



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

Transformação de laranja doce visando a superexpressão do gene licopeno beta-clase 1 (LCY-b1)

Daniele **Paschoal**^{1a}; Thaísa Tessutti **Pinheiro**^{2c}; Antônio **Figueira**^{2c}; Rodrigo Rocha **Latado**^{1b}

¹ Centro Apta de Citros Sylvio Moreira; ² Centro de Energia Nuclear na Agricultura

Nº 13107

RESUMO - *As laranjas doces possuem frutos com polpa de cor amarela devido à presença de diversos carotenoides. As laranjas de polpa vermelha, no entanto, possuem polpa com coloração vermelha devido à presença de maiores teores de carotenóides totais, principalmente o β -caroteno e licopeno. As hipóteses mais prováveis para o acúmulo de licopeno na polpa dos frutos de laranjas de polpa vermelha estão relacionadas: a) expressão mais baixa do gene LCY-b; b) expressão mais uma baixa do gene HY-b ou c) uma maior expressão dos primeiros genes da via, principalmente o PSY na polpa dos frutos. Este projeto objetivou a transformação genética das laranjeiras x11 e sanguínea de Mombuca, de polpa amarela e polpa vermelha, respectivamente, visando a sua superexpressão do gene LCY-b1, a fim de tentar comprovar uma das hipóteses para o acúmulo de licopeno e maior conteúdo de β -caroteno nos frutos de polpa vermelha. Para tal utilizou-se a *A. tumefaciens* com promotor 35S e o gene LCY-b1. Segmentos de epicótilo foram co-cultivados com a bactéria (DO 0,8) e, após três dias, iniciou-se a seleção em meio contendo canamicina e cefotaxime. Para a identificação e confirmação de plantas transformadas foram realizados os testes: histoquímico de GUS, e PCR. Os vários experimentos realizados com a 'x11' apresentaram em média 0,31 brotação por explante inoculado, o que representou uma eficiência média de 3,7% brotações transformadas por explante. A 'Sanguínea de Mombuca' apresentou média de 0,39 brotação por explante, o que resultou em uma taxa de 7,5% de brotações transformadas por explante.*

Palavras-chaves: Citros, licopeno, beta-caroteno, 'x11', 'Sanguínea de Mombuca', transgênico

^a Bolsista CNPq, Graduação Universidade Federal de São Carlos, dani_paschoal21@hotmail.com, ^b Orientador, ^c Colaborador.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

ABSTRACT- *The golden sweet oranges have fruits with a yellow pulp due to the presence of carotenoids at different levels. The red-fleshed sweet oranges, however, have red colored pulp due to the presence of higher levels of carotenoids, especially β -carotene and lycopene. The most probable hypothesis for the accumulation of lycopene in the red-fleshed SO is related to: a) lower expression of lycopene β -cyclase (LCY-b) and/or lycopene β -hydroxylase (HY-b) genes; b) increased expression of the upstream genes of the carotenoid pathway, probably phytoene synthase (PSY) in fruit pulp. This study aimed to genetic transformation of 'x11' and 'Sanguínea de Mombuca', with yellow pulp and red pulp, respectively, seeking the overexpression of LCY-b1 gene, in order to try to prove an hypothesis for the accumulation of lycopene and β -carotene content in the pulp of red-fleshed varieties. *A. tumefaciens* with the 35S promoter and LCY-b1 gene was used. Epicotyl segments were co-cultured with bacteria (OD 0.8) and, after three days, *in vitro* selection method started using medium containing kanamycin and cefotaxime. For the identification and confirmation of transformed plant, tests were performed: GUS histochemical and PCR. The various experiments conducted with the 'x11' showed on average 0.31 shoots per inoculated explant, which represented an average efficiency of 3.7% transformed shoots per explant. The 'Sanguínea de Mombuca' showed an average of 0.39 shoots per explant, which resulted in a rate of 7.5% of shoots per explant transformed.*

Key-words: citrus, lycopene, beta-carotene, 'x11', 'Sanguínea de Mombuca', transgenic



1 INTRODUÇÃO

1.1 Carotenoides nas laranjas

As laranjas podem ser classificadas conforme a coloração da polpa dos frutos. As laranjas claras possuem cor amarela devido à presença de carotenoides, pigmentos que variam do amarelo ao vermelho. Assim, a variação de cores na polpa dos frutos de citros é decorrente das flutuações na quantidade dos diferentes carotenoides presentes nela (Bitters, 1961). Ao grupo das variedades de polpa clara pertencem quase que a totalidade das laranjas comerciais cultivadas no mundo todo, como Pêra, Valência, Bahia, Natal e Hamlin.

