



## EXPRESSÃO COMPARATIVA DO GENE GUS COM DOIS DIFERENTES PROMOTORES EM CITROS TRANSGÊNICOS

MARINA C. PELUCI<sup>1</sup>; VALDENICE M. NOVELLI<sup>2</sup>; POLYANA  
K.MARTINS<sup>3</sup>; LARISSA C. D. DA SILVA<sup>4</sup>; JULIANA FREITAS-ASTÚA<sup>5</sup>

Nº 12106

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi comparar a expressão do gene repórter *uidA*(GUS), realizando-se para isso a transformação genética, via *Agrobacterium tumefaciens*, de plantas de citros (citrange "Carrizo") utilizando duas construções gênicas, sendo uma delas com promotor constitutivo, amplamente empregado em transgenia, e outra com promotor floema-específico, isolado e caracterizado pelo nosso grupo, para confirmar a especificidade deste promotor. Segmentos de epicótilo de plântulas germinadas *in vitro* foram utilizados como explantes. Os explantes foram inoculados com o inóculo contendo a bactéria com a construção gênica. Os explantes foram co-cultivados em meio contendo acetoseringona por 3 dias a 24°C, no escuro, e posteriormente transferidos para meio MS suplementado com canamicina e mantidos no escuro por aproximadamente 2 semanas a 28°C. Após esse período, as placas com os explantes foram colocadas sob a luz, e o meio foi trocado a cada 3-4 semanas, até os explantes começarem a formar brotos adequados para realizar o teste histoquímico com X-GLUC. A transformação dos explantes foi confirmada através do teste histoquímico e as taxas de eficiência de transformação encontradas foram 2,3% para o promotor floema-específico e 3,1% para o promotor constitutivo. A expressão do gene *uidA* utilizando a construção com o promotor floema-específico evidenciou preferência ao floema, confirmando a hipótese de que o promotor isolado era específico para essa região.

1 Bolsista CNPq: Graduação em Biotecnologia, UFSCar, Araras-SP, marinapeluci@yahoo.com.br

2 Orientadora: Pesquisadora, Centro APTA Citros "Sylvio Moreira" – IAC, Cordeirópolis-SP.

3 Colaboradora: Pesquisadora, Centro APTA Citros "Sylvio Moreira" – IAC, Cordeirópolis-SP.

4 Colaboradora: Graduação em Ciências Biológicas, UFSCar, Araras-SP.

5 Colaboradora: Pesquisadora EMBRAPA Mandioca e Fruticultura/Centro APTA Citros "Sylvio Moreira" – IAC. Cordeirópolis-SP



## ABSTRACT

Genetic transformation appears to be an important tool for genetic improvement, including for citrus, bypassing the difficulties encountered when using classical breeding, due to natural barriers of the genus. The objective of this study was to compare the gene expression of the reporter gene *uidA* (GUS), through genetic transformation of citrus (citrange "Carrizo") using *Agrobacterium tumefaciens* plant using two gene constructs, one of them with constitutive promoter, widely used in citrus breeding, and another one with phloem-specific promoter, isolated and characterized by our group, to confirm its tissue-specificity. Epicotyl segments of seedlings germinated in vitro were used as explants. Explants were inoculated with the pre-inoculum containing *Agrobacterium* cells with the construct. The explants were co-cultured in medium containing acetosyringone, and cultured for 3 days at 24 ° C in the dark, and then cultured on MS medium for selection, grown for 2 weeks at 28 ° C in the dark. After this period the plates with the explants were placed under the light, and the medium was changed every 3-4 weeks. The transformation of the explants was confirmed using the GUS histochemical test and the rates of transformation efficiency found were 2.3% for the phloem-specific promoter and 3.1% for the constitutive promoter. The *uidA* gene expression using the construction with the phloem-specific promoter was restricted to the phloem, confirming the hypothesis that the isolated promoter was specific for this region.

## INTRODUÇÃO

Plantas cítricas do gênero *Citrus*, da família Rutaceae, tem origem no sudeste do continente asiático, com ramos filogenéticos que se estendem do centro da China ao Japão e do leste da Índia à Nova Guiné, Austrália e África tropical (REIS et al., 2009).

O Brasil é hoje o maior exportador de suco de laranja, e a citricultura comercial gera cerca de 500 mil empregos diretos e indiretos. De acordo com a FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations), em 2007, o Brasil detinha aproximadamente 29% da produção mundial e 21% da área plantada no mundo, com 18,5 milhões de toneladas por ano e 821 mil hectares, respectivamente (REIS et al., 2009).

