

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

**Transformação genética de tomate Micro-Tom e de laranja doce com os genes *chitinase type III (PR-8)* e *constitutive disease resistance protein (CDR-1)* de *Citrus sinensis***

**Nathália Felipe Ansante**

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

**Piracicaba  
2015**

**Nathália Felipe Ansante**  
**Engenheira Agrônoma**

**Transformação genética de tomate Micro-Tom e de laranja doce com os genes *chitinase type III (PR-8)* e *constitutive disease resistance protein (CDR-1)* 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  
Mestra em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

**Piracicaba**  
**2015**

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

Ansante, Nathália Felipe

Transformação genética de tomate Micro-Tom e de laranja doce com os genes *chitinase type III (PR-8)* e *constitutive disease resistance protein (CDR-1)* de *Citrus sinensis* / Nathália Felipe Ansante. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.

80 p. : il.

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

1. HLB 2. Melhoramento 3. Planta modelo 4. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*  
5. Resistência 6. *Solanum lycopersicum* I. Título

CDD 634.31  
A617t

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

## **DEDICO E OFEREÇO**

Aos meus pais, Sueli Conceição Mendes Felipe e Roque Miguel Ansante, à minha irmã  
Raphaela Felipe Ansante e ao meu irmão Thiago Felipe Ansante, pelo incentivo,  
compreensão, confiança, amor, carinho, atenção e por estarem ao meu lado e serem o meu  
alicerce em todos os momentos da minha vida.

Ao Rafael Mendes Fehr, amigo, namorado e companheiro, por estar sempre ao meu lado, me  
apoiando, dividindo os sonhos, planos e alegrias.



## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser o socorro nos momentos de aflição, fortalecer, proteger e me dar sabedoria em todos os momentos de minha vida.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ/USP, e ao programa de fitotecnia pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho, pela oportunidade concedida, pelos ensinamentos, apoio, orientação, incentivo, amizade e exemplo de comportamento ético e profissional.

Aos meus pais Sueli Conceição Mendes Felipe e Roque Miguel Ansante e aos meus irmãos, Raphaela Felipe Ansante e Thiago Felipe Ansante, por estarem sempre ao meu lado, me motivando, dando atenção e amor, e pela compreensão nos momentos de ausência.

Ao meu namorado, Rafael Mendes Fehr, pelo amor, carinho, companheirismo, compreensão, apoio, e ajuda prestada na condução dos experimentos.

A Thais Mendes, Celso Fehr e Bruna Mendes Fehr pelo incentivo durante todo este processo.

A Liliane Stipp (Lili), técnica do Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas, ESALQ/USP, pela grande amizade, apoio, incentivo, conselhos e auxílio em diversas etapas deste trabalho.

A Professora Beatriz Madalena Januzzi Mendes, CENA/USP, e toda a sua equipe, pela parceria e apoio concedidos durante todo o processo de realização deste trabalho.

Aos Professores, Ivan Paulo Bedendo e José Belasque Júnior, do departamento de Fitopatologia e Nematologia-ESALQ/USP pelo apoio, atenção e dedicação no auxílio com os experimentos de inoculação desenvolvidos neste trabalho.

A professora Lilian Amorim, pelo uso dos fitotrons no departamento de Fitopatologiae Nematologia-ESALQ/USP.

Ao Leandro José Dallagnol pelo auxílio em conseguir o isolado bacteriano usado neste trabalho.

Ao Professor Lázaro Perez, do departamento de Ciências Biológicas ESALQ-USP, por ceder inicialmente às sementes de tomate Micro-Tom, para iniciarmos os experimentos de transformação genética, pelo apoio e atenção.

A pós-doutoranda Lilian Ellen Pino, do Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal, pelo apoio nos experimentos de transformação genética.

Ao pesquisador Ricardo Harakava, do Instituto Biológico, pelo inestimável apoio, atenção e auxílio no desenvolvimento das análises de qPCR utilizadas neste projeto.

Ao João Geraldo Brancalion, pelo auxílio na edição das fotos da análise de *Southern blot*.

As doutorandas, do departamento de Genética ESALQ/USP, Patricia Dayane Carvalho Schaker e Leila Priscila Peters, pelo apoio concedido durante as análises de qPCR.

A Doutoranda Meire Bassan, pelo auxílio na confecção dos primers utilizados nas análises de PCR dos genes de interesse.

A mestranda Perla Novaes de Oliveira, pela parceria, amizade e companherismo durante a realização das análises dos experimentos.

A Fabiana Quagio e Murilo Nadaleso, pela amizade, compreensão e ajuda concedida em diversas etapas neste trabalho.

Aos funcionários do departamento de Produção Vegetal (Horticultura) ESALQ/USP, Aparecido Donizete Serrano, Eder, e Sr. José, pelo auxílio nos experimentos realizados em casa de vegetação, pelo apoio e dedicação nos cuidados com as plantas.

