

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Transformação genética de laranjeira doce e de tomateiro Micro-Tom com  
os genes *npr1* e *npr3-4* de *Citrus sinensis***

**Filipi Augusto Coelho Rodrigues**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre  
em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

**Piracicaba  
2016**

**Filipi Augusto Coelho Rodrigues**  
**Engenheiro Agrônomo**

**Transformação genética de laranjeira doce e de tomateiro Micro-Tom com os genes**  
***npr1* e *npr3-4* de *Citrus sinensis***  
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:  
Prof. Dr. **FRANCISCO DE ASSIS ALVES MOURÃO FILHO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre  
em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

**Piracicaba**  
**2016**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Rodrigues, Filipi Augusto Coelho

Transformação genética de laranjeira doce e de tomateiro Micro-Tom com os genes *npr1* e *npr3-4* de *Citrus sinensis* / Filipi Augusto Coelho Rodrigues. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.

93 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Citros 2. Cultura de tecidos 3. HLB 4. Resistência sistêmica adquirida I. Título

CDD 634.31  
R696t

**"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de realizar este sonho e pela presença em minha vida como um guia indicando o caminho para ser capaz de completar esse sonho.

A Universidade de São Paulo e a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pelo espaço e infraestrutura para a realização deste projeto e pelos ensinamentos durante todos esses anos.

Ao orientador e professor Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho, pelos conhecimentos a mim passados sem os quais este projeto não seria viável.

A Dra. Liliane Stipp, pela amizade e ensinamentos durante todos os anos que estivemos trabalhando juntos.

As “meninas do laboratório” Perla, Tatiana, Lígia, Meire, Nathália e Fabiana pelo tempo que passamos juntos realizando nossos experimentos e compartilhando nosso conhecimento e nossas descobertas.

A todo o pessoal do Laboratório de Biotecnologia Vegetal por compartilhar também os conhecimentos.

Ao professor Dr Lázaro Eustáquio Pereira Peres, a Dra. Lilian Ellen Pino e a todo o pessoal do Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal, pela ajuda nos trabalhos com o tomateiro Micro-Tom.

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal que ajudaram a cuidar das plantas tão bem.

A Secretária do programa de pós-graduação Luciane Aparecida Lopes Toledo, por ajudar a cuidar da minha vida acadêmica.

Agradeço em Especial:

A minha mãe Ana Maria Vilhena Coelho, por segurar em minha mão e me guiar pela vida.

Ao meu irmão Caio César Coelho Rodrigues, por estar sempre ao meu lado e ajudar sempre com um sorriso no rosto.

Ao meu pai Messias Maria Rodrigues Sobrinho, por acompanhar sempre nos meus pensamentos, me ensinado a ser uma boa pessoa.

A minha namorada Camila Goldoni Barijan, por apoiar sempre e ajudar a expressar o que eu tenho de melhor.

A minha madrinha Maria Alice Vilhena Coelho, por animar nas horas mais difíceis e ensinar a ver o mundo mais colorido.

E a todas as pessoas que se fizeram presentes durante a realização deste trabalho.



## SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT .....	9
LISTA DE FIGURAS .....	11
LISTA DE TABELAS.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	21
2.1 Plantas geneticamente modificadas .....	21
2.2 Cultura dos citros.....	23
2.3 Transformação genética via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	26
2.4 Resistência Sistêmica Adquirida .....	30
2.5 Tomateiro Micro-Tom como planta modelo. ....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Identificação dos genes.....	35
3.2 Clonagem do gene <i>Csnpr3-4</i> .....	35
3.3 Transformação genética de citros e Micro-Tom.....	43
3.4 Identificação das plantas geneticamente modificadas .....	48
4 RESULTADOS .....	55
4.1 Identificação dos genes:.....	55
4.2 Clonagem do gene <i>Csnpr3-4</i> .....	55
4.3 Transformação genética de laranja doce .....	58
4.4 Transformação genética de tomateiro Micro-Tom.....	61
4.5 Southern blot de tomateiro Micro-Tom geneticamente modificado .....	62
4.6 Avaliação da progênie de tomateiro transgênico Micro-Tom com canamicina.....	63
5 DISCUSSÃO .....	65
6 CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS .....	71
APÊNDICES .....	81
ANEXOS .....	89



## RESUMO

### **Transformação genética de laranjeira doce e de tomateiro Micro-Tom com os genes *npr1* e *npr3-4* de *Citrus sinensis***

A cultura da laranja doce é muito importante ao redor do mundo, em especial no Brasil, maior produtor mundial dessas frutas. A produção citrícola sempre esteve ameaçada por muitas doenças de grande importância, tais como, o cancro cítrico, a clorose variegada dos citros (CVC) e pinta preta. Entretanto, em 2004, surgiu o huanglongbing (HLB) ou greening, que tem devastado pomares, e para a qual ainda não foi encontrada uma solução definitiva. A transgenia pode ser uma técnica auxiliar no manejo desta doença com a busca de cultivares mais tolerantes, em especial ao HLB. Neste trabalho, as pesquisas de transgenia não envolveram genes exógenos à planta como, por exemplo, genes de outros organismos ou genes sintéticos, ou seja, foi baseado em tecnologias mais recentes já aplicadas em outras espécies vegetais, nas quais a transgenia é utilizada para super-expressar genes dos sistemas de defesa da própria planta. Estudos indicam que a super-expressão de genes do sistema de Resistência Sistêmica Adquirida (SAR – do inglês, “Systemic Acquired Resistance”) promove a resistência de plantas a doenças. Um gene importante para esse sistema é o gene *npr1* que controla a expressão das proteínas relacionadas à patogênese (PR), em especial a PR1. Junto do gene *npr1*, os genes *npr3* e *npr4* também são reguladores desse sistema, atuando sobre o gene *npr1* de acordo com os níveis de ácido salicílico presentes na célula, nível este que varia de acordo com o nível de infecção de cada célula. Porém, a avaliação de um evento transgênico de citros pode levar muitos anos. Desta forma, para diminuir esse tempo de avaliação, pensou-se em usar plantas modelos. O sistema escolhido foi o tomateiro Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-Tom). Para a obtenção das construções gênicas, foram identificados os genes *Csnpr1*, *Csnpr3* e *Csnpr4* de *Citrus sinensis* L. Osbeck a partir dos genes *Atnpr1*, *Atnpr3* e *Atnpr4* de *Arabidopsis thaliana* L.. Os genes de citros foram obtidos a partir de uma planta de laranja doce por RT-PCR e clonados no vetor pCambia 2201, que foi então inserido em *Agrobacterium tumefaciens* para a transformação genética. Foi feita a transformação genética de plantas de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) e do tomateiro Micro-Tom. Após o crescimento dos brotos regenerados, foi feita a avaliação das plantas obtidas por meio de PCR. As plantas geneticamente modificadas foram aclimatizadas. As plantas de citros foram enxertadas e mantidas em casa de vegetação. As plantas de tomateiro Micro-Tom foram propagadas por sementes. A progênie foi avaliada aplicando o antibiótico de seleção canamicina, obtendo-se assim uma linhagem transgênica homocigota.

Palavras-chave: Citros; Cultura de tecidos; HLB; Resistência sistêmica adquirida





## ABSTRACT

### Genetic transformation of sweet orange and Micro-Tom tomato with *Citrus sinensis npr1* and *npr3-4* genes

The sweet orange industry is very important worldwide, specially in Brazil, considered the world's largest producer. The citrus production has always been threatened by several diseases of great importance, such as canker, CVC, and black spot. However, in 2004, the huanglongbing (HLB) or greening has been detected and devastated many citrus groves, and no definitive solution has been found yet. Transgenes may be a helpful tool for the management of this diseases, leading to the production of tolerant cultivars, especially to HLB. In this work, research on transgenic did not include the use of exogenous genes to the plant, such as genes from other organism or synthetic genes, i.e, it was based on new emerging technologies, already used on other crops, in which transgeny is used to super express genes from the plants own defense system. Studies indicate that a super expression of genes from the system called Systemic Acquired Resistance (SAR) promotes disease resistance. One important gene to this system is the *npr1* gene, which controls the expression of the pathogen related proteins (PR), in special the PR1. Together with the *npr1* gene, the genes *npr3* and *npr4* are also regulators of this system, regulating the action of the *npr1* gene according to the levels of salicylic acid present in the cell, this level varies with the level of infection in each cell. Nevertheless, evaluating a citrus transgenic event may take several years. In order to shorten this time, model plants were used. The model chosen was the Micro-Tom tomato (*Solanun lycopersicum* L. cv. Micro-Tom). In order to obtain the genetic constructions, the genes *Csnpr1*, *Csnpr3* e *Csnpr4* were identified in *Citrus sinensis* L. Osbeck from the genes, *Atnpr1*, *Atnpr3* and *Atnpr4* present in the *Arabidopsis thaliana* L. genome. The citrus genes were obtained from the citrus genome using RT-PCR procedure and cloned separately into the pCambia 2201 vector, which was inserted into *Agrobacterium tumefaciens* in order to perform the genetic transformation. Sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) and Micro-Tom plants were genetically modified. After the growth of the regenerated shoots, the evaluation of the obtained plants was done through PCR analysis. The genetically modified plants were acclimatized, the citrus plants were grafted and kept in the greenhouse, the Micro-Tom plants were propagated trough seeds and its progeny was evaluated by applying the selection antibiotic kanamycin, thus obtaining a homozygous transgenic line.

Keywords: Citrus; HLB; Systemic acquired resistance; Tissue culture



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Gráfico indicando a produção total de laranja doce dos quatro maiores produtores mundiais em 2013 (FAO, 2015). .....23
- Figura 2 - Gráfico comparativo entre a quantidade total de suco de laranja concentrado exportadas no mundo e a quantidade exportada pelo Brasil entre 1990 e 2010 (FAO, 2015). .....24
- Figura 3 - Gráfico comparativo entre as produções brasileiras de suco de laranja concentrado e suco de laranja não concentrado (NFC) entre os anos de 1995 e 2013 (FAO, 2015). .....24
- Figura 4 - Esquema de uma *A. tumefaciens* contendo o plasmídeo “Ti” e o vetor binário, indicando a presença dos genes *Vir* no plasmídeo “Ti” e do T-DNA e do gene de resistência A antibiótico no vetor binário. ....29
- Figura 5 - Esquema das funções das proteínas VIR envolvidas no processo de transferência do T-DNA de uma célula de *Agrobacterium tumefaciens* para uma célula vegetal. Em um primeiro momento, a proteína VIRA é ativada pela presença de compostos fenólicos como acetoseringona e ativa a proteína VIRG. A proteína VIRG age como fator de transcrição das outras proteínas VIR. As proteínas VIRD1 e VIRD2 se ligam ao T-DNA e o estabilizam em fita simples. A proteína VIRC direciona o complexo formado entre o T-DNA e as proteínas VIRD, através da proteína VIRB, que é responsável em abrir uma passagem entre a célula da *Agrobacterium* e a célula vegetal. A proteína VIRE2 é transportada para as células vegetais com ajuda da proteína VIRE1 onde pode proteger o T-DNA. Finalmente a proteína VIRD2 transporta o T-DNA para o núcleo da célula vegetal no qual esse conjunto de genes será integrado ao genoma. ....29
- Figura 6 - Esquema de um T-DNA padrão, situado entre as bordas esquerda e direita, contém um gene de seleção e um gene de interesse. O gene de interesse está situado em um sítio múltiplo de clonagem, uma região onde estão presentes uma grande quantidade de sítios de clivagem por enzimas de restrição para facilitar a clonagem do gene de interesse. ....29
- Figura 7 - Esquema da regulação negativa da proteína NPR1. **a:** Representa uma célula não infectada em uma planta sadia, onde nível de ácido salicílico é baixo, assim, a proteína NPR4 pode se ligar à NPR1 e levá-lo à proteólise. **b:** Representa uma célula infectada que deve sofrer morte celular programada, onde nível de ácido salicílico é

muito alto, inativando as proteínas NPR4 e também ativando as proteínas NPR3 simultaneamente, levando à proteólise de NPR1. **c:** Representa uma célula sadia, porém de uma planta doente, onde os níveis de ácido salicílico estão altos, então NPR4 é inativado, porém o nível não é tão alto a ponto de ativar as proteínas NPR3, essa situação específica não leva à proteólise de NPR1 mas sim à ativação da resistência sistêmica adquirida. Adaptado de (FU et al., 2012). ..... 32

Figura 8 - Esquema da função de fator de transcrição da proteína NPR1 **a:** na ausência de NPR1, a transcrição do gene *pr1* é impedida por proteínas da família TGA. **b:** na presença de ácido salicílico, a proteína NPR1 está presente no núcleo e se liga à proteína TGA liberando a transcrição do gene *pr1*, iniciando assim o sistema RSA..... 33

Figura 9 - Representação do plasmídeo pJet1.2/Blunt usando o software pDRAW32, em que o gene *bla* confere resistência ao antibiótico ampicilina e o gene *Eco47I/T7* produz uma endonuclease letal à bactéria, o gene *Csnpr3-4* foi inserido interrompendo a sequência do gene *Eco47I/T7*, inativando sua capacidade letal..... 38

Figura 10 - Representação do vetor binário pCAMBIA 1201 usando o software pDRAW32, indicando a presença dos genes: *cat*, responsável pela resistência ao antibiótico cloranfenicol; *hptII*, responsável pela resistência ao antibiótico higromicina; *uidA*, responsável pela produção da proteína repórter GUS. Também estão representados o promotor 35S, que foi usado como promotor do gene *Csnpr3-4* e os sítios de restrição das enzimas *NcoI* e *BstEII*, usadas na digestão para remoção do gene *uidA*, e a enzima *BamHI*, usada na fase seguinte para remoção do conjunto 35S – *Csnpr3-4*. ..... 40

Figura 11 - Representação do vetor binário pCAMBIA 2201 usando o software pDRAW32, indicando a presença dos genes: *cat*, responsável pela resistência ao antibiótico cloranfenicol; *nptII*, responsável pela resistência ao antibiótico canamicina; *uidA*, e seu promotor 35S, responsáveis pela produção da proteína repórter GUS. Também estão representados os sítios de restrição das enzimas *BamHI* e *BstEII*, usadas na digestão para remoção do promotor 35S e do gene *uidA*. Também está representado o t-DNA que é limitado pelas Bordas Esquerda e Direita, sendo essas sequências de 25 pb a partir dos nucleotídeos indicados. .... 42

Figura 12 - Esquema do plasmídeo pCAMBIA 2201 – *Csnpr1*, clonado anteriormente usando o software pDRAW32, indicando a presença dos genes de resistência *cat* e *nptII*, o promotor 35S junto ao gene *Csnpr1*, também estão indicadas as bordas direita e

esquerda que limitam o T-DNA. Os sítios de restrição para as enzimas *Bam*HI, *Bst*EII e *Nco*I.....43

- Figura 13 - a-d: Fases do preparo do explante de citros para a transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*. a: Plantas germinadas estioladas após período de crescimento no escuro. b: Planta apresentando a coloração verde após incubação sob incidência de luz. c: Cortes dos explantes de citros. d: Explantes em placa contendo meio de cultura MS líquido. e-h: Preparo dos explantes de tomateiro Micro-Tom para a transformação genética: e: Plântulas em frasco do tipo de maionese 8 dias após a semeadura. f: Detalhe da plântula quando pronta para a transformação genética. g: Detalhe dos cortes feitos nos cotilédones para a obtenção dos explantes. h: Disposição dos explantes em meio de cocultivo de tomate (MCT) .....47

- Figura 14 - Detalhes da transformação genética de tomateiro Micro-Tom. a: Inoculação de *Agrobacterium tumefaciens* sobre os explantes com ajuda de pipeta estéril. b: Secagem do excesso de inoculo com papel filtro estéril. ....48

- Figura 15 - Árvore de identidade gerada a partir do procedimento CLUSTAL, foram alinhadas as sequências encontradas no genoma de *Arabidopsis thaliana* correspondentes ao gene *Atnpr1* e seus parálogos e também os genes de laranja doce (*Citrus sinensis*) similares ao gene *Atnpr1*. Os genes mais próximos possuem identidade semelhantes.....56

- Figura 16 - Géis de eletroforese mostrando as digestões feitas durante a fase de avaliação das ligações. a: Digestão com as enzimas *Nco*I e *Bst*EII do vetor obtido após da ligação do gene *Csnpr3-4* ao plasmídeo pJET1.2/Blunt. b: Digestão com as enzimas *Nco*I e *Bst*EII do vetor obtido após da ligação do gene *Csnpr3-4* ao plasmídeo pCAMBIA1201. c: Digestão com as enzimas *Bam*HI e *Bst*EII do vetor obtido após da ligação do gene *Csnpr3-4* junto do promotor 35S ao plasmídeo pCAMBIA2201. O marcador usado foi de 1 kb (Thermo Scientific, USA).....57

- Figura 17 - Esquema do plasmídeo pCAMBIA 2201 – *Csnpr3-4* usando o software pDRAW32, indicando a presença dos genes de resistência *cat* e *nptII*, o promotor 35S junto ao gene *Csnpr3-4*, também estão indicadas as bordas direita e esquerda que limitam o T-DNA. Os sítios de restrição para as enzimas *Bam*HI, *Bst*EII e *Nco*I .....57

- Figura 18 - Géis de eletroforese das avaliações da inserção do plasmídeo pCAMBIA 2201 – *Csnpr3-4* em *Agrobacterium tumefaciens* estirpes EHA105 e GV3101. a: PCR feita com DNA extraído das duas estirpes de *A. tumefaciens* foi usado os primers

para o gene *Csnpr3-4*. **b e c:** Digestão com as enzimas *BamHI* e *BstEII*. O marcador usado foi de 1 kb (Thermo Scientific, USA) ..... 58

Figura 19 - Fases do processo de obtenção de plantas transgênicas de citros. **a:** Regeneração de brotos dos explantes inoculados com *Agrobacterium tumefaciens*. **b:** Detalhe de broto regenerado separado do explante em meio de cultura de enraizamento. **c:** Detalhe do broto recém enxertado em citrange ‘Carrizo’. **d:** Detalhe do sucesso da enxertia em planta já em vaso **e:** Planta em processo de aclimatização com ajuda de um saco plástico. **f:** Planta já aclimatizada, pronta para ser levada para a casa de vegetação..... 59

Figura 20 - Géis de eletroforese da avaliação por meio de PCR dos brotos regenerados de citros para os genes *Csnpr1* e *Csnpr3-4*, as bandas indicam o amplicon do 466pb referente ao uso dos primers para o gene *nptII* presente no T-DNA inserido na planta. Para controle positivo foi usado o DNA extraído da *E. coli* usada durante as fases de clonagem dos genes. Para o controle negativo foi usado uma planta na transformada. Foram consideradas plantas positivas aquelas que apresentaram bandas referente ao gene *nptII*, ou seja, aquelas que apresentaram bandas de 466pb. O marcador usado foi de 1 kb (Thermo Scientific, USA) ..... 60

Figura 21 - Fases do processo de obtenção de plantas transgênicas de tomateiro Micro-Tom. **a:** Regeneração de brotos dos explantes inoculados com *Agrobacterium tumefaciens*. **b:** Detalhe de broto regenerado **c:** Brotos enraizados em meio de cultura, detalhe da seleção de brotos escapes pelo antibiótico canamicina, os brotos não transformados não são resistentes a esse antibiótico e apresentando coloração amarelada e morrendo. **d:** Transferência dos brotos enraizados para vaso com substrato..... 61

Figura 22 - Southern blot da planta MT-*Csnpr1/1*, indicando a presença de três inserções do gene *Csnpr1* no seu genoma. O controle positivo e sonda usadas foram o produto de PCR do gene *nptII*. O marcador representa onde estariam indicadas as bandas em gel de eletroforese do marcador 1Kb (Thermo Scientific, USA) ..... 62

Figura 23 - Detalhe do experimento de aplicação de 400 mg L<sup>-1</sup> de canamicina sobre as progênies das plantas geneticamente modificadas de tomateiro Micro-Tom com os genes *Csnpr1* e *Csnpr3-4*, as plantas reagiram à aplicação de três diferentes formas, apresentando sinais severos, brandos ou nenhum sinal..... 64

**LISTA DE TABELAS**

- Tabela 1 - Transformações genéticas de laranja ‘Hamlin’ com os genes *Csnpr1* e *Csnpr3-4*, indicando o número de explantes introduzidos para a transformação genética, o número de brotos positivos, avaliados em PCR, aclimatizados e a eficiência de transformação. ....58
- Tabela 2 - Transformações genéticas de tomateiro Micro-Tom com os genes *Csnpr1* e *Csnpr3-4*, indicando a estirpe de *A.tumefaciens*, o número de explantes introduzidos para a transformação genética, o número de plantas positivas, avaliados em PCR, aclimatizadas e a eficiência de transformação. ....62





## 1 INTRODUÇÃO

Desde o início da agricultura, há milhares de anos, o homem procurou melhorar os sistemas de plantio. Isso fez com que a busca por novas tecnologias de produção estivesse sempre presente. Em 1996, houve o início da comercialização de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs), com cerca de 1,7 milhão de hectares plantados. Já em 2014, após 18 anos, o crescimento da área plantada com OGMs atingiu 181,5 milhões de hectares em 28 países (JAMES, 2014). No Brasil, em 2014, foram plantados 42,2 milhões de hectares de OGMs, englobando as culturas de soja, milho e algodão (GALVÃO, 2014).

Atualmente, a grande maioria dos OGMs cultivados possui genes de tolerância a herbicidas e/ou genes de resistência a pragas, características essas que modificam o manejo da cultura, trazendo benefícios, principalmente, ao produtor. Por outro lado, também existem OGMs que trazem vantagens aos consumidores, como por exemplo, plantas com maior teor de aminoácidos, aumento do tempo de prateleira dos produtos, redução de alergênicos, entre outros (INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRI-BIOTECH APPLICATIONS - ISAAA, 2015).

O uso de plantas transgênicas tem causado controvérsia em todo o mundo, com muitas organizações alertando sobre um possível perigo quanto ao uso de OGMs, principalmente, por causa dos genes que são usados para a resistência de plantas a insetos e tolerância a herbicidas. Estes genes são provenientes de espécies de bactérias, que por métodos convencionais seria impossível a transferência de suas características genéticas para as plantas (COLLI, 2011). Como a real tecnologia presente nos OGMs é proveniente dos genes inseridos na planta, uma alternativa ao uso de genes exógenos é a cisgenia ou a intragenia. Estes dois métodos trabalham com a inserção de genes que poderiam ser transferidos para uma planta de interesse por métodos convencionais, em que na cisgenia, os mecanismos de regulação gênica também são transferidos. Por outro lado, na intragenia, os mecanismos de regulação gênica podem ser mudados (ESPINOZA et al., 2013).

As doenças de plantas são um grande problema para a produção mundial de alimentos. Sendo assim, o desenvolvimento de OGMs também tem buscado alternativas para o combate aos patógenos e o aumento da resistência das plantas às doenças. Existem liberados para a produção no mundo, cultivares de feijão, mamão, pêssego, pimentão, tomate, batata e pepino resistentes à diferentes doenças por meio de diferentes genes inseridos nestes organismos (ISAAA, 2015). Os resultados positivos obtidos com esses produtos incentivam a busca de novos genes que proporcionem resistência a doenças fitopatogênicas.

No Brasil, uma das culturas de grande expressão é o citros, em especial a laranja doce, a qual ocupou no país, em 2013, a primeira posição em termos de produção com um total de 17,5 milhões de toneladas, somando 24,6% do total mundial. Porém, o Brasil já registrou melhores índices de produção e produtividade, mas a grande pressão das doenças presentes afetou esses índices (BOTEON; NEVES, 2005; FAO, 2015). Como ocorreu com outras culturas, o uso de transgenes pode ajudar no desenvolvimento de cultivares de citros resistentes às doenças presentes na cultura, principalmente aquelas cujos patógenos são encontrados no xilema ou floema, doenças estas que possuem características que dificultam o controle e o manejo no campo (LARANJEIRA et al., 2005; SINGH; RAJAM, 2009).

De maneira geral, as plantas possuem sistemas de defesa contra patógenos que atuam de maneira diferente. Entretanto, algumas doenças são capazes de causar danos e ignorarem essas defesas. No entanto, alguma alteração nos sistemas de defesa pode permitir a resistência da planta ao patógeno. Sendo que uma reinserção de um gene da própria planta, mas com regiões flanqueadoras, modificando sua expressão, é considerada uma intragenia (RAI; SHEKHAWAT, 2014).

Dentre as principais doenças de citros, as doenças do xilema e floema são consideradas doenças biotróficas, ou seja, o patógeno se desenvolve usando os nutrientes retirados de tecidos vivos da planta. Dentre os mecanismos de resistência, existe um sistema chamado de Resistência Sistêmica Adquirida (SAR – do inglês, “Systemic Acquired Resistance”) (GLAZEBROOK, 2005). A SAR é interessante por dois motivos principais: o primeiro é a capacidade de expandir a resistência para outras partes da planta que não foram infectadas, o segundo motivo é a grande gama de patógenos que este mecanismo é capaz de combater, incluindo muitos patógenos biotróficos (RYALS et al., 1996; DURRANT; DONG, 2004).

A SAR consiste em um sinal de ácido salicílico que é disperso do local de infecção para toda a planta. Esse ácido salicílico entra em contato com proteínas receptoras que agem como reguladores de transcrição de DNA e desencadeiam a produção de proteínas de defesa relacionadas aos patógenos, chamadas proteínas PRs (do inglês, “Pathogen Related”). São as PRs que agem diretamente no patógeno impedindo a disseminação da doença para outros tecidos da planta (MÉTRAUX et al., 2002).

Dentro do SAR, a proteína NPR1 (do inglês, “Nonexpressor of PR1”) foi identificada como responsável por receber o sinal de ácido salicílico e promover a expressão de proteínas PRs. Conhecendo essa propriedade, foram produzidas plantas transgênicas com maior expressão dessa proteína e, conseqüentemente, uma maior produção de proteínas PRs e uma maior resistência a patógenos. Tudo isso mostrou o potencial desta proteína na obtenção de

plantas resistentes que sejam obtidas a partir da intragenia (CAO et al., 1998; CHEN et al., 2012). Além dela, foram identificadas outras cinco proteínas similares à proteína NPR1 em *Arabidopsis thaliana*. Dentre elas, duas são reguladoras da SAR, regulando mais especificamente a própria proteína NPR1. Tais proteínas foram denominadas NPR3 e NPR4 (CAO et al., 1997; ZHANG et al., 2006).

