



**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE TANGERINEIRA SUNKI COM O FATOR DE
TRANSCRIÇÃO DREB**

Natália Storti **Rodrigues**^{1a}; Raquel Luciana Boscarol **Camargo**^{1b};

¹Instituto Agronômico de Campinas, Centro de Citricultura Sylvio Moreira

Nº 13128

RESUMO – *Considerando que o déficit hídrico afeta o desenvolvimento da planta, e portanto, pode interferir significativamente na produtividade de citros, a utilização de porta-enxerto tolerante à seca é fundamental. A tangerina Sunki (Citrus sunki Hort. ex Tan) é um porta-enxerto promissor, pois possui tolerância ao vírus da tristeza, ao declínio e à morte súbita, no entanto apresenta baixa tolerância à seca. O objetivo deste trabalho foi obter plantas geneticamente modificadas de tangerineira Sunki contendo o gene CitDREB, o qual foi identificado e caracterizado como um fator de transcrição no genoma do citros. Este gene foi clonado num vetor binário pCambia2301, sob o controle do promotor CaMV35S, visando a superexpressão deste gene para aumentar a tolerância à seca nestas plantas. A transformação genética foi mediada por Agrobacterium tumefaciens EHA 105, contendo o vetor binário com o gene de interesse, além dos genes repórter uid-A (Gus) e de seleção nptII. Segmentos de epicótilo de plântulas germinadas in vitro foram inoculadas com Agrobacterium, cultivados a 24°C durante 3 dias, e posteriormente transferidos para meio seletivo a 28°C, fotoperíodo de 16 horas, até o desenvolvimento de brotos. Os explantes transformados foram selecionados in vitro e os brotos avaliados através do teste histoquímico de GUS e pela técnica de PCR, confirmando ou não a inserção do gene de interesse. Utilizando o protocolo de transformação proposto foi possível obter quatro plantas transgênicas, que foram microenxertadas e posteriormente aclimatizadas em casa de vegetação para futuros estudos de expressão gênica e de resposta ao estresse hídrico.*

Palavras-chaves: Superexpressão, DREB, porta-enxerto, *Agrobacterium tumefaciens*, estresse hídrico.

^a Bolsista CNPq: Graduação em Biotecnologia UFSCar- Araras, SP, nataliasr@hotmail.com, ^bOrientador



ABSTRACT- *Considering that drought interferes in plant development thus affecting the citrus productivity, the use of drought tolerant rootstocks is essential. Sunki mandarin (Citrus sunki Hort. ex Tan) is a promising rootstock because it has tolerance to citrus tristeza virus, to decline and sudden death, but has low tolerance to drought. The objective of this work was to obtain genetically modified Sunki mandarin overexpressing CitDREB gene, which was identified and characterized as a transcription factor in the citrus genome. This gene was cloned into a binary vector pCambia2301, under the control of the promoter CaMV35S. Overexpression of this gene can increase drought tolerance in these plants. Genetic transformation was mediated by Agrobacterium tumefaciens EHA 105 containing the binary vector with the gene of interest, in addition to uidA reporter gene (Gus) and the nptII selection gene. Epicotyl segments of in vitro germinated seedlings were inoculated with Agrobacterium, co-cultivated at 24°C for 3 days and then transferred to selection medium and incubated at 28°C, with a photoperiod of 16 h, until shoot development. Transformed explants were selected in vitro and shoots were evaluated by histochemical GUS assay and by PCR, confirming or not the insertion of the gene of interest. Four transgenic plants were obtained with the genetic transformation protocol described herein. Transformed plants were micrografted and later acclimatized in a greenhouse for future studies of gene expression and response to water stress.*

Key-words: Overexpression, DREB, rootstock, *Agrobacterium tumefaciens*, water stress

1 INTRODUÇÃO

Algumas regiões de cultivo no estado de São Paulo apresentam déficit hídrico acentuado. Diante disso, a citricultura se estabeleceu através do uso do porta-enxerto limão Cravo, que apresenta tolerância à seca. Considerando que a seca é uma condição abiótica que afeta o crescimento e a produtividade, a utilização de porta-enxerto tolerante à seca é imprescindível, assim como a diversificação de genótipos nos pomares.