Aos secretários do departamento de Produção Vegetal (Horticultura) ESALQ/USP, Elisabete Sarkis São João (Bete), Maria Célia Rodrigues (Célia) e Paulo Jaoude, pela atenção e apoio.

A Luciane Ap. Lopes Toledo, secretária do programa de fitotecnia, pela atenção, dedicação e carinho.

A todos que de alguma forma, diretamente ou indiretamente, colaboraram para realização deste trabalho.

*“Finalmente, fortaleçam-se no Senhor e no seu forte poder [...]. Por isso, vistam toda a armadura de Deus, para que possam resistir no dia mau e permanecer inabaláveis, depois de terem feito tudo. Assim, mantenham-se firmes, cingindo-se com o cinto da verdade, vestindo a couraça da justiça e tendo os pés calçados com a prontidão do evangelho da paz. Além disso, usem o escudo da fé, com o qual vocês poderão apagar todas as setas inflamadas do maligno. Usem o capacete da salvação e a espada do Espírito, que é a palavra de Deus.”*

*(Efésios 6: 10, 13-17)*





## SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT .....	13
LISTA DE FIGURAS .....	15
LISTA DE TABELAS .....	19
1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	23
2.1 Citros: Características gerais e econômicas.....	23
2.2 Huanglongbing (HLB).....	24
2.3 Transformação genética em citros e plantas modelo.....	26
2.4 Micro-Tom: Características gerais .....	27
2.5 Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) através dos genes <i>PR-8</i> e <i>CDR-1</i> .....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	33
3.1 Obtenção das construções gênicas .....	33
3.1.1 Construção gênica contendo gene <i>PR-8</i> .....	33
3.1.2 Construção gênica contendo gene <i>CDR-1</i> .....	33
3.2 Transformação genética de tomate Micro-Tom via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	34
3.2.1 Obtenção do material vegetal .....	34
3.2.2 Cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para experimentos de transformação genética..	34
3.2.3 Transformação genética.....	35
3.2.4 Seleção de brotos regenerantes, enraizamento de plântulas e aclimatização .....	36
3.2.5 Seleção das linhagens T1 e T2 das plantas transgênicas por canamicina .....	37
3.2.6 Obtenção do isolado bacteriano.....	37
3.2.7 Cultivo e seleção de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> .....	37
3.3 Análises moleculares em plantas transgênicas de tomate Micro-Tom.....	38
3.3.1 Teste histoquímico de GUS .....	38
3.3.2 Confirmação da transgenia por <i>Polymerase Chain Reaction</i> - PCR.....	39
3.3.3 Análise de <i>Southern blot</i> .....	40
3.3.4 Construção da curva padrão de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> pela técnica de qPCR.....	41
3.4 Transformação genética de laranja ‘Hamlin’ via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	43
3.4.1 Obtenção do material vegetal .....	43
3.4.2 Cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para experimentos de transformação genética..	43
3.4.3 Transformação genética.....	44

3.4.4 Enraizamento das brotações.....	44
3.4.5 Enxertia <i>in vitro</i> e aclimatização.....	45
3.5 Análises moleculares em plantas transgênicas de laranja ‘Hamlin’ .....	46
3.5.1 Teste histoquímico - GUS.....	46
3.5.2 Confirmação da transgenia por <i>Polymerase Chain Reaction</i> - PCR .....	46
3.5.3 Análise de <i>Southern Blot</i> .....	47
4 RESULTADOS.....	49
4.1 Transformação genética de tomate Micro-Tom.....	49
4.2 Transformação genética de laranja ‘Hamlin’ .....	53
4.3 Análise de <i>Southern blot</i> em plantas de tomate Micro-Tom e de laranja ‘Hamlin’ .....	55
4.4 Seleção de plantas transgênicas T1 por canamicina .....	56
5 DISCUSSÃO .....	59
6 CONCLUSÃO .....	63
REFERÊNCIAS.....	65
ANEXOS .....	75

## RESUMO

### **Transformação genética de tomate Micro-Tom e de laranja doce com os genes *chitinase type III (PR-8)* e *constitutive disease resistance protein (CDR-1)* de *Citrus sinensis***