As proteínas homólogas são aquelas encontradas em diferentes organismos, sendo similares e possuindo a mesma função. Ao identificar o gene ortólogo, que codifica para a proteína NPR1 em citros, foi possível cloná-lo e iniciar o processo de transformação genética de citros para a produção de plantas, super-expressando uma proteína já encontrada nesta espécie (CAO et al., 1997; RODRIGUES et al., 2012). Porém, da produção à avaliação de plantas transgênicas de citros, envolvendo ensaios com patógenos, levam-se anos (ORBOVIĆ; GROSSER, 2015). Por esse motivo, uma alternativa para validar a função de um gene é o uso de plantas-modelo. Esse uso agiliza o processo de validação de um gene para uma determinada função. Portanto, um modelo interessante é o tomateiro Micro-Tom, por possuir um ciclo de vida mais curto, tamanho reduzido e facilidade de trabalho in vitro, e apresenta suscetibilidade a doenças (PINO et al., 2010).

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi a identificação de ortólogos cítricos dos genes *npr3* e *npr4* encontrados em *Arabidopsis thaliana*, cloná-los em *Agrobacterium tumefaciens* para a subsequente transformação genética do modelo Micro-Tom juntamente com o gene *npr1*. Em paralelo com os trabalhos em Micro-Tom também foi objetivo desse trabalho a obtenção de plantas geneticamente modificadas de laranja doce com os genes obtidos.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.0 Plantas geneticamente modificadas

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO – do inglês “Food and Agriculture Organization”), na ocasião de uma força tarefa com a Organização Mundial da Saúde (OMS) e outras organizações internacionais para discussão de normas e orientações em relação a alimentos oriundos de processos biotecnológicos, chamado “Codex Alimentarius Ad Hoc Intergovernmental Task Force on Foods Derived from Biotechnology”, realizado em 2000 no Japão, afirmou que existe uma diversidade de “Biotecnologias” que englobam as diferentes técnicas de produção de OGMs. Além disso, a FAO entende que o uso de OGMs, juntamente com outras tecnologias de produção, viabiliza o desenvolvimento sustentável da agricultura. Também há o apoio ao uso de biotecnologia em países em desenvolvimento onde há vulnerabilidade alimentar, incentivando um benefício maior para pequenos produtores. Mesmo assim, a FAO está atenta aos riscos que podem ser causados pelo mau uso de OGMs, tanto para com a população como para com o meio ambiente, e insiste que os riscos e benefícios de cada OGM deva ser avaliado individualmente, antes da liberação e que também seja feito um acompanhamento após sua legalização (FAO, 2000).

O uso de biotecnologia para produzir plantas geneticamente modificadas teve início na primeira metade da década de 1980. Após uma década, algumas plantas começaram a ser comercializadas, como por exemplo o tomate *flavr savr*. Porém os pesquisadores consideram como início da era das plantas geneticamente modificadas o ano de 1996, no qual cerca de 1,7 milhão de hectares foram plantados com OGMs ao redor do mundo, principalmente, nos Estados Unidos (VASIL, 2008; JAMES, 2014).

Após o início do cultivo das plantas transgênicas, seu crescimento foi intenso, atingindo um total de 185,1 milhões de hectares cultivados em 2014. São 28 espécies de plantas geneticamente modificadas cultivadas no mundo, 374 eventos de transformação genética com diversas características diferentes, sendo as principais aquelas relacionadas à resistência a insetos e tolerância a herbicidas. A adesão ao uso de plantas transgênicas alcançou um total de 36 países. Somado a este número, está a União Europeia, onde cada país possui a palavra final sobre o cultivo de OGMs (Apêndice 1) (ISAAA, 2015). Todos esses 374 eventos possuem liberações em pelo menos um país. Porém, podem ser permitidos somente para cultivo para consumo animal e/ou até, para consumo humano. As características liberadas nas plantas geneticamente modificadas no mundo (Apêndice 2) classificam-se nos seguintes grupos (ISAAA, 2015):

- Tolerância a estresses abióticos
- Alteração no crescimento ou produtividade
- Resistência a doenças
- Tolerância a herbicidas
- Resistência a insetos
- Modificação da qualidade do produto
- Sistemas de controle de polinização

No Brasil, são liberados apenas os cultivos de soja, milho, algodão e feijão, nas quais a representatividade dos OGMs dentro do total plantado no país foi de 93,2% para a soja, 82,6% para o milho e 66,5% para o algodão (A variedade transgênica de feijão não é representativa em relação à área total cultivada em relação às outras culturas) (GALVÃO, 2014). As culturas da soja, milho e algodão possuem genes que conferem resistência a insetos e tolerância a herbicidas, já o feijão possui um gene que confere resistência ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro (COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA - CTNBIO, 2014).

A avaliação individual de cada OGM é necessária, pois, a transgenia é apenas uma ferramenta, que consiste na inserção artificial de um ou mais genes, também conhecidos como “transgenes”. São eles considerados a verdadeira tecnologia das plantas geneticamente modificadas, são eles que ditam as características desejadas a cada OGM, e fazem a função diferenciada dentro da planta (ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA - ANBIO, 2012). O uso de plantas transgênicas é definido pela característica conferida pelo gene inserido. E as opções para o desenvolvimento de plantas com novas características são muitas, e podem possuir as mais diferentes finalidades, podendo ser úteis para resolver problemas agrônômicos, melhoria da qualidade do produto final ao consumidor ou até para fins medicinais (TELI; TIMKO, 2004; THANAVALA; LUGADE, 2010).

Os genes estudados em transformações genéticas podem ter diversas origens, como por exemplo, bactérias, fungos, vírus, outras plantas, animais ou até serem completamente sintéticos, o que traz preocupações para os consumidores (SHELTON; ZHAO; ROUSH, 2002). Novos estudos, feitos a partir desse sentimento, têm buscado usar genes da própria família ou espécie a ser geneticamente modificada, processo chamado de intragenia ou cisgenia. Os dois conceitos se baseiam na inserção de genes encontrados em plantas que sejam sexualmente compatíveis. Além disso, o uso de marcadores ou genes de seleção não é permitido. A cisgenia é a inserção de um gene completo incluindo suas regiões reguladoras; na intragenia é possível

usar regiões reguladoras de outros genes, desde que estas também estejam presentes em organismos sexualmente compatíveis (ESPINOZA et al., 2013; HOLME et al., 2013).

Portanto, o estudo com plantas transgênicas possui grande potencial e estudos com espécies diferentes das já liberadas são feitos, em destaque para frutíferas, em que o investimento em mudas de boa qualidade e com características desejáveis é imprescindível para o sucesso da produção. Características como tolerância a estresses ambientais e resistência a doenças são objetivos interessantes, também buscados no melhoramento genético tradicional (RAI; SHEKHAWAT, 2014).

## 2.1 Cultura dos citros

Dentre as frutíferas, a cultura do citros em especial a laranja doce é a mais importante no Brasil, porque, em 2013 produziu cerca de 17,5 milhões de toneladas, garantindo o posto de maior produtor mundial, seguido por Estados Unidos, China e Índia (Figura 1). Essa contribuição corresponde a 24,6% da produção mundial de laranja doce e sua importância é creditada, principalmente, à exportação do suco concentrado pois cerca de 80% é destinado a essa commodity. Além do suco concentrado e não concentrado, a laranja também é comercializada in natura. Há ainda subprodutos importantes na cadeia produtiva de suco de laranja, tais como, farelo de polpa, óleo essencial, e terpenos, sendo este último grupo com predominância do d-limoneno (FAO, 2015; BRASIL, 2015; NEVES et al., 2015).

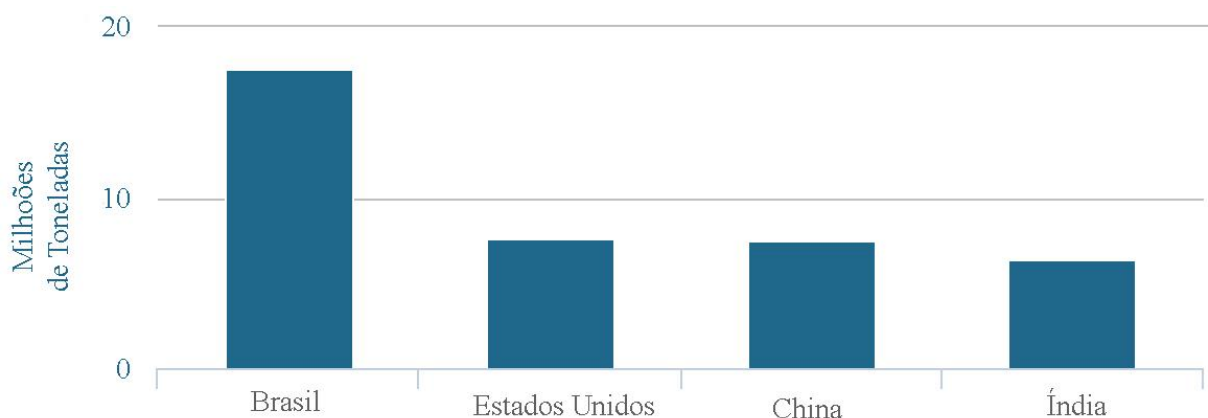


Figura 1 - Gráfico indicando a produção total de laranja doce dos quatro maiores produtores mundiais em 2013 (FAO, 2015)

O Brasil é o maior produtor e exportador de suco de laranja concentrado congelado, sobressaindo-se por muito os outros grandes produtores. Em 2013, sua produção foi de pouco mais de um milhão de toneladas da 1,7 milhão de toneladas produzidas no mundo no mesmo ano, totalizando 60% da produção mundial. Além disso, exporta praticamente tudo que é



produzido de suco concentrado, sendo o maior exportador, com uma média de cerca de três quintos de todo suco concentrado consumido no mundo (Figura 2) (FAO, 2015).

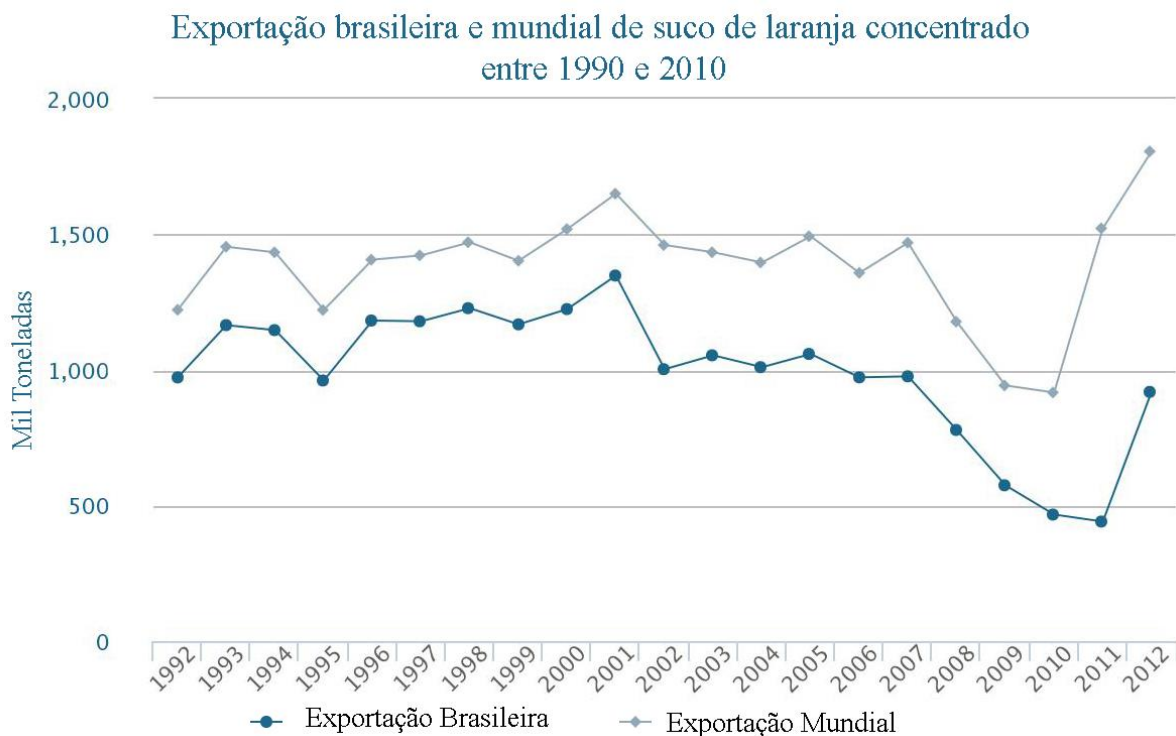


Figura 2 - Gráfico comparativo entre a quantidade total de suco de laranja concentrado exportadas no mundo e a quantidade exportada pelo Brasil entre 1990 e 2010 (FAO, 2015)

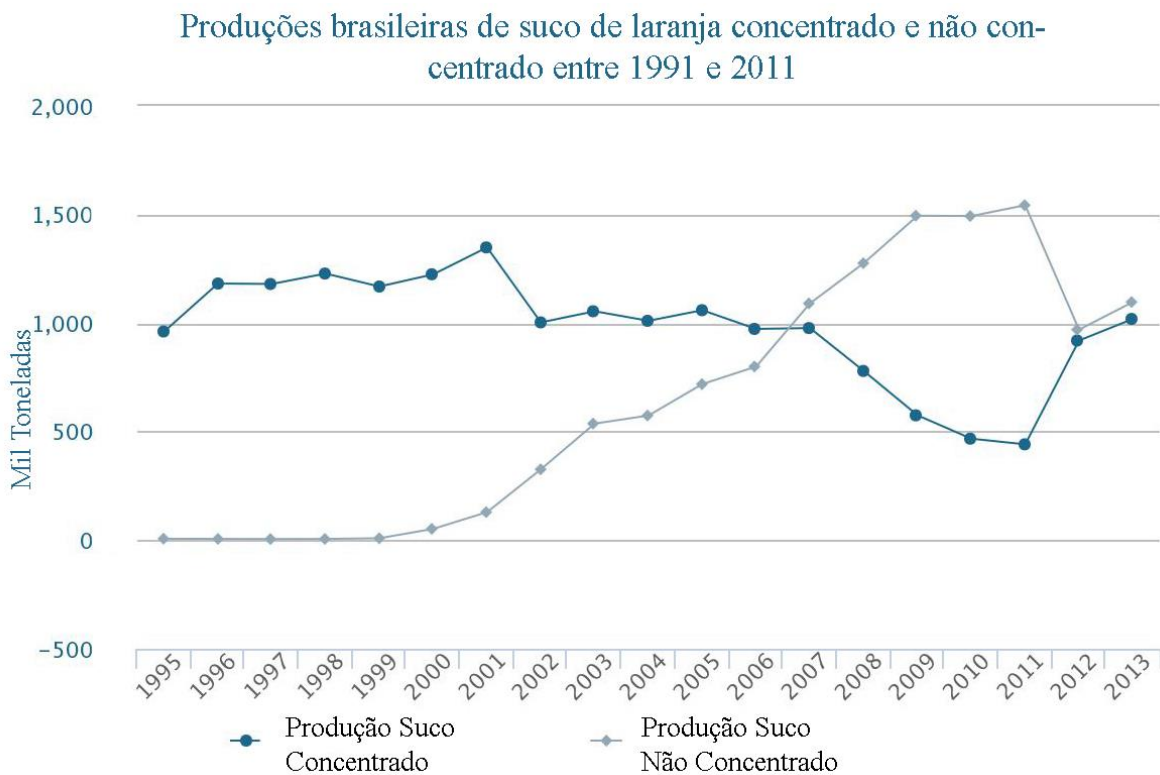


Figura 3 - Gráfico comparativo entre as produções brasileiras de suco de laranja concentrado e suco de laranja não concentrado (NFC) entre os anos de 1995 e 2013 (FAO, 2015)

Junto do suco de laranja concentrado, a partir do final da década de 1990, o suco não concentrado também começou a ser produzido e exportado em grande quantidade e tem ganhado preferência entre os consumidores. De 2006 a 2011, a produção de suco de laranja não concentrado (NFC – do inglês “Not From Concentrate”) superou a produção de suco de laranja concentrado, justificando a diminuição na quantidade exportada de suco concentrado, em 2012 e 2013 as produções foram equivalentes (Figura 3) (FAO, 2015).

No Brasil, a região produtora em destaque é o Estado de São Paulo e o sul do Estado de Minas Gerais, com mais de 80% da produção nacional. A produção citrícola nessa área foi muito importante para vários municípios, mas a citricultura brasileira já viveu dias melhores. Os citricultores brasileiros já conviviam com doenças presentes no país, como por exemplo o cancro cítrico, a clorose variegada dos citros (CVC) e a pinta preta, mas a identificação em 2004 de uma nova doença introduzida no país trouxe ainda mais problemas para os agricultores (BOTEON; NEVES, 2005; NEVES et al., 2015).

O greening ou huanglongbing (HLB), identificado em 2004, é uma doença associada a duas bactérias gram-negativas semelhantes, conhecidas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* e *Candidatus Liberibacter americanus*, que vivem no floema das plantas de citros e da falsa-murta (*Murraya* spp.). A bactéria é transmitida, principalmente, pelo psilídeo *Diaphorina citri*. As plantas afetadas sofrem redução na produção e os frutos produzidos são defeituosos. Não há cura para uma planta infectada e a poda somente facilita a transmissão pelo psilídeo. Também não há cultivares resistentes, portanto, o manejo da doença deve ser realizado da mesma maneira que é feito para doenças como o cancro cítrico, como aquisição de mudas sadias e a inspeção e erradicação das plantas infectadas, além do controle do psilídeo e erradicação da falsa-murta (FUNDECITRUS, 2013). Um dos grandes problemas para o controle e manejo do HLB é a demora para o aparecimento dos sintomas, dificultando a identificação das plantas doentes e a erradicação dos focos de disseminação da doença. Essas características fizeram com que a incidência da doença passasse de 3,4% para 64,1% dos talhões do Estado de São Paulo infectados entre 2004 e 2012 (FUNDECITRUS, 2013).

Os tratos culturais com as doenças já existentes, somados aos novos tratos culturais exigidos para a manutenção do HLB, em especial, o grande aumento do uso de inseticidas para controle do psilídeo e o custo de inspeção de plantas doentes, aumentaram o custo de produção, dificultando a sua viabilidade da produção de laranja e retirando muitos produtores do mercado, levando à redução da área plantada, principalmente, quando a produtividade por área é baixa (FNP, 2013; NEVES et al., 2015).

O melhoramento genético convencional de citros pode demorar décadas, portanto, uma alternativa para aumentar a resistência do citros a doenças é o uso de cultivares transgênicas visando essa resistência. O protocolo de transformação genética de citros via *Agrobacterium tumefaciens* já é usado há algum tempo e, mesmo possuindo alguns problemas como baixa eficiência em algumas cultivares e longo período de juvenilidade da planta, a transformação genética é possível e viável (PEÑA et al., 2004; GROSSER et al., 2011; FÁVERO et al., 2012; DONMEZ et al., 2013).

## 2.2 Transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*

A história das plantas transgênicas teve início em 1983, com a obtenção dos primeiros eventos por pesquisadores na Europa e nos Estados Unidos. As tecnologias usadas na época baseavam-se na transferência dos genes *DHFR Mtx<sup>R</sup>* e *nptII* que codificam respectivamente as proteínas Dihidrofolato Redutase e Neomicina Fosfotransferase tipo II. Estes genes agem como marcadores, pois, conferem às plantas resistência a antibióticos. O gene *DHFR Mtx<sup>R</sup>* confere resistência à metotrexato e o gene *nptII* confere resistência à neomicina e canamicina. As plantas contendo esses genes são capazes de se desenvolver normalmente na presença desses antibióticos, diferentemente das plantas não modificadas (BEVAN et al., 1983; HERRERA-ESTRELLA et al., 1983; VAN LIJSEBETTENS et al., 2013).

O início dos estudos com plantas transgênicas só foi possível graças a uma bactéria chamada *Agrobacterium* ssp.. Esta bactéria é encontrada no solo e é considerada um patógeno, pois, causa em muitas plantas dicotiledôneas a doença conhecida como galha da coroa. A galha da coroa é caracterizada pelo crescimento de tumores na região de união entre a raiz e o caule de uma planta. As *Agrobacterium* ssp. são bactérias gram-negativas com forma de bacilo e temperatura de crescimento ótimo entre 25 e 28 °C. Como doença fitopatogênica, embora sua incidência não seja muito expressiva, uma infecção pode ser devastadora, principalmente, em espécies propagadas vegetativamente. A notoriedade dessa bactéria aumentou quando foi descoberto o mecanismo que causa os sintomas de sua doença (ANDRADE et al., 2003). Tal mecanismo consiste em que as células das galhas da coroa são capazes de crescer indefinidamente em meio de cultura, de modo similar às células oncogênicas, ou seja, as galhas nada mais são do que tumores induzidos pela bactéria em especial uma das espécies de *Agrobacterium* ssp., denominada *Agrobacterium tumefaciens*. A formação dos tumores é causada, pois há uma transferência de genes da bactéria para as células vegetais após a infecção da planta por *A. tumefaciens*. Alguns genes transferidos se expressam na planta e causam um desbalanço na produção de auxinas e citocininas, desencadeando o crescimento e multiplicação

descontrolada das células vegetais, formando assim o tumor que é a galha da coroa. Além disso, outros genes transferidos se expressam para proporcionar a formação de compostos que, normalmente, não são encontrados em plantas. Tais compostos, chamados de opinas, são derivados de aminoácidos e açúcares. É possível encontrar até quatro opinas diferentes, podendo variar de acordo com a linhagem de *Agrobacterium* infectante. São elas octopina, nopalina, leucinopina e aspariginopina. A *Agrobacterium* usa dessas opinas como alimento para sua multiplicação (HOOYKAAS; SCHILPEROORT, 1992; ANDRADE et al., 2003).

A formação de galhas está diretamente relacionada à presença do plasmídeo “Ti” (do inglês, “Tumor Inducing” – Indutor de Tumor) e ocorre após um processo natural de transferência de material genético presente no plasmídeo “Ti” da bactéria e o genoma da célula vegetal. O plasmídeo “Ti” possui duas regiões responsáveis pela transferência do material genético da bactéria para a célula vegetal. A primeira delas é conhecida como região de virulência, ou região “Vir”. É nessa região que se encontram os genes responsáveis pela transferência do DNA entre as espécies. A segunda região presente no plasmídeo “Ti” é conhecida como T-DNA (do inglês, Transferred-DNA – DNA Transferido). O T-DNA é praticamente o material genético que é transferido entre a bactéria e a célula vegetal, porém, ele está flanqueado no plasmídeo “Ti” por regiões de 25pb chamadas Borda Esquerda e Borda Direita. Tais regiões são identificadas por duas proteínas “Vir” e limitam o material genético que será transferido para a célula vegetal (ZUPAN et al., 2000).

A região “Vir” é composta pelo conjunto de genes responsáveis pela transferência do T-DNA presente na *Agrobacterium* para a célula vegetal. Para que a região “Vir” inicie o processo de transferência do T-DNA, é necessário um sinal emitido pela planta. Esse sinal é a presença de compostos fenólicos como a acetoseringona que são liberados pela célula vegetal após algum tipo de injúria. A função das proteínas VIR é descrita a seguir (GELVIN, 2000) e explicada na Figura 4:

- VIRA – Recebe os compostos fenólicos provenientes da célula vegetal injuriada e ativa a proteína VIRG.
- VIRG – Ativa a transcrição dos genes *Vir* após a indução pelo sinal recebido da proteína VIRA, agindo como fator de transcrição.
- VIRB – Produz poros nas membranas das células bacteriana e vegetal, para permitir a passagem do T-DNA.
- VIRC – Facilita o transporte do T-DNA para a célula infectada.

- *VIRD1* e *VIRD2* – Cortam nas bordas direita e esquerda do T-DNA e o deixam como fita simples (ssT-DNA). A proteína *VIRD2* é necessária para o transporte do T-DNA e sua ligação ao genoma da planta.
- *VIRE1* – Facilita o transporte de *VIRE2* para a célula vegetal.
- *VIRE2* – Protege o T-DNA de fita simples durante o processo de transporte dentro da célula vegetal e são transportados separadamente para a célula vegetal.

Foi descoberto que somente a presença das regiões flanqueadoras do T-DNA, chamadas de borda direita e esquerda, é necessária para a identificação da sequência que será integrada no genoma da planta pelas proteínas *VIRD* (HOEKEMA et al., 1983). Sendo assim, não é necessária a presença do T-DNA no plasmídeo “Ti” para que ocorra a transferência. Portanto, o T-DNA pode estar presente em outro plasmídeo dentro da *Agrobacterium*. Esta estratégia possibilita o uso de dois plasmídeos, o Plasmídeo “Ti” e o vetor binário, trazendo vantagens pela facilidade de engenharia genética em plasmídeos menores. Os vetores binários são desenvolvidos especialmente para a inserção de genes de interesse na região do T-DNA através de sítios múltiplos de clonagem, os quais possuem uma grande quantidade de sequências reconhecidas por enzimas de restrição usadas durante o processo de engenharia genética do T-DNA. Além disso, esses plasmídeos possuem também genes de resistência a antibióticos que selecionam as bactérias em que foram inseridos (BEVAN, 1984) (Figura 5). Após a inserção do T-DNA no genoma da célula vegetal, a mesma deve se multiplicar, e regenerar uma nova planta através do uso de técnicas de cultura de tecidos vegetais, com o uso de reguladores vegetais. Porém, durante a inoculação de um tecido vegetal com *A. tumefaciens*, não são todas as células vegetais que têm o T-DNA integrado ao genoma, mas durante a fase de cultura de tecidos, todas as células possuem capacidade para regenerar uma planta nova. Desse modo, é preciso alguma estratégia para que somente as células que sofreram a transformação genética sejam capazes de regenerar uma nova planta. Com isso o T-DNA deve conter além do gene de interesse, um gene de seleção que vai conferir uma resistência ou capacidade de metabolização de compostos adicionados ao meio de cultura. Os genes de seleção mais usados conferem resistência aos antibióticos canamicina ou higromicina. Também são usados genes que conferem resistência a herbicida como o glufosinato, ou genes que conferem a capacidade de metabolizar manose como fonte de carbono (Figura 6) (LEE; GELVIN, 2008).