As tangerinas Cleópatra e Sunki são porta-enxertos promissores, pois possuem tolerância ao vírus da tristeza, à xiloporose, ao declínio e à morte súbita, além de outras características agrônomicas favoráveis. Estas duas variedades são as únicas opções para a variedade copa Pêra, porém ambas são suscetíveis à deficiência hídrica (Pompeu Junior, 2005).

Diversos estudos em andamento para elucidação dos mecanismos de tolerância aos estresses abióticos, e que podem resultar no uso de ferramentas moleculares para a engenharia de plantas mais tolerantes ao estresse hídrico, baseiam-se na expressão de genes estresse-específicos. Dentre esses genes encontram-se fatores transcricionais tais como HSF, as famílias



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

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

CBF/DREB e ABF/ABAE (Stockinger et al., 1997; Schöffl et al., 1998; Choi et al., 2000). O fator de transcrição DREB (Dehydration Responsive Element Binding) que interage com *C-repeats/DRE* (A/GCCGAC) e tem um papel importante no controle da expressão de genes induzidos por seca e/ou frio. Alguns exemplos da superexpressão de genes *DREB* em plantas indicam um aumento na tolerância à seca, salinidade e frio (Wang et al., 2008, Liu et al., 2008).

Protocolos de transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* foram estabelecidos para diferentes genótipos de citros, utilizando tecido juvenil, dentre eles podemos citar, variedades de laranja doce (Mendes et al., 2002; Almeida et al., 2003; Li et al., 2009), limão ‘Cravo’ (Almeida et al., 2003), pomelo, tangerina e Kunquat (Duan et al., 2010). No Brasil já existem protocolos de transformação genética que são utilizados rotineiramente por alguns grupos de pesquisa (Mendes et al., 2002; Almeida et al., 2003; Boscariol et al., 2006). No entanto, as tangerinas em geral apresentam baixa eficiência de transformação, quando comparadas ao citrange Carrizo e algumas laranjas, necessitando de frequentes modificações no protocolo de transformação visando aumentar o sucesso na obtenção de plantas transformadas.

A proposta do presente trabalho foi a transformação genética de tangerineira Sunki para a superexpressão do gene *CitDREB*, visando obter um porta-enxerto mais resistente em condição de estresse hídrico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

A agrobactéria contendo o vetor com o gene de interesse foi plaqueada em meio YEP sólido (10 g/L extrato de levedura, 10 g/L de peptona e 5 g/L de NaCl e 15 g/L de ágar, com pH 7,0) contendo os antibióticos rifampicina (50 mg/ml) e canamicina (100 mg/ml) e colocada para crescimento em B.O.D à 28°C, por três dias. Após este período, uma colônia isolada foi inoculada em 50 mL de meio YEP líquido, com os antibióticos já citados acima, e colocada para crescimento overnight, sob agitação constante de 130rpm, a 28°C (pré-inóculo). Após a cultura atingir uma D.O entre 0,8 a 1,0, este inóculo foi centrifugado por 10 minutos, 25°C, e as células bacterianas foram ressuspendidas em meio de cultura MS líquido com acetosseringona (100 µM) e colocado em contato com os explantes.

Epicótilos provenientes de plântulas germinadas *in vitro* de tangerina Sunki (*Citrus sunki* Hort. ex Tan) foram utilizados como explantes após segmentação (segmentos de epicótilo de cerca de 1 cm). Foram utilizados cerca de duzentos explantes em cada experimento de transformação