Atualmente, o HLB é considerado a principal doença que acomete as plantas cítricas. Diante desse fator, pesquisas por cultivares resistentes a esta doença são necessárias. A transformação genética via *Agrobacterium*, juntamente com o uso de plantas modelos, tem sido uma alternativa para verificação do funcionamento dos genes em resposta a patógenos, isto porque as plantas modelos possuem como característica ciclo de vida curto e alto poder de regeneração. Assim sendo, objetivou-se com o presente trabalho, a transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*, de tomate Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* L.) e de laranja doce, com os genes que codificam as proteínas *PR-8* e *CDR-1*, isolados a partir de *Citrus sinensis*. Os cotilédones provenientes de sementes germinadas *in vitro* de tomate Micro-Tom foram utilizados como fonte de explante para os experimentos de transformação genética com os genes *PR-8* e *CDR-1*. Esses explantes foram subcultivados até o aparecimento de brotos regenerantes e posteriormente plantas transgênicas, as quais foram aclimatizadas e levadas a casa-de-vegetação. A transgenia foi confirmada por PCR e o número de inserções do gene por *Southern blot*. As plantas foram cultivadas até a obtenção da geração T1. Simultaneamente, foram realizados experimentos de transformação genética em segmentos de epicótilo, provenientes de sementes de laranja ‘Hamlin’ germinadas *in vitro*, com o gene *CDR-1*, a fim de se obter plantas transgênicas e sua caracterização. Paralelamente, foi realizada a construção da curva padrão pela análise de qPCR para identificação de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Foram obtidas treze plantas transgênicas de tomate Micro-Tom com o gene *PR-8* e três com o gene *CDR-1*. As eficiências de transformação foram em torno de 0,38 a 1,98%. Três plantas de tomate Micro-Tom transgênicas com o gene *PR-8* foram caracterizadas por *Southern blot* e o número de inserções variou de 1 a 3. Dezenove plantas transgênicas de laranja ‘Hamlin’ com o gene *CDR-1* foram obtidas através dos experimentos de transformação genética. A eficiência de transformação foi de 2,06 a 5,96%. Dessas, apenas uma foi caracterizada por *Southern blot* apresentando 1 número de cópia do DNA no genoma da planta.

Palavras-chave: HLB; Melhoramento; Planta modelo; *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*; Resistência; *Solanum lycopersicum*



## ABSTRACT

### **Genetic transformation of Micro-Tom tomato and sweet orange with *chitinase type III (PR-8)* and *constitutive disease resistance protein (CDR-1)* genes from *Citrus sinensis***

HLB is currently considered the main disease affecting citrus plants. Given this factor, research for cultivars resistant to this disease is needed. Genetic transformation via *Agrobacterium* with the use of model plants has been an alternative for checking the gene function in response to pathogens, because these model plants have as characteristic a short life cycle and high power of regeneration. Therefore, the aim of this work was to produce transgenic plants, via *Agrobacterium tumefaciens*, of Micro-Tom tomato (*Solanum lycopersicum* L.), and sweet orange, with the genes encoding the *PR-8* and *CDR-1* proteins isolated from *Citrus sinensis*. The cotyledons from *in vitro* germinated Micro-Tom tomato seeds were used as explants source for genetic transformation experiments with *PR-8* and *CDR-1* genes. These explants were subcultured until the appearance of regenerating shoots and after transgenic plants, which were acclimatized and taken to a greenhouse. The transgenic plants were confirmed by PCR and the number of gene insertions by *Southern blot*. The plants were grown until T1 generation was obtained. Simultaneously genetic transformation experiments were performed with epicotyl segments from 'Hamlin' sweet orange seeds germinated *in vitro* with *CDR-1* gene in order to obtain transgenic plants and their characterization. Simultaneously, the standard curve construction was performed by qPCR analysis for identification of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Thirteen transgenic plants of Micro-Tom tomato with *PR-8* gene and three with *CDR-1* gene were obtained. The transformation efficiencies were around 0,38 to 1,98%. Three transgenic plants of Micro-Tom tomato with *PR-8* gene were characterized by *southern blot*, and the number of inserts ranged from 1 to 3. Nineteen transgenic 'Hamlin' sweet orange plants with *CDR-1* gene were obtained through genetic transformation experiments, and the transformation efficiency was 2,06 to 5,96%. One plant was characterized, by *Southern blot* and has one DNA copy number in the plant genome.

Keywords: HLB; Improvement; Model plant; *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*; Resistance; *Solanum lycopersicum*



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Representação esquemática do vetor de expressão pCAMBIA2201/35S::*CsPR-8* contendo o gene *CsPR-8*. *nptII*: gene que confere resistência a canamicina. 35S-P: promotor constitutivo CaMV35S. 35S-T: terminador. NOS-T: terminador. LB: borda esquerda. RB: borda direita..... 33
- Figura 2- Representação esquemática do vetor de expressão pCAMBIA2301/UBI10::*CsCDR-1* contendo o gene *CsCDR-1*, dirigido pelo promotor UBI10. 35S-T: terminador. *nptII*: gene que confere resistência a canamicina. 35S-P: promotor constitutivo CaMV35S. UBI10: promotor constitutivo de *Arabidopsis thaliana*. OCS: terminador. *uidA*: gene GUS. NOS-T: terminador. LB: borda esquerda. RB: borda direita ..... 34
- Figura 3- Estágios de desenvolvimento dos cotilédones de tomate Micro-Tom durante o processo de transformação genética e cultivo. A: Placa de Petri contendo explantes cotiledonares de tomate após a transformação genética; B: detalhe