O HLB é uma das mais severas e destrutivas doenças de citros, com prejuízos no desenvolvimento da planta (clorose, queda de folhas, redução de crescimento e do sistema radicular) e na produção de frutos (deformação, aborto de



sementes, queda acentuada e redução de crescimento). O agente causal (bactéria *Candidatus liberibacter* spp.) multiplica-se nos vasos do floema e é transmitida pela *Diaphorina citri*, um psílídeo comum nos pomares (Bovè, 2006).

O controle da doença baseia-se no uso de material propagativo sadio, controle químico do vetor e erradicação das plantas infectadas, acarretando perdas e prejuízos para o produtor e para o agronegócio. Uma vez infectadas, não existem métodos eficientes para a cura da doença nas plantas. Portanto, uma forma de controle mais duradoura desta doença baseia-se no melhoramento genético do citros, através de variedades resistentes ou tolerantes, o que pode ser possível com a utilização de técnicas de transformação genética.

Há muitos anos, plantas cultivadas vêm sendo manipuladas geneticamente pelo homem, por meio do melhoramento clássico. Características fenotípicas de interesse, determinadas por genes, são transferidas à progênie, através de cruzamentos. No entanto, esses métodos convencionais de melhoramento esbarram em uma série de problemas, como a redução do pool gênico, a ligação gênica e a incompatibilidade sexual, além do tempo gasto necessário para se transferirem caracteres desejáveis para cultivares de interesse que podem durar décadas em espécies bienais e em perenes ou em espécies altamente heterozigotas. Atualmente, o melhoramento genético pode recorrer às técnicas de engenharia genética (BRASILEIRO; CARNEIRO, 1998).

A combinação de técnicas de biologia molecular, cultura de tecidos e transferência de genes representa uma ferramenta poderosa para introduzir novas características em uma determinada planta. Genes oriundos de diferentes espécies vegetais, animais ou de micro-organismos podem ser introduzidos de forma controlada em um genoma vegetal receptor, de modo independente da fecundação. O gene responsável pela característica de interesse deve ser caracterizado e isolado dos demais genes do genoma. De posse do gene, ele será então caracterizado e introduzido em vetores para transformação de plantas (BRASILEIRO; CARNEIRO, 1998).

Ferramentas biotecnológicas podem ser uma opção para que as limitações relacionadas à biologia reprodutiva dos citros, que dificultam a obtenção de variedades melhoradas através de métodos convencionais de melhoramento, sejam superadas. Maiores possibilidades de sucesso no melhoramento dos citros podem ser conseguidas pelo desenvolvimento de programas que associem essas novas técnicas ao melhoramento convencional (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990).



Desta forma, a transformação genética surge como uma ferramenta de grande importância e com potencial significativo para incrementar os programas de melhoramento de citros, pois podem ser utilizados como alternativa para introdução de genes de interesse agrônômico, incluindo aqueles que conferem resistência a doenças, mantendo-se as características originais e também evitando a transferência de características indesejáveis (FEBRES et al., 2003).

Existem diversas técnicas utilizadas para a transformação genética de plantas, entre elas as técnicas diretas, como a eletroporação de protoplastos e a biobalística, que irão provocar alterações nas paredes e membranas celulares, e que utilizam-se de processos físicos ou químicos; e entre as técnicas indiretas a mais utilizada é a intermediada por *Agrobacterium tumefaciens*, que é uma bactéria tipicamente de solo, Gram-negativa, aeróbica, em forma de bacilo, pertencente à família Rhizobiaceae (ANDRADE, 2003). As agrobactérias (*Agrobacterium* spp.) ocorrem em quase todos os tipos de solos, cultivados ou não, onde são geralmente encontradas nas galhas ou em estreita associação com raízes ou no solo adjacente às plantas (BRASILEIRO; CARNEIRO, 1998). Sua importância para os estudos de transformação de plantas reside na capacidade natural que esses patógenos possuem de introduzir DNA em plantas hospedeiras, permitindo a expressão de genes desejados, uma vez que esses foram introduzidos no material vegetal da bactéria.

É essencial para a transformação genética o uso de promotores, os quais irão iniciar a transcrição, expressando os caracteres desejados nas plantas. Dentre os promotores temos os constitutivos, que serão expressos em toda a planta, como por exemplo, o promotor CaMV35S, isolado do vírus do mosaico da couve-flor; e os tecido-específicos, que serão expressos apenas em regiões pré-estabelecidas, como o a região promotora isolada e caracterizada pelo nosso grupo, que provavelmente, possui expressão específica no floema.

Promotores floema-específicos têm grande importância, pois podem direcionar a expressão de algum gene candidato diretamente em contato com patógenos que habitam esse tecido dos citros, como *Ca. Liberibacter* spp. e o vírus da tristeza dos citros, causadores do *huanglongbing* (HLB) e tristeza, respectivamente. Dessa forma, a seleção de promotores tecido-específicos e genes candidatos pode auxiliar na obtenção de citros transgênicos resistentes ou tolerantes a algumas das principais doenças da cultura.