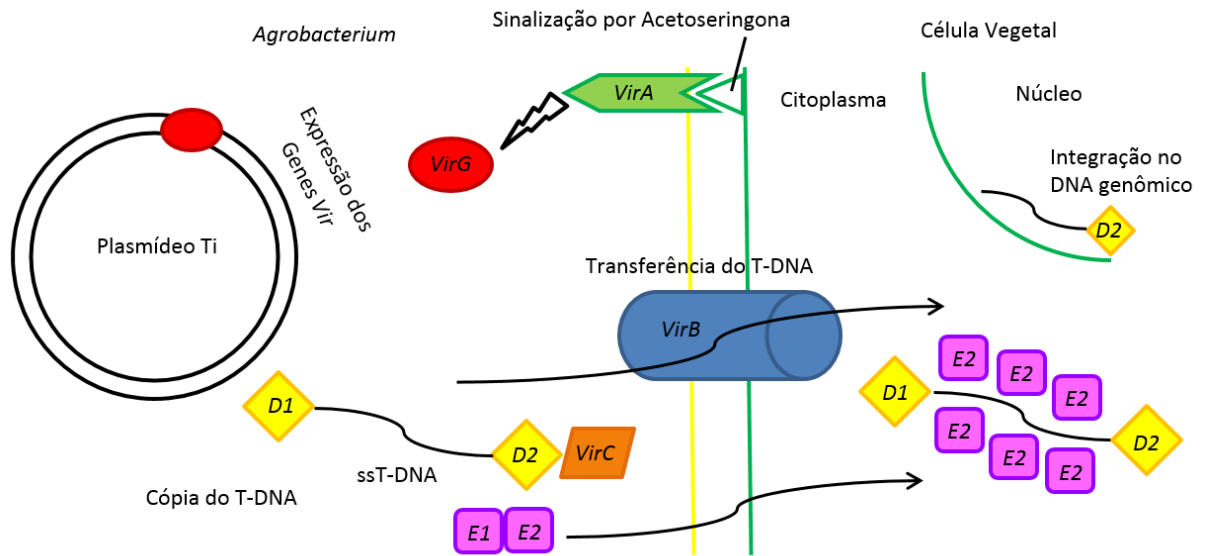


Figura 4 - Esquema das funções das proteínas VIR envolvidas no processo de transferência do T-DNA de uma célula de *Agrobacterium tumefaciens* para uma célula vegetal. Em um primeiro momento, a proteína VIR A é ativada pela presença de compostos fenólicos como acetoseringona e ativa a proteína VIR G. A proteína VIR G age como fator de transcrição das outras proteínas VIR. As proteínas VIR D1 e VIR D2 se ligam ao T-DNA e o estabilizam em fita simples. A proteína VIR C direciona o complexo formado entre o T-DNA e as proteínas VIR D, através da proteína VIR B, que é responsável em abrir uma passagem entre a célula da *Agrobacterium* e a célula vegetal. A proteína VIR E2 é transportada para as células vegetais com ajuda da proteína VIR E1 onde pode proteger o T-DNA. Finalmente a proteína VIR D2 transporta o T-DNA para o núcleo da célula vegetal no qual esse conjunto de genes será integrado ao genoma

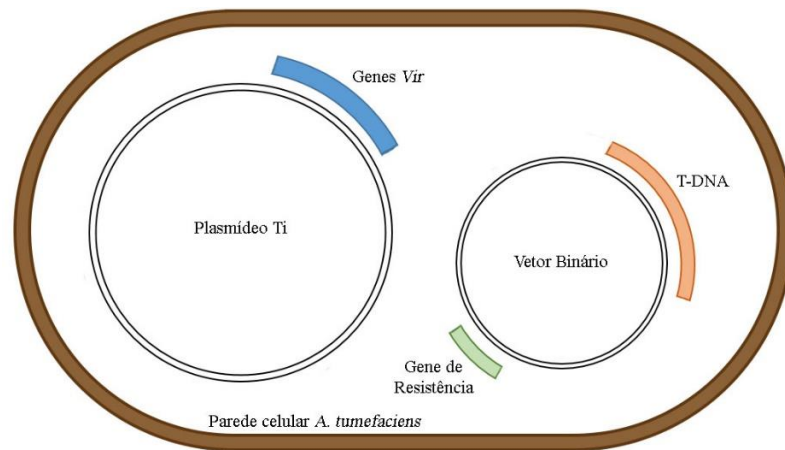


Figura 5 - Esquema de uma *A. tumefaciens* contendo o plasmídeo “Ti” e o vetor binário, indicando a presença dos genes *Vir* no plasmídeo “Ti” e do T-DNA e do gene de resistência A antibiótico no vetor binário

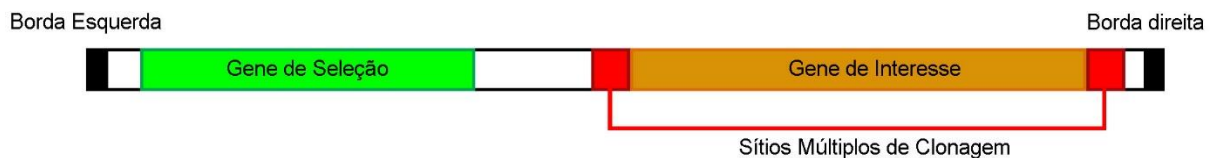


Figura 6 - Esquema de um T-DNA padrão, situado entre as bordas esquerda e direita, contém um gene de seleção e um gene de interesse. O gene de interesse está situado em um sítio múltiplo de clonagem, uma região onde estão presentes uma grande quantidade de sítios de clivagem por enzimas de restrição para facilitar a clonagem do gene de interesse

Para a expressão dos genes na planta, é necessária a presença de um promotor e de um terminador logo antes e depois da sequência do gene, respectivamente. A função do promotor é dar início à transcrição do gene, e a do terminador, é de finalizar a transcrição. O promotor mais usado em transformações genéticas tem origem no Vírus do Mosaico da Couve Flor (CaMV) e é chamado 35S. Esse promotor possui um elevado índice de expressão em todos os tecidos da planta. Um terminador muito usado também é o responsável pela finalização da transcrição do gene que codifica para a enzima que sintetiza Nopalina (Nopalina Sintetase – NOS) (KARIMI et al., 2007). O uso de outros promotores pode trazer diferentes resultados, tais como, conferir diferentes níveis de expressão de um gene, expressão apenas em tecido específico ou até uma expressão induzida por algum fator externo ou interno da planta (SCHÜNMANN et al., 2003; MIYATA et al., 2012).

O uso do sistema de transformação genética por *Agrobacterium tumefaciens* é realizado há mais de 30 anos e o entendimento de como ele funciona foi muito estudado devido ao grande crescimento do número de experimentos com plantas transgênicas durante este tempo, tanto por empresas privadas quanto no setor público. Assim, pode-se dizer que a transformação genética por *A. tumefaciens* é um método muito interessante, principalmente, para dicotiledôneas.

### **2.3 Resistência Sistêmica Adquirida**

Plantas possuem diversos modos de se proteger e defender de patógenos. Um deles é o sistema chamado de Resistência Sistêmica Adquirida (RSA). A princípio, após uma primeira infecção, a RSA promove um aumento de resistência de toda a planta à uma segunda infecção da doença (ROSS, 1961). A RSA é induzida a partir de tecido vegetal necrosado, seja ele devido a um sintoma natural da doença ou uma reação de hipersensibilidade desenvolvida pela planta, também conhecida como morte celular programada (ROBERTS, 1982; DURRANT; DONG, 2004).

Quando a RSA é ativada após uma infecção, diversos mecanismos entram em ação, sendo eles: modificações na parede celular, produção de fitoalexinas e a síntese de proteínas relacionadas à patogênese (PR) ou a ativação de reação de hipersensibilidade (MÉTRAUX et al., 2002). As fitoalexinas são compostos químicos produzidos pela planta que combatem uma infecção, fazendo parte do sistema de defesa da planta (HAMMERSCHMIDT, 1999). As PRs também possuem funções antimicrobianas e existem diversas famílias de PRs com diferentes funções. Porém, todas são detectadas somente após a infecção da planta por algum patógeno ou estímulo externo (VAN LOON et al., 1994; SELS et al., 2008).

O estímulo induz a produção de ácido salicílico pela planta, o qual é responsável pelo desencadeamento da RSA. O ácido salicílico é transportado de partes infectadas da planta para partes saudáveis. Sendo assim, o ácido salicílico produzido nas células infectadas é transportado para as células saudáveis desencadeando uma produção de proteínas PRs, fitoalexinas ou reação de hipersensibilidade (SHULAEV et al., 1995; GAO et al., 2014). A importância do ácido salicílico foi comprovada em plantas transgênicas expressando a enzima salicilato hidroxilase, que inativa o ácido salicílico, impedindo sua ação, as quais não apresentaram resposta da RSA (GAFFNEY et al., 1993).

Sendo o ácido salicílico apenas uma molécula sinal, é necessário um receptor que desencadeie a RSA tanto no tecido infectado como no tecido sadio. Por isso, foram feitos estudos com mutantes de *Arabidopsis*, sendo que aqueles que não apresentavam o gene *npr1*, mesmo sobre estímulo de ácido salicílico, não apresentavam resposta esperada da RSA. Dessa forma confirmou-se a importância desse gene para a RSA (CAO et al., 1994).

O gene *npr1*, na cadeia da RSA, é o indutor da produção das proteínas PRs. A proteína NPR1 age como um regulador do processo de defesa da planta fazendo com que os genes relacionados com a defesa da planta somente sejam ativados quando necessário, ou seja, quando a planta for infectada. A ação regulatória da proteína NPR1 acontece pois, quando expressa na ausência de ácido salicílico, várias unidades da proteína NPR1 estão aglomeradas o que impossibilita que sua função seja exercida. Porém, quando em presença de ácido salicílico, o aglomerado de proteína NPR1 é disperso e conseguem assim serem mobilizadas para o núcleo celular. Dentro do núcleo, as proteínas NPR1 agem no promotor dos genes de proteínas PRs induzindo sua replicação e dando início ao processo de defesa da planta a patógenos (KINKEMA et al., 2000; PIETERSE et al., 2004).

Porém, junto com o gene *npr1* existem, em *Arabidopsis*, mais cinco genes parálogos, genes semelhantes, mas com funções diferentes, nomeados de *npr2* a *npr6*. Dentre esses genes, dois deles produzem proteínas que são responsáveis pela regulação negativa da proteína NPR1, os quais são chamados *npr3* e *npr4*, que codificam proteínas com o mesmo nome (HEPWORTH et al., 2005; LIU et al., 2005). As proteínas NPR3 e NPR4 também são as receptoras do ácido salicílico e ambas possuem um efeito negativo na regulação da proteína NPR1, auxiliando a degradação da proteína NPR1 dependendo do nível de ácido salicílico presente, pois, possuem diferentes níveis de afinidade com o ácido salicílico (KUMAR, 2014). A degradação ocorre quando o complexo NPR1 e NPR3 ou NPR4 se ligam com uma proteína chamada CUL3 (Culina 3). A proteína NPR4 age enquanto o nível de ácido salicílico está baixo, já a proteína NPR3 age quando o nível de ácido salicílico está muito alto, aqueles níveis correspondem à



uma célula saudável, e estes à uma célula infectada que apresentará uma reação de hipersensibilidade respectivamente (Figura 7) (SPOEL et al., 2009; FU et al., 2012).

A proteína NPR1, quando ativada pela presença de ácido salicílico e não está sendo regulada pela ação das proteínas NPR3 e NPR4, possui função de fator de transcrição. Porém na sequência da proteína NPR1, existem dois domínios de função de interação proteína-proteína, a repetição de anquirina (ANK) e BTB/POZ. Porém, não há nenhum domínio de interação de proteína e ácido nucleico (FAN; DONG, 2002). A função de fator de transcrição de NPR1 se dá pela sua interação com proteínas da família TGA. Algumas proteínas da família TGA se ligam à região promotora do gene *pr1* e impedem sua transcrição, na ativação da RSA, NPR1 se liga à proteína TGA, liberando a transcrição do gene *pr1* e a subsequente ativação da RSA (Figura 8) (SEYFFERTH; TSUDA, 2014).

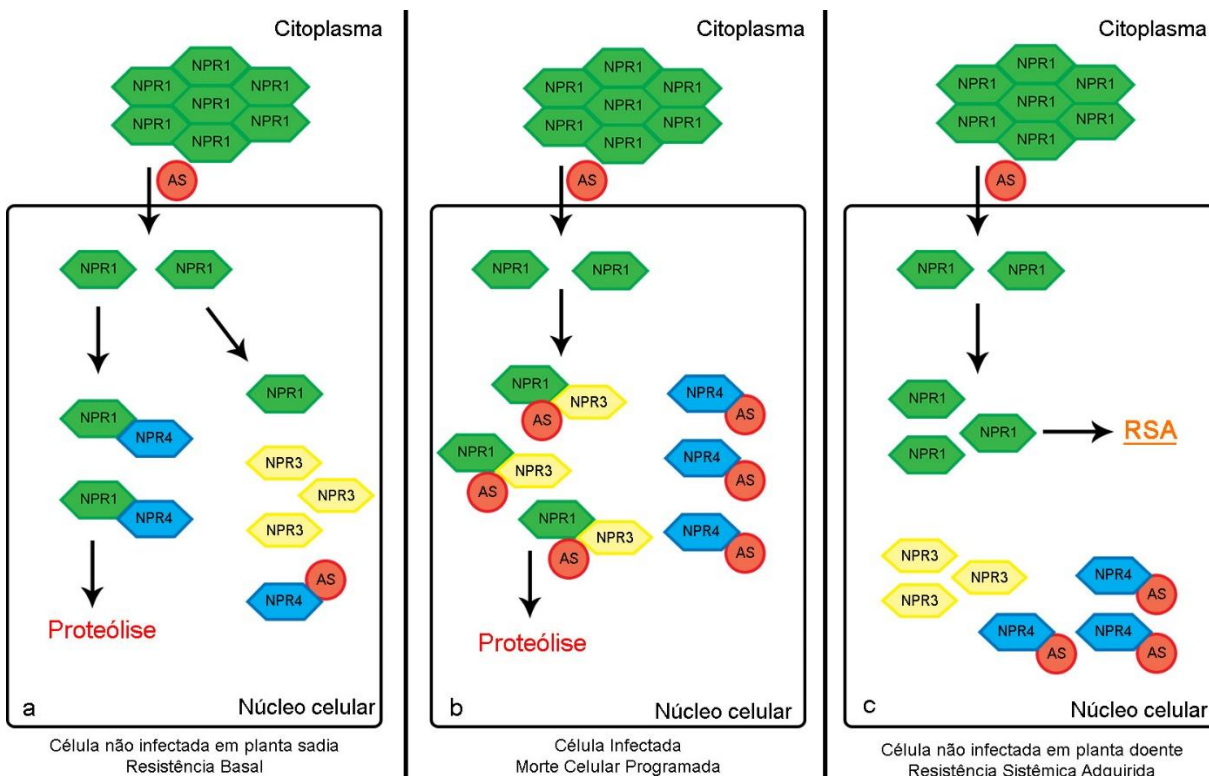


Figura 7 - Esquema da regulação negativa da proteína NPR1. **a:** Representa uma célula não infectada em uma planta sadia, onde nível de ácido salicílico é baixo, assim, a proteína NPR4 pode se ligar à NPR1 e levá-lo à proteólise. **b:** Representa uma célula infectada que deve sofrer morte celular programada, onde nível de ácido salicílico é muito alto, inativando as proteínas NPR4 e também ativando as proteínas NPR3 simultaneamente, levando à proteólise de NPR1. **c:** Representa uma célula sadia, porém de uma planta doente, onde os níveis de ácido salicílico estão altos, então NPR4 é inativado, porém o nível não é tão alto a ponto de ativar as proteínas NPR3, essa situação específica não leva à proteólise de NPR1 mas sim à ativação da resistência sistêmica adquirida. Adaptado de (FU et al., 2012)

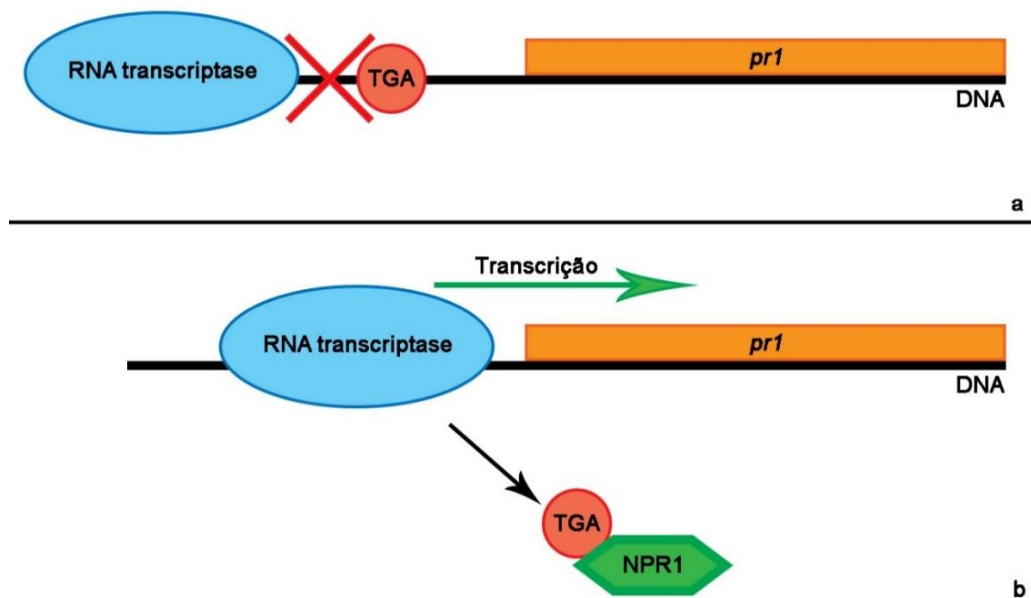


Figura 8 - Esquema da função de fator de transcrição da proteína NPR1 **a:** na ausência de NPR1, a transcrição do gene *pr1* é impedida por proteínas da família TGA. **b:** na presença de ácido salicílico, a proteína NPR1 está presente no núcleo e se liga à proteína TGA liberando a transcrição do gene *pr1*, iniciando assim o sistema RSA

Transformações genéticas têm sido feitas usando o gene *npr1* de *Arabidopsis* (*Atnpr1*) em diversas espécies, inclusive em citros, obtendo resultados interessantes no aumento da resistência a doenças, tais como o cancro cítrico (ZHANG et al., 2010). Alguns estudos têm usado genes ortólogos ao *Atnpr1*, como por exemplo o *Vvnpr1* (*Vitis vinifera*) (LE HENANFF et al., 2011), *Osnpr1* (*Oryza sativa*) (CHERN et al., 2005) e *Mpnpr1* (*Malus x domestica*) (MALNOY et al., 2007), todos aumentando a resistência às doenças das culturas estudadas. Sendo assim o estudo do ortólogo cítrico do gene *npr1*, *Csnpr1*, é interessante para buscar alternativas no controle de doenças dos citros.

## 2.4 Tomateiro Micro-Tom como planta modelo

Devido ao maior tempo requerido pela cultura dos citros para crescimento e propagação das plantas geneticamente modificadas, podem ser necessários de 5 a 6 anos para o florescimento e frutificação (ORBOVIĆ; GROSSER, 2015). Sendo assim, para a avaliação de um gene específico, é interessante a transformação genética de plantas-modelo concomitantemente à transformação genética de citros. O uso de plantas-modelo esclareceria as propriedades de um gene e proporcionaria uma maior garantia de que o gene está atuando no sistema vegetal como esperado.

Um sistema modelo interessante é o uso do tomateiro Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-Tom), usado tanto em estudos genômicos como em transgenias, porque o Micro-Tom possui características de ser uma planta de tamanho reduzido e de ciclo

de vida curto, agilizando assim os processos de propagação. Além disso, é considerada uma planta com um protocolo de transformação genética definido e possui uma boa taxa de transformação (DAN et al., 2006; PINO et al., 2010).

Sendo assim, o uso do modelo Micro-Tom é interessante para a geração de dados sobre o gene de interesse, enquanto as plantas geneticamente modificadas de citros são propagadas. O tomateiro também é interessante pela grande quantidade de doenças que a cultura apresenta, muitas delas em comum com outras culturas. Além disso, pesquisas têm sido realizadas com tomateiros transgênicos com a finalidade de aumentar a resistência a doenças (EKENGREN et al., 2003; CHEN et al., 2006).

A grande diferença no processo de transgenia da cultura do tomateiro com a cultura do citros é o modo de propagação. Enquanto os citros são propagados vegetativamente a partir de enxertias, o tomateiro é propagado sexualmente por sementes. A multiplicação por sementes leva à segregação dos genes, inclusive do transgene, sendo necessário cuidado para que sejam feitos experimentos com uma linhagem homozigota. É possível selecionar as plantas contendo o transgene das seguintes gerações, usando a característica do gene de seleção que foi inserido durante a fase de transformação genética, como por exemplo o gene *nptII*, que promove a resistência ao antibiótico canamicina ou o gene *bar* que promove a resistência ao antibiótico glufosinato (KHUONG et al., 2013).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas, situado no Departamento de Produção Vegetal, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba, São Paulo.

#### 3.1 Identificação dos genes

Para a identificação dos genes *npr* presentes na laranja doce, foi utilizada a base de dados online Phytozome (JGI, 2015). Nela, foram buscados o gene de *Arabidopsis thaliana*, *Atnpr1* e seus parálogos *Atnpr2*, *Atnpr3*, *Atnpr4*, *Atnpr5* e *Atnpr6* (HEPWORTH et al., 2005). Usando a função BLAST (do inglês “Basic Local Alignment Search Tool” – Ferramenta local de busca de alinhamento) foi feito o alinhamento entre esses genes e o genoma da laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck), a fim de encontrar os ortólogos cítricos no banco de dados.

A identidade genética de cada um dos genes cítricos foi encontrada usando o programa BioEdit (HALL, 2015), no qual foi realizado o procedimento CLUSTAL, um alinhamento múltiplo entre os genes de *A. thaliana* e de *C. sinensis*. Esse procedimento permite a identificação da proximidade genética dos genes, criando uma árvore filogenética dos genes, mostrando a proximidade quanto às suas identidades, sendo possível identificar, dentre todos os genes similares de citros encontrados, quais são os mais próximos aos genes *Atnpr3* e *Atnpr4* e obter sua sequência.

Com a obtenção da sequência do gene *Csnpr3-4*, foi desenvolvida a estratégia de clonagem, em que, usando o programa pDRAW32 (AcaClone), foram desenvolvidos os primers para subseqüentes reações em cadeia da polimerase (PCR – do inglês “Polymerase Chain Reaction), e também foram escolhidas as enzimas de restrição usadas durante o processo de clonagem.

#### 3.2 Clonagem do gene *Csnpr3-4*

Após a identificação e a obtenção da sequência do gene *Csnpr3-4*, foi realizada a clonagem desse gene, ou seja, o gene foi copiado do genoma dos citros e inserido em bactéria *Escherichia coli*, na qual foi clonado ao vetor binário, responsável pela transformação genética. Quando pronto, o vetor binário, contendo o gene *Csnpr3-4* foi inserido em *Agrobacterium tumefaciens*.

### 3.2.1 Obtenção do gene *Csnpr3-4*

O gene *Csnpr3-4* teve origem do RNA da variedade Pineapple de *C. sinensis* L. Osbeck. Para o isolamento do RNA total, foi seguido o protocolo descrito junto ao kit comercial de extração de RNA “RNeasy Plant Mini Kit” (QIAGEN, Alemanha). Primeiramente, foram macerados em nitrogênio líquido, com cadinho e pistilo, cerca de 100mg de tecido foliar. O material triturado foi transferido para um tubo de micro centrífuga, no qual foram adicionados 450  $\mu\text{L}$  do tampão “RLT”. O tubo foi homogeneizado em “Vortex” para ressuspensão do material vegetal. A solução foi transferida para a minicoluna de filtração (lilás) acoplada a um tubo coletor. O conjunto foi centrifugado por 2 minutos a 12.225 g. Foi adicionado ao tubo coletor, um volume de etanol 100% igual à metade do volume coletado após a centrifugação. Essa nova solução foi transferida para uma nova coluna de filtração (rosa) e esse conjunto foi centrifugado por 15s a 6.708 g. O filtrado foi descartado. Foram adicionados à coluna 700  $\mu\text{L}$  do tampão “RW1” e o conjunto foi centrifugado na mesma especificação anterior. Após esse passo, o filtrado também foi descartado e, por duas vezes, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  do tampão “RPE” seguido de centrifugação e descarte do filtrado, sendo que a última centrifugação foi de 2 minutos. Por fim, a coluna foi transferida para um novo tubo coletor, na qual adicionaram-se 30  $\mu\text{L}$  de água livre de RNase. Esse conjunto foi centrifugado por 1 minuto a 6.708 g. O RNA total ficou na solução filtrada.

Após a extração, foi feito um procedimento com uma enzima chamada transcriptase reversa. Essa enzima transcreve todas as moléculas de RNA em moléculas de DNA. Foi seguido o protocolo descrito pelo fabricante do kit da enzima M-MLV RT (Invitrogen, EUA). Primeiramente, foram adicionados a um tubo de micro centrífuga os seguintes componentes: 1  $\mu\text{L}$  oligo-dT (500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 2  $\mu\text{L}$  do RNA total extraído, 1  $\mu\text{L}$  de dNTP Mix (10 mM de cada: dATP, dGTP, dCTP e dTTP) e 8  $\mu\text{L}$  de água destilada estéril. Essa mistura foi aquecida a 65 °C por 5 minutos e rapidamente esfriada em gelo. O conteúdo foi acumulado no fundo do tubo por meio de uma rápida centrifugação. Foram adicionados 4  $\mu\text{L}$  do tampão “5X First-Strand Buffer” e 2  $\mu\text{L}$  DTT (0,1 M), incluídos no kit. Também foi adicionado 1  $\mu\text{L}$  (40 units/ $\mu\text{L}$ ) da enzima RNaseOUT™ (Invitrogen, EUA). O conteúdo do tubo foi gentilmente misturado e incubado a 37 °C por 2 minutos. Por fim foi adicionada à solução 200 U da enzima M-MLV RT. A mistura foi incubada por 50 minutos a 37 °C. A inativação da reação foi feita após esse tempo aquecendo o tubo a 70 °C por 15 minutos.

Com DNA obtido na reação anterior, foram realizadas quatro PCRs seguindo o protocolo do fabricante do kit de PCR de alta fidelidade “Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix” (Thermo Scientific, EUA). As quatro reações foram idênticas, nas quais em cada

tubo de micro centrífuga foram adicionados: 2 µL do DNA, 10 µL da solução “2x Phusion Flash PCR Master Mix”, 1 µL do primer *Csnpr3-4-F* (5' - CCATGGCTAATTCGATTGAACCGT - 3'), 1 µL do primer *Csnpr3-4-R* (5' - GGTGACCTCATAATTTTCCGAGCTT - 3'), ambos já diluídos na concentração de 10µM e 6 µL de água destilada estéril. O programa da PCR iniciou-se a 98 °C por 10 segundos, seguido por 30 ciclos nos quais o tubo foi mantido a 98 °C por 1 segundo, a 62 °C por 5 segundos e a 72 °C por 30 segundos. Ao término dos ciclos, o tubo foi mantido a 72 °C por 1 minuto.