Outro grupo é o das variedades de laranjas doces de polpa vermelha, que possuem coloração vermelha na polpa de seus frutos devido à presença de maiores teores de carotenóides totais, principalmente o beta-caroteno e licopeno (Lee; Coates, 2002). As laranjas de polpa vermelha são mutantes espontâneos, provavelmente originados de laranjas de polpa clara. Alguns exemplos de variedades de polpa vermelha presentes no Brasil são Bahia Cara-Cara, Sanguínea de Mombuca, Valência Puka, entre outras.

A laranja é uma importante fonte de vitamina C, essencial à alimentação humana. Acredita-se que o cultivo e a comercialização das variedades de polpa vermelha sejam vantajosos, porque estas variedades podem apresentar maior valor nutricional e medicinal, devido ao acúmulo do pigmento licopeno. O licopeno é considerado um dos mais potentes agentes antioxidantes naturais, sendo sugerido na prevenção de câncer.

1.2 Transformação genética de laranja doce

A transformação genética de plantas tem sido considerada como uma importante ferramenta para o melhoramento de plantas perenes, por permitir a introdução de uma ou poucas características em genótipos-elite sem a necessidade de alterar completamente genótipo, pois não envolve a fase de recombinação genética na meiose (Deng; Duan, 2006).

A variedade 'x11' é um mutante espontâneo de laranja doce que apresenta frutos com polpa amarela, contendo seis sementes em média, geralmente poliembriônicas e média de três embriões por semente. Além disto, a variedade tem a capacidade de florescer várias vezes ao ano, independentemente de estímulos ambientais, bastando para isto realizar podas. Assim, a 'x11' se constitui num excelente material para estudos de transformação genética em laranjeiras doces,



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

com a possibilidade de superexpressar ou nocautear genes e poder avaliar o fenótipo resultante num curto espaço de tempo (um ou dois anos).

A laranja Sanguínea de Mombuca é uma variedade do grupo das laranjas de polpa vermelha, que não apresenta florescimento precoce, média de cinco sementes por fruto, altamente poliembriônica. A característica mais importante é a capacidade de produzir frutos contendo licopeno na polpa, fato incomum para a maioria das variedades de laranja.

Este trabalho teve como objetivo a transformação genética de plantas das laranjas x11 e sanguínea de Mombuca, com uma construção contendo o gene LCY-b1 visando a sua superexpressão e avaliação do fenótipo resultante, em relação ao acúmulo de licopeno e de beta-caroteno, na polpa dos frutos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Construção vetorial e transformação genética

Foi utilizada, nos experimentos de transformação, a linhagem EHA 105 de *A. tumefaciens* contendo o vetor binário pCAMBIA 2301 com promotor 35S e o gene LCY-b1. Esse vetor introduz T-DNA contendo gene de seleção ao antibiótico canamicina, e possui um íntron inserido na região codificadora (ORF) do gene repórter uidA (GUS).

A técnica de transformação genética com segmentos de epicótilo de laranjas x11 e Sanguínea de Mombuca foi realizada por meio de co-cultivo dos explantes com a *A. tumefaciens*, seguido de cultivo in vitro contendo agente seletivo no meio de cultivo e regeneração de brotações transformadas.

2.2 Germinação de sementes in vitro

Para a germinação de sementes, primeiramente elas foram descascadas. A desinfecção foi feita com imersão em solução de água sanitária (50% durante 20 minutos) e tween (1 gota/100 mL) em agitação. Em fluxo laminar, as sementes foram lavadas três vezes com água esterilizada e transferidas para tubos de ensaio contendo meio MS sólido (sais MS, sacarose, vitaminas MS, ágar) autoclavado. Estas sementes germinaram durante um mês no escuro, para somente depois serem colocadas na luz.

