

## COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

# EFICIÊNCIA DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE CITRANGE ‘CARRIZO’ COM DUAS CONSTRUÇÕES GÊNICAS<sup>1</sup>

LUZIA YURIKO MIYATA<sup>2</sup>, FRANCISCO DE ASSIS ALVES MOURÃO FILHO<sup>3</sup>,  
JOÃO ALEXIO SCARPARE FILHO<sup>4</sup>, FLÁVIA ZAMBON<sup>5</sup>, MEIRE MENEZES BASSAN<sup>6</sup>,  
BEATRIZ MADALENA JANUZZI MENDES<sup>7</sup>, RICARDO HARAKAVA<sup>8</sup>

**RESUMO** - Transformação genética é considerada uma importante ferramenta auxiliar no melhoramento genético de plantas cítricas. Entretanto, a eficiência de transformação pode variar em função de diversos fatores, incluindo a própria construção gênica utilizada. Este trabalho buscou avaliar a eficiência de transformação genética de plantas de citrange ‘Carrizo’ [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck] com duas construções gênicas diferentes contendo o gene *uidA* (GUS) sob o controle dos promotores *Arabidopsis thaliana phloem protein 2* (AtPhP2) e *Arabidopsis thaliana sucrose transporter 2* (AtSuT2). Segmentos de epicótilo de plântulas germinadas *in vitro* foram utilizados como explantes. O gene *nptII*, que confere resistência ao antibiótico canamicina, foi utilizado nas construções gênicas como agente de seleção para regeneração de plantas transgênicas. O ensaio histoquímico com X-GLUC foi realizado em todas as brotações regeneradas para verificar a expressão do gene *uidA*. Dos 4.790 segmentos de epicótilo utilizados, registrou-se a regeneração de 366 brotações com reação positiva no ensaio histoquímico, as quais foram enxertadas em porta-enxertos cultivados *in vitro*. Cinco dessas brotações, de cada construção gênica, foram selecionadas para análise da PCR, com primers específicos para amplificação da sequência do gene *uidA*. A inserção do transgene foi confirmada por PCR em todas as brotações selecionadas. A eficiência de transformação e o número de brotos escapes, avaliada pelo teste histoquímico, variaram em função das construções gênicas utilizadas.

**Termos para a indexação:** biotecnologia, *Citrus* spp., cultura de tecidos, gene *uidA* (GUS), melhoramento genético.

## GENETIC TRANSFORMATION EFFICIENCY OF ‘CARRIZO’ CITRANGE WITH TWO GENE CONSTRUCTIONS

**ABSTRACT** – Genetic transformation is considered an important tool to be applied in citrus genetic improvement. However, transformation efficiency may vary according to several factors, including the genetic construction utilized. This study was carried out to evaluate the efficiency of genetic transformation of ‘Carrizo’ citrange [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck], containing two different gene constructions including the *uidA* (GUS) gene controlled by the promoters *Arabidopsis thaliana phloem protein 2* (AtPhP2) and *Arabidopsis thaliana sucrose transporter 2* (AtSuT2). Epicotil segments from *in vitro* germinated seedlings were used as explants. The *nptII* gene, which confers resistance to the kanamycin antibiotic, was used in the constructions as a selection agent to regenerate transgenic plants. X-GLUC histochemical analysis was performed in all regenerated shoots in order to verify the expression of the *uidA* gene. From the 4790 epicotyl segments utilized, 366 shoots had a positive reaction in the histochemical analysis, and were further grafted on *in vitro* grown rootstocks. Five out of these shoots, from each gene construction, were selected to perform PCR analysis, with specific primers for *uidA* gene sequence amplification. All selected plants evaluated by PCR confirmed gene integration. Transformation efficiency and number of non-transformed shoots, evaluated by histochemical analysis, varied among gene constructions utilized.

**Index terms:** biotechnology; *Citrus* spp.; *uidA* gene (GUS); genetic improvement; tissue culture.

<sup>1</sup>(Trabalho 016-10). Recebido em: 04-01-2010. Aceito para publicação em: 27-08-2010.