Após a PCR, as quatro soluções idênticas foram misturadas, com adição de 8 µL um tampão de carga (Anexo A), e passaram por um processo de eletroforese, em que o DNA sintetizado durante as reações percorreu através de um gel de agarose, com ajuda de corrente elétrica de 80v por 30 minutos. O gel foi feito com tampão TAE (Anexo A), Agarose 1% (peso/volume) e 0,003% de brometo de etídeo. Esse processo separou o gene *Csnpr3-4* sintetizado dos outros reagentes usados na PCR. Com ajuda de um transiluminador ultravioleta, o segmento em que o gene estava presente foi fisicamente separado do restante do gel com um bisturi.

O gene *Csnpr3-4* foi retirado do fragmento de gel de agarose seguindo o protocolo do fabricante do kit de purificação “QIAEX II Gel Extraction Kit” (QIAEX, Alemanha). Primeiramente, o segmento de gel foi diminuído para que não pesasse mais que 250 mg. Este fragmento foi transferido para um tubo de micro centrífuga, em que foram adicionados 750 µL do tampão “QX1” e 10 µL do reagente “QIAEX II” (ressuspendido por 30 segundos em “Vortex”). Essa solução foi aquecida a 50 °C e homogeneizada em “Vortex” a cada 2 minutos por cerca de 10 minutos (até a dissolução do gel). Após esse período, a amostra foi centrifugada por 30 segundos a 12.225 g e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 500 µL do tampão “QX1”, ressuspendendo a amostra em vórtex. A centrifugação anterior foi repetida e após o descarte do sobrenadante, foram realizadas duas lavagens da amostra, adicionados 500 µL do tampão “PE”, centrifugando a solução nas mesmas especificações anteriores e a remoção do sobrenadante. Após a última lavagem, o precipitado foi seco em capela de fluxo laminar por cerca de 15 minutos (até obter uma coloração branca opaca). O precipitado seco foi ressuspendido após a adição de 20 µL de água destilada estéril. Uma última centrifugação foi feita e o sobrenadante líquido contendo o gene *Csnpr3-4* foi coletado em um novo tubo estéril (Os tampões QX1, PE e o reagente QIAEX II são componentes do kit).

### 3.2.2 Obtenção do Vetor Binário

O gene *Csnpr3-4* isolado foi ligado ao vetor de clonagem pJET1.2/Blunt (Figura 9) como primeiro passo para a obtenção do vetor binário. O vetor pJET1.2 faz parte do kit

“CloneJET PCR Cloning Kit” (Thermo Scientific, EUA), porém para a ligação entre o gene e o vetor foi feita com ajuda da enzima “T4 DNA Ligase” (Promega, EUA). Foram adicionados em um tubo de micro centrífuga 1  $\mu$ L da “T4 DNA Ligase”, 1  $\mu$ L do tampão de reação, 7,5  $\mu$ L do gene *Csnpr3-4* e 0,5  $\mu$ L do vetor de clonagem pJET1.2/Blunt. A reação foi mantida a 16 °C por 16 horas.

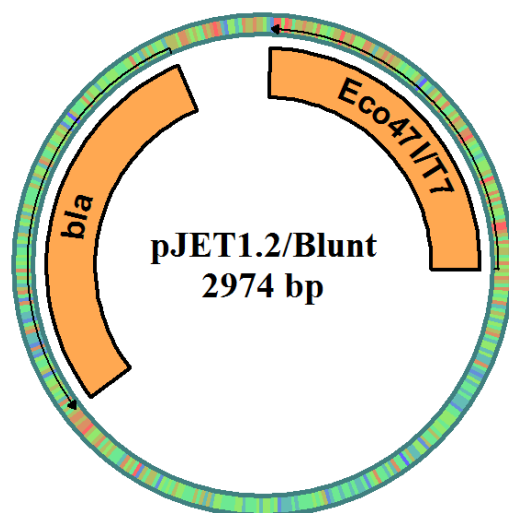


Figura 9 - Representação do plasmídeo pJet1.2/Blunt usando o software pDRAW32, em que o gene *bla* confere resistência ao antibiótico ampicilina e o gene *Eco47I/T7* produz uma endonuclease letal à bactéria, o gene *Csnpr3-4* foi inserido interrompendo a sequência do gene *Eco47I/T7*, inativando sua capacidade letal

Após a espera da etapa anterior, realizou-se a precipitação do produto ligado, adicionando 1  $\mu$ L de acetato de amônio 7,8M e 27,5  $\mu$ L de etanol à reação de ligação. A solução foi então resfriada à -80 °C em ultrafreezer por 20 minutos. Após esse tempo, foi feita uma centrifugação a 13.200 g por 20 minutos em uma centrífuga resfriada a 4 °C. O sobrenadante obtido foi descartado e ao precipitado foi adicionado 100  $\mu$ L de etanol 70%, foi centrifugado a 13.200 g por 7 minutos e após esse procedimento, o sobrenadante foi descartado e o precipitado seco no fluxo laminar. Após a secagem, foram adicionados 4  $\mu$ L de água mili-Q estéril ao plasmídeo precipitado pJET1.2/*Csnpr3-4*.

Em seguida, realizou-se a inserção desse plasmídeo na bactéria *Escherichia coli* estirpe Dh5 $\alpha$  por meio de eletroporação. Esse processo consistiu na homogeneização do plasmídeo pJET1.2/*Csnpr3-4* obtido em 40  $\mu$ L de solução de células eletro-competentes de *E. coli*. Essa mistura foi transferida para uma cubeta especial na qual foi realizado no Eletroporador (BioRad, EUA) o choque para a inserção do plasmídeo no interior da bactéria. Após a eletroporação, a solução foi diluída em 800  $\mu$ L de meio de cultura SOC comercial (Invitrogen, EUA), em que foi incubada a 37 °C sob agitação por uma hora. Decorrido este tempo, para fim de rápida secagem, as células foram concentradas por meio de uma rápida centrifugação e subsequente

diluição no mesmo meio de cultura SOC, porém, em volume menor. A cultura concentrada foi transferida para placa de Petri com meio de cultura YEP sólido (Anexo B) contendo o antibiótico ampicilina ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ). As bactérias foram espalhadas com ajuda de alça de Drigalski até sua secagem. A placa inoculada com as bactérias foi incubada a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  até o dia seguinte.

Durante esse período, as células de bactérias em que houve a inserção do plasmídeo pJET1.2/*Csnpr3-4* desenvolveram colônias que foram selecionadas e inoculadas em frascos, do tipo Erlenmeyer, contendo meio de cultura YEP líquido suplementado com o antibiótico ampicilina ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), a fim de multiplicação e avaliação dessas colônias. Os frascos foram incubados a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  sob agitação até o dia seguinte.

Para a avaliação das colônias de bactérias, foi feito um procedimento de extração e purificação do material genético das células bacterianas chamado Miniprep. Foi seguido o protocolo desenvolvido pelo fabricante do kit “Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega, EUA). Primeiramente, foi precipitado, por meio de centrifugação por 1 min a  $11.336 \text{ g}$ , por duas vezes  $1,5 \text{ mL}$  da cultura de bactérias, somando um total de  $3 \text{ mL}$ . O precipitado foi ressuscitado com a adição de  $250 \text{ } \mu\text{L}$  da solução de ressuspensão, foi adicionado  $250 \text{ } \mu\text{L}$  da solução de lise à mistura, que agiu por 4 minutos. Em seguida foram adicionados à solução  $10 \text{ } \mu\text{L}$  de proteinase alcalina, que agiu, também, por 4 minutos. Ao final desta etapa, foram adicionados  $350 \text{ } \mu\text{L}$  da solução de neutralização. O tubo foi invertido gentilmente e levado à centrífuga onde passou 10 minutos a  $11.336 \text{ g}$ . Após esse tempo, o sobrenadante foi coletado e colocado sobre a micro-coluna de filtragem acoplada a um tubo coletor, o conjunto foi centrifugado por 1 minuto a  $11.336 \text{ g}$ . A solução filtrada foi descartada e a coluna foi lavada duas vezes adicionando  $600 \text{ } \mu\text{L}$  da solução de lavagem e centrifugando por 1 minuto a  $11.336 \text{ g}$ . Ao final, a coluna foi transferida para novo tubo coletor onde foram adicionados então  $100 \text{ } \mu\text{L}$  de água destilada estéril à coluna, o novo conjunto foi centrifugado por 2 minutos a  $11.336 \text{ g}$ , obtendo no produto filtrado o material genético das bactérias.

A avaliação desse material genético, para confirmar a ligação do gene *Csnpr3-4* ao vetor pJET1.2/Blunt, foi feita através de digestões enzimáticas visando o corte no início e final de gene, local onde foram inseridos os sítios de restrição para a clonagem. Neste caso, as enzimas usadas foram *NcoI* e *BstEII* de digestão rápida, FastDigest (Thermo Scientific, EUA). Usando o protocolo descrito pelo fabricante, a reação foi montada usando os seguintes reagentes:  $1 \text{ } \mu\text{L}$  da enzima *NcoI*,  $1 \text{ } \mu\text{L}$  da enzima *BstEII*,  $2 \text{ } \mu\text{L}$  do tampão de reação 10X,  $2 \text{ } \mu\text{L}$  de água destilada estéril e  $14 \text{ } \mu\text{L}$  do DNA obtido da bactéria. A reação foi mantida a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 8 minutos. Após esse tempo, foram adicionados à amostra  $2 \text{ } \mu\text{L}$  do tampão de carga e foi feita a eletroforese



como descrito anteriormente. Com a ligação do gene *Csnpr3-4* ao vetor pJET1.2/Blunt e a inserção do conjunto em *E. coli*, foi feita uma suspensão misturando a cultura líquida das bactérias e glicerol 50% à uma proporção 1:1, formando assim um estoque para ser guardado em ultrafreezer a -80 °C.

A fim de garantir a integridade da sequência do gene obtido pelos processos de transcriptase reversa e PCR, a amostra obtida da Miniprep foi enviada para sequenciamento no Laboratório de Genômica e Biologia Molecular de Plantas, junto ao Departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba, São Paulo.

Com os resultados do sequenciamento indicando que não havia problemas com a sequência dos nucleotídeos, os trabalhos de clonagem puderam continuar. Antes de transferir o gene *Csnpr3-4* para o vetor binário de transformação, segundo a estratégia desenvolvida anteriormente, foi preciso inseri-lo em um vetor intermediário chamado pCAMBIA 1201 (Cambia, Austrália) (Figura 10), ligando assim o gene ao promotor 35S. Para isso, foram feitas reações de digestão enzimática com as enzimas *NcoI* e *BstEII*, sendo quatro reações para o plasmídeo pJET1.2/*Csnpr3-4* e duas reações para o plasmídeo pCAMBIA 1201. O DNA digerido nas reações foi separado por meio de eletroforese e o gene *Csnpr3-4* e a parte contendo o promotor 35S do vetor pCAMBIA 1201 foram fisicamente separados do gel e purificados usando o kit “QIAEX II Gel Extraction Kit” descrito anteriormente.

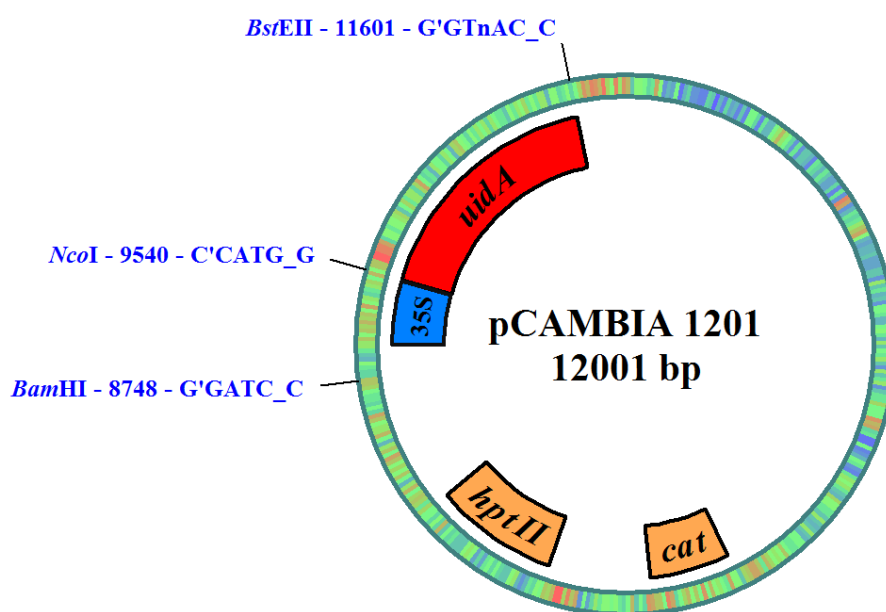


Figura 10 - Representação do vetor binário pCAMBIA 1201 usando o software pDRAW32, indicando a presença dos genes: *cat*, responsável pela resistência ao antibiótico cloranfenicol; *hptII*, responsável pela resistência ao antibiótico higromicina; *uidA*, responsável pela produção da proteína repórter GUS. Também estão representados o promotor 35S, que foi usado como promotor do gene *Csnpr3-4* e os

sítios de restrição das enzimas *NcoI* e *BstEII*, usadas na digestão para remoção do gene *uidA*, e a enzima *BamHI*, usada na fase seguinte para remoção do conjunto 35S – *Csnpr3-4*

Para a ligação dos dois fragmentos, foi necessário fazer uma quantificação do DNA obtido após a purificação. Isso foi feito usando o aparelho de quantificação fluorométrica Qubit® 1.0 (Invitrogen, EUA), juntamente do kit de reações de alta sensibilidade “Qubit® dsDNA HS Assay Kit” (Invitrogen, EUA). Para a quantificação foi preciso preparar uma solução de trabalho misturando 199 µL do tampão e 1 µL do reagente de quantificação para cada amostra a ser quantificada e para os dois padrões do kit, usados para calibrar o aparelho. Para cada padrão, foram adicionados 190 µL da solução de trabalho e 10 µL de cada solução padrão. As amostras foram preparadas adicionando-se 198 µL da solução de trabalho e 2 µL de cada amostra em seu respectivo tubo. Os tubos foram homogeneizados e deixados descansar por 3 minutos, após esse tempo, foi feita a quantificação usando o aparelho.

A quantificação foi feita, pois, a ligação segue uma proporção de 5:1 entre o inserto (gene *Csnpr3-4*) e o vetor (pCAMBIA 1201). A ligação foi feita com a enzima T4 DNA Ligase, do mesmo modo que descrito anteriormente, mas seguindo essa proporção. O volume final da reação foi de 20 µL, usando assim 2 µL do tampão de reação e 2 µL da enzima T4 DNA Ligase. Não é recomendado o uso de mais que 100 ng do inserto, sendo assim, é possível usar água destilada estéril para completar o volume final da reação. O tempo de incubação e temperatura continuam os mesmos que descritos anteriormente.

No dia seguinte, foi feita a precipitação da ligação, adicionando desta vez 2 µL de acetato de amônio 7,8 M e 55 µL de etanol à reação. O restante do processo de precipitação continuou como descrito anteriormente. Em seguida, foi feita a eletroporação da ligação pCAMBIA 1201 – *Csnpr3-4* em *E. coli* da mesma maneira vista anteriormente. As bactérias eletroporadas, após serem ressuscitadas, foram colocadas sobre meio de cultura YEP sólido contendo o antibiótico cloranfenicol (100 mg L<sup>-1</sup>). O cultivo da bactéria, a Miniprep, a avaliação e o estoque foram feitos como descrito acima.

Após a confirmação da inserção em *E. coli* da ligação entre o vetor pCAMBIA 1201 e o inserto *Csnpr3-4*, o gene junto do promotor 35S foram transferidos para o vetor binário, pCAMBIA 2201 (Cambia, Austrália) (Figura 11). Para isso foram feitas digestões como as anteriores mas usando as enzimas *BamHI* e *BstEII*. Os processos de eletroforese, purificação, quantificação, ligação, precipitação, eletroporação, cultivo de bactéria, avaliação, e preparo de estoque foram os mesmos descritos acima.

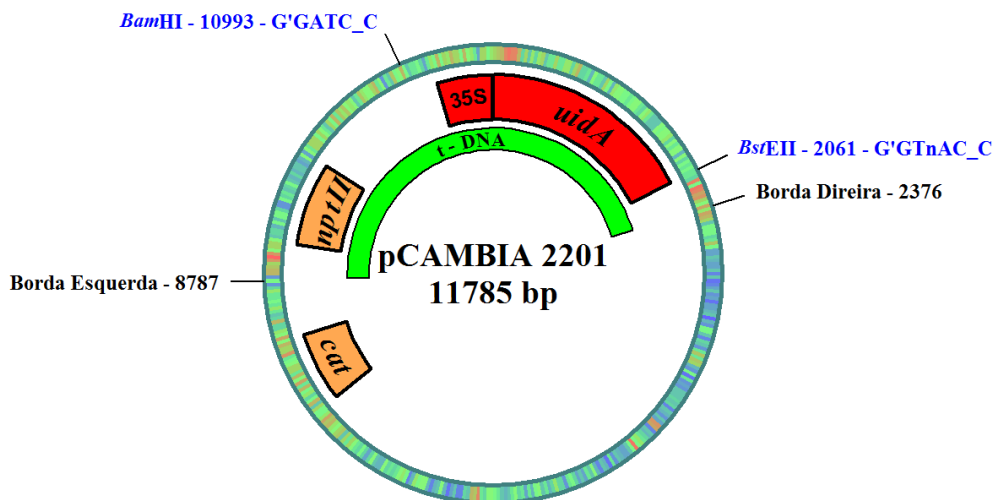


Figura 11 - Representação do vetor binário pCAMBIA 2201 usando o software pDRAW32, indicando a presença dos genes: *cat*, responsável pela resistência ao antibiótico cloranfenicol; *nptIII*, responsável pela resistência ao antibiótico canamicina; *uidA*, e seu promotor 35S, responsáveis pela produção da proteína repórter GUS. Também estão representados os sítios de restrição das enzimas *Bam*HI e *Bst*EII, usadas na digestão para remoção do promotor 35S e do gene *uidA*. Também está representado o t-DNA que é limitado pelas Bordas Esquerda e Direita, sendo essas sequências de 25 pb a partir dos nucleotídeos indicados

### 3.2.3 Clonagem em *Agrobacterium tumefaciens*

O novo vetor obtido, chamado pCAMBIA 2201 – *Csnpr3-4*, é o vetor binário que foi usado para as transformações genéticas de citros e tomate. Entretanto, foi necessário sua inserção em *Agrobacterium tumefaciens* estirpes EHA105 e GV3101. A estirpe EHA105 foi usada pelo fato de o laboratório de plantas hortícolas usar esta estirpe para as transformações genéticas de citros, a estirpe GV3101 foi usada após informações posterior do Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal que cedeu esta estirpe para uso nos experimentos. Isso foi feito por meio de choque térmico em células competentes. Para isso, foram adicionados 2  $\mu$ L do plasmídeo em 100  $\mu$ L de célula competente. Essa mistura foi mantida no gelo por 30 minutos, após esse tempo foi colocado em nitrogênio líquido por 2 minutos e, em seguida, a 37 °C por 5 minutos.

Após o procedimento de choque térmico, foi adicionado à bactéria, 1 mL de meio de cultura SOC e foi incubada a 28 °C por 2 horas. Decorrido este tempo, a solução foi centrifugada e o precipitado ressuspenso em um volume menor de meio SOC. A bactéria foi então colocada sobre meio de cultura YEP sólido, contendo os antibióticos rifampicina (50 mg L<sup>-1</sup>) e canamicina (100 mg L<sup>-1</sup>), onde foi incubada por 2 a 3 dias a 28 °C.

As colônias obtidas após a incubação foram avaliadas após serem cultivadas em meio YEP líquido, contendo os mesmos antibióticos, até o dia seguinte. Foi feita uma Miniprep como descrito acima, e as avaliações foram feitas por digestão com os pares de enzimas *Nco*I – *Bst*EII

e *Bam*HI e *Bst*EII, além de uma PCR usando os primers específicos para o gene *Csnpr3-4*, *Csnpr3-4-F* e *Csnpr3-4-R*. Confirmada a presença do vetor binário e o gene *Csnpr3-4* na *A. tumefaciens*, foi possível iniciar os trabalhos de transformação genética.

### 3.3 Transformação genética de citros e Micro-Tom

As transformações genéticas foram feitas usando a bactéria *Agrobacterium tumefaciens* contendo o vetor binário onde foram clonados os genes *npr1* e *npr3-4*. O gene *Csnpr1* já havia sido clonado durante o projeto de iniciação científica (RODRIGUES et al., 2012) (Figura 12). O gene *Csnpr3-4* foi clonado durante esse projeto de mestrado.

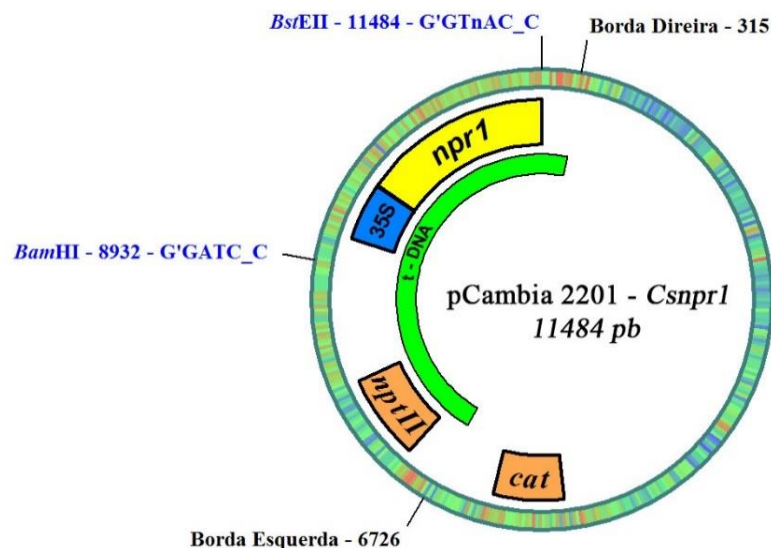


Figura 12 - Esquema do plasmídeo pCAMBIA 2201 – *Csnpr1*, clonado anteriormente usando o software pDRAW32, indicando a presença dos genes de resistência *cat* e *nptII*, o promotor 35S junto ao gene *Csnpr1*, também estão indicadas as bordas direita e esquerda que limitam o T-DNA. Os sítios de restrição para as enzimas *Bam*HI, *Bst*EII e *Nco*I

#### 3.3.1 Preparo da cultura de *Agrobacterium tumefaciens*

Para inocular os explantes, tanto de laranja doce como de tomateiro Micro-Tom, foi preciso preparar a cultura da bactéria. Isso foi feito espalhando-se sobre uma placa de Petri, uma pequena quantidade do estoque de bactéria, feito ao final da clonagem, contendo o vetor binário. Essa placa de Petri continha meio de cultura YEP sólido suplementado com os antibióticos rifampicina ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) e canamicina ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ). A bactéria foi cultivada por 3 dias a  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Decorrido esse tempo, uma ou duas colônias isoladas de bactéria foram adicionadas, com ajuda de palitos de dentes estéreis, a um frasco do tipo *Erlenmeyer* contendo 50 mL de meio de cultura YEP líquido com a mesma quantidade dos antibióticos usados anteriormente.

Essa cultura foi mantida sob agitação orbital a 28 °C por cerca de 16 horas. No dia seguinte, foi medida em espectrofotômetro a absorvância de luz, com comprimento de onda de 600nm, da cultura de bactérias. A cultura continuou a incubação até que absorvância tenha atingido valores de ordem entre 0.5 a 0.6 OD (do inglês “Optical Density” - Densidade Ótica), que corresponde a cerca de  $10^8$  bactérias mL<sup>-1</sup>. Em seguida, toda a cultura de *A. tumefaciens* foi transferida para um tubo de centrífuga do tipo Falcon, e centrifugada por 15 minutos a 2665 g e 15 °C. Após esse tempo, o meio de cultura foi descartado e a bactéria foi ressuspensa em meio MS líquido. A ressuspensão foi feita de modo diferente para cada cultura: Para transformação genética de laranja doce, foi adicionado volume de meio MS líquido (Anexo B) igual ao volume de meio YEP descartado multiplicado pelo valor obtido na espectrofotometria; para o tomateiro Micro-Tom foi adicionado meio MS líquido até uma segunda medição em espectrofotômetro apresentasse valor próximo a 0,3 OD.

Nos dois casos, após a ressuspensão das células de *A. tumefaciens*, foram adicionados à suspensão 100 mg L<sup>-1</sup> de acetosseringona. Esse inóculo foi reservado até o término da preparação dos explantes para a transformação genética.

### 3.3.2 Preparo dos explantes de citros para transformação genética

Os frutos para a extração das sementes de laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) usadas foram cedidas pela empresa CITROGRAF mudas, localizada em Rio Claro, Estado de São Paulo. Primeiramente, foi removido o tegumento de sementes de laranjas ‘Hamlin’ para facilitar a germinação. As sementes sem o tegumento passaram por um processo de assepsia, que consistiu em agitar as sementes por 20 minutos em solução de água e hipoclorito de sódio comercial (2,0 a 2,5% de cloro ativo) na proporção de 3:1. Após a desinfecção, as sementes foram enxaguadas por 3 vezes com água destilada estéril.

Em fluxo laminar, as sementes, agora livres de qualquer contaminação, foram introduzidas, em pares, em tubos de ensaio contendo cerca de 5mL de meio de cultura MS sólido (Anexo B). Os tubos foram fechados, vedados com filme plástico e colocados em caixas de papelão. Os explantes ficaram nesta condição escura por 40 dias em sala de crescimento a 25 °C. Após esse período, os tubos foram retirados das caixas e mantidos na mesma sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas por mais 15 dias.

Após a germinação, crescimento e o aparecimento da coloração verde, as plantas estavam prontas para o processo de transformação genética. Durante o preparo do inóculo de *A. tumefaciens* estirpe EHA105, as plantas foram retiradas dos tubos, e o epicótilo, parte entre os cotilédones e as primeiras folhas, foi segmentado em explantes de cerca de 1 cm de

comprimento. Conforme as plantas foram cortadas, os explantes foram colocados em uma placa de Petri contendo meio de cultura MS líquido, onde ficaram até o momento da transformação genética (

Figura 13 a-d).

### 3.3.3 Transformação genética de laranja doce

O inóculo de *A. tumefaciens* EHA 105 foi vertido em uma placa de Petri em que os explantes de epicótilo de citros foram transferidos, aos poucos, e mantidos submersos por 10 minutos. Decorrido esse tempo, foram transferidos para um papel toalha esterilizado para secagem. Após secos, os segmentos foram transferidos para uma placa de Petri contendo meio de cocultivo de citros (MCC) (Anexo B).

As placas foram fechadas, vedadas e a co-cultura de citros e de *A. tumefaciens* foi mantida em incubadora do tipo BOD (do inglês “Biochemical Oxygen Demand” – Demanda Bioquímica de Oxigênio), a 23 °C, por dois dias.