O objetivo deste trabalho foi comparar a expressão do gene repórter *uidA*(GUS), realizando-se para isso a transformação genética, via *Agrobacterium*

*tumefaciens*, de plantas de citros (citrange “Carrizo” – *Poncirus trifoliata* (L.) Raf X *Citrus sinensis* (L.) Osbeck) utilizando-se duas construções gênicas, com dois diferentes promotores. Ambas as construções possuem o gene *nptII*, que codifica a enzima neomicina fosfotransferase II, conferindo resistência ao antibiótico canamicina, sendo este o agente de seleção utilizado.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Desinfestação e introdução das sementes

As sementes de citrange “Carrizo” foram lavadas para desinfestação superficial inicialmente com álcool 70%, para quebra da tensão superficial, e em seguida tratadas com solução comercial de hipoclorito de sódio diluído em água destilada, para uma concentração de 30% (v/v). A essa solução foram adicionadas 3 gotas de Tween 20, ficando sob agitação por 45 minutos. Posteriormente, as sementes foram lavadas com água e descascadas. As sementes foram tratadas novamente com hipoclorito de sódio diluído em água destilada, na mesma concentração, por vinte minutos. As sementes foram então lavadas três vezes com água destilada autoclavada e sob fluxo laminar. Após a desinfestação, as sementes foram introduzidas duas a duas em tubos de ensaio contendo meio MS (Murashige & Skoog, 1962) sólido  $\frac{1}{2}$  força (sacarose  $30\text{ g L}^{-1}$ , MS  $2,2\text{ g L}^{-1}$ , ágar  $8\text{ g L}^{-1}$ ). As sementes foram armazenadas no escuro por aproximadamente 3 a 4 semanas para germinação e depois expostas à luz, sob fotoperíodo de 16h, por 1-2 semanas.

### Preparo do pré-inóculo

*Agrobacterium tumefaciens* cepa EHA105, contendo o plasmídeo pCAMBIA2301 com o promotor 35SCaMV ou o promotor específico, previamente conservadas em solução de glicerol 50% a uma temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ , foram estriadas em placas contendo meio YEP sólido (extrato de levedura  $10\text{ g L}^{-1}$ , NaCl  $5\text{ g L}^{-1}$ , peptona  $10\text{ g L}^{-1}$  e ágar  $15\text{ g L}^{-1}$ ) suplementado com canamicina ( $100\text{ mg L}^{-1}$ ) e rifampicina ( $50\text{ mg L}^{-1}$ ) e acondicionadas a  $28^{\circ}\text{C}$  *overnight* para obtenção de colônias isoladas. Para o preparo do pré-inóculo uma colônia isolada da bactéria foi transferida para meio YEP líquido (50 mL) com a mesma composição, e incubado em agitador rotacional ( $28^{\circ}\text{C}/ 185\text{ RPM}$ ), *overnight*. Posteriormente 2mL deste pré-inóculo foi adicionado à 48 mL de meio YEP fresco e incubado por 3 horas à  $28^{\circ}\text{C}$  com agitação de 185 rpm.

### **Transformação de citros (via *Agrobacterium tumefaciens*)**

Epicótilos de citrange ‘Carrizo’ foram utilizados como explantes para transformação genética. Os explantes foram incubados em suspensão bacteriana por 10 minutos, e em seguida secos em papel de filtro autoclavado, para remover o excesso de bactéria dos explantes. Os explantes foram então acondicionados em placas contendo meio MS sólido de co-cultivo (sacarose 30g L<sup>-1</sup>, MS 4,4 g L<sup>-1</sup> e ágar 8 g L<sup>-1</sup>) suplementado com acetoseringona (0,1 mM). Como controle positivo de regeneração, explantes que não foram infectados pela bactéria foram cultivados em meio MS sólido suplementado com BAP (1mg L<sup>-1</sup>); e em meio MS sólido suplementado com canamicina (75 mg L<sup>-1</sup>), timentim (150 mg L<sup>-1</sup>), cefotaxima sódica (150 mg L<sup>-1</sup>) e BAP (1mg L<sup>-1</sup>) como controle negativo, ou seja, explantes que não foram expostos à bactéria, e conseqüentemente não possuem o gene de resistência à canamicina, não poderão regenerar no meio contendo tal antibiótico.

Os explantes foram incubadas por 3 dias, em ausência de luz, à temperatura de 24°C. Após esse período os mesmos foram transferidos para meio MS sólido suplementado com canamicina (75mg L<sup>-1</sup>), timentim (150mg L<sup>-1</sup>), cefotaxima sódica (150mg L<sup>-1</sup>) e BAP (1mg L<sup>-1</sup>) – exceto os controles, que foram mantidos nos respectivos meios – e incubados por aproximadamente duas semanas, em ausência de luz, à temperatura de 28°C.