<sup>2</sup>Aluna de Mestrado, PPG Fitotecnia, ESALQ/USP. Bolsista CNPq. Email: luzaiym@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Eng. Agr., PhD, Prof. Associado, Depto de Produção Vegetal, ESALQ/USP. Piracicaba-SP, Bolsista CNPq. Email: francisco.mourao@usp.br

<sup>4</sup>Eng. Agr., Dr., Prof. Associado (aposentado), Depto de Produção Vegetal, ESALQ/USP. Piracicaba-SP. Bolsista CNPq. Email: jascarpa@esalq.usp.br

<sup>5</sup>Aluna de graduação em Engenharia Agrônoma, ESALQ/USP, Piracicaba-SP. Email: flavia.zambon@usp.br

<sup>6</sup>Aluna de graduação em Engenharia Agrônoma, ESALQ/USP, Piracicaba-SP. Email: meire.bassan@usp.br

<sup>7</sup>Eng. Agr., Dra., Professora Associada, Universidade de São Paulo, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Av. Centenário, 303, C.P. 96, 13409-970, Piracicaba-SP, bolsista CNPq. Email: bmdendes@cena.usp.br

<sup>8</sup>Biólogo, PhD, Pesquisador Científico, Seção de Bioquímica Fitopatológica, Instituto Biológico, Bolsista CNPq. Email: harakava@biologico.sp.gov.br

O melhoramento genético convencional dos citros apresenta limitações relacionadas à sua biologia reprodutiva. Dessa forma, a maioria das cultivares existentes nas principais regiões citrícolas do mundo é proveniente de seleções ou de mutações somáticas espontâneas (CERVERA et al., 2008; DUTT; GROSSER, 2009).

A utilização de instrumentos biotecnológicos, a exemplo da fusão de protoplastos, genética molecular e a transformação genética de plantas em programas de melhoramento de citros possibilitam a utilização da variabilidade genética disponível, além de viabilizar a utilização do germoplasma ainda não explorado, podendo gerar novas combinações a serem incluídas em programas de melhoramento convencional, ou resultar em novas cultivares. Embora a transformação genética seja uma importante ferramenta auxiliar no melhoramento de citros, sua eficiência pode variar em função de diversos fatores, incluindo a própria construção gênica utilizada.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de transformação genética de citrange 'Carrizo', via *Agrobacterium tumefaciens*, contendo o gene *uidA* (GUS) sob o controle dos promotores específicos para expressão gênica nos tecidos do floema *Arabidopsis thaliana phloem protein 2* (AtPhP2) e *Arabidopsis thaliana sucrose transporter 2* (AtSuT2).

Segmentos de epicótilo (0,8-1,0 cm), obtidos a partir de plântulas previamente germinadas e estioladas *in vitro*, provenientes de sementes de frutos maduros de citrange 'Carrizo' [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck], foram utilizados como explantes nos experimentos de transformação genética.

As construções gênicas utilizadas foram AtPhP2-GUS, contendo o gene *uidA*, sob o controle do promotor *Arabidopsis phloem protein 2*, e AtSuT2-GUS contendo o gene *uidA* (GUS) sob o controle do promotor *Arabidopsis sucrose transporter 2*. Essas construções foram preparadas no plasmídeo pCAMBIA2201, utilizado na transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*, e contendo promotores derivados de genes preferencialmente expressos no floema.

Colônias de *Agrobacterium tumefaciens* contendo os referidos plasmídeos foram cultivadas em meio YEP sólido contendo os antibióticos canamicina (100 mg.L<sup>-1</sup>) e rifampicina (50 mg.L<sup>-1</sup>), em placas de Petri (90 x 15 mm). Após esse período, duas colônias da bactéria foram transferidas para 50 ml de meio YEP líquido acrescido dos antibióticos canamicina (100 mg.L<sup>-1</sup>) e rifampicina (50 mg.L<sup>-1</sup>), e cultivadas em erlenmeyers de 250 ml, a 160 rpm e

a 28°C. Após crescimento, solução bacteriana com concentração entre 5 x 10<sup>8</sup> e 5 x 10<sup>9</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> foi transferida para tubos (Falcon®, 50 mL) e centrifugada por 20 minutos, a 4.800 rpm, a 20 °C. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e o precipitado formado foi ressuspenso em meio MS líquido (MURASHIGE; SKOOG, 1962), ajustando-se a concentração para 5 x 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, para ser utilizada na transformação genética.

