttg ataaatttct cagccacaaa ttctacattt aggttttagc
2941 atatcgaagg ctcaatcaca aatacaatag atagactaga gattccagcg tcacgtgagt
3001 tttatctata aataaaggac caaaaatcaa atcccggagg cattttcgtat atccaacata
3061 aaacccttaa acttcaagtc tcatttttaa acaaatcatg ttcacaagtc tcttcttctt
3121 ctctgtttct ctatctcttg ctcatctttc tctgaacca tggcggcggc aacaacaaca
3181 acaacaacat cttcttcgat ctcttctcc accaaacctc ctcttctc ctccaaatca
3241 ccattaccaa tctccagatt ctccctccc tctctcctaa accccaaca atcatctctc
3301 tctctccgct gccgctgat caaatccagc tctctctct ccactctcc cgtgctcaac
3361 acaaccaca atgtcacaa cactctctc ccaaccaa acaccaaac ctaccaaac cgaacattc
3421 atctccgat tcgctccaga tcaacccgc aaaggcgtg atatcctcgt ggaagctta
3481 gaacgtcaag cgttagaaac cgtattcgtc taccctggag gtgcatcaat ggagattcac
3541 caagccttaa cccgctctc ctcaatcgt aacgtcctc ctgctcacga acaaggagg
3601 gtattcgcag cagaaggata cgctcgatcc tcaggtaaac caggatctg tatagccact
3661 tcaggctccg gagctacaaa tctcgttagc ggattagccg atgcgttgtt agatagtgtt
3721 cctcttgtag caatcacagg acaagtcctc cgtcgtatga ttggtacaga tgcgtttcaa
3781 gagactccga ttggtgaggt aacgcgttcg attacgaagc ataactatct tgtgatggat
3841 gttgaagata tccctaggat tattgaggaa gctttcttt tagctacttc tggtagacct
3901 ggacctgttt tgggtgatgt tcttaaagat attcaacaac agcttgcgat tccatattgg
3961 gaacaggcta tgagattacc tggttatatg tctaggatgc ctaaactctc ggaagattct
4021 catttgagc agattgtag gttgatttct gagtctaaga agcctgtgtt gtatgttgg
4081 ggtggttgtt tgaattctag cgatgaattg gtagggttg ttgagcttac ggggatccct
4141 gttgcgagta cgttgatggg gctgggatct tctcttgtg atgatgagtt gtcgttacat
4201 atgcttgga tgcatgggac tgtgtatgca aattacgctg tggagcatag tgatttgtt
4261 ttggcgtttg gggtaagggt tgatgatcgt gtcacgggta agcttgaggc ttttgctagt
4321 agggctaaga ttgttcatat tgatattgac tggctgaga ttgggaagaa taagactcct
4381 catgtgtctg tgtgtggtga tgttaagctg gctttgcaag ggatgaataa ggttcttgag
4441 aaccgagcgg aggagcttaa gcttgatttt ggagtttga ggaatgagtt gaacgtacag
4501 aacagaagt ttccgttgag cttaagacg tttggggaag ctattcctcc acagtatgcg
4561 attaagggtcc ttgatgagtt gactgatgga aaagccataa taagtactgg tgcgggcaa
4621 catcaaatgt gggcggcgca gttctacaat tacaagaaac caaggcagtg gctatcatca
4681 ggaggccttg gagctatggg atttggactt cctgctgca ttggagcgtc tgttgctaac
4741 cctgatgcga tagttgtgga tattgacgga gatggaagct ttataatgaa tgtgcaagag
4801 ctagccacta ttcgtgtaga gaatcttcca gtgaaggtac ttttattaaa caaccagcat
4861 cttggcatgg ttatgcaatg ggaagatcgg ttctacaaag ctaaccgagc tcacacattt
4921 ctgggggatc cggctcagga ggacgagata ttcccgaaca tgttctgtt tgcagcagct
4981 tgcgggattc cagcggcgag ggtgacaaag aaagcagatc tccgagaagc tattcagaca
5041 atgctggata caccaggacc ttacctgtt gatgtgattt gtccgcacca agaacatgtg
5101 ttgccgatga tcccagtggt tggcactttc aacgatgtca taacggaagg agatggcgg
5161 attaaatact gagagatgaa accggtgatt atcagaacct tttatggtct ttgtatgcat
5221 atggtaaaaa aacttagttt gcaatttctt gtttgtttt gtaatttgag tttcttttag
5281 ttgttgatct gcctgctttt tggtttacgt cagactacta ctgctgttgt tgtttgggtt
5341 cttttctttc attttataaa taaataatcc ggttcgggtt actcctgtg actggctcag
5401 tttggttatt gcgaaatgcg aatggtaaat tgagtaattg aaattcgtta ttagggttct

5461 aagctgtttt aacagtcact gggtaatat ctctcgaatc ttgcatggaa aatgctctta
5521 ccattggttt ttaattgaaa tgtgctcata tgggccgtgg tttccaaatt aaataaaact
5581 acgatgtcat cgagaagtaa aatcaactgt gtccacatta tcagttttgt gtatacgatg
5641 aaatagggta attcaaaaac tagcttgata tgccttttgg ttcatttttaa ctttctgtaa
5701 acattttttc agattttttaa caagtaaact caaaaaaaa aaaaaaaa tctcaactca
5761 acactaaatt attttaatgt ataaaagatg cttaaaacat ttggcttaaa agaaagaagc
5821 taaaaacata gagaactcct gtaaaattgaa gtatgaaaat atactgaatt gggattata