### **Detecção da atividade do gene uidA (GUS) pelo ensaio histoquímico**

Para o teste histoquímico folhas de brotos regenerados foram incubadas em solução de X-GLUC (5-bromo-4cloro-3-indolil glucuronida), à temperatura de 37°C, no escuro, por 16 h. Após a remoção das folhas, os brotos foram acondicionados em Magenta® contendo meio RMG (MS 4,4 g L<sup>-1</sup>, MES 0,5 g L<sup>-1</sup>, sacarose 30 g L<sup>-1</sup>, ágar 8 g L<sup>-1</sup>; suplementado com 1mg L<sup>-1</sup>GA<sub>3</sub> e 300mg L<sup>-1</sup> timentim), para posterior micro-enxertia dos brotos que se mostraram positivos. As amostras foram então lavadas com solução de etanol e ácido acético (3:1), para retirada da clorofila, facilitando a visualização da reação pela presença da coloração azul das amostras. As amostras positivas foram armazenadas em glicerol 50%.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Dos 126 explantes usados para transformação genética com a construção contendo o promotor específico, três brotos regenerados foram positivos com expressão do gene *GUS* preferencial pelo floema (Figura 1A). Para a construção com

o promotor constitutivo, a expressão do gene *GUS* foi positiva para seis brotos dos 188 explantes submetidos à transformação (Figura 1B). Portanto, a região promotora isolada, clonada e testada para expressão de genes tecido-específica mostrou ter preferência de expressão no local desejado, o floema.



**FIGURA 1.** Comparação entre padrão de expressão de GUS obtida com as duas construções testadas. A) Promotor floema-específico, B) Promotor constitutivo.

Além disso, as eficiências de transformação obtidas com os dois promotores foram próximas 2,3 e 3,1%, respectivamente. Em trabalhos realizados por Miyata (2011), a cultivar citrange ‘Carrizo’ mostrou ser um dos genótipos com maior facilidade de regeneração de plantas geneticamente transformadas, apresentando as maiores médias de eficiência de transformação e menores porcentagens de brotos escapes, independentemente da construção utilizada. Resultados superiores de eficiência de transformação para citrange ‘Carrizo’ foram obtidos por Dutt e Gosser (2009), que registraram valores de 15% a 47% em experimentos de estabelecimento de protocolo de transformação genética de citros.

## CONCLUSÃO

Este trabalho teve como objetivo comparar a expressão genética do gene repórter *uidA(GUS)*, utilizando-se duas construções gênicas, com dois diferentes promotores. O promotor floema-específico mostrou uma preferência por expressar-se no floema, o que era esperado. Além disso, a taxa de eficiência de transformação obtida com a construção contendo o promotor floema-específico foi próxima à taxa de eficiência de transformação quando se utiliza o promotor constitutivo.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBITI, pela bolsa concedida.

Ao IAC – CCSM, pela oportunidade de estágio.



## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, G. M. de; SARTORETTO, L. M.; BRASILEIRO, A. C. M.. **Biologia molecular do processo de infecção por *Agrobacterium spp.*** Fitopatologia Brasileira., Brasília, v.28, n.5, p. 465-476, 2003.
- BOVÉ, J.M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal Plant Pathology**, Bari, v.88, n.1, p. 7-37, 2006.
- BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (Eds.). **Manual de Transformação Genética de Plantas**. EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-Cenargen, Brasília-DF, p.143-154, 1998.
- FEBRES, V. J.; NIBLETT, C. L.; LEE, R. F.; MOORE, G.A. Characterization of grapefruit plants (*Citrus paradise* Macf.) transformed with citrus tristeza clostovirus genes. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.21, n. 5, p. 421-428, 2003.
- GROSSER, J.W.; GMITTER JÚNIOR, F.G.. Protoplast fusion and citrus improvement. **Plant Breeding Reviews**, New York, v.8, p.339-374, 1990.
- MIYATA, L.Y., MOURÃO FILHO, F.A.A., SCARPARE FILHO, J.A., ZAMBON, F., BASSAN, M.M., MENDES, B.M.J., HAKAKAVA, R. Eficiência de transformação genética de citrange 'Carrizo' com duas construções gênicas. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 1, p. 311-315, 2011.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- REIS, E. L.; CORÁ, J. E.; FRANCO, D.; GIANELLO, E. M. **Adubação organo-mineral em pomar de citros: efeito nos atributos físicos do solo**. UNESP. Jaboticabal Disponível em <[http://prope.unesp.br/xxi\\_cic/27\\_35264674809.pdf](http://prope.unesp.br/xxi_cic/27_35264674809.pdf)>. 2009.