



TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DA LARANJA DOCE VISANDO RESISTÊNCIA A PATÓGENOS

Maria Julia Franco da **Cunha**¹; Marcelle Balduino de **Almeida**²; Juliana Freitas **Astúa**³;
Raquel Luciana **Boscariol-Camargo**⁴

Nº14131

RESUMO - A citricultura brasileira, especialmente em São Paulo, vem sofrendo muitas perdas nos últimos anos devido a presença da bactéria *Candidatus Liberibacter spp.*, agente causal do Huanglongbing (HLB). O HLB, também conhecido como greening, causa enormes prejuízos ao citricultor, com a diminuição de área plantada no estado e aumento nos custos de produção, devido ao controle intensivo do psílídeo *Diaphorinacitri*, vetor da doença. Como não há resistência genética descrita em citros, faz-se necessário a utilização de formas alternativas para obter resistência, como por exemplo, a utilização da transformação genética. A partir da identificação de genes potenciais envolvidos na interação citros/HLB, foi clonado o gene *CsiBiP*. *CsiBiP* é uma proteína de ligação pertencente a família multigênica *HSP70* ("heatshockprotein") que foi clonada de *Citrus sinensis*. A expressão de *BiP* em plantas tem sido observada em condições de estresse, tais como, estresse hídrico, nutricional e na interação com patógenos. O objetivo deste projeto foi obter plantas geneticamente modificadas de laranja doce 'Pineapple' que superexpresssem o gene *CsiBiP*, visando resistência a patógenos. O processo foi mediado via *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105, contendo além do gene de interesse, os genes repórter *uid-A* (*Gus*) e de seleção *nptII*. Os epicótilos das plântulas germinadas *in vitro* foram inoculados com *Agrobacterium* e após seleção *in vitro*, os brotos formados foram avaliados pelo teste histoquímico de *Gus* e pela técnica de PCR, confirmando a inserção do transgene na planta. As plantas transgênicas obtidas foram microenxertadas e aclimatizadas em casa de vegetação.

Palavras-chaves: transgenia, citrus, HLB

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Biotecnologia UFSCar, Araras-SP, mariajuliafranco@hotmail.com.br,

2 Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Biotecnologia UFSCar, Araras-SP

3 Colaborador: Pesquisadora EMBRAPA Mandioca e Fruticultura. Cruz das Almas-BA.

4 Orientadora: Pesquisadora do Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, Cordeirópolis-SP. raquel@centrodecitricultura.br



ABSTRACT-*The Brazilian citrus industry, especially in São Paulo, has suffered many losses in recent years due to the presence of the bacterium *Candidatus Liberibacter spp.*, causal agent of Huanglongbing (HLB). HLB, also known as greening, cause huge losses to the growers, with a decrease in planted area in the state and increase in production costs due to intensive control of psilídio *Diaphorinacitri*, vector of the disease. Since there is no genetic resistance described in citrus, it is necessary to use alternative ways for resistance, such as the use of genetic transformation. From the identification of potential genes involved in citrus/HLB interaction, it was cloned the gene *CsiBiP*. *CsiBiP* binding protein is a multigene family belonging to HSP70 ("heatshockprotein") that was cloned from *Citrus sinensis*. The *BiP* expression has been observed in plants under stress conditions such as drought, nutritional and pathogens. The objective of this project was to obtain genetically modified sweet orange 'Pineapple' overexpressing the *CsiBiP* gene for resistance to pathogens. The process was mediated by *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105, containing the gene of interest plus the *uid* reporter gene (*GUS*) and *nptII* selection. Epicotyl's segments from seedlings germinated in vitro were inoculated with *Agrobacterium* and after in vitro selection, the new shoots were evaluated by *Gus* histochemical test and by PCR, confirming the insertion of the transgene. The transgenic plants obtained were micrografted and acclimatized in a greenhouse.*

Key-words: transgenesis, citrus, HLB

1 INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira apresenta números expressivos que traduzem a grande importância econômica e social que a atividade tem para a economia do país, responsável por um faturamento anual da ordem de 1,5 a 2,5 bilhões de dólares, principalmente com exportação de suco concentrado e subprodutos da laranja. No entanto, nos últimos dez anos, pragas e doenças foram responsáveis pela erradicação de 40 milhões de árvores, por perdas de quase 80 milhões de caixas por ano e por um aumento significativo na mortalidade que passou de 4% para 7,5% (Neves et al., 2010). Com isso aumentou a demanda por estudos para desenvolver novas tecnologias e estratégias duradouras para o controle de doenças.