Após os dois dias de cocultivo, os segmentos de epicótilo foram transferidos para nova placa de Petri contendo meio de seleção de citros (MSC) (Anexo B). Os explantes permaneceram nesse meio de cultura por 45 dias, sendo que nos primeiros 30 dias foram mantidos em incubadora BOD a 27 °C, sem presença de luz. A partir deste momento, a incubação de todas as etapas foi feita em sala de crescimento a 25 °C com fotoperíodo de 16 horas. Durante o período de cultivo em MSC, a cada 15 dias, os segmentos foram transferidos para placas de Petri contendo MSC novo, selecionando-se os explantes que apresentaram sinais de regeneração e descartando-se os que apresentaram oxidação e contaminação.

Após esse período de 45 dias, os novos brotos transgênicos foram individualizados e transferidos para tubos de ensaio contendo cerca de 5 mL de meio de enraizamento de citros (MEC) (Anexo B). Os brotos ficaram neste meio por 30 a 45 dias, transferindo-os para MEC novo a cada 15 dias. Os brotos, conforme seu crescimento, foram enxertados *in vitro* em plantas de citrange ‘Carrizo’ (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*) obtidas por semeadura *in vitro* do mesmo modo que a laranja ‘Hamlin’. A enxertia consistiu na limpeza da planta de citrange ‘Carrizo’, retirando-se os cotilédones e excesso de raiz além da parte superior de seu epicótilo. Foi feito então um pequeno corte em paralelo com a direção do epicótilo. Foi cortada, em forma de cunha, a base do pequeno broto transgênico, que em seguida foi introduzido no corte feito no epicótilo do citrange ‘Carrizo’.

A planta enxertada foi colocada em tubo de ensaio contendo meio de cultura MS líquido sendo novamente transferida a cada 15 dias. Desta vez, durante a transferência os brotos escapes

de citrange ‘Carrizo’ foram removidos e descartados. Após 45 dias da enxertia, as plantas foram transferidas para vasos contendo substrato autoclavado. Foi feita a aclimatização das plantas, usando-se sacos plásticos que encobriram os vasos, abrindo-se e retirando-se os sacos gradativamente até que fosse possível transferir as plantas para casa de vegetação (

Figura 13 a-d).

#### 3.3.4 Preparo dos explantes de tomateiro Micro-Tom para transformação genética

As sementes de tomateiro Micro-Tom foram fornecidas pelo Prof. Lázaro Eustáquio Pereira Peres do Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal do Departamento de Ciências Biológicas, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba, São Paulo.

A assepsia das sementes de tomateiro Micro-Tom foi feita por 10 minutos, sob agitação, em uma solução de água e hipoclorito de sódio comercial (2,0 a 2,5% de cloro ativo) na proporção de 2:1 e a adição de uma gota de detergente comercial. As sementes foram enxaguadas por 3 vezes com água destilada estéril e colocadas em frascos de vidro do tipo de maionese contendo meio de germinação de tomate (MGT) (Anexo B). Os frascos foram mantidos em sala de crescimento a 25 °C por 8 dias. Nos primeiros 4 dias foram mantidos dentro de caixas de papelão e os últimos 4 dias em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas.

Após a germinação e o crescimento, as plantas estavam prontas para a transformação genética. Durante o preparo do inóculo de *A. tumefaciens* estirpe GV3101 e EHA 105, as plantas foram removidas dos frascos e seus cotilédones foram separados e cortados ao meio no sentido perpendicular à nervura central da folha. Cada metade de cotilédone foi colocada, com a parte abaxial voltada para baixo, em meio de cocultivo de tomate (MCT) (Anexo B), vertido em placa de Petri, onde foram mantidas até o término do preparo da *A. tumefaciens* o momento da transformação genética (

Figura 13 e-h).

#### 3.3.5 Transformação genética de tomateiro Micro-Tom

Com os explantes de cotilédones de tomate já colocados sobre o MCT, a inoculação de *A. tumefaciens* estirpe GV3101 ou EHA105 foi feita pingando-se uma gota, sobre cada explante com ajuda de uma pipeta estéril (Figura 14 a). O inóculo foi mantido sobre os explantes por 10 minutos. Em seguida, retirou-se o excesso de bactéria com ajuda de micropipeta. O restante foi absorvido colocando-se, individualmente, duas folhas de papel filtro estéril sobre a placa

(Figura 14 b). As placas foram fechadas, vedadas e a co-cultura de Micro-Tom e *A. tumefaciens* foi mantida em incubadora do tipo BOD a 23 °C por dois dias.



Figura 13 - a-d: Fases do preparo do explante de citros para a transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*. a: Plantas germinadas estioladas após período de crescimento no escuro. b: Planta apresentando a coloração verde após incubação sob incidência de luz. c: Cortes dos explantes de citros. d: Explantes em placa contendo meio de cultura MS líquido. e-h: Preparo dos explantes de tomateiro Micro-Tom para a transformação genética: e: Plântulas em frasco do tipo de maionese 8 dias após a semeadura. f: Detalhe da plântula quando pronta para a transformação genética. g: Detalhe dos cortes feitos nos cotilédones para a obtenção dos explantes. h: Disposição dos explantes em meio de cocultivo de tomate (MCT)



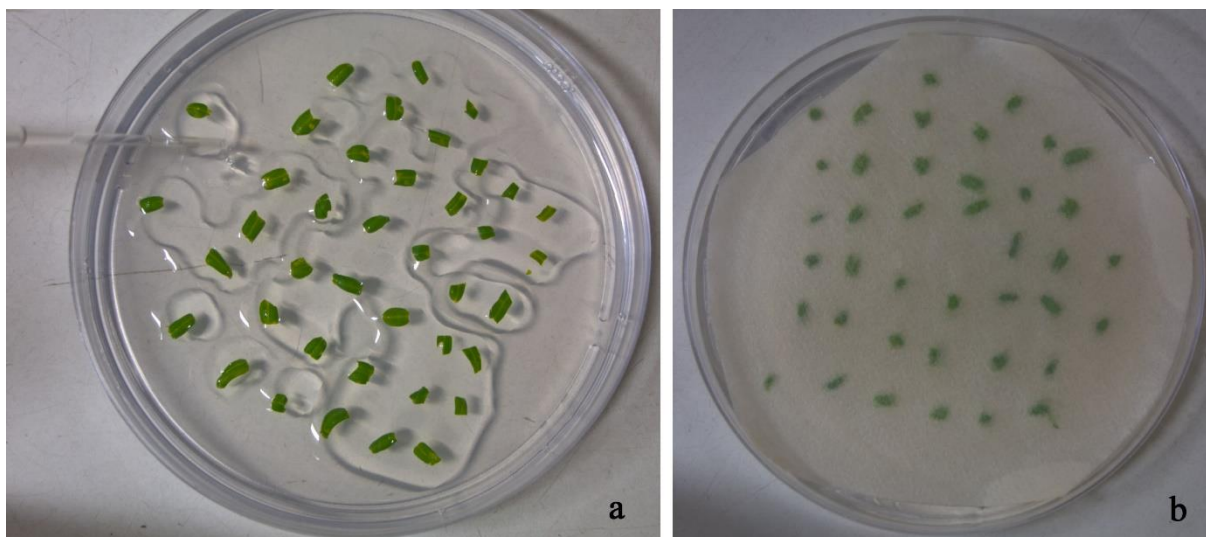


Figura 14 - Detalhes da transformação genética de tomateiro Micro-Tom. **a:** Inoculação de *Agrobacterium tumefaciens* sobre os explantes com ajuda de pipeta estéril. **b:** Secagem do excesso de inóculo com papel filtro estéril

Após os 2 dias de co-cultivo, os segmentos de epicótilo foram transferidos para nova placa de Petri contendo meio de seleção de tomate (MST) (Anexo B). Os explantes ficaram nesse meio de cultura por 21 dias, em sala de crescimento, a 25 °C, com fotoperíodo de 16 horas. Após esse período, os brotos regenerados foram individualizados e transferidos para meio de enraizamento de tomate (MET) (Anexo B), onde ficaram por mais 30 dias. Durante esse período, houve transferência dos brotos para MET novo no décimo quinto dia.

Após a formação das raízes, os brotos regenerados foram transferidos para vasos contendo substrato estéril. Foi feita a aclimatização com sacos plásticos e, assim que possível, foram transferidas para casa de vegetação.

### 3.4 Identificação das plantas geneticamente modificadas

Embora tenham sido utilizados antibióticos durante a fase de seleção dos brotos regenerados, foi preciso confirmar a transformação genética por meio das análises moleculares PCR e Southern blot.

#### 3.4.1 Avaliação das plantas transgênicas por PCR

A avaliação por meio de PCR seguiu o mesmo procedimento para as culturas de citros e tomate. Para isso, foi preciso, primeiramente, fazer a extração do DNA das plantas. Esse procedimento foi feito a partir de cerca de 100 mg de tecido foliar coletado em um tubo de micro centrífuga. Com ajuda de um pistilo próprio para o tubo, esse material foi congelado em nitrogênio líquido e macerado. Foram então adicionados ao material vegetal 650 µL do tampão

CTAB (Anexo A) e deixado em banho Maria a 60 °C por uma hora, agitando o tubo a cada 10 minutos.

Decorrido esse tempo, foram adicionados ao tubo 650 µL de solução gelada de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 24:1. Os tubos foram invertidos vagarosamente e centrifugados por 5 minutos a 13.200 g e 4 °C. O sobrenadante obtido foi coletado em um novo tubo ao qual foi adicionado o mesmo volume obtido de isopropanol gelado. Os tubos foram novamente invertidos vagarosamente por algumas vezes e deixados em ultra freezer a -80 °C, por 20 minutos. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi então descartado e o precipitado foi lavado por duas vezes, adicionando-se 500 µL de etanol 70% gelado. A solução foi centrifugada por 5 minutos nas mesmas especificações anteriores, e descartando o sobrenadante. Após a segunda lavagem, o precipitado foi seco em fluxo laminar e, ao final, foi ressuspenso em solução contendo RNase. A solução contendo o DNA extraído foi incubada por uma hora, a 37 °C, antes de ser usada para a PCR.

Para cada amostra, foram realizadas duas reações diferentes, uma delas para avaliar a presença do transgene usando primers para o gene *nptII*, sendo o primer forward (*nptII* – F 5' GAGGCTATTCGGCTATGACTGG 3') e o primer reverse (*nptII* – R 5' ATTCGCCGCCAAGCTCTT 3'). A outra reação foi feita para avaliar a ausência de contaminação por *A. tumefaciens*, evitando-se assim falsos positivos. Para isso, foram usados primers para o gene *virG*, sendo o primer forward (*virG* – F 5' CTGGCGGCAAAGTCTGAT 3') e o primer reverse (*virG* – R 5' TGTCGTAAACCTCCTCGT 3').

A PCR foi feita usando a enzima *Taq* polimerase do kit “GoTaq® Green Master Mix” (Promega, USA). As reações foram feitas no gelo, e em cada tubo foram adicionados: 12,5 µL do Mix provido pelo kit, 1 µL de cada primer já diluído na concentração de 10µM do respectivo par, 8,5 µL de água destilada estéril e 2 µL do DNA extraído. O programa da PCR iniciou-se a 95 °C por 2 minutos, seguido por 30 ciclos nos quais o tubo foi mantido a 95 °C por 30 segundos, a 55 °C (*nptII*) e 53 °C (*virG*) por 30 segundos e a 72 °C por 45 segundos. Ao término dos ciclos, o tubo foi mantido a 72 °C por 5 minutos. Após a reação, foi feita uma eletroforese, do mesmo modo descrito anteriormente, com as amostras obtidas a fim de observar o DNA sintetizado durante a PCR.

#### 3.4.2 Avaliação das plantas transgênicas por Southern blot

A avaliação por meio de Southern blot foi realizada para as plantas de tomateiro Micro-Tom já avaliadas por PCR usando o seguinte procedimento. A análise também foi feita com o

DNA das plantas, porém diferentemente da PCR a quantidade necessária para a análise é cerca de 10 vezes maior; sendo assim, a extração também deve ser maior.

Primeiramente, para a extração de DNA para Southern blot, foi coletado 1,4 g de folhas. Esse material foi macerado em cadinho com pistilo sob resfriamento por nitrogênio líquido. As amostras foram colocadas em tubos do tipo Falcon, no qual foram adicionados 7 mL do tampão CTAB, homogeneizado e deixado em banho-maria a 60 °C por uma hora, agitando a cada 10 minutos.

Decorrido esse tempo, foram adicionados 7 mL de solução de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 24:1, as amostras foram gentilmente agitadas e centrifugadas por 15 minutos a 3.838 g e 4 °C. O sobrenadante obtido foi coletado e transferido para um novo tubo, em que foi adicionado isopropanol em igual volume. Os tubos foram invertidos por algumas vezes e incubados em ultra freezer a -80 °C por 20 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 10 minutos nas mesmas condições anteriores.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado deixando somente o precipitado, que foi lavado por duas vezes adicionando 2 mL de Etanol 70% e centrifugando por 5 minutos nas especificações usadas até agora, em cada lavagem o sobrenadante foi descartado e após o último descarte o precipitado foi seco com ajuda de fluxo laminar. Por fim, o precipitado foi ressuspenso em 200 µL de água destilada estéril contendo RNase, incubado a 37 °C por 1 hora e à temperatura ambiente até o dia seguinte.

No segundo dia da extração, o DNA diluído foi transferido para um tubo de micro centrífuga, em que foram adicionados 300 µL de fenol. As amostras foram invertidas por algumas vezes e centrifugadas por 10 minutos a 11.093 g e 4 °C. O sobrenadante foi coletado em novo tubo no qual foi adicionado solução de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 24:1. Novamente as amostras foram vagarosamente agitadas e centrifugadas por 10 minutos nas mesmas condições anteriores.

O sobrenadante obtido desta centrifugação foi transferido para um outro tubo de micro centrífuga no qual foram adicionados, para cada 100 µL coletados, 50 µL de acetato de amônio 7,8M e 375 µL de etanol absoluto. As amostras foram invertidas algumas vezes e incubadas em ultra freezer a -80 °C por 20 minutos. Em seguida, foram centrifugadas por 20 minutos a 11.093 g e 4 °C.

O sobrenadante obtido foi descartado e o precipitado foi lavado por duas vezes adicionando-se 500 µL de etanol 70% e centrifugando por 5 minutos a 11.093 g e 4 °C. Em cada lavagem, o sobrenadante foi descartado e após a última, o precipitado foi seco em fluxo laminar e ressuspenso em 150 µL de água destilada estéril contendo RNase.

Ao final da extração, antes da análise de Southern blot, as amostras foram quantificadas usando o aparelho Qubit 1.0, do mesmo modo que usado anteriormente, mudando somente para o kit de amplo espectro “Qubit® dsDNA BR Assay Kit” (Invitrogen, EUA). As reações para os dois kits usados são as mesmas.

Com as amostras quantificadas, o processo de análise por Southern blot iniciou-se pela digestão, em tubo de micro centrífuga, de 20 a 60 µg do DNA de cada amostra. A enzima usada foi a *EcoRI*, na quantidade de 5 unidades de enzima para cada 30 µg de DNA. Nesta reação, foram colocados 30 µL da solução tampão e completado para 300 µL com água mili-Q estéril. A digestão ocorreu por 16 horas a 37 °C.

No dia seguinte, o DNA digerido foi precipitado com 30 µL de acetato de amônio 7,8M e 750 µL de etanol absoluto. Os tubos foram invertidos vagarosamente e incubados em ultra freezer a -80 °C, por 40 minutos. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 13.200 g e 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado, com 500 µL de etanol 70 %, centrifugando-se do mesmo modo que anteriormente. O sobrenadante foi novamente descartado e o DNA digerido foi seco em fluxo laminar e ressuspenso em 40 µL de água mili-Q estéril em cada amostra.

Para o controle positivo e a sonda usados no Southern blot, foi feito uma PCR usando o kit “GoTaq® Green Master Mix” e os *primers* do gene *nptII*. Foi feita uma eletroforese como descrito anteriormente e em seguida o produto da PCR foi purificado usando o kit “QIAEX II Gel Extraction Kit”. Após a purificação, o DNA obtido foi quantificado em Qubit 1.0, usando o kit “Qubit® dsDNA HS Assay Kit” e diluído para 10 ng µL<sup>-1</sup> e 0,1 ng µL<sup>-1</sup> em água destilada estéril, a serem usados como sonda e controle positivo respectivamente.

Durante os tempos de espera da fase de precipitação, foi preparado um gel de agarose feito com tampão TAE, agarose 0.8% (peso/volume) e 0,003% de brometo de etídeo. Após o término da precipitação do DNA, foram adicionados 10 µL de solução de sacarose 40 % e 2 µL do tampão de carga em cada amostra. Esses foram colocados no gel de agarose, juntamente com 1 µL da solução 0,1 ng µL<sup>-1</sup> do purificado de PCR do gene *nptII* como controle positivo. A eletroforese correu a 35v, por cerca de 16 horas.

Após a eletroforese, o gel foi preparado para a transferência. Em primeiro lugar, foi fotografado no transiluminador junto a uma régua e cortado a fim de levar somente as partes que continham o DNA digerido. Após isso, foi lavado com 500 mL da solução de despurinação (Anexo A) sob agitação, por 10 minutos. O gel foi então enxaguado com água mili-Q estéril. O próximo passo foi a lavagem com a solução de desnaturação (Anexo A) sob agitação durante 10 minutos. Em seguida, o gel foi novamente enxaguado com água mili-Q estéril. Cada uma

das duas últimas lavagens foi feita com 250 mL da solução de neutralização (Anexo A), agitando-se por 15 minutos e enxaguando-se, a cada lavagem, com água mili-Q estéril.

O próximo passo após as lavagens foi a transferência, na qual foi colocado em um vasilhame de vidro 500 mL da solução SSC 20X (Anexo A). Sobre este, apoiado nas bordas, foi colocada uma placa de vidro. Sobre o vidro, foi colocada uma tira da largura do gel e comprimento suficiente para as pontas encostarem na solução SSC 20X. A partir deste momento, todas as folhas de papel foram cortadas em pedaços do tamanho do gel e umedecidos com um pouco da solução SSC 20X, tomando-se cuidado para não deixar bolhas. Sobre as tiras de papel filtro foi colocado um pedaço de papel cromatográfico. Depois dele foi colocado o gel virado para baixo, sobre o gel foi colocada a membrana “Amersham Hybond” (GE Healthcare, Suécia) e sobre essa um outro pedaço de papel cromatográfico, seguido de três pedaços de papel filtro e uma pilha de cerca de 6 cm de papel toalha. A pilha foi finalizada e nivelada colocando uma outra placa de vidro e peso. A transferência foi mantida dessa maneira durante a noite.

No dia seguinte, a transferência foi desmontada e a membrana foi colocada para secar em estufa a 80 °C por duas horas. Durante esse tempo, foi feita a marcação da sonda usando o kit “Amersham Gene Images AlkPhos Direct Labelling and detection System” (GE Healthcare, Suécia). Em primeiro lugar foi diluído, em tubo de micro centrífuga, 3 µL de Cross-linker em 12 µL de água destilada estéril. Essa diluição foi mantida em gelo. Em um novo tubo, foram adicionados 15 µL do produto de PCR diluído a 10 ng µL<sup>-1</sup> preparado anteriormente. Esse tubo foi incubado a 98 °C por 7 minutos e transferido rapidamente para o gelo, em que foram adicionados 15 µL do tampão de reação, 3 µL do reagente de marcação e os 15 µL da solução de Cross-linker gelada. Essa mistura foi incubada por 30 minutos a 37 °C e reservado no gelo.

Após a secagem da membrana por duas horas, essa foi esfriada em temperatura ambiente por 15 minutos e colocada em uma garrafa de vidro, encostando a parte que não entrou em contato com o gel no interior da garrafa. Foram adicionados 50 mL de solução SSC 5X (Anexo A) e agitada em forno de hibridização por 1 hora e meia em temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi descartada e foram adicionados 50 mL da solução de hibridização (Anexo A) pré-aquecida a 60 °C. A garrafa foi agitada no forno de hibridização por 25 minutos a 60 °C. Após esse tempo, a solução foi recolhida, homogeneizada com a sonda previamente preparada e recolocada na garrafa, na qual ficou junto com a membrana agitando em baixa velocidade e à 60 °C até o dia seguinte.

No último dia da análise de Southern blot, a solução de hibridização foi descartada e foram feitas duas lavagens com 200 mL da solução tampão “Buffer 1” (Anexo A) pré aquecida, a 60 °C cada. As lavagens consistiram na adição de solução e agitação por 15 minutos no forno

de hibridização a 60 °C, após cada lavagem, a solução foi descartada. O próximo passo foi lavar a membrana por mais duas vezes, sendo cada uma com 200 mL da solução tampão “Buffer 2” (Anexo A). As lavagens tiveram duração de 10 minutos sob agitação à temperatura ambiente, descartando a solução após o uso.

Após as lavagens, a membrana foi seca em fluxo laminar com ajuda de pinças e apoiada sobre um azulejo estéril. Sobre a membrana seca, foi colocado, de 30 a 40  $\mu\text{L cm}^{-2}$  da membrana, o agente de detecção do kit “Amersham Gene Images CDP-Star detection Module” (GE Healthcare, Suécia). Decorridos 5 minutos, a membrana foi seca novamente e colocada entre folhas de plástico transparente dentro de um cassete de raio-X. O conjunto foi levado para sala escura onde foi colocado junto uma chapa de raio-X (GE Healthcare, Suécia).

Depois de 50 minutos, a chapa foi revelada, passando por travessas de vidro contendo, primeiro a solução reveladora por 4 minutos; em seguida, enxaguada e colocada na solução fixadora por 15 minutos. Ao final, a chapa foi lavada e seca onde foi possível visualizar as bandas correspondentes a cada amostra.

### **3.5 Avaliação da progênie de tomateiro Micro-Tom por meio de aplicação foliar de canamicina**

Após a avaliação das plantas transgênicas de tomateiro Micro-Tom, essas foram sexualmente propagadas. As sementes foram removidas dos frutos e colocadas em um béquer ou tubo, adicionou-se uma pequena porção de fermento biológico comercial, onde ficou até o dia seguinte, quando as sementes foram enxaguadas e secas sobre papel pardo à temperatura ambiente. Nesse ponto as sementes das plantas transgênicas de Micro-Tom puderam ser armazenadas ou usadas para novos experimentos.

Porém, foi necessário avaliar essa progênie a fim de selecionar as linhagens homozigotas para os transgenes. Isso foi feito semeando, de modo aleatório, a progênie das plantas regeneradas em uma bandeja com substrato. Após 2 semanas foi borrifado sobre as mesmas uma solução contendo o antibiótico canamicina 400  $\text{mg L}^{-1}$  diariamente, por 5 dias.

Após duas semanas da aplicação, as plantas começaram a apresentar sinais da ação do antibiótico, como clorose nas folhas. As plantas foram avaliadas e categorizadas, levando-se em consideração a extensão dos sinais apresentados. Essas foram classificadas em plantas com sinais extremos, plantas com pouco sinais e planta sem sinais. As plantas que não apresentaram nenhum tipo de clorose foram transferidas para vasos onde foram propagadas.

Nas próximas gerações, foram feitas novas avaliações da mesma maneira, a fim de encontrar qual das plantas não apresentava descendência onde não havia mais segregação, ou seja, uma linhagem homozigota.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Identificação dos genes

Junto ao banco de dados do Phytozome, foram encontrados uma série de genes de citros que contém semelhanças aos genes *Atnpr1*, *Atnpr2*, *Atnpr3*, *Atnpr4*, *Atnpr5* e *Atnpr6*. Todos esses genes foram alinhados pelo procedimento CLUSTAL, que identificou semelhanças entre cada gene, montando uma árvore de identidade que indica a proximidade com cada um deles com os genes de *Arabidopsis thaliana*. Com esses dados foi possível observar o acesso do Phytozome “*Csinensis|orange1.1g007849*” como o gene mais próximo aos genes *Atnpr3* e *Atnpr4*. Esse gene foi então nomeado como *Csnpr3-4* (Figura 15).

A árvore de identidade mostrou que o gene *Csnpr3-4* como o mais parecido com o gene *Atnpr3* ou *Atnpr4*. Optou-se então por clonar somente este. A partir da escolha desse gene, as estratégias de clonagem foram traçadas e em primeiro momento foram desenhados os primers para a clonagem, adicionando sítios de restrição para as enzimas *NcoI* e *BstEII* ao final dos primers *Csnpr3-4-F* e *Csnpr3-4-R*, respectivamente

### 4.2 Clonagem do gene *Csnpr3-4*

A confirmação da inserção do gene *Csnpr3-4* no vetor pJET1.2/Blunt foi feita pela digestão com as enzimas *NcoI* e *BstEII*, liberando dois fragmentos de DNA, um deles com 1756 pb referente ao gene e outro com 2974 pb referente ao plasmídeo (Figura 16a). Nessa fase, também foi feito o sequenciamento de um clone do gene. A sequência obtida foi alinhada com a sequência esperada retirada do banco de dados Phytozome e, mesmo com o uso da enzima de alta fidelidade *Phusion*, em uma primeira clonagem, houve uma deleção no gene, impossibilitando o uso desse produto de PCR clonado no vetor pJET1.2/Blunt. O procedimento foi repetido por três vezes, pois após o sequenciamento, foram encontrados erros na sequência do gene, na terceira vez, foi encontrada uma única base trocada mas que não alteraria a proteína NPR3-4 após a transcrição e tradução, podendo-se assim dar continuidade aos experimentos.

A inserção do gene *Csnpr3-4* no vetor pCAMBIA 1201 também foi avaliada pela digestão com as enzimas *NcoI* e *BstEII* liberando dois fragmentos de DNA, um deles com 1756 pb referente ao gene e outro com 9940 pb referente ao plasmídeo (Figura 16b). Já a inserção do gene *Csnpr3-4* junto ao promotor 35S no vetor pCAMBIA 2201 foi avaliada pela digestão com as enzimas *BamHI* e *BstEII*, liberando dois fragmentos de DNA, um deles com 2558 pb referentes ao gene junto do promotor e outro com 8932 pb referente ao plasmídeo (Figura 16c).