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

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

genética. Desses, trinta explantes foram utilizados como controles não transformados e o restante foi incubado com a suspensão bacteriana, por 20 minutos. Após este período, os explantes foram secos em papel toalha estéril para retirada do excesso de agrobactéria e, em seguida, transferidos para o meio de co-cultivo, composto pelos sais de MS, 30 g/L de sacarose, 0,1 g/L de inositol, 8 g/L de ágar, 0,1mg/L de ANA, 1mg/L de 2,4D, 1mg/L de BAP e 100µM de acetosseringona, pH 5,8. Após três dias de co-cultivo em B.O.D à 24°C, cerca de 20 explantes foram distribuídos por placa de Petri contendo meio seletivo composto pelos sais de MS, 30 g/L de sacarose, 0,1 g/L de inositol, 6 g/L de ágar, 0,5 mg/L de ANA, 1 mg/L de BAP, 500mg/L do antibiótico cefotaxina e 100 mg/L do antibiótico canamicina e incubados a 28°C, com fotoperíodo de 16 horas, até o desenvolvimento de brotos.

2.2 Confirmação da transformação genética:

2.2.1 Análise de expressão do gene GUS

Uma parte do tecido foliar dos brotos provenientes da transformação genética foi retirada para análise histoquímica do gene Gus (Lacorte, 1998). O tecido foi imerso em solução de X-Gluc e incubado por cerca de 16 horas a 37°C. Após este período, visualmente poderá se observar a coloração azul indicando a ação da enzima GUS sobre o substrato 5-bromo-cloro-3-indolil-β-D-glucuronídeo (X-Gluc) e a expressão do gene introduzido na planta.

2.2.2 Análise por PCR

O DNA dos brotos que foram positivos no teste de Gus foi extraído com o método Doyle & Doyle, 1990. Este DNA foi utilizado para amplificação por reação em cadeia da polimerase com os iniciadores DREB-F e DREB-R, utilizando o seguinte programa: 5 minutos a 95°C, seguidos por 30 ciclos de: 30 segundos a 95°C; 40 segundos a 50°C; 45 segundos a 72°C; e uma extensão final de 72°C por 10 minutos. O produto amplificado (800pb) foi visualizado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio.

2.3 Enraizamento de porta-enxerto

As plantas transgênicas foram enraizadas *in vitro*, em meio MS contendo metade dos sais, 70 g/L sacarose, 0,3 g/L de inositol, 6 g/L de ágar, 0,5 g/L de carvão ativado e acrescido de 5mg/L de AIB (ácido indol butírico) e espermidina (100 µM).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após transformação genética e seleção dos explantes em meio de cultura com a utilização de canamicina, durante o período de formação dos brotos, estes foram regenerados (**Figura 1**). No entanto, a concentração utilizada de canamicina como agente de seleção não impediu o aparecimento de uma alta porcentagem de brotos escapes, resultando em uma baixa eficiência de transformação (**Tabela 1**). A eficiência de transformação foi calculada considerando o número de brotos Gus+/pelo número total de explantes utilizados inicialmente.

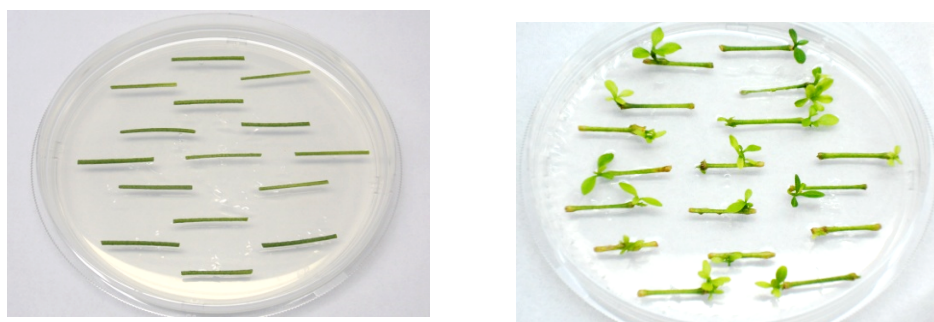


Figura 1. Explantes em placa de Petri contendo meio seletivo com canamicina e brotos regenerados após 60 dias de cultivo.

Tabela 1. Experimentos de transformação genética realizados com tangerina Sunki, número de plantas transgênicas obtidas e eficiência de transformação..