Entre os problemas fitossanitários que afetam a citricultura, os principais fatores bióticos limitantes aos citros incluem bacterioses como a clorose variegada dos citros (CVC), o cancro



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

cítrico, o *huanglongbing* (HLB) e também a leprose, causada pelo vírus CiLV. A necessidade de diversificação genética dos pomares e obtenção de resistência a patógenos, faz com que intensifiquem os programas de melhoramento apoiados em ferramentas de biotecnologia.

Conforme Costa et al. (2007), a transformação genética é considerada uma opção viável para o melhoramento de citros, permitindo a rápida introdução de genes de interesse. Protocolos de transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* foram estabelecidos para diferentes genótipos de citros, utilizando tecido juvenil (Mendes et al., 2002; Boscariol et al., 2006; Reyes et al., 2011). Alguns genes de interesse agrônômico já foram introduzidos em citros com sucesso.

Utilizando um banco de dados de ESTs de citros (CitEST) e também o genoma completo já disponível, foi possível a identificação de vários genes potenciais para serem utilizados em trabalhos de transformação genética visando resistência a diferentes patógenos causadores de importantes doenças em citros. Dentre eles, a expressão de BiP em plantas vem sendo demonstrada em diversas condições bióticas e abióticas de estresse, tais como, estresse hídrico, nutricional, frio, ataque de insetos e patógenos (Anderson et al., 1994; Kalinskiet al., 1995; Fontes et al., 1996; Figueiredo et al., 1997). O conhecimento da função e regulação de BiP, um membro da família HSP70 de proteínas relacionadas com estresse térmico, resultará no desenvolvimento de novas estratégias moleculares para obtenção de plantas tolerantes a condições de estresses do meio ambiente (Carolino et al., 2003).

As proteínas de choque térmico HSPs estão envolvidas na CSR (resposta de estresse celular) e formam o grupo mais conhecido e estudado (Morris et al., 2013). Os membros dessa família de proteínas são divididos em dois grupos distintos: as que são constitutivamente expressas (Hsc70) e aquelas que são induzíveis pelo estresse (HSP70) (Morris et al., 2013). No estudo de Albrecht e Bowman (2012) uma HSP70 foi induzida em plantas tolerantes ao HLB, mas não no genótipo suscetível, indicando uma possível ação na resposta ao patógeno. Assim, esta proteína foi identificada no genoma de citros e clonada para sua super expressão em plantas suscetíveis de laranja doce, para verificar a resposta destas em diferentes interações com patógenos dos citros. A proposta do presente trabalho é a transformação genética de laranja doce variedade 'Pineapple' para a super expressão do gene *CsiBiP*, visando obter plantas resistentes a patógenos.



2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

A agrobactéria contendo o vetor com o gene de *CsiBip* foi plaqueada em meio LB 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 a 28°C, por três dias. Após este período, uma colônia isolada foi inoculada em 50 mL de meio LB 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 O.D entre 0,8 a 1,0, este inóculo foi centrifugado por 10 minutos, 25°C, e as células bacterianas foram ressuspensas 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 laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) variedade 'Pineapple' foram utilizados como explantes, após segmentação (segmentos de 1 cm). Foram utilizados aproximadamente cento e setenta explantes em cada experimento de transformação 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, 6 g/L de ágar, 1mg/L de BAP e 100µM de acetosseringona, pH 5,5. Após três dias de co-cultivo em B.O.D a 24°C, cerca de 25 explantes foram distribuídos por placa de Petri contendo meio seletivo MS já descrito, acrescido de 250 mg/L do antibiótico cefotaxima, 150mg/L de timetin e 100 mg/L de canamicina, sendo mantidos 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. O tecido foi imerso em solução de X-Gluc e incubado por 16 horas a 37°C. Após este período observou-se 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 positivos no teste de Gus foi extraído com método CTAB. Este DNA foi utilizado para a reação de amplificação em cadeia da polimerase com os iniciadores kana-F GAGGCTATTCGGCTATGACTGG e Kana-R ATCGGGAGCGGCGATACCGTA 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 (700 pb) foi visualizado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. Um segundo primer foi utilizado para amplificar o gene CsiBip no mesmo programa já citado. Os primers utilizados nesta amplificação foram: Ubiq-F GCTTTCTCGTGACCTAGTCG e Bip-R CACCAATCAAACGCTAGAA, amplificando um produto de 646 pb.