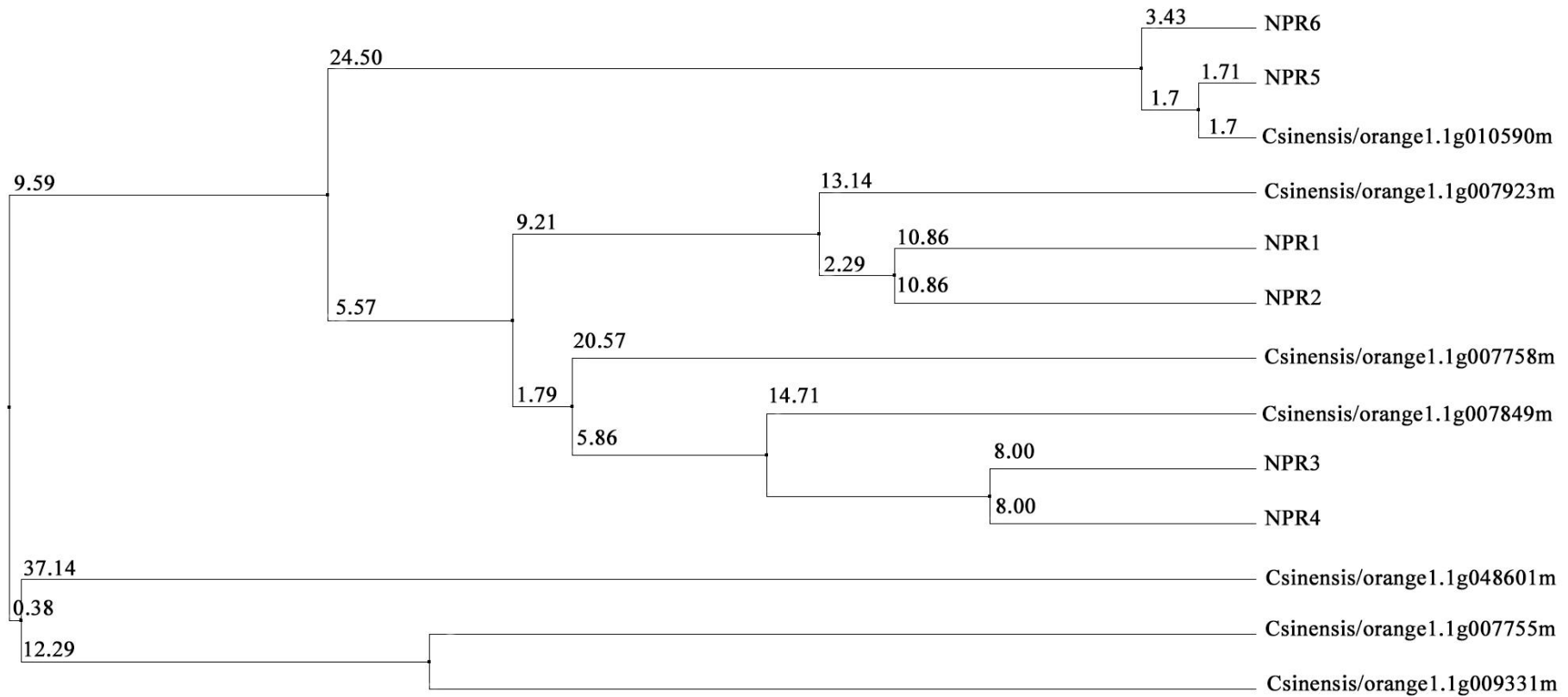


Figura 15 - Árvore de identidade gerada a partir do procedimento CLUSTAL. Foram alinhadas as sequências encontradas no genoma de *Arabidopsis thaliana* correspondentes ao gene *Atnpr1* e seus parálogos e também os genes de laranja doce (*Citrus sinensis*) similares ao gene *Atnpr1*. Os genes mais próximos possuem identidade semelhantes

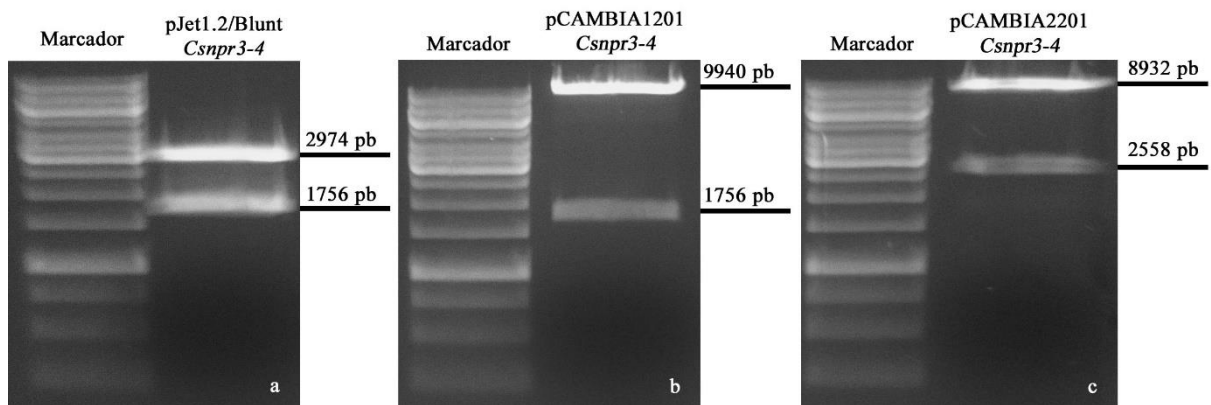


Figura 16 - Géis de eletroforese mostrando as digestões feitas durante a fase de avaliação das ligações. **a:** Digestão com as enzimas *NcoI* e *BstEII* do vetor obtido após da ligação do gene *Csnpr3-4* ao plasmídeo pJET1.2/Blunt. **b:** Digestão com as enzimas *NcoI* e *BstEII* do vetor obtido após da ligação do gene *Csnpr3-4* ao plasmídeo pCAMBIA1201. **c:** Digestão com as enzimas *BamHI* e *BstEII* do vetor obtido após da ligação do gene *Csnpr3-4* junto do promotor 35S ao plasmídeo pCAMBIA2201. O marcador usado foi de 1 kb (Thermo Scientific, USA)

A clonagem do plasmídeo pCAMBIA 2201 – *Csnpr3-4* (Figura 17) em *A. tumefaciens* foi avaliada por meio de PCR usando os primers desenhados para o gene *Csnpr3-4* e a digestão com as enzimas *BamHI* e *BstEII* com os mesmos resultados esperados que a digestão anterior (Figura 18).

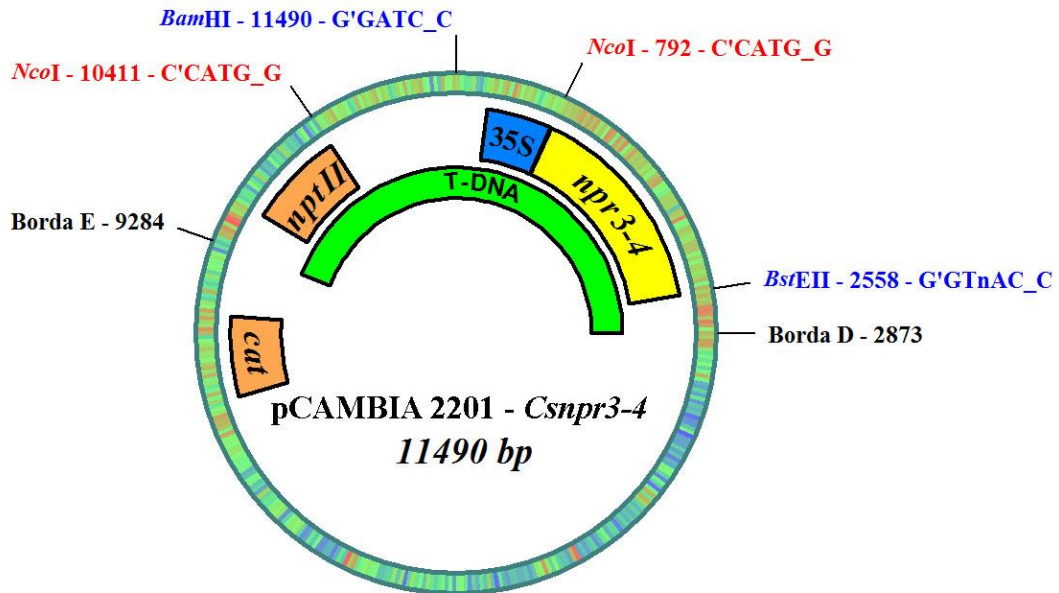


Figura 17 - Esquema do plasmídeo pCAMBIA 2201 – *Csnpr3-4* usando o software pDRAW32, indicando a presença dos genes de resistência *cat* e *nptII*, o promotor 35S junto ao gene *Csnpr3-4*, também estão indicadas as bordas direita e esquerda que limitam o T-DNA. Os sítios de restrição para as enzimas *BamHI*, *BstEII* e *NcoI*

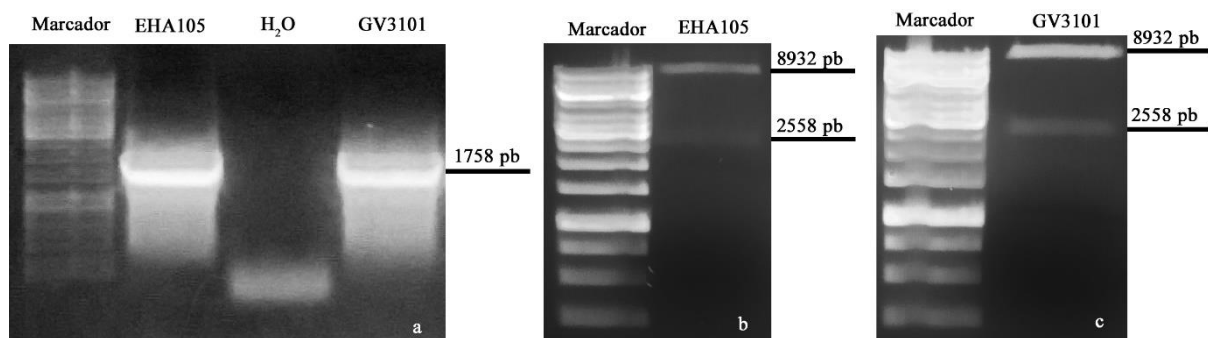


Figura 18 - Géis de eletroforese das avaliações da inserção do plasmídeo pCAMBIA 2201 – *Csnpr3-4* em *Agrobacterium tumefaciens* estirpes EHA105 e GV3101. **a**: PCR feita com DNA extraído das duas estirpes de *A. tumefaciens* foi usado os primers para o gene *Csnpr3-4*. **b** e **c**: Digestão com as enzimas *Bam*HI e *Bst*EII. O marcador usado foi de 1 kb (Thermo Scientific, USA)

### 4.3 Transformação genética de laranja doce

As transformações genéticas de laranja doce foram feitas com os genes *Csnpr1* e *Csnpr3-4*, com a estirpe EHA105 de *A. tumefaciens*. Foram realizados seis experimentos com o gene *Csnpr1* e quatro com o gene *Csnpr3-4* totalizando 2077 e 1386 explantes introduzidos, respectivamente. Os brotos regenerados, após crescerem em meio de enraizamento, foram enxertados em plantas de citrange ‘Carrizo’ (Figura 19 c) e avaliadas por meio de PCR com os primers para o gene *nptII*

(Figura 20). Como controle de falsos positivos, analisaram-se PCRs com primers para o gene *virG*. Somente os brotos que obtiveram resultados positivos para a PCR com o gene *nptII* e resultados negativos para o gene *virG* foram consideradas transgênicos. A Tabela 1 indica o número brotos que foram avaliados por meio de PCR e apresentaram resultado positivo. As plantas enxertadas, aclimatizadas e consideradas como positivas foram levadas à casa de vegetação (Figura 19 f).

Tabela 1 - Transformações genéticas de laranja ‘Hamlin’ com os genes *Csnpr1* e *Csnpr3-4*, indicando o número de explantes introduzidos para a transformação genética, o número de brotos positivos, avaliados em PCR, aclimatizados e a eficiência de transformação

Gene	Explantes introduzidos	Explantes PCR positivos	Brotos positivos aclimatizados	Eficiência de transformação
<i>Csnpr1</i>	2077	7	2	0.1%
<i>Csnpr3-4</i>	1386	24	9	0.6%



Figura 19 - Fases do processo de obtenção de plantas transgênicas de citros. a: Regeneração de brotos dos explantes inoculados com *Agrobacterium tumefaciens*. b: Detalhe de broto regenerado separado do explante em meio de cultura de enraizamento. c: Detalhe do broto recém enxertado em citrange 'Carrizo'. d: Detalhe do sucesso da enxertia em planta já em vaso e: Planta em processo de aclimatização com ajuda de um saco plástico. f: Planta já aclimatizada, pronta para ser levada para a casa de vegetação

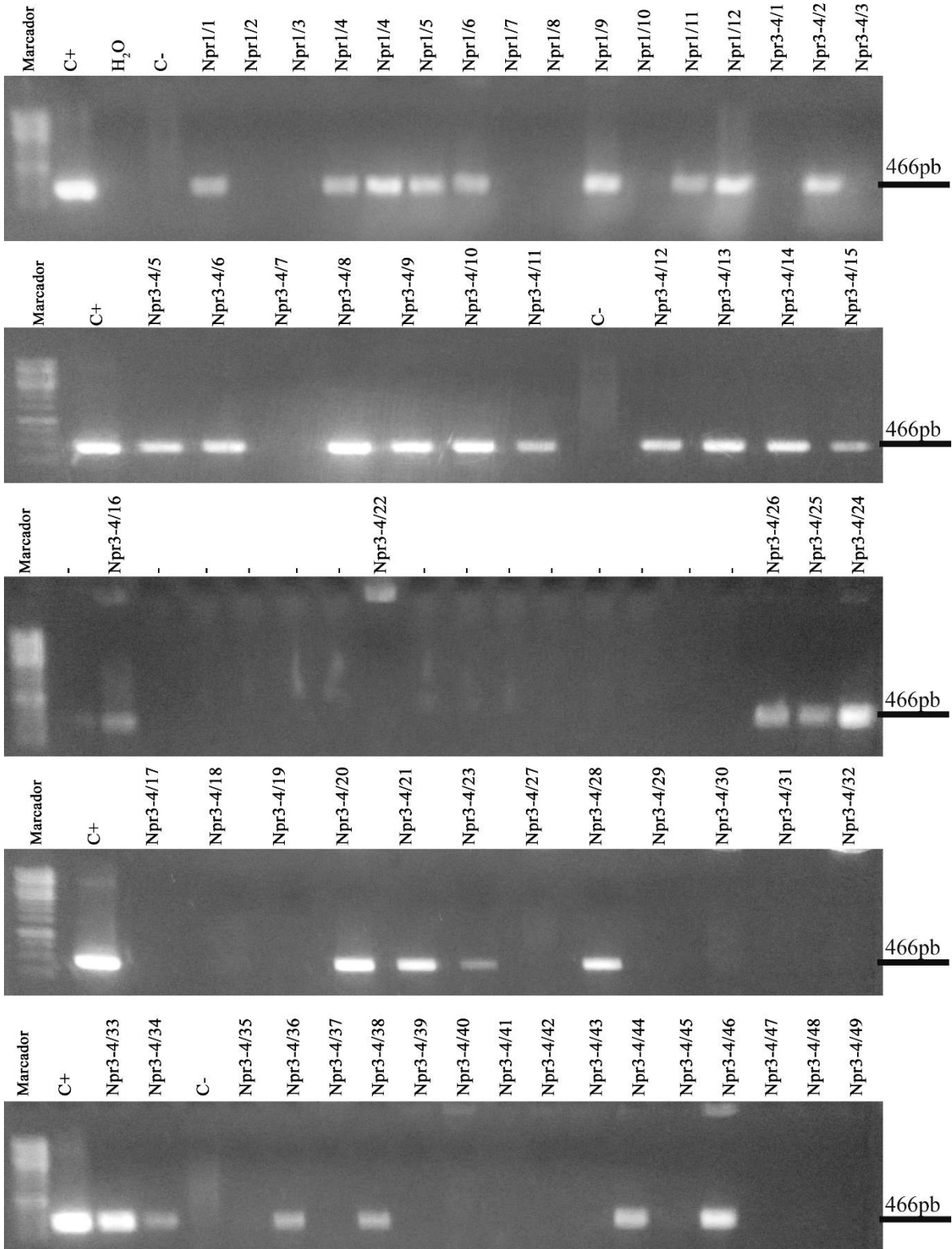


Figura 20 - Géis de eletroforese da avaliação por meio de PCR dos brotos regenerados de citros para os genes *Csnpr1* e *Csnpr3-4*, as bandas indicam o amplicon de 466pb referente ao uso dos primers para o gene *nptIII* presente no T-DNA inserido na planta. Para controle positivo foi usado o DNA extraído da *E. coli* usada durante as fases de clonagem dos genes. Para o controle negativo foi usado uma planta na transformada. Foram consideradas plantas positivas aquelas que apresentaram bandas referentes ao gene *nptIII*, ou seja, aquelas que apresentaram bandas de 466 pb. O marcador usado foi de 1 kb (Thermo Scientific, USA)

#### 4.4 Transformação genética de tomateiro Micro-Tom

As transformações genéticas de tomateiro Micro-Tom foram feitas tanto com o gene *Csnpr1* como com o gene *Csnpr3-4*. Para as transformações com o gene *Csnpr1*, foi usado somente a estirpe EHA105 de *A tumefaciens*, já para o gene *Csnpr3-4* foram usadas as estirpes EHA105 e GV3101. Foram realizados 18 experimentos com o gene *Csnpr1* e 5 com o gene *Csnpr3-4* sendo 5 com estirpe GV3101 e 1 com a estirpe EHA105, totalizando 7217, 2580 e 200 explantes inoculados respectivamente. Os brotos regenerados foram enraizados, aclimatizados (Figura 21) e avaliados por meio de PCR com os primers para o gene *nptII* e, como controle de falsos positivos, com primers para o gene *virG*. Somente as plantas que obtiveram resultados positivos para a PCR com o gene *nptII* e resultados negativos para o gene *virG* foram consideradas transgênicas. A Tabela 2 indica o número brotos transgênicos obtidos avaliados desse modo. As plantas aclimatizadas consideradas como positivas foram levadas à casa de vegetação onde foram propagadas sexualmente.

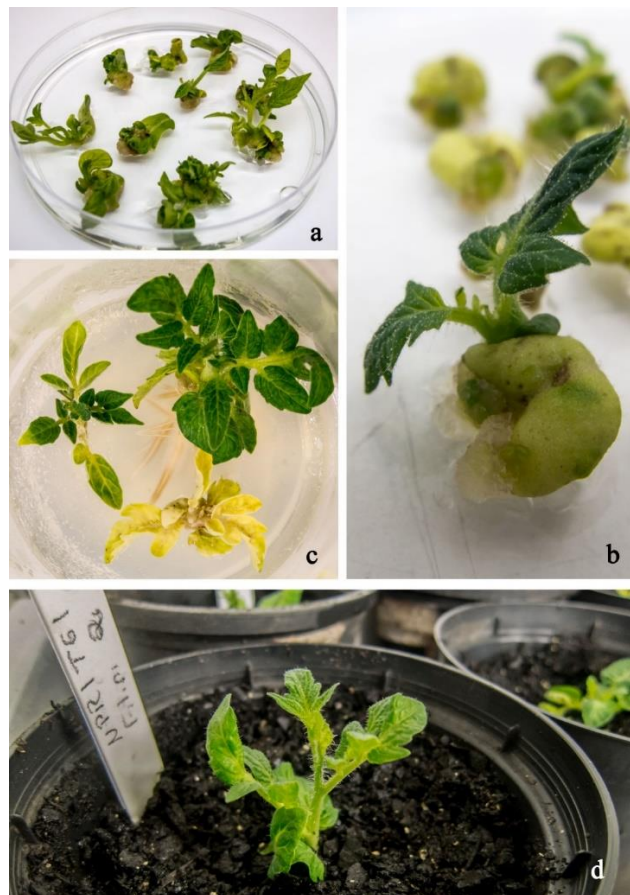


Figura 21 - Fases do processo de obtenção de plantas transgênicas de tomateiro Micro-Tom. **a:** Regeneração de brotos dos explantes inoculados com *Agrobacterium tumefaciens*. **b:** Detalhe de broto regenerado **c:** Brotos enraizados em meio de cultura, detalhe da seleção de brotos escapes pelo antibiótico canamicina, os brotos não transformados não são resistentes a esse antibiótico, em sua presença apresentam coloração amarelada e morrem. **d:** Transferência dos brotos enraizados para vaso com substrato



Tabela 2 - Transformações genéticas de tomateiro Micro-Tom com os genes *Csnpr1* e *Csnpr3-4*, indicando a estirpe de *A.tumefaciens*, o número de explantes introduzidos para a transformação genética, o número de plantas positivas, avaliados em PCR, aclimatizadas e a eficiência de transformação

Gene	<i>A. tumefaciens</i>	Explantes introduzidos	Plantas positivas aclimatizadas	Eficiência de transformação
<i>Csnpr1</i>	EHA105	7217	5	0,07%
<i>Csnpr3-4</i>	EHA105	200	0	0%
	GV3101	2580	2	0,08%

#### 4.5 Southern blot de tomateiro Micro-Tom geneticamente modificado

Foi feita a avaliação de Southern blot de um tomateiro Micro-Tom geneticamente modificado. Analisando a marca deixada em uma chapa de Raio-X, além de mostrar a presença do transgene no genoma da planta, o Southern blot também mostra quantas vezes esse transgene foi inserido. No caso desta planta “MT-*Csnpr1*/1”, o gene foi inserido em, pelo menos, três locais diferentes no genoma do tomateiro (Figura 22).

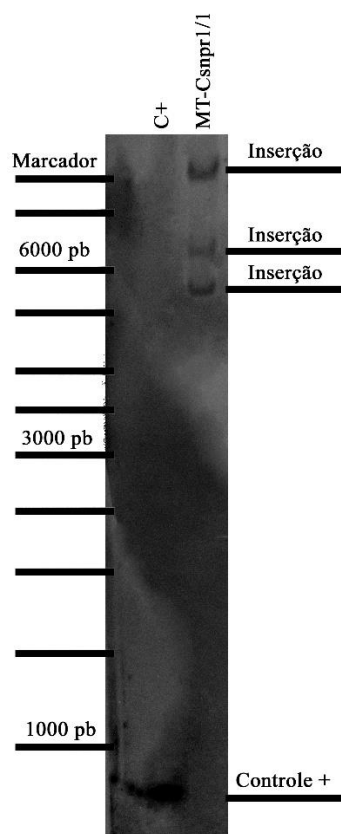


Figura 22 - Southern blot da planta MT-*Csnpr1*/1, indicando a presença de três inserções do gene *Csnpr1* no seu genoma. O controle positivo e sonda usadas foram o produto de PCR do gene *nptII*. O marcador representa onde estariam indicadas as bandas em gel de eletroforese do marcador 1Kb (Thermo Scientific, USA)

As plantas MT-*Csnpr1/5*, MT-*Csnpr1/10*, MT-*Csnpr1/11*, MT-*Csnpr1/16*, MT-*Csnpr3-4/1* e MT-*Csnpr3-4/2* não tiveram avaliação pelo método Southern blot por falta de material vegetal para realizar uma segunda tentativa da análise. Não foi possível obter resultados em uma primeira análise feita com material coletado anteriormente.

#### **4.6 Avaliação da progênie de tomateiro transgênico Micro-Tom com canamicina**

Após a aplicação de canamicina na progênie das plantas de tomateiro Micro-Tom geneticamente modificadas, foi possível observar diferentes sinais nas plantas causados pelo antibiótico. Junto com o controle, não transformado, algumas plantas apresentaram sinais severos, como uma clorose extensa nas folhas. Algumas plantas descendentes da planta MT-*Csnpr1/1* apresentaram sinais brandos como pequenas pontuações cloróticas nas folhas. Algumas plantas descendentes das plantas MT-*Csnpr1/10*, MT-*Csnpr1/11*, MT-*Csnpr3-4/1* e MT-*Csnpr3-4/2* não apresentaram nenhum sinal (Figura 23).

As plantas que não apresentaram nenhum sinal foram transferidas para vaso individual onde floresceram e frutificaram. As sementes obtidas foram semeadas e a segunda avaliação com canamicina definiu as linhagens homozigotas como sendo as plantas em que não houve segregação, ou seja, a linhagem em que todas as plantas foram resistentes ao antibiótico. Nesse experimento foram selecionadas uma linhagem homozigota proveniente da planta MT-*Csnpr1/10* e uma linhagem proveniente da planta MT-*Csnpr3-4/1*.



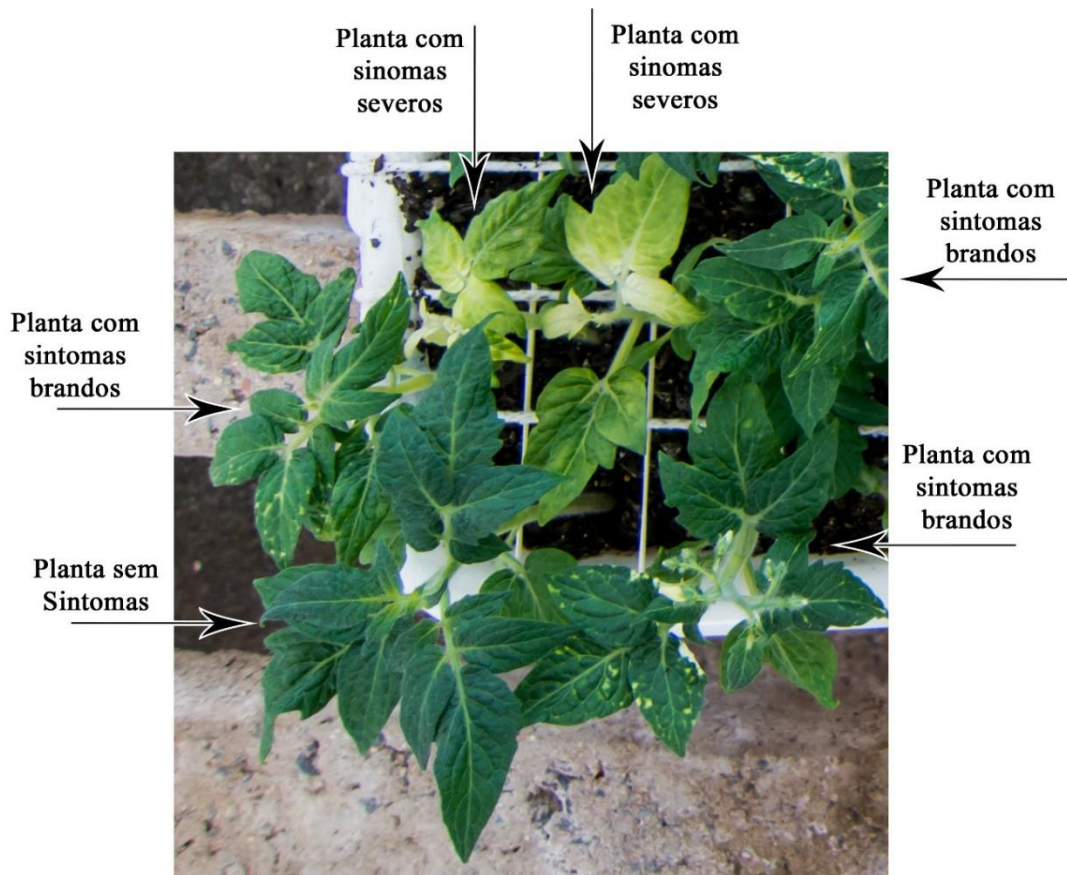


Figura 23 - Detalhe do experimento de aplicação de  $400 \text{ mg L}^{-1}$  de canamicina sobre as progênies das plantas geneticamente modificadas de tomateiro Micro-Tom com os genes *Csnpr1* e *Csnpr3-4*, as plantas reagiram à aplicação de três diferentes formas, apresentando sinais severos, brandos ou nenhum sinal

## 5 DISCUSSÃO

Na identificação dos genes de citros, em uma primeira abordagem, foram encontrados sete genes de laranja doce semelhantes aos seis genes de *Arabidopsis* *Atnpr1*, *Atnpr2*, *Atnpr3*, *Atnpr4*, *Atnpr5* e *Atnpr6* (HEPWORTH et al., 2005). Dentre estes sete genes de citros, dois deles apresentaram maior semelhança com os genes de *Arabidopsis* *Atnpr3* e *Atnpr4*, focos deste trabalho. Entretanto, dentre os dois genes identificados em laranja doce, não foi possível identificar quais são os ortólogos correspondentes para aqueles de *Arabidopsis* (*Atnpr3* e *Atnpr4*), em função da grande semelhança entre eles. Sendo assim, selecionou-se o acesso “*Csinensis*|orange1.1g007849” para clonagem e convencionou-se denominá-lo *Csnpr3-4*, já que não foi possível distinguir de qual gene de *Arabidopsis*, *Atnpr3* ou *Atnpr4*, correspondente a este ortólogo.