Número de explantes cultivados	Número total de brotos produzidos	Número de brotos GUS +	Número de brotos micro enxertados	Eficiência de transformação (%)
200	8	0	0	0
194	46	2	2	1,0
217	17	0	0	0
213	48	2	2	0,9
204	37	0	0	0
221	63	0	0	0

Após a avaliação dos brotos regenerados no teste histoquímico de GUS, os que apresentaram resultado positivo (coloração azul, **Figura 2**) foram submetidos a uma análise por PCR, pela qual ficou confirmada a obtenção de quatro transgênicos. (**Figura 3**).

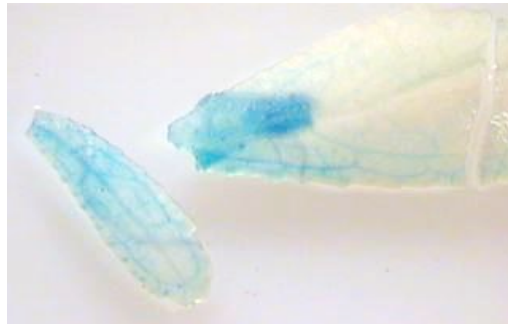


Figura 2. Resultado positivo para o teste histoquímico de GUS.

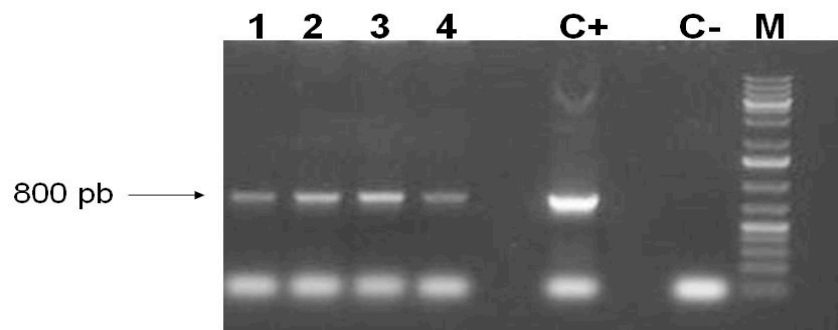
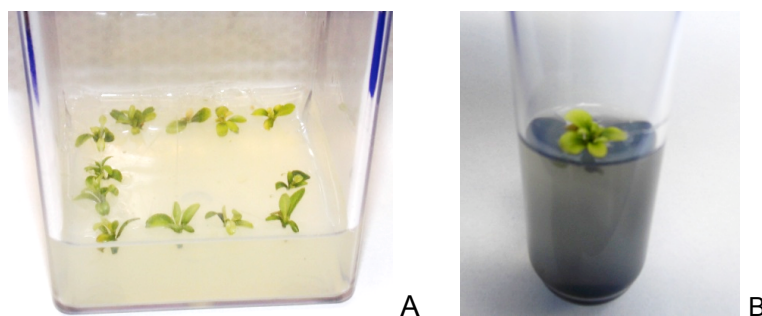


Figura 3. PCR dos brotos positivos para teste de GUS, utilizando primers específicos para identificar o gene *CitDREB*. 1 a 4= brotos positivos para GUS e confirmados com o PCR; C+= controle positivo (plasmídeo com gene clonado), C- = planta não transformada; M= marcador de peso molecular 1Kb.

Posteriormente, os quatro brotos positivos foram transferidos para meio de enraizamento, porém não formaram raiz *in vitro*. Estes foram então microenxertados *in vitro* seguindo o protocolo de Navarro et al. (1974) em porta enxertos de citrange Carrizo. Após o desenvolvimento dos brotos microenxertados eles foram novamente enxertados, *ex vitro*, em porta-enxertos mais vigorosos mantidos em casa de vegetação, o que acelerou o seu crescimento e vigor durante o processo de aclimatização (**Figura 4**).