2.2.3 Microenxertia

As plantas transgênicas foram microenxertadas *in vitro* seguindo o protocolo de Navarro et al. (1974) e posteriormente foram aclimatizadas em casa de vegetação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após transformação genética e seleção dos explantes em meio de cultura com a utilização de canamicina, houve a regeneração de grande número de brotos (Tabela 1). No entanto, a concentração de canamicina utilizada como agente de seleção não impediu o aparecimento de brotos escapes. Apesar disso a eficiência mostrou-se alta em alguns casos, chegando a quase 25% (Tabela 1).

Observou-se entre as transformações, muita oscilação na eficiência, variando de 2,3% até 24,7%. De acordo com as condições de cada transformação, podemos relacionar as variações ao modo de preparação do inóculo, a O.D. inicial e ao meio de cultura utilizado para o cultivo da Agrobactéria. Durante o processo de transformação, foram feitas algumas modificações no protocolo para obter a melhor condição de trabalho. Assim, foram utilizados dois métodos de



preparo de inóculo (direto e com pré-inóculo). A utilização de inóculo direto diminuiu a eficiência da transformação, ao passo que o pré-inóculo aumentou o número de plantas transformadas. O meio de cultura mais comumente utilizado para *Agrobactéria* é o meio YEP, mas depois que este foi substituído pelo meio LB, foi observado um aumento na eficiência de transformação. A utilização de inóculo na densidade ótica (D.O.) acima de 0,7, também influenciou positivamente os resultados. Sendo assim, conclui-se que a melhor condição para transformação genética da variedade 'Pineapple' foi a utilização de pré-inóculo preparado em meio LB, com uma D.O. de 0,7 a 0,8.

Tabela 1. Experimentos de transformação genética realizados com laranja doce 'Pineapple', 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 (%)
145	91	6	3	4,1
88	17	2	2	2,3
141	52	3	1	2,1
162	306	40	21	24,7
157	207	29	6	18,5
171	63	4	4	2,3

Os brotos regenerados e submetidos ao teste histoquímico de GUS apresentaram a coloração azul, característica da inserção do cassete contendo o gene repórter. Estas plantas selecionadas no teste de GUS foram submetidos à análise de PCR, confirmando a presença do gene *CsiBIP* (Figura 1).

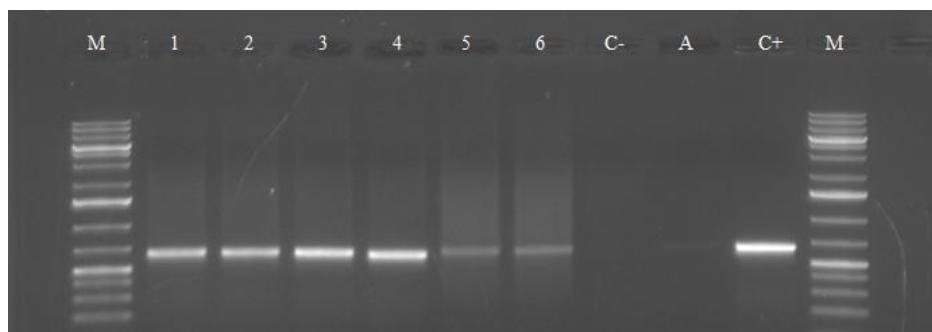


Figura 1. PCR de plantas transgênicas utilizando primers específicos para identificar o gene *CsiBip*. 1 a 6 = brotos positivos para GUS e confirmados com o PCR; C+= controle positivo (*Agrobacterium* transformada), C- = planta não transformada; A= água destilada; M= marcador 1 Kb Plus Fermentas.

Os brotos positivos foram microenxertados *in vitro* em porta-enxertos de citrange Carrizo (Figura 2), e nesta fase foi onde ocorreram as maiores perdas de plantas transformadas. Esta técnica facilita muito o desenvolvimento do broto *in vitro* quando comparada ao enraizamento *in vitro*, e forma brotos mais vigorosos. No entanto, ela depende muito do tipo e idade do porta-enxerto utilizado, do tamanho do broto enxertado, entre outros. Os brotos desenvolvidos após a microenxertia foram novamente enxertados *ex vitro*, em porta-enxertos mais vigorosos, sendo que treze puderem ser aclimatados em casa de vegetação. Estas plantas estão sendo mantidas em casa de vegetação para futuros testes de expressão gênica e de resistência a patógenos.