As plântulas germinadas *in vitro* foram seccionadas para a obtenção dos explantes e acondicionadas em placa de Petri (60 x 15 mm) contendo meio de cultura MS líquido, suplementado com 25 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e pH ajustado para 5,2. Em seguida, a solução de meio MS líquido foi retirada com o auxílio de uma pipeta de Pasteur estéril, adicionando-se a suspensão bacteriana. O material foi incubado por 10 minutos à temperatura ambiente. Após esse procedimento, a suspensão bacteriana foi retirada com auxílio de pipeta de Pasteur estéril, e os explantes foram secos em folha de papel absorvente estéril. Os explantes foram transferidos para placas de Petri (90 x 15 mm) contendo o meio de cultura MT (MURASHIGE; TUCKER, 1964), suplementado com 25 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 8 g.L<sup>-1</sup> de ágar, pH 5,8, acrescido de 1 mg.L<sup>-1</sup> de benzilaminopurina (BAP), e cultivados por 2 dias (cocultivo) a 24 °C em ausência de luz. Após cocultivo, os explantes foram transferidos para meio de cultura MT suplementado com sacarose (25 g.L<sup>-1</sup>), ágar (8 g.L<sup>-1</sup>), BAP (1 mg.L<sup>-1</sup>), canamicina (50 mg.L<sup>-1</sup>) e cefatoxima sódica (500 mg.L<sup>-1</sup>), e pH ajustado para 5,8. Os explantes foram subcultivados a cada 15 dias, por um período de 60 dias, quando o material foi transferido para a sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas de luz e a 27°C.

Os brotos obtidos foram subcultivados até atingirem 1 cm de comprimento, quando foram enxertados em plântulas de laranja 'Hamlin' [*C. sinensis* (L.) Osbeck] germinados e estiolados *in vitro*. Nesse momento, também foi retirada uma amostra do material vegetal para realização de ensaio histoquímico com a solução de X-GLUC (5-bromo-4-cloro-3-indolil glucuronida). Apenas o material que apresentou reação positiva (coloração azul) foi mantido e subcultivado em tubos de ensaio (25 x 125 mm) contendo 30 mL de meio de cultura MT, por 40 dias. Após a cicatrização dos ferimentos da enxertia *in vitro*, as plântulas foram aclimatizadas em vasos plásticos (500 mL) contendo substrato esterilizado (Plantmax™).

A confirmação da transformação genética foi realizada por PCR com primers que amplificaram fragmento de DNA correspondente ao gene *uidA* (GUS), cuja sequência é a seguinte: F: 5' CAA CGA

ACT GAA CTG GCA - 3'; R: 5'CAT CAC CAC GCT TGG GTG - 3'. Amostras de folhas jovens foram coletadas para extração de DNA, pelo método de CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990) de plantas transformadas. Como controle positivo, utilizou-se o DNA de plasmídeo utilizado para a clonagem das construções. DNA de plantas não transformadas funcionaram como controle negativo. As reações foram realizadas em termociclador, utilizando-se de 1 ciclo a 94°C, por 2 min, para a primeira desnaturação, seguida por 30 ciclos a 94°C, por 30 segundos, a 60°C por 30 segundos e a 72°C por 2 min 30 s, e um ciclo final a 72°C, por 4 minutos. Os produtos obtidos na reação de PCR foram submetidos à separação por eletroforese em gel de agarose a 1%, com solução tampão TBE (0,5%), a 85 V. Os géis foram corados com brometo de etídeo e, posteriormente, visualizados e fotografados em luz UV.

Cada experimento foi repetido 10 vezes, resultando em 20 experimentos de transformação genética. Dessa forma, na realização dos trabalhos de transformação genética, foram utilizados 4.790 segmentos de epicótilo, que regeneraram 366 brotos GUS positivos. Os resultados revelaram que plantas de citrange 'Carrizo' foram transformadas com as construções gênicas contendo os promotores AtPhP2 e AtSuT2 (Tabela 1).