5881 tgaatttttc tgatttagga ttcacatgat ccaaaaagga aatccagaag cactaatcag
5941 acattggaag taggaatatt tcaaaaagtt tttttttttt aagtaagtga caaaagcttt
6001 taaaaaatag aaaagaaact agtattaag ttgtaaattt aataaacaaa agaaattttt
6061 tatatttttt catttctttt tccagcatga ggttatgatg gcaggtatg gatttcattt
6121 ttttcctttt gatagccttt taattgatct attataattg acgaaaaaat attagttaat
6181 tatagatata ttttaggtag tattagcaat ttacacttcc aaaagactat gtaagttgta
6241 aatatgatgc gttgatctct tcatcattca atggttatgc aaaaaataa aagcttaact
6301 agtaaaactaa agtagtcaaa aattgtactt tagtttaaaa tattacatga ataatccaaa
6361 acgacattta tgtgaaacaa aaacaatata tagaactagt ggatccccg ggctgcagga
6421 attcccgatc tagtctcat agatgacacc gcgcgcgata atttatccaa gtttgcgagc
6481 gatattttgt tttctatcgc gtattaaatg tataattgcg ggactctaata cataaaaacc
6541 catctcataa ataacgtcat gcattacatg ttaaataata catgcttaac gtaattcaac
6601 agaaattata tgataatcat cgcaagaccg gcaacaggat tcaatcttaa gaaactttat
6661 tgccaaatgt ttgaacgatc ggggaaattc gagctcagtt ctttgctggg caaactgtta
6721 tggatgtgct gcaacatggt tcctctcca ccaccaattt aaggttgta tcttattgca
6781 atcttaaaaa ggaagaggat ggtaagatga tgctggctat taaggagcag aggcaccgac
6841 ggttggtgac actgtcatat ggtgctatgt gttttcaatt ctcaaattca gtaggggatg
6901 agggcataga agtgatgat gagagttgat gtttgaata tttgatgat tgctgcgac
6961 aaagatttca aactcaaagg gcatgacgca cttatacagc tggatgctg gagtttatct
7021 cagcacttc aaagtagagg tgcatgtga tgattacaac tcaaactcga tggagaagga
7081 tttggctgga gaagctcagg gtctttcaca ggagacaaga gcttagcaag gcttagcttc
7141 gatttttatg aagtcacatc taagcttctc gacagagcaa ggaagcaat agcacagatg
7201 aaggctgcag ctctcgccaa cgtaaacacc aggatgttcg gcctggatgg gaatgtggca
7261 acaactagtg agaacactga gaggcacact gctactgatg tcaatcagaa catgcattcc
7321 cttttgggaa tgacgcatgg gcagtaaagg cctgggtccg cccccgccac agttatcgtc
7381 tcacgatctt agctaattgt tggttttagt aaatagtacg catatatcca gtcaaactat
7441 atatgttagt gtggtttccc accagtatgt tatattactt taattgaact tagcggagag
7501 gccatgccc ggttgagtg ctacagatga ttgtgtcacg cgtagctacc gagatttggtg
7561 tatgaaaact ctccggccca ctagttttat ggtccatttt ctttactct ctctttatac
7621 aacacattag ttggtttgga ttggatttga ccgacattgg tgaaactttt gaataaact
7681 gtaacaaact ttttaattgga ccgcttcaa tttggtatca gtttaaattt ggttttgta
7741 tatttatgtc tgaatttact attcagagga attgaccaa tttagttggt ctggcaggct
7801 agttaatatc aaatttgttt ggtttggtgt atttcgatcc ggttctggtt ttatctatgt
7861 tcgatacaag tcgatttgggt ttggtttggt atgttctgct gtatataata tccggtttaa
7921 actaaccaaa ttaagtaaat tttgtgttg ggtttgaaca ggctgatgga tccgggttac
7981 cgggcccgag agttttcata cacaaatctc ggtagctacg cgtgacaaa tcaactctgag
8041 cactccaacc ggggcatggc ctctccgcta agttcaatta aagtaataata acatactggt
8101 gggaaaccac actaacatat atagtttgac tggatataat cgtactattt actaaaacca
8161 accatttagt aagatcgtga gacgataact gtggcggggg cggaccagg ctttactgc
8221 ccatgctgca ttcccaaaag ggaatgcatg ttctgattga catcagtagc agtgtgcctc
8281 tcagtgttct cactagttgt tgccacattc ccatccaggc cgaacatcct ggtgtaacg
8341 ttggcgagag ctgcagcctt catctgtgct attgcttccc ttgctctgtc agaagtctta
8401 gatgtgactt cataaaaaac gaaagcatac cttgctaagc tcttgtctcc tgtgaaagac
8461 cctgagcttc tccagccaaa tccttctcca gcagatttga gttgtaatca tcacactgca
8521 cctctacttt gaatgtgctg agataaaact cacgcatcca gctgtataag tgcgtcatgc
8581 cttttgagtt tgaaatcttt gtgctgagca atgcatcaaa ttttcaaac atcaactctc
8641 atcatccact tctatgccct catcccctac tgaatttgag aattgaaaac acatagcacc
8701 atatgacagt gtcaacaacc gtcggtgcct ctgctcctta atagccagca tcatcttacc
8761 atcctcttcc tttttaagat tgcaataaga taacaacctt aatttggtgg tgggagagga
8821 aacatggtgc agcacatcca taacagtttg ccagcaaaag aactgagctc tagaggcgtg