2.3 Crescimento da *Agrobacterium tumefaciens*

As linhagens de *A. tumefaciens* foram mantidas como estoque em solução 50% glicerol, a - 80°C. A bactéria foi cultivada em meio sólido LB (10 g.L⁻¹ triptona, 10 g.L⁻¹ extrato de levedura, 5



g.L⁻¹ cloreto de sódio, 7 g.L⁻¹ ágar) suplementado com canamicina (100 mg.L⁻¹) e rifampicina (100 mg.L⁻¹), a 28 °C.

As linhagens de *A. tumefaciens* foram crescidas overnight em meio LB líquido, adicionado de 100 mg L⁻¹ canamicina e 100 mg L⁻¹ de rifampicina no shake, sob agitação constante (140 rpm) e a 28 °C. A suspensão bacteriana foi centrifugada a 15°C e 4000 rpm, por 8 minutos. Em seguida foi feita a leitura da densidade óptica (DO_{600nm} 0,8) sendo o pellet ressuspensão em água esterilizada, nos primeiros experimentos, e em meio MS líquido, nos demais.

2.4 Co-cultivo e seleção de segmentos de epicótilo

Foram cortados segmentos do epicótilo de plântulas recém-germinadas em condições in vitro e estioladas, devido ao cultivo no escuro. Os segmentos de epicótilo foram co-cultivados durante 20 minutos em suspensão bacteriana e em seguida transferidos para meio sólido MS, durante três dias. Após esse período, os explantes inoculados foram transferidos para o mesmo meio MS adicionado de canamicina (100 mg L⁻¹) e cefotaxima (500 mg.L⁻¹), para controlar o crescimento das bactérias e iniciar a seleção das células transformadas, respectivamente. Os explantes permaneceram no escuro durante 15 dias, e em seguida, os mesmos foram transferidos para condições de temperatura de 25 ± 1°C, luminosidade de 35 µmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas de luz.

2.5 Identificação de brotos transformados

Inicialmente, foi realizado o ensaio histoquímico nas brotações obtidas, para determinar a atividade da beta-glucuronidase (GUS) conforme descrito por Jefferson (1987). Após a incubação das folhas em solução x-Gluc por 24 h, formação de cor azul nas mesmas, determinaram brotos transformados.

Para a confirmação da inserção dos gene LCY-b1 nas plantas de 'x11' e 'Sanguínea de Mombuca', foram realizadas reações de PCR. Foi utilizado o iniciador correspondente ao gene para a amplificação do mesmo. A reação seguiu os seguintes parâmetros: 20 ng de DNA na diluição, 200 mM de DNTPs, 0,2 mM de cada iniciador (Forward e Reverse), 2 mM de MgCl₂, 0,52 U da enzima Taq polimerase, 1x Taq buffer, totalizando 13 µL de reação. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1%.

Os brotos confirmados positivos foram microenxertados em Citrange Carrizo, mantidos em condições in vitro por volta de um mês, e em seguida aclimatizados em casa de vegetação.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos experimentos realizados superexpressando o gene LCY-b1 em laranjeira x11, foram obtidas oito plantas transgênicas, que já estão em fase de aclimatização em casa de vegetação. Os resultados detalhados dos experimentos realizados estão presentes na Tabela 1.

Tabela 1. Eficiência de regeneração e transformação dos explantes de ‘x11’ inoculados.

Experimento	Número de explantes inoculados	Número de brotos regenerados	Eficiência de regeneração*	Número de brotos avaliados por GUS e PCR	Número de brotos GUS+ e PCR+	Eficiência de transformação**	Eficiência de transformação***
1	58	23	0,19	16	2	0,125	0,034
2	37	3	0,03	10	1	0,1	0,027
3	47	23	0,46	14	3	0,21	0,06
4	67	14	0,17	12	2	0,16	0,029
Total	209	63	0,3	51	8	0,15	0,04

*Número total de brotos regenerados por número de explantes inoculados

** Número de brotos GUS+ e PCR+ em relação aos brotos avaliados por GUS e PCR

*** Número de brotos GUS+ e PCR+ em relação a todos explantes inoculados

Com os experimentos realizados em laranjeira Sanguínea de Mombuca, no entanto, foram obtidos 24 brotos transformados, dos quais 10 plantas já estão em fase de aclimatização. Pode-se observar os resultados dos experimentos na Tabela 2.