O gene *Csnpr3-4* pode possuir as mesmas funções dos genes *Atnpr3* ou *Atnpr4*, que em citros seriam ambas reguladoras do gene *Csnpr1* de acordo com o nível de infecção da planta (FU et al., 2012). Além do gene *Csnpr3-4*, e do gene *Csnpr1* (que já havia sido identificado anteriormente), foi possível identificar, na mesma árvore de identidade outros genes de citros que seriam ortólogos aos genes de *Arabidopsis* descritos por HEPWORTH et al. (2005), como por exemplo um gene de citros semelhante aos genes *Atnpr5* e *Atnpr6*.

Após a identificação dos genes estudados, foi feito o estudo sobre a clonagem, onde foi decidido manter os padrões de clonagem do laboratório (RODRIGUES et al., 2012) e trocar o gene *uidA* do vetor de transformação pCAMBIA 2201 pelo gene de interesse, nesse caso o gene *Csnpr3-4*. Essa decisão foi tomada por introduzir na planta apenas dois genes exógenos, sendo eles o gene de interesse e o gene de seleção, além de ser o mesmo método utilizado para a clonagem do gene *Csnpr1*.

A clonagem do gene *Csnpr3-4* apresentou, por duas vezes, problemas no sequenciamento do gene sendo que na primeira vez houve uma deleção de uma base nitrogenada afetando assim todas as sequências dos códons a partir daquele ponto, modificando os aminoácidos, e conseqüentemente, toda sua estrutura e função. Já na segunda clonagem, o sequenciamento apresentou uma troca das bases nitrogenadas, não afetando a sequência dos códons, nem a função da proteína. Sendo assim, o gene *Csnpr3-4* clonado possui uma troca de bases em sua sequência que não afeta sua função.

Foram obtidas plantas de citros geneticamente modificadas contendo os genes *Csnpr1* e *Csnpr3-4* super-expressados, porém a eficiência de transformação foi apenas de 0,1% para o gene *Csnpr1* e 0,6% para o gene *Csnpr3-4*, aquém dos resultados obtidos em outras

transformações genéticas em laranja ‘Hamlin’ no mesmo laboratório, onde tal eficiência foi de 1,79%, 4,4% e 6,08% (MIYATA, 2009).

A obtenção de plantas transgênicas de tomateiro Micro-Tom com os genes *Csnpr1* e *Csnpr3-4* foi possível, mas em vista de valores como 0,07% e 0,08% obtidos de eficiência de transformação, era esperado um valor maior,  $25 \pm 3,2$  utilizando o mesmo método de cálculo, dividindo o número de plantas aclimatizadas geneticamente modificadas pelo número de explantes introduzidos para a transformação genética (PINO et al., 2010). O fato principal disso foi a inexperiência com a cultura quanto à transformação genética, regeneração, enraizamento, aclimatização e até em casa de vegetação, levando à perda de muitos brotos por contaminação, não enraizamento, morte durante aclimatização ou simplesmente não geravam sementes.

Durante a avaliação das plantas transgênicas de tomateiro Micro-Tom, na análise de Southern blot da planta “MT-*Csnpr1/1*” foram vistas três bandas diferentes, correspondentes a três inserções do T-DNA no genoma, trazendo um problema pois o tomateiro Micro-Tom é propagado sexualmente, e mesmo com a autopolinização há a segregação desses três transgenes. Isso faz com que a identificação das linhagens homozigotas seja difícil, mesmo com análises de qPCR (do inglês “quantitative PCR” – PCR quantitativo) (MIEOG et al., 2013).

A importância de conseguir a linhagem homozigota é a eliminação da segregação, ou seja, obter uma população uniforme. Isso foi feito aplicando-se o antibiótico canamicina em um grupo de plantas descendentes das plantas geneticamente modificadas. Isso é possível pois o T-DNA que é inserido na planta contém o gene de resistência ao antibiótico e junto o gene a ser estudado, no caso os genes *Csnpr1* e *Csnpr3-4*. Como a resistência a esse antibiótico está presente no T-DNA, diferenciar as que possuem o gene de resistência daquelas que não possuem é simples. A avaliação foi feita analisando a severidade dos sinais encontrados, duas semanas após a aplicação, onde as plantas foram classificadas em três categorias de sinais: aquelas que apresentaram, por toda a planta, grandes partes das folhas amareladas; aquelas que apresentaram sinais brandos, como pequenos pontos amarelos; e aquelas que não apresentaram qualquer tipo de sinal.

Como há segregação dos transgenes após a multiplicação sexual, o genótipo segue um padrão de segregação mendeliana, sendo no caso de plantas com uma única inserção do gene, um quarto das plantas obtidas seriam homozigotas transgênicas, dois quartos heterozigotas e um quarto homozigotas não transgênicas. Dentre essas, as plantas desejáveis, são as homozigotas transgênicas, que produzem na sua progênie linhagens homozigotas que contém o transgene. O fenótipo dessas plantas seria visto, após a aplicação de canamicina, como 75% das plantas apresentando resistência ao antibiótico, sendo que um terço seria de plantas

homozigotas e dois terços de plantas heterozigotas. A separação entre os homozigotos transgênicos dos heterozigotos deve ser feita avaliando a segunda geração das progênes, onde a linhagem das plantas homozigotas apresentará fenótipo 100% resistente, já a linhagem das plantas heterozigotas apresentará novamente 75% de resistência.

Com o aumento de número de cópias do transgene no genoma, existe dificuldade em separar homozigotos de heterozigotos já que a incidência dos homozigotos entre os heterozigotos é cada vez menor. Na segregação mendeliana, desde que as inserções sejam feitas em cromossomos diferentes, a proporção fenotípica vai de, em termos de plantas resistentes para plantas não resistentes, 3:1 com uma cópia, 15:1 com duas cópias, 63:1 com três cópias e 255:1 com quatro cópias (Ahuja e Fladung, 2014). Porém, assim como a planta não resistente, a planta homozigota transgênica é apenas uma entre 15, 63 ou 255 plantas. Além disso, existem as plantas que serão homozigotas para algumas inserções e não serão para outras, suas progênes serão 100% resistentes, mas ainda apresentarão segregação das outras inserções, tornando impossível separá-las por meio de uma avaliação do fenótipo.

Somado a esse problema, a herança genética para transgenes é afetada também pelo modo de integração e interação do transgene com o genoma da planta, sua estabilidade estrutural, seu posicionamento e até estresses ambientais, podendo causar falhas na expressão, desarranjo da segregação mendeliana e até a perda do transgene conforme a propagação das plantas (AHUJA; FLADUNG, 2014).

Avaliando o fenótipo das progênes, foi possível identificar alguns desses casos. Mesmo com um baixo número de plantas para avaliar, foi possível visualizar o que pode estar acontecendo. Vale lembrar que todas as plantas avaliadas são progênes de plantas PCR positivas e a planta MT-*Csnpr1/1* é Southern blot positiva com três inserções do T-DNA.

Sobre a planta MT-*Csnpr1/1*, o fato dela possuir três inserções do gene dificulta a tentativa de buscar qualquer segregação mendeliana, principalmente, pelo grande número de sementes que seriam necessárias para gerar um experimento. Além disso, tanto a primeira geração da planta MT-*Csnpr1/1* como sua progênie não apresentaram fenótipo de resistência ao gene, como era esperado de uma segregação mendeliana de três inserções que geraria um fenótipo com proporções de 63:1. Ao invés disso, a maioria das plantas apresentaram algum tipo de sinal, mas também não apresentaram sinais como nas plantas controle. Isso pode ser resultante de alguma falha na expressão do gene de resistência devido ao número de cópias.

As plantas MT-*Csnpr1/10*, MT-*Csnpr1/11*, MT-*Csnpr3-4/1* e MT-*Csnpr3-4/2*, apresentaram progênie com muitas plantas totalmente resistentes e, no caso MT-*Csnpr1/10*, MT-*Csnpr1/11*, algumas plantas com sinais severos. Isso indica que as plantas que contêm o

T-DNA inserido, conseguem expressar a resistência completa ao antibiótico e na ausência do T-DNA não há qualquer resistência, mostrando que não há problemas na expressão dos genes como identificado através dos sinais brandos vistos na progênie de MT-*Csnpr1/1*. É possível que essas plantas apresentem segregação mendeliana, mas, devido a falta da análise de Southern blot, não é possível saber qual a proporção fenotípica esperada.

A planta MT-*Csnpr1/5*, embora tenha sido considerada PCR positiva, não foi confirmada a inserção do T-DNA em seu genoma através de análise de Southern blot, e o fenótipo encontrado após a aplicação de canamicina indica que o gene pode não estar inserido no genoma ou não está havendo expressão da resistência.

A avaliação da segunda geração, seguindo o mesmo método de aplicação de canamicina, possibilitou separar uma linhagem homozigota da planta MT-*Csnpr1/10* e uma linhagem proveniente da planta MT-*Csnpr3-4/1*. Linhagens essas que todas as plantas possuem resistência à canamicina e conseqüentemente possuem os genes *Csnpr1* e *Csnpr3-4* respectivamente. A progênie avaliada das plantas MT-*Csnpr1/11* e MT-*Csnpr3-4/2*, apresentaram segregação da resistência a canamicina, o que indica que ainda não foi selecionado uma linhagem homozigota.

Com as duas linhagens homozigotas em mãos, será possível, em experimentos futuros, avaliar as plantas geneticamente modificadas e o potencial dos genes *Csnpr1* e *Csnpr3-4* nem conferir resistência a doenças, uma maneira para avaliar as plantas de tomateiro Micro-Tom é inocular as plantas com a bactéria *Pseudomonas syringae* pv. Tomato, e observar a redução de sintomas (BASHAN et al., 1978; BASHAN; DE-BASHAN, 2002).

## 6 CONCLUSÕES

- Foi identificado o gene *npr3-4* de citros (*Citrus sinensis* L. Osbeck) comparando-se com os genes já identificados de *Arabidopsis thaliana*.
- O gene identificado foi clonado no vetor de transformação pCAMBIA 2201 e inserido em *Agrobacterium tumefaciens*.
- Foi possível obter plantas geneticamente modificadas de laranja 'Hamlin' com os genes *Csnpr1* ou *Csnpr3-4*, assim como linhagens homozigotas de tomateiro Micro-Tom contendo tais genes.



## REFERÊNCIAS

- AHUJA, M.R.; FLADUNG, M. Integration and inheritance of transgenes in crop plants and trees. **Tree Genetics and Genomes**, Berlin, v. 10, n. 4, p. 779-790, 2014.
- ANDRADE, G.M.; SARTORETTO, L.M.; ANA, C.M. Biologia molecular do processo de infecção por *Agrobacterium* spp. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 5, p. 465-476, out. 2003.
- ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA. **O que você precisa saber sobre plantas transgênicas**. Informativos ISAAA. Disponível em: <[http://www.anbio.org.br/site/index.php?option=com\\_content&view=article&id=617:informativos-isaaa-o-que-voce-precisa-saber-sobre-plantas-transgenicas&catid=62:biologia-sintetica&Itemid=61](http://www.anbio.org.br/site/index.php?option=com_content&view=article&id=617:informativos-isaaa-o-que-voce-precisa-saber-sobre-plantas-transgenicas&catid=62:biologia-sintetica&Itemid=61)>. Acesso em: 09 fev. 2015.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L.E. Reduction of bacterial speck (*Pseudomonas syringae* pv. tomato) of tomato by combined treatments of plant growth-promoting bacterium, *Azospirillum brasilense*, streptomycin sulfate, and chemo-thermal seed treatment. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, n. 9, p. 821-829, Nov. 2002.
- BASHAN, Y.; OKON, Y.; HENIS, Y. Infection studies of *Pseudomonas-tomato*, causal agent of bacterial speck of tomato. **Phytoparasitica**, Dordrecht, v. 6, n. 3, p. 135-143, 1978
- BEVAN, M. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 12, n. 22, p. 8711-8721, 1984.
- BEVAN, M.W.; FLAVELL, R.B.; CHILTON, M.D. A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. **Nature**, London, v. 304, n. 5922, p. 184-187, 1983.
- BOTEON, M.; NEVES, E.M. Citricultura brasileira: aspectos econômicos. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico; FUNDAG, 2005. p. 19-36.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Saiba mais - MAPA**. 2015. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/citrus/saiba-mais>>. Acesso em: 12 mar. 2015.
- CAO, H.; LI, X.; DONG, X.N. Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 11, p. 6531-6536, May 1998.
- CAO, H.; BOWLING, S.A.; GORDON, A.S.; DONG, X. Characterization of an Arabidopsis mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 6, n. 11, p. 1583-1592, 1994.
- CAO, H.; GLAZEBROOK, J.; CLARKE, J.D.; VOLKO, S.; DONG, X. The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. **Cell**, Cambridge, v. 88, n. 1, p. 57-63, 1997.



CHEN, X.-K.;ZHANG, JI.Y.; ZHANG, Z.; DU, X.-L.; DU, B.-B.; QU, S.-C.. Overexpressing MhNPR1 in transgenic Fuji apples enhances resistance to apple powdery mildew. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 39, n. 8, p. 8083-8089, Aug. 2012.

CHEN, S.C.; LIU, A.R.; ZOU, Z.R. Overexpression of glucanase gene and defensin gene in transgenic tomato enhances resistance to *Ralstonia solanacearum*. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 53, n. 5, p. 671-677, 2006.

CHERN, M.; FITZGERALD, H.A.; CANLAS, P.E.; NAVARRE, D.A.; RONALD, P.C. Overexpression of a rice NPR1 homolog leads to constitutive activation of defense response and hypersensitivity to light. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 18, n. 6, p. 511-520, 2005.

COLLI, W. Organismos transgênicos no Brasil: regular ou desregular? **Revista USP**, São Paulo, n. 89, p. 148-173, 2011.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA. **Resumo geral de plantas geneticamente modificadas aprovadas para comercialização**. 2014. Disponível em: <[http://www.ctnbio.gov.br/upd\\_blob/0002/2040.pdf](http://www.ctnbio.gov.br/upd_blob/0002/2040.pdf)>. Acesso em: 05 mar. 2014.

DAN, Y.; YAN, H.; MUNYIKWA, T.; DONG, J.; ZHANG, Y.; ARMSTRONG, C.L. MicroTom-a high-throughput model transformation system for functional genomics. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, n. 5, p. 432-441, May 2006.

DONMEZ, D.; SIMSEK, O.; IZGU, T.; AKA KACAR, Y.; YALCIN MENDI, Y. Genetic transformation in citrus. **The Scientific World Journal**, New York, v. 2013, n. 491207, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3745968/pdf/TSWJ2013-491207.pdf>>. Acesso em: 13 mar. 2015

DURRANT, W.E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 185-209, 2004.

EKENGREN, S.K.; LIU, Y.; SCHIFF, M.; DINESH-KUMAR, S.P.; MARTIN, G.B. Two MARK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato. **Plant Journal**, Oxford, v. 36, n. 6, p. 905-917, 2003.

ESPINOZA, C.; SCHLECHTER, R.; HERRERA, D.; TORRES, E.; SERRANO, A.; MEDINA, C.; ARCE-JOHNSON, P. Cisgenesis and intragenesis: new tools for improving crops. **Biological Research**, London, v. 46, n. 4, p. 323-331, 2013.

FAN, W.; DONG, X. In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 6, p. 1377-1389, 2002.

FAO. **FAO stresses potential of biotechnology but calls for caution**. Rome, 2000. Disponível em: < [http://www.fao.org/waicent/ois/press\\_ne/presseng/2000/pren0017.htm](http://www.fao.org/waicent/ois/press_ne/presseng/2000/pren0017.htm)>. Acesso em:09 fev. 2015.

\_\_\_\_\_. Statistics Division. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org> . Acesso em: 09 fev. 2015.

FÁVERO, P.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; STIPP, L.C.L.; MENDES, B.M.J. Genetic transformation of three sweet orange cultivars from explants of adult plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, Warszawa, v. 34, n. 2, p. 471-477, 2012.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Laranja, custo de produção (R\$/ha) - 2012. In: \_\_\_\_\_. **AGRIANUAL 2013**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2013. p. 257-258.

FU, Z.Q.; YAN, S.; SALEH, A.; WANG, W.; RUBLE, J.; OKA, N.; MOHAN, R.; SPOEL, S.H.; TADA, Y.; ZHENG, N.; DONG, X.. NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. **Nature**, London, v. 486, n. 7402, p. 228-232, June 2012.

FUNDECITRUS. **Greening (Huanglongbing, HLB ou Amarelão dos Citros), Candidatus liberibacter**. 2013. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/greening/10> >. Acesso em: 12 mar. 2015.

GAFFNEY, T.; FRIEDRICH, L.; VERNOOIJ, B.; NEGROTTO, D.; NYE, G.; UKNES, S.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. **Science**, Washington, v. 261, n. 5122, p. 754-756, 1993.

GALVÃO, A. **Informativo Céleres Biotecnologia**. 2014. Disponível em: <<http://www.celeres.com.br/wordpress/wp-content/uploads/2014/12/IB1403.pdf>>. Acesso em: 12 mar. 2015.

GAO, Q.M.; KACHROO, A.; KACHROO, P. Chemical inducers of systemic immunity in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, n. 7, p. 1849-1855, 2014.

GELVIN, S.B. Agrobacterium and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 51, p. 223-256, 2000.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 205-227, 2005.

GROSSER, J.W.; DUTT, M.; OMAR, A.; ORBOVIC, V.; BARTHE, G. Progress towards the development of transgenic disease resistance in citrus. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 892, p. 101-108, 2011.

HALL, T. **BioEdit**. Carlsbad: Ibis Biosciences, 2015. Disponível em: <<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html#downloads> >. Acesso em: 30 mar. 2013

HAMMERSCHMIDT, R. Phytoalexins: what have we learned after 60 years? **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 285-306, 1999.

HEPWORTH, S.R.; ZHANG, Y.; MCKIM, S.; LI, X.; HAUGHN, G.W. Blade-on-petiole-dependent signaling controls leaf and floral patterning in Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 5, p. 1434-1448, 2005.

HERRERA-ESTRELLA, L.; BLOCK, M. DE ;MESSENS, E. ;HERNALSTEENS, J. P.; MONTAGU, M. VAN; SCHELL, J.. Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 2, n. 6, p. 987-995, 1983.

HOEKEMA, A.; HIRSCH, P.R.; HOOYKAAS, P.J.J.; SCHILPEROORT, R.A. A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. **Nature**, London, v. 303, n. 5913, p. 179-180, 1983.

HOLME, I.B.; WENDT, T.; HOLM, P.B. Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 11, n. 4, p. 395-407, 2013.

HOOYKAAS, P.J.J.; SCHILPEROORT, R.A. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 19, n. 1, p. 15-38, 1992.

INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRI-BIOTECH APPLICATIONS. **GM approval database | GMO Database | GM crop approvals:** ISAAA.org. 2015. Disponível em: <<http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp>>. Acesso em: 09 fev. 2015.

JAMES, C. **Global status of commercialized biotech/Gm Crops**. Ithaca: ISAAA, 2014. Disponível em: < <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/46/executivesummary/> > (ISAAA. Brief, 49). Acesso em 09 fev. 2015

JOINT GENOME INSTITUTE. **Phytozome**. Mitchell Drive Walnut Creek: DOE Joint Genome Institute, 2015. Disponível em: < <http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html> >; Acesso em 10 fev. 2015

KARIMI, M.; BLEYS, A.; VANDERHAEGHEN, R.; HILSON, P. Building blocks for plant gene assembly. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 145, n. 4, p. 1183-1191, 2007.

KHUONG, T.T.H.; CRÉTÉ, P.; ROBAGLIA, C.; CAFFARRI, S. Optimisation of tomato Micro-tom regeneration and selection on glufosinate/Basta and dependency of gene silencing on transgene copy number. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 32, n. 9, p. 1441-1454, 2013.

KINKEMA, M.; FAN, W.; DONG, X. Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. **Plant Cell**, Rockville, v. 12, n. 12, p. 2339-2350, 2000.

KUMAR, D. Salicylic acid signaling in disease resistance. **Plant Science**, Shannon, v. 228, p. 127-134, 2014.

LARANJEIRA, F.F.; FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B. Manejo integrado de doenças de citros. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico; FUNDAG, 2005. p. 629-654

LE HENANFF, G.; FARINE, S.; KIEFFER-MAZET, F.; MICLOT, A.S.; HEITZ, T.; MESTRE, P.; BERTSCH, C.; CHONG, J. *Vitis vinifera* VvNPR1.1 is the functional ortholog of AtNPR1 and its overexpression in grapevine triggers constitutive activation of PR genes and enhanced resistance to powdery mildew. **Planta**, Berlin, v. 2, n. 234, p. 1-13, 2011.

- LEE, L.Y.; GELVIN, S.B. T-DNA binary vectors and systems. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 146, n. 2, p. 325-332, 2008.
- LIU, G.; HOLUB, E.B.; ALONSO, J.M.; ECKER, J.R.; FOBERT, P.R. An Arabidopsis NPR1-like gene, NPR4, is required for disease resistance. **Plant Journal**, Oxford, v. 41, n. 2, p. 304-318, 2005.
- MALNOY, M.; JIN, Q.; BOREJSZA-WYSOCKA, E.E.; HE, S.Y.; ALDWINCKLE, H.S. Overexpression of the apple MpNPR1 gene confers increased disease resistance in *Malus x domestica*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 20, n. 12, p. 1568-1580, 2007.
- MÉTRAUX, J.P.; NAWRATH, C.; GENOUD, T. Systemic acquired resistance. **Euphytica**, Dordrecht, v. 124, n. 2, p. 237-243, 2002.
- MIEOG, J.C.; HOWITT, C.A.; RAL, J.P. Fast-tracking development of homozygous transgenic cereal lines using a simple and highly flexible real-time PCR assay. **BMC Plant Biology**, London, v. 13, n. 1, p. 13-71, 2013.
- MIYATA, L.Y. **Specific promoters for gene expression in the phloem in citrus genetic transformation**. 2009. 66 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- MIYATA, L.Y.; HAKAKAVA, R.; STIPP, L.C.L.; MENDES, B.M.J.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; MOURÃO FILHO, F.A.A. GUS expression in sweet oranges (*Citrus sinensis* L. Osbeck) driven by three different phloem-specific promoters. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 31, n. 11, p. 2005-2013, 2012.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physionogia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- MURASHIGE, T.; TUCKER, D.P.H. Growth factor requirement of citrus tissue culture. **International Citrus Symposium**, Riverside, v. 1, p. 1155-1169, 1969.
- NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G.; MILAN, P.; LOPES, F.F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**. 2015. Disponível em: <[http://www.citrusbr.com.br/download/biblioteca/o\\_retrato\\_da\\_citricultura\\_brasileira\\_baixa.pdf](http://www.citrusbr.com.br/download/biblioteca/o_retrato_da_citricultura_brasileira_baixa.pdf)>. Acesso em: 12 fev. 2015
- ORBOVIĆ, V.; GROSSER, J.W. Citrus transformation using juvenile tissue explants. **Methods in molecular biology**. Totawa, v. 1224 p. 245-257, 2015.
- PEÑA, L.; PÉREZ, R.M.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.A.; NAVARRO, L. Early events in Agrobacterium-mediated genetic transformation of citrus explants. **Annals of Botany**, Oxford, v. 94, n. 1, p. 67-74, 2004.
- PIETERSE, C.M.J.; VAN LOON, L.C. NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, n. 4, p. 456-464, 2004.

- PINO, L.E.; LOMBARDI-CRESTANA, S.; AZEVEDO, M.S.; SCOTTON, D.C.; BORGIO, L.; QUECINI, V.; FIGUEIRA, A. PERES, L.E.P. The Rg1 allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato 'Micro-Tom' model system. **Plant Methods**, London, v. 6, Oct. 2010.
- RAI, M.K.; SHEKHAWAT, N.S. Recent advances in genetic engineering for improvement of fruit crops. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 116, n. 1, p. 1-15, 2014.
- ROBERTS, D.A. Systemic acquired resistance induced in hypersensitive plants by nonnecrotic localized viral infections. **Virology**, New York, v. 122, n. 1, p. 207-209, 1982.
- RODRIGUES, F.A.C.; STIPP, L.C.L.; TAKITA, M.A.; MOURÃO FILHO, F.A.A. Desenvolvimento de uma construção gênica com o gene npr1 visando resistência de citros a doenças por transgenia. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 20., 2012, Piracicaba. Disponível em: <<https://uspdigital.usp.br/siicusp/cdOnlineTrabalhoVisualizarResumo?numeroInscricaoTrabalho=1407&numeroEdicao=20>> **Anais...** Piracicaba: USP, 2012. Acesso em 10 fev. 2015
- ROSS, A.F. Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. **Virology**, New York, v. 14, n. 3, p. 340-358, 1961.
- RYALS, J.A.; NEUENSCHWANDER, U.H.; WILLITS, M.G.; MOLINA, A.; STEINER, H.Y.; HUNT, M.D. Systemic acquired resistance. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 10, p. 1809-1819, 1996.
- SCHÜNMANN, P.H.D.; LLEWELLYN, D.J.; SURIN, B.; BOEVINK, P.; DE FEYTER, R.C.; WATERHOUSE, P.M. A suite of novel promoters and terminators for plant biotechnology. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 30, n. 4, p. 443-452, 2003.
- SELS, J.; MATHYS, J.; DE CONINCK, B.M.A.; CAMMUE, B.P. A.; DE BOLLE, M. F. C.. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 46, n. 11, p. 941-950, 2008.
- SEYFFERTH, C.; TSUDA, K. Salicylic acid signal transduction: the initiation of biosynthesis, perception and transcriptional reprogramming. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, n. 697, Dec. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4260477/pdf/fpls-05-00697.pdf>>. Acesso em: 16 mar. 2015.
- SHELTON, A.M.; ZHAO, J.Z.; ROUSH, R.T. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 47, p. 845-881, 2002.
- SHULAEV, V.; LEON, J.; RASKIN, I. Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in tobacco? **Plant Cell**, Rockville, v. 7, n. 10, p. 1691-1701, 1995.
- SINGH, S.; RAJAM, M.V. Citrus biotechnology: achievements, limitations and future directions. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, New Delhi, v. 15, n. 1, p. 3-22, 2009.