8881 gaagtatttg aaagaaaatt aaaaataaaa agatctctc tccaaatgaa atgaacttcc
8941 ttatatagag gaaggtctt gcgaaggata gtgggattgt gcgtcatccc ttacgtcagt
9001 ggagatatca catcaatcca cttgctttga agacgtggtt ggaacgtctt cttttccac
9061 gatgctcctc gtgggtggg gtccatcttt gggaccactg tcggcagagg catcttgaac

9121 gatagccttt cctttatcgc aatgatggca tttgtaggtg ccaccttctt tttctactgt
9181 ccttttgatg aagtgacaga tagctgggca atggaatccg aggaggtttc ccgatattac
9241 cctttgttga aaagtctcag atcggacat cacatcaatc cacttgcttt gaagacgtgg
9301 ttggaacgtc ttctttttcc acgatgctcc tcgtgggtgg ggggccatct ttgggaccac
9361 tgtcggcaga ggcattctga acgatagcct ttcctttatc gcaatgatgg cattttagg
9421 tgccaccttc cttttctact gtccttttga tgaagtgaca gatagctggg caatggaatc
9481 cgaggagggt tcccgatatt accctttgtt gaaaagtctc agatcggacc tgcaggcatg
9541 caagcttatc gataccgtcg acctcgaggg ggggcccggt acccagcttt tgttcccttt
9601 agtgagggtt aattgcgcg cttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt
9661 gttatccgct cacaattcca cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg
9721 gtgcctaata agtgagctaa ctcacattaa ttgctgtgag ctactgccc gctttccagt
9781 cgggaaacct gtcgtgccag ctgcattaat gaatcggcca acgcgcgggg agaggcgggt
9841 tgcgtattgg gcgctcttcc gcttctctgc tctactgact gctgcgctcg tgcgttcggc
9901 tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg
9961 ataacgcagc aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg
10021 ccgctgtgct ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac
10081 gctcaagtca gaggtggcga aaccgacag gactataaag ataccaggcg tttcccctg
10141 gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgct
10201 ttctcccttc ggaagcgtg gcgctttctc atagctcac ctgtaggtat ctgagttcgg
10261 tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct
10321 gcgccttatc cggtaactat cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac
10381 tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt
10441 tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc
10501 tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca
10561 ccgctggtag cgggtgtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaggat
10621 ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactac
10681 gttaaaggat tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt
10741 aaaaatgaag ttttaaatca atctaagta tatatgagta aacttggctc gacagttacc
10801 aatgcttaat cagtgagcga cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg
10861 cctgactccc cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg
10921 ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc
10981 cagccggaag ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgctcc atccagtcta
11041 ttaattgttg ccggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg
11101 ttgccattgc tacaggcatc gtggtgtcac gctcgtcgtt tggatgggt tcattcagct
11161 ccggttccca acgatcaagg cgagttacat gatccccc atgtgtgcaa aaagcgggta
11221 gtccttcggt tcctccgatc gttgtcagaa gtaagtggc cgcagtgta tcaactatgg
11281 ttatggcagc actgcataat tctcttactg tcatgcatc cgtaagatgc ttttctgtga
11341 ctggtgagta ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt
11401 gccccgctgc aatacgggat aataccgctc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca
11461 ttggaacacg ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt
11521 cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt
11581 ctgggtgagc aaaaacagga aggcaaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga
11641 aatgttgaat actcactatc ttcctttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt
11701 gtctcatgag cggatacata tttgaaatgta tttagaaaaa taacaaata ggggttccgc
11761 gcacatttcc ccgaaaagt cccac