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

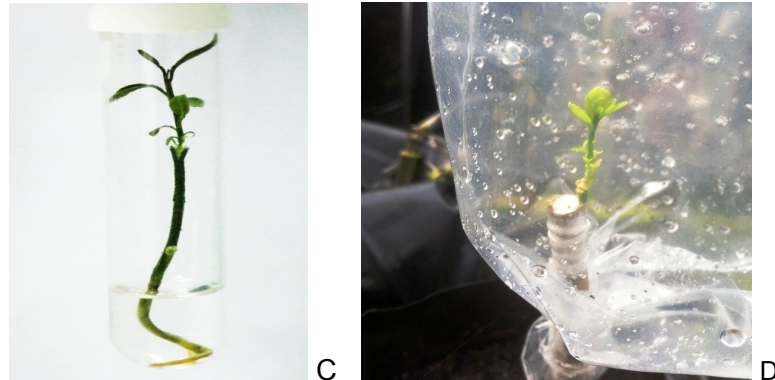


Figura 4. Brotos transformados e brotos de planta controle em processo de enraizamento *in vitro* sem carvão ativado (A), e broto em meio de enraizamento com carvão ativado (B). C= microenxertia *in vitro* do broto transgênico sobre porta enxerto da citrange Carrizo. D= Enxertia *ex vitro* de broto transgênico sobre cavalo de limão Cravo.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho comprovaram a dificuldade em se transformar tangerina Sunki. Contudo, foi possível obter plantas transformadas com uma eficiência de transformação de 1%. A alta ocorrência de brotos escapes interferiu numa melhor eficiência, comprovando a necessidade de ajustes metodológicos, visando uma diminuição na regeneração destes e uma maior eficiência na transformação genética.

As plantas transformadas com o gene *CitDREB* estão em processo de aclimatização em casa de vegetação, para futuros estudos de expressão gênica e estresse hídrico.

5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida. Ao Instituto Agrônomo de Campinas, Centro de Citricultura Sylvio Moreira, pela oportunidade de estágio.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, W.A.B.; Mourão Filho, F.A.A.; Pino, L.E.; Boscarol, R.L.; Rodriguez, A.P.M.; Mendes, B.M.J. Genetic transformation and plant recovery from mature tissues of *Citrus sinensis* L. Osbeck. **Plant Science**, v.164, p.203-211, 2003.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

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

Boscariol-Camargo RL, Berger IJ, Takita MA, Freitas-Astua J, Carlos EF, Machado MA. *In silico* analysis of ESTs from roots of Rangpur lime (*Citrus limonia* Osbeck) under water stress. **Genetics and Molecular Biology**, 30(3), 2007.

Choi, H.I.; Hong, J.H.; Ha, J.; Kang, J.Y.; Kim, S.Y. (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. **J. Biol. Chem.**, 275:1723-1730.

Liu, L., Zhu, K., Yang, Y., Wu, J., Chen, F., Yu, D. (2008) Molecular cloning, expression profiling and trans-activation property studies of a DREB2-like gene from chrysanthemum (*Dendranthema vestitum*) . **J Plant Res** 121:215–226.

Mendes, B.M.J., Boscariol, R.L., Mourão Filho, F.A.A., Almeida, W.A.B. 2002. Agrobacterium-mediated transformation of citrus Hamlin cultivar (*Citrus sinensis* L. Osbeck) epicotyl segments. **Pesq. Agrop. Brasil.** 37:955-961.

Navarro, L.; Roistacher, C.N.; Murashige, T. Improvement of shoot-tip grafting in vitro for virus-free citrus. **American Society for Horticultural Science**, 100: 471-479. 1974.

Pompeu Junior, J. **Porta-enxertos**. In: **MATTOS JUNIOR, D. et al. (ed) Citros**. Instituto Agronômico e Fundag: Campinas, 2005. p.63-104.

Schöffl, F.; Prändl, R.; Reindl, A. Regulation of the heat-shock response. **Plant Physiol.**, 117:1135-1141.1998.

Stockinger, E.J.; Gilmour, S.J.; Tomashow, M.F. Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcription activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, 94:1035-1040. 1997.