Figura 2. A= Microenxertia *in vitro* do broto transgênico sobre porta-enxerto citrange Carrizo. B= Enxertia *ex vitro* de broto transgênico sobre porta-enxerto de limão Cravo

4 CONCLUSÃO

A obtenção de brotos transgênicos expressando o gene *CsiBiP* via *Agrobacterium* apresentou variações de eficiência, mas permitiu a obtenção dos brotos transformados. No entanto, algumas plantas tiveram seu desenvolvimento comprometido no período de microenxertia *in vitro* e aclimação em casa de vegetação, resultando no total treze plantas transformadas aclimatadas, as quais poderão ser desafiadas com diferentes patógenos dos citros.

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

- ALBRECHT, U.; BOWMAN, K.D. Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Plant Science**, v. 185-186, p. 118-130, 2012.
- ANDERSON JV, Li QB, HASKELL DW, GUY CL. Structural organization of the spinach endoplasmic reticulum luminal 70-kilodalton heat-shock cognate gene and expression of 70-kilodalton heat-shock genes during cold acclimation. **Plant Physiology**. v.104, p.1395-1370, 1994.
- BOSCARIOL, R.L.; MONTEIRO, M.; TAKARASHI, G.K.; CHABREGAS, S.M.; VIEIRA, M.L.C.; VIEIRA, L.G.E.; PEREIRA, L.F.P.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; CARDOSO, S.C.; CRISTIANO, R.S.C.; BERGAMIN FILHO, A.; BARBOSA, J.M.; AZEVEDO, F.A.; MENDES, B.M.J. Attacin A gene from *Tricloplusiani* reduces susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* cv. Hamlin. **Journal of the American Society for Horticultural Science** v.131, n.4, p.530-536, 2006.
- CAROLINO, S. M. B.; VAEZ, J. R.; IRSIGLER, A. S. T.; VALENTE, M. A. S.; RODRIGUEZ, L. A. Z.; FONTES, E.P.B. Plant BiP gene family: differential expression, stress induction and protective role against physiological stresses. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.15, n.2, p.59-66, 2003.
- COSTA, M. G. C.; OLIVEIRA, M. L. P.; LANI, E. R. G.; OTONI, W. C. Transformação genética de citros. In: A.C. Torres; A.N. Dusi; M.D.M. dos Santos. (Eds.). **Transformação genética de plantas via Agrobacterium: teoria e prática**. 1 ed. Brasília: Embrapa Hortaliças, v. 1, p. 93, 118, 2007.
- FIGUEIREDO JEF, CASCARDO JCM, CAROLINO SMB, ALVIM F, FONTES EPB. Water-stress regulation and molecular analysis of the soybean BiP gene family. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** v.9, p.103-110, 1997.
- FONTES EPB, SILVA CJ, CAROLINO SMB, FIGUEIREDO JEF, BATISTA DPO. A soybean binding protein (BiP) homolog is temporally regulated in soybean seeds and associates detectably with normal storage proteins *in vitro*. **Brazilian Journal of Genetics** v.19, p.306-312, 1996.
- KALINSKI A; ROWLEY DL; LOER DS; FOLEY C; BUTA G; HERMAN EM. Binding-protein expression is subject to temporal, developmental and stress-induced regulation in terminally differential soybean organs. **Plant** v.195, p.611-621, 1995.
- LÓPEZ, C; CERVERA, M; FAGOAGA, C; MORENO, P; NAVARRO, L; FLORES, R; PEÑA, L. Accumulation of transgene-derived siRNAs is not sufficient for RNAi-mediated protection against *Citrus tristeza virus* in transgenic Mexican lime. **Molecular Plant Pathology** v.11, n.1, p. 33–41, 2010.
- MENDES, B. M. J.; BOSCARIOL, R. L.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; ALMEIDA, W. A. B. Agrobacterium-mediated transformation of citrus Hamlin cultivar (*Citrus sinensis* L. Osbeck) epicotyl segments. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v.37, p.955-961, 2002.
- MORRIS, J. P.; THATJE, S.; HAUTON C. The use of stress-70 proteins in physiology: a re-appraisal. **Molecular Ecology** v.22, p.1494–1502, 2013.
- NAVARRO, L.; ROISTACHER, C. N.; MURACHIGE, T. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. **American Society for Horticultural Science**, v.100, p. 471-479, 1974.
- NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. O retrato da Citricultura Brasileira. **CitrusBR**, Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos, Outubro, 2010.