Trabalhos têm sido realizados para o estabelecimento de um protocolo eficiente de transformação genética em plantas cítricas. Entretanto, a eficiência de transformação é variável em função de diversos fatores, tais como: condições de incubação das plantas para coleta do explante, tempo de incubação dos explantes com *Agrobacterium tumefaciens*, condições de cocultivo, espécies e variedades cítricas utilizadas na transformação e idade ou maturação do tecido (DUTT; GROSSER, 2009; BOSCARIOL et al., 2006; MENDES et al., 2002, 2009; ALMEIDA et al., 2003).

Neste trabalho, a eficiência de transformação genética variou de 6,05% a 8,31%, com base nos dados coletados a partir dos ensaios histoquímicos de GUS, no momento da enxertia *in vitro* (Tabela 1). Dutt e Grosser (2009) registraram valores de eficiência de transformação entre 15% e 47% em experimentos envolvendo citrange 'Carrizo'. Por outro lado, Yu et al. (2002) observaram até 80% de eficiência de transformação para essa cultivar.

Muitas cultivares de citros têm sido transformadas com relativa facilidade, enquanto outras têm mostrado eficiência muito baixa, ou até mesmo se mostram recalcitrantes ao processo de transformação. Portanto, a variação na eficiência de transformação

entre genótipos de citros é comum, sendo encontrados valores de 0,52% a 80,0% para citrange 'Carrizo' (MOORE et al., 1992; PEÑA et al., 1995a; DUTT; GROSSER, 2009; YU et al., 2002), de 10% a 20% para laranja-azedo (DOMÍNGUEZ et al., 2000; PENA et al., 1997), 3,6% para a transformação de pomelo (YANG et al., 2000) de 7,6% para laranja 'Pineapple' (PEÑA et al., 1995a).

Outro fator relacionado à dificuldade de obtenção de plantas transgênicas é o aparecimento de brotos escapes, ou seja, brotos regenerados, mas não transformados. Os resultados obtidos neste trabalho mostram alta frequência de brotos escapes, em especial para a construção contendo o promotor AtSuT2 (Tabela 1). Em trabalhos de transformação genética de laranja 'Pineapple', Peña et al. (1995a) obtiveram até 92% de brotos escapes. O mesmo foi observado por Moore et al. (1992), que relataram mais de 95% de brotos escapes regenerados de citrange 'Carrizo', citrumelo 'Swingle' e lima-ácida 'Galego'.

Diversos trabalhos têm sido desenvolvidos visando à diminuição da regeneração de brotos escapes no processo de transformação genética de citros, incluindo o cocultivo na ausência de luz para favorecer a formação de calos e a regeneração de gemas adventícias por organogênese indireta, posicionamento do explante inoculado na placa contendo meio de cultura com canamicina (YANG et al., 2000) e aumento do tempo de exposição dos explantes ao agente de seleção (PEÑA et al., 1995b). No entanto, neste trabalho, a utilização de canamicina durante o período de formação dos brotos não impediu o aparecimento de uma alta porcentagem de brotos escapes. A ocorrência de brotos escapes na transformação genética de plantas pode ser explicada pela ineficiência do agente de seleção ou, ainda, pela proteção de células não transformadas pelas células transformadas (GHORBEL et al., 1999).

Para a amplificação das sequências dos promotores estudados, foram realizadas reações de PCR para amplificação da sequência do gene *uidA* (GUS), utilizando-se de primers específicos para a identificação da inserção do DNA exógeno em cinco plantas transformadas com cada construção. Todas as cinco plantas de citrange 'Carrizo' transformadas com as construções contendo os promotores AtPhP2 e AtSuT2, confirmadas inicialmente pelo ensaio de GUS, foram reconfirmadas como transgênicas por PCR.

Os resultados deste trabalho indicam que a eficiência de transformação genética de citros, bem como a porcentagem de brotos escapes, são

variáveis em função da construção utilizada. o padrão de expressão do gene *uidA* (GUS) sob Análises complementares deverão confirmar controle dos promotores.

**TABELA 1** - Transformação genética de citrange 'Carrizo' com os vetores de transformação pCAMBIA2201/AtPhP2 e pCAMBIA2201/AtSuT2.