SPOEL, S. H.; MOU, Z.; TADA, Y.; SPIVEY, N. W.; GENSCHIK, P.; DONG, X.. Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity. **Cell**, Cambridge, v. 137, n. 5, p. 860-872, 2009.

TELI, N.P.; TIMKO, M.P. Recent developments in the use of transgenic plants for the production of human therapeutics and biopharmaceuticals. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 79, n. 2, p. 125-145, 2004.

THANAVALA, Y.; LUGADE, A.A. Oral transgenic plant-based vaccine for hepatitis B. **Immunologic Research**, Totawa, v. 46, n. 1-3, p. 4-11, 2010.

VAN LIJSEBETTENS, M.; ANGENON, G.; DE BLOCK, M. Transgenic plants: from first successes to future applications. **International Journal of Developmental Biology**, Vizcaya, v. 57, n. 6/8, p. 461-465, 2013.

VAN LOON, L.C.; PIERPOINT, W.S.; BOLLER, T.; CONEJERO, V. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 12, n. 3, p. 245-264, 1994.

VASIL, I.K. A history of plant biotechnology: from the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, n. 9, p. 1423-1440, 2008.

ZHANG, X.; FRANCIS, M.I.; DAWSON, W.O.; GRAHAM, J.H.; ORBOVIĆ, V.; TRIPLETT, E.W.; MOU, Z. Over-expression of the Arabidopsis NPR1 gene in citrus increases resistance to citrus canker. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 128, n. 1, p. 91-100, 2010.

ZHANG, Y.; CHENG, Y.T.; QU, N.; ZHAO, Q.; BI, D.; LI, X. Negative regulation of defense responses in Arabidopsis by two NPR1 paralogs. **Plant Journal**, Oxford, v. 48, n. 5, p. 647-656, Dec. 2006.

ZUPAN, J.; MUTH, T.R.; DRAPER, O.; ZAMBRYSKI, P. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. **Plant Journal**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 11-28, 2000.



## **APÊNDICES**





## Apêndice A

**Liberações dos transgênicos no mundo**

Lista dos países que possuem liberação para plantio de espécies geneticamente modificadas, incluindo o número de eventos liberados, as espécies liberadas, e as características encontradas. (ISAAA, 2015)

\*A União Europeia está listada como um único país pois a liberação é única porém cada país possui legislação própria e pode proibir o cultivo dos eventos liberados pela EU .

País (Eventos liberados)	Plantas - Espécies	Características Gerais
Argentina (39)	Algodão – <i>Gossypium hirsutum L.</i> Milho – <i>Zea mays L.</i> Soja – <i>Glycine max L.</i>	Tolerância a Herbicida Resistência à Insetos
Austrália (101)	Alfafa – <i>Medicago sativa</i> Algodão – <i>Gossypium hirsutum L.</i> Arroz – <i>Oryza sativa L.</i> Batata – <i>Solanum tuberosum L.</i> Beterraba – <i>Beta vulgaris</i> Canola – <i>Brassica napus</i> Cravo – <i>Dianthus caryophyllus</i> Milho – <i>Zea mays L.</i> Rosa – <i>Rosa hybrida</i> Soja – <i>Glycine max L.</i> Trigo – <i>Triticum aestivum</i>	Tolerância a Herbicida Resistência à Insetos Redução na Produção de G-Lignina Esterilidade masculina/restauração da fertilidade Modificação da coloração da flor Aumento na produção de aminoácido lisina Aumento na produção de etanol Resistência à doença viral Melhora da qualidade do óleo no grão
Bangladesh (1)	Berinjela – <i>Solanum melongena</i>	Resistência à insetos
Bolívia (1)	Soja – <i>Glycine max L.</i>	Tolerância a Herbicida
Brasil (40)	Algodão – <i>Gossypium hirsutum L.</i> Feijão - <i>Phaseolus vulgaris</i> Milho – <i>Zea mays L.</i> Soja – <i>Glycine max L.</i>	Tolerância a Herbicida Resistência à Insetos Resistência à doença viral
Burquina Faso (1)	Algodão – <i>Gossypium hirsutum L.</i>	Tolerância a Herbicida
Canada (158)	Abobrinha – <i>Cucurbita pepo</i> Alfafa – <i>Medicago sativa</i> Algodão – <i>Gossypium hirsutum L.</i> Arroz – <i>Oryza sativa L.</i> Batata – <i>Solanum tuberosum L.</i> Beterraba – <i>Beta vulgaris</i> Canola – <i>Brassica napus</i> Linhaça – <i>Linum usitatissimum L.</i> Mamão – <i>Carica papaya</i> Milho – <i>Zea mays L.</i> Nabo – <i>Brassica rapa</i> Soja – <i>Glycine max L.</i> Tomate – <i>Solanum lycopersicum L.</i>	Tolerância a Herbicida Resistência à Insetos Redução na Produção de G-Lignina Esterilidade masculina/restauração da fertilidade Aumento na produção de aminoácido lisina Aumento na produção de etanol Resistência à doença viral Melhora da qualidade do óleo no grão Tolerância a estresse hídrico Atraso no amolecimento do fruto
Chile(3)	Canola – <i>Brassica napus</i> Milho – <i>Zea mays L.</i> Soja – <i>Glycine max L.</i>	Tolerância a Herbicida
China (60)	Algodão – <i>Gossypium hirsutum L.</i> Arroz – <i>Oryza sativa L.</i> Beterraba – <i>Beta vulgaris</i> Canola – <i>Brassica napus</i> Mamão – <i>Carica papaya</i> Milho – <i>Zea mays L.</i> Petúnia - <i>Petunia hybrida</i> Pimentão - <i>Capsicum annum</i> Populus- <i>Populus sp</i> Soja – <i>Glycine max L.</i> Tomate – <i>Solanum lycopersicum L.</i>	Tolerância a Herbicida Resistência à Insetos Esterilidade masculina/restauração da fertilidade Aumento na produção de etanol Resistência à doença viral Modificação da coloração da Flor Atraso no amolecimento do fruto

País (Eventos liberados)	Plantas – Espécies	Características Gerais
Colômbia (73)	Algodão – <i>Gossypium hirsutum L.</i> Arroz – <i>Oryza sativa L.</i> Beterraba – <i>Beta vulgaris</i> Cravo – <i>Dianthus caryophyllus</i> Linhaça – <i>Linum usitatissimum L.</i> Milho – <i>Zea mays L.</i> Rosa – <i>Rosa hybrida</i> Soja – <i>Glycine max L.</i> Trigo – <i>Triticum aestivum</i>	Tolerância a Herbicida Resistência à Insetos Aumento na produção de aminoácido lisina Aumento na produção de etanol Modificação da coloração da Flor
Costa Rica (15)	Algodão – <i>Gossypium hirsutum L.</i> Soja – <i>Glycine max L.</i>	Tolerância a Herbicida Resistência à Insetos
Egito (1)	Milho – <i>Zea mays L.</i>	Resistência à Insetos
União Europeia (73)*	Algodão – <i>Gossypium hirsutum L.</i> Beterraba – <i>Beta vulgaris</i> Canola – <i>Brassica napus</i> Cravo – <i>Dianthus caryophyllus</i> Milho – <i>Zea mays L.</i> Soja – <i>Glycine max L.</i>	Tolerância a Herbicida Resistência à Insetos Esterilidade masculina/restauração da fertilidade Modificação da coloração da Flor Aumento dos níveis de amilopectina
Honduras (8)	Milho – <i>Zea mays L.</i> Arroz – <i>Oryza sativa L.</i>	Tolerância a Herbicida Resistência à Insetos
Índia (11)	Algodão – <i>Gossypium hirsutum L.</i> Algodão – <i>Gossypium hirsutum L.</i>	Tolerância a Herbicida Resistência à Insetos
Indonésia (12)	Cana de Açúcar - <i>Saccharum sp</i> Milho – <i>Zea mays L.</i> Soja – <i>Glycine max L.</i>	Tolerância a Herbicida Resistência à Insetos Aumento na produção de etanol Tolerância a estresse hídrico
Íran (1)	Arroz – <i>Oryza sativa L.</i>	Resistência à Insetos
Japão (201)	Alfafa – <i>Medicago sativa</i> Algodão – <i>Gossypium hirsutum L.</i> Arroz – <i>Oryza sativa L.</i> Batata – <i>Solanum tuberosum L.</i> Beterraba – <i>Beta vulgaris</i> Canola – <i>Brassica napus</i> Cravo – <i>Dianthus caryophyllus</i> Mamão – <i>Carica papaya</i> Milho – <i>Zea mays L.</i> Rosa – <i>Rosa hybrida</i> Soja – <i>Glycine max L.</i>	Tolerância a Herbicida Resistência à Insetos Redução na Produção de G-Lignina Esterilidade masculina/restauração da fertilidade Aumento na produção de aminoácido lisina Aumento na produção de etanol Modificação da coloração da Flor Resistência à doença viral Melhora da qualidade do óleo no grão Tolerância a estresse hídrico Aumento da tolerância à alergênicos do pólen
Malásia (20)	Cravo – <i>Dianthus caryophyllus</i> Milho – <i>Zea mays L.</i> Soja – <i>Glycine max L.</i>	Tolerância a Herbicida Resistência à Insetos Modificação da coloração da Flor
México (147)	Alfafa – <i>Medicago sativa</i> Algodão – <i>Gossypium hirsutum L.</i> Arroz – <i>Oryza sativa L.</i> Batata – <i>Solanum tuberosum L.</i> Beterraba – <i>Beta vulgaris</i> Canola – <i>Brassica napus</i> Milho – <i>Zea mays L.</i> Soja – <i>Glycine max L.</i> Tomate – <i>Solanum lycopersicum L.</i>	Tolerância a Herbicida Resistência à Insetos Redução na Produção de G-Lignina Esterilidade masculina/restauração da fertilidade Aumento na produção de aminoácido lisina Aumento na produção de etanol Resistência à doença viral Melhora da qualidade do óleo no grão Tolerância a estresse hídrico Melhora da qualidade do óleo no grão Atraso no amolecimento do fruto
Myanmar (1)	Algodão – <i>Gossypium hirsutum L.</i>	Resistência à Insetos

País (Eventos liberados)	Plantas - Espécies	Características Gerais
Nova Zelândia (89)	Alfafa – <i>Medicago sativa</i> Algodão – <i>Gossypium hirsutum</i> L. Arroz – <i>Oryza sativa</i> L. Beterraba – <i>Beta vulgaris</i> Canola – <i>Brassica napus</i> Milho – <i>Zea mays</i> L. Batata – <i>Solanum tuberosum</i> L. Soja – <i>Glycine max</i> L. Trigo – <i>Triticum aestivum</i>	Tolerância a Herbicida Resistência à Insetos Esterilidade masculina/restauração da fertilidade Redução na Produção de G-Lignina Aumento na produção de etanol Aumento na produção de aminoácido lisina Resistência à doença viral Melhora da qualidade do óleo no grão
Noruega (11)	Cravo - <i>Dianthus caryophyllus</i>	Modificação da coloração da Flor
Paquistão (2)	Algodão - <i>Gossypium hirsutum</i> L.	Resistência à Insetos
Panama (1)	Milho – <i>Zea mays</i> L.	Tolerância a Herbicida Resistência à Insetos
Paraguai (14)	Algodão - <i>Gossypium hirsutum</i> L. Milho – <i>Zea mays</i> L. Soja- <i>Glycine max</i> L.	Tolerância a Herbicida Resistência à Insetos
Filipinas (75)	Alfafa – <i>Medicago sativa</i> Algodão - <i>Gossypium hirsutum</i> L. Arroz - <i>Oryza sativa</i> L. Batata - <i>Solanum tuberosum</i> L. Beterraba - <i>Beta vulgaris</i> Canola – <i>Brassica napus</i> Milho – <i>Zea mays</i> L. Soja- <i>Glycine max</i> L.	Tolerância a Herbicida Resistência à Insetos Aumento na produção de etanol Resistência à doença viral Melhora da qualidade do óleo no grão
Rússia (23)	Arroz - <i>Oryza sativa</i> L. Batata - <i>Solanum tuberosum</i> L. Beterraba - <i>Beta vulgaris</i> Milho – <i>Zea mays</i> L. Soja- <i>Glycine max</i> L.	Tolerância a Herbicida Resistência à Insetos Aumento na produção de etanol
Singapura (21)	Alfafa – <i>Medicago sativa</i> Algodão - <i>Gossypium hirsutum</i> L. Beterraba - <i>Beta vulgaris</i> Canola – <i>Brassica napus</i> Milho – <i>Zea mays</i> L. Soja- <i>Glycine max</i> L.	Tolerância a Herbicida Resistência à Insetos
África do Sul (64)	Algodão - <i>Gossypium hirsutum</i> L. Arroz - <i>Oryza sativa</i> L. Canola – <i>Brassica napus</i> Milho – <i>Zea mays</i> L. Soja- <i>Glycine max</i> L.	Tolerância a Herbicida Resistência à Insetos Esterilidade masculina/restauração da fertilidade Melhora da qualidade do óleo no grão
Coreia do Sul (127)	Alfafa – <i>Medicago sativa</i> Algodão - <i>Gossypium hirsutum</i> L. Batata - <i>Solanum tuberosum</i> L. Beterraba - <i>Beta vulgaris</i> Canola – <i>Brassica napus</i> Milho – <i>Zea mays</i> L. Soja- <i>Glycine max</i> L.	Tolerância a Herbicida Resistência à Insetos Esterilidade masculina/restauração da fertilidade Aumento na produção de etanol Resistência à doença viral Tolerância a estresse hídrico Melhora da qualidade do óleo no grão
Suíça (4)	Milho – <i>Zea mays</i> L. Soja- <i>Glycine max</i> L.	Tolerância a Herbicida Resistência à Insetos

País (Eventos liberados)	Plantas - Espécies	Características Gerais
Taiwan (84)	Algodão - <i>Gossypium hirsutum</i> L. Milho – <i>Zea mays</i> L. Soja- <i>Glycine max</i> L.	Tolerância a Herbicida Resistência à Insetos Aumento na produção de etanol Aumento na produção de aminoácido lisina Tolerância a estresse hídrico Resistência à doença viral Melhora da qualidade do óleo no grão
Tailândia (15)	Milho - <i>Zea mays</i> L. Soja - <i>Glycine max</i> L.	Tolerância a Herbicida Resistência à Insetos
Turquia (19)	Milho – <i>Zea mays</i> L. Soja- <i>Glycine max</i> L.	Tolerância a Herbicida Resistência à Insetos
Estados Unidos da América (186)	Abobrinha - <i>Cucurbita pepo</i> <i>Agrostis stolonifera</i> Alfafa – <i>Medicago sativa</i> Algodão - <i>Gossypium hirsutum</i> L. Arroz - <i>Oryza sativa</i> L. Batata - <i>Solanum tuberosum</i> L. Beterraba - <i>Beta vulgaris</i> Canola – <i>Brassica napus</i> Chicória – <i>Cichorium intybus</i> Linhaça – <i>Linum usitatissimum</i> L. Maçã - <i>Malus domestica</i> Mamão – <i>Carica papaya</i> Melão - <i>Cucumis melo</i> Milho – <i>Zea mays</i> L. Pêssego - <i>Prunus domestica</i> Rosa - <i>Rosa hybrida</i> Soja- <i>Glycine max</i> L. Tabaco – <i>Nicotiana tabacum</i> L. Tomate - <i>Solanum lycopersicum</i> L. Trigo - <i>Triticum aestivum</i>	Tolerância a Herbicida Resistência à Insetos Redução na Produção de G-Lignina Esterilidade masculina/restauração da fertilidade Aumento na produção de aminoácido lisina Aumento na produção de etanol Modificação da coloração da Flor Resistência à doença viral Melhora da qualidade do óleo no grão Tolerância a estresse hídrico Melhora da aparência do Fruto Redução do potencial de acrilamida Carboidratos modificados Aumento dos níveis de amilopectina Atraso no amolecimento do fruto
Uruguai (18)	Milho - <i>Zea mays</i> L. Soja- <i>Glycine max</i> L.	Tolerância a Herbicida Resistência à Insetos
Vietnã (5)	Milho - <i>Zea mays</i> L.	Tolerância a Herbicida Resistência à Insetos

## Apêndice B

### **Características dos transgênicos liberados no mundo (ISAAA, 2015)**

- Tolerância à herbicidas, sendo que existem genes que conferem resistência aos seguintes herbicidas: 2,4-D, Dicamba, Glufosinato, Glifosato, Ixoxaflutole, Mesotrione, Oxynil e Sulfonilureia.
- Resistência à insetos, com genes de amplo espectro de resistência e genes específicos para insetos das ordens Coleóptera e Lepidóptera.
- Resistência à doenças causadas por vírus, como o Mosaico dourado do Feijão, a mancha anelar do mamoeiro, Doença-da-Sharca do pessegueiro, enrolamento da folha da batata, Mosaico do pepino, Mosaico amarelo da abobrinha, Mosaico da melancia – 2.
- Modificações dos óleos: Acumulação de ácido oleico na semente, diminuição dos níveis de ácidos graxos saturados, produção de ácidos graxos do tipo ômega-3 e aumento de triacilglicerídeos contendo ácido láurico esterificado.
- Modificações de amidos e carboidratos: Redução da amilase, aumentando o nível de amilopectina nos grãos de amido, diminuição da formação de açúcares reduzidos pela degradação de amido.
- Produção de proteína que estimula o sistema imunológico humano e inibe a alergia a pólen.
- Resistência aos antibióticos, canamicina, ampicilina, higromicina, spectinomomicina/streptomomicina.
- Supressão da Polifenol Oxidase, evitando que ocorra a oxidação e o escurecimento da maçã após ser cortada.
- Produção de Fitase, que quebra fitatos que imobilizadores de fósforo, disponibilizando este fósforo para animais monogástricos.
- Degradação da Asparagina Sintetase, diminuindo a formação de acrilamida, que possui potencial carcinogênico.
- Redução na quantidade de Guaiacil (G) Lignina.
- Tolerância à mancha preta causada por batidas na batata.
- Atraso no amolecimento e amadurecimento do fruto.
- Resistência ao estresse hídrico (seca).
- Melhora na capacidade fotossintética.
- Restauração da fertilidade.
- Macho-esterilidade.
- Capacidade de metabolização de Manose.

- Aumento na produção de etanol por modificar a alfa-amilase.
- Aumento da produção do aminoácido lisina.
- Modificação na coloração da flor.
- Redução da produção de nicotina.
- Síntese de nopalina.
- Marcadores visuais: *uidA* e *dsRed2*.

**ANEXOS**





Anexo A  
**Soluções**

**ELETROFORESE****Tampão de Carga**

- Sacarose – 40%
- Azul de Bromofenol – 0,17%

**Solução Estoque Tampão TAE 50X (1L)**

- Triz-Base – 242 g
- Ácido acético glacial - 57,1 mL
- EDTA (0,5M, pH 8.0) – 100 mL
- Água mili-Q – Completar para 1 L

**Tampão TAE (1L)**

- Solução Estoque Tampão TAE 50X – 20 mL
- Água mili-Q – Completar para 1 L

**EXTRAÇÃO DE DNA****CTAB (10mL)**

- CTAB – 0,2 g
- PVP – 0.1 g
- NaCl (5M) – 2,8 mL
- EDTA (1M, pH 8) – 0,4 mL
- Água mili-Q – Completar para 10 mL
- B-mercaptoetanol (no momento de uso) – 20 µL

**SOUTHERN BLOT****Despurinação (HCl 0,25M) (500 mL)**

- HCl – 10,4 mL
- Água mili-Q – Completar para 500 mL

**Desnaturação (NaCl 1,5M / NaOH 0,5M) (500 mL)**

- NaCl – 43,85 g
- Água mili-Q – Completar para 500 mL
- NaOH – 10 g (na hora do uso)

**Neutralização (NaCl 1,5M / Tris HCl 0,5M pH 7,5) (500 mL)**

- NaCl – 43,85 g
- Tris HCl – 39,41
- Água mili-Q – Completar para 500 mL

**SSC 20X (NaCl 3M / Citrato de Sódio 0,3M pH 7) (500 mL)**

- NaCl 87,65g
- Citrato de Sódio 44,1g
- Água mili-Q – Completar para 500 mL

**SSC 5X (NaCl 0,75M / Citrato de Sódio 0,075M pH 7)**

- Solução SSC20X – 25%
- Água mili-Q – 75%

**Solução de Hibridização****Kit “ECL Direct Labeling and Detection System” (GE Healthcare, Suécia)**

- Tampão de Hibridização – 25 mL
- NaCl – 0,73g
- Agente bloqueador – 1g

**Buffer 1 (400 mL)**

- Uréia – 48 g
- NaCl – 3,48 g
- SDS – 0,4 g
- Agente Bloqueador – 0,8g
- Fosfato de sódio (0,5M, pH 7) – 40 mL
- $MgCl_2$  (1M) – 0,4 mL
- Água mili-Q – Completar para 400 mL

**Estoque Buffer 2 20X pH 10 (50mL)**

- NaCl – 5,6 g
- Tris Base – 6,05 g
- Água mili-Q – Completar para 50 mL

**Buffer 2 (400 mL)**

- Solução estoque Buffer 2 20X – 20 mL
- Água mili-Q – 380 mL
- $MgCl_2$  (1M) – 0,8 mL

## Anexo B

### Meios de Cultura

#### Meio YEP

Para cultivo de *E. coli* e *A. tumefaciens*

- Extrato de Levedura – 10 g L<sup>-1</sup>
- NaCl – 5 g L<sup>-1</sup>
- Peptona – 5 g L<sup>-1</sup>
- Para meio YEP sólido foi adicionado ágar – 15g L<sup>-1</sup>

#### Meio B-King

Para cultivo de *P. syringae*

- Peptona 20 g L<sup>-1</sup>
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1,5g L<sup>-1</sup>
- MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O – 1,5g L<sup>-1</sup>
- Glicerol – 15ml L<sup>-1</sup>
- Para meio B-King sólido foi adicionado ágar – 15g L<sup>-1</sup>

#### Meio MS sólido

- Meio de cultura MS
- Phytigel – 2 g L<sup>-1</sup>

#### Meio de Cocultivo de Citros (MCC)

- Meio de cultura MT
- Ágar – 8 g L<sup>-1</sup>
- Benzilaminopurina (BAP) – 1mg L<sup>-1</sup>

#### Meio de Seleção de Citros (MSC)

- Meio de cultura MT
- Ágar – 8 g L<sup>-1</sup>
- Benzilaminopurina (BAP) – 1mg L<sup>-1</sup>
- Cefotaxima – 500 mg L<sup>-1</sup>
- Canamicina – 50 mg L<sup>-1</sup>

#### Meio de Enraizamento de Citros (MEC)

- Meio de cultura MT
- Phytigel – 2g L<sup>-1</sup>
- Ácido Naftaleno Acético (ANA) – 0,5mg L<sup>-1</sup>
- Ácido Indol Butílico (IBA) – 0,5mg L<sup>-1</sup>

**Meio de Germinação de Tomate (MGT)**

- Meio de cultura MS-B5
- Phytigel – 2g L<sup>-1</sup>
- Redução da concentração de sacarose para 15 g L<sup>-1</sup>

**Meio de Cocultivo de Tomate (MCT)**

- Meio de cultura MS-B5
- Phytigel – 2g L<sup>-1</sup>
- Ácido Naftaleno Acético (ANA) – 0,4 mM
- Acetossiringona – 100 mg L<sup>-1</sup>

**Meio de Seleção de Tomate (MST)**

- Meio de cultura MS-B5
- Phytigel – 2g L<sup>-1</sup>
- Benzilaminopurina (BAP) – 5 mM
- Timentin – 300mg L<sup>-1</sup>
- Canamicina – 50 mg L<sup>-1</sup>

**Meio de Enraizamento de Tomate (MET)**

- Meio de cultura MS-B5
- Phytigel – 2g L<sup>-1</sup>
- Ácido Naftaleno Acético (ANA) – 0,5 mg L<sup>-1</sup>
- Timentin – 300mg L<sup>-1</sup>
- Canamicina – 50 mg L<sup>-1</sup>

### Meios de Cultura de Plantas, MS, MT e MS-B5 (Meios Base Líquidos)

Tabela Anexa 1 – Componentes dos meios de cultura líquidos MS, MT e MS-B5

Componentes	MS (mg L <sup>-1</sup> )	MT (mg L <sup>-1</sup> )	MS-B5 (mg L <sup>-1</sup> )
<b>Macronutrientes</b>			
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	440	440	440
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170	170
KNO <sub>3</sub>	1900	1900	1900
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	370	370	370
NH <sub>4</sub> NO <sub>2</sub>	1650	1650	1650
Fe(SO <sub>4</sub> ) 7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8	27,8
<b>Micronutrientes</b>			
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	6,2	6,2
KI	0,83	0,83	0,83
MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	22,3	22,3	22,3
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,25
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	8,6	8,6	8,6
Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O	37,2	37,2	37,2
<b>Vitaminas</b>			
Ácido nicotínico	0,5	0,5	1,0
Glicina	2	2	-
Mio- Inositol	100	100	100
Piridoxina HCl	0,5	0,5	1,0
Tiamina	0,1	0,1	10
<b>Fonte de carbono</b>			
Sacarose	30.000	30.000	30.000

(MURASHIGE; SKOOG, 1962; MURASHIGE; TUCKER, 1969; PINO et al., 2010)

- O pH dos meios de cultura foram acertados para 5,8