Tabela 2. Eficiência de regeneração e transformação dos explantes de ‘Sanguínea de Mombuca’ inoculados.

Experimento	Número de explantes inoculados	Número de brotos regenerados	Eficiência de regeneração	Número de brotos avaliados por GUS e PCR	Número de brotos GUS + e PCR +	Eficiência de transformação**	Eficiência de transformação***
1	20	6	0,3	4	2	0,5	0,1
2	24	4	0,16	4	2	0,5	0,08
3	24	4	0,16	12	3	0,25	0,125
4	34	21	0,61	21	3	0,14	0,08
5	56	27	0,48	21	8	0,38	0,14
6	48	37	0,77	30	4	0,13	0,08
7	66	32	0,48	27	2	0,07	0,03
Total	272	131	0,48	92	24	0,26	0,08

*Número total de brotos regenerados por número de explantes inoculados

** Número de brotos GUS+ e PCR+ em relação aos brotos avaliados por GUS e PCR



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

*** Número de brotos GUS+ e PCR+ em relação a todos explantes inoculados

O principal problema na transformação de citros é a ocorrência de escapes, o que resultou em baixa eficiência de transformação, 4%, para laranjeira X11 e 8%, para laranjeira sanguínea de mombuca. A regeneração de escapes pode ser explicada pela elevada eficiência de formação de brotos em oposição à baixa eficiência de transformação mediada por *A. tumefaciens* reportada para citros, e uma seleção ineficaz da canamicina devido à proteção das células não transformadas por células transformadas circundantes. Estas células circundantes impedem a ação da canamicina nas células não transformadas (Pena et al., 1994).

As eficiências de regeneração e transformação mostraram-se menores nos experimentos realizados em 'x11', comparando-os com os de 'Sanguínea de Mombuca'. Isto pode ocorrer pelo fato de os explantes serem mais sensíveis à *A. tumefaciens*, fazendo com que os mesmos não regenerem efetivamente, ou mesmo pela ocorrência de brotações escapes.

Já em relação ao crescimento e manutenção das plantas transgênicas regeneradas, a microenxertia mostrou-se como um método rápido e eficiente. Moore et al (1992) relataram dificuldade em enraizar brotos, já que geralmente estes são pequenos e fracos. Pena et al (1994) obteve sucesso com a microenxertia, demonstrando sua vantagem sob o enraizamento em espécies lenhosas ou com dificuldade em enraizamento.

4 CONCLUSÃO

As eficiências de regeneração e de transformação foram maiores em laranjeira Sanguínea de Mombuca, comparado com à 'x11', utilizando o protocolo especificado. As plantas transgênicas posteriormente terão o seu fenótipo avaliado visando estudos de genômica funcional.

5 AGRADECIMENTOS

Ao PIBIC – CNPq, pela bolsa concedida.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bitters, W. P. Physical characters and chemical composition as affected by scions and rootstocks. In: SINCLAIR, W. B. (ed.). *The orange, Its Biochemistry and Physiology*. Riverside: The University of California, Santa Cruz, p. 56-95, 1961.
- Deng, X. X.; DUAN, Y. X. Modification of perennial fruit trees. In: Fladung, M., Ewald, D. (Eds.), *Tree Transgenesis: Recent Developments*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany, p. 47–66, 2006.
- Endo et al. Ectopic expression of an FT homolog from Citrus confers an early flowering phenotype on trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.). **Transgenic research**, London, v. 14, p. 703–712, 2005.
- Jeferson, R. A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. **Plant Mol. Bid. Rep.**, v. 5, p. 387-405, 1987.
- Lee, H. S.; Coates, G. A. Characterization of color fade during frozen storage of red grapefruit juice concentrates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, p. 3988-3991, 2002.
- Moore, G.A. et al. Agrobacterium-mediated transformation of citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. **Plant. Cell. Rep.**, 11 238-242, 1992.
- Pena, L. et al. High efficiency Agrobacterium-mediated transformation and regeneration of citrus. **Plant Science**, p. 183-191, 1995.