Promotor	Nº de explantes responsivos/ nº total de explantes introduzidos*	Brotos GUS <sup>+</sup> / Brotos avaliados*	Taxa de brotos escapes (%)**	Eficiência de transformação (%) **
AtPhP2	134/2700	163/183	9,37***	6,05***
AtSuT2	279/2090	203/393	39,23***	8,31***
Total	413/4790	366/576		

\*Número ao final de 10 experimentos.

\*\*A eficiência de transformação foi obtida dividindo-se o número de brotos GUS positivos obtidos ao final do processo, pelo número de explantes transformados e multiplicados por 100, para obter o dado em porcentagem.

\*\*\* Média ao final de 10 experimentos.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, W.A.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; PAVAN, A.; RODRIGUEZ, A.P.M. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus sinensis* and *Citrus limonia* epicotyl segments. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.60, n.1, p.23-29, 2003.
- BOSCARIOL, R.L.; MONTEIRO, M.; TAKAHASHI, 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.; CHRISTIANO, R.S.C.; BERGAMIN FILHO, A.; BARBOSA, J.M.; AZEVEDO, F.A.; MENDES, B.M.J. *Attacin A* gene from *Tricloplusia ni* reduces susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* cv. Hamlin. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.131, n.4, p.530-536, 2006.
- CERVERA, M.; NAVARRO, A.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Production of transgenic adult plants from clementine mandarin by enhancing cell competence for transformation and regeneration. **Tree Physiology**, Victoria, v.28, n.1, p.55-66, 2008.
- DOMÍNGUEZ, A.; GUERRI, J.; CAMBRA, M.; NAVARRO, L.; MORENO, P.; PEÑA, L. Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.19, n.4, p.427-433, 2000.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v.12, p.13-15, 1990.
- DUTT, M.; GROSSER, J.W. Evaluation of parameters affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus. **Plant Cell, Tissue Organ and Culture**, Dordrecht, v.98, p.331-340, 2009.
- GHOBEL, B.R.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. *Green fluorescent protein* as a screenable marker to increase the efficiency of generating woody fruit plants. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.99, p.350-358, 1999.
- MENDES, B.M.J.; CARDOSO, S.C.; BOSCARIOL-CAMARGO, R.L.; CRUZ, R.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; BERGAMIN FILHO, A. Reduction in susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* expressing the rice *Xa21* gene. **Plant Pathology**, Brisol, v.59, n.1, p.68-75, 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3059.2009.02148.x/full>>. Acesso em: 11 ago. 2009.
- MENDES, B.M.J.; BOSCARIOL, R.L.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; ALMEDA, W.A.B. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of 'Hamlin' sweet orange. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, p.955-961, 2002.
- MOORE, G.A.; JACONO, C.C.; NEIDIGH, J.L.; LAWRENCE, S.D.; CLINE, K. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.11, p.238-242, 1992.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.

MURASHIGE, T.; TUCKER, D.P.H. Growth factor requirement of citrus tissue culture. **Proceedings of the First International Citrus Symposium**, Riverside, v.3, p.1155-1169, 1969.

PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, A.; PINA, J.A.; NAVARRO, L. Genetic transformation of lime (*Citrus aurantifolia* Swing): factors affecting transformation and regeneration. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.16, p.731-737, 1997.

PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; PINA, J.A.; DURÁN-VILLA, N.; NAVARRO, L. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.14, p.183-191, 1995a.

PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; ORTEGA, C.; PINA, J.A.; DURÁN-VILLA, N.; NAVARRO, L. High efficiency *Agrobacterium*-mediated of sweet orange and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.14, p.616-619, 1995b.

YANG, Z.N.; INGELBRECHT, I.L.; LOUZADA, E.; SKARIA, M.; MIRKOV, T.E. *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important grapefruit cultivar Rio Red (*Citrus paradisi* Macf.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v.19, n.12, p.1203-1211, 2000.

YU, C.; HUANG, S.; CHEN, C.; DENG, Z.; LING, P.; GMITTER Jr., F.G. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of sweet orange and citrange. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.71, n.2, p.147-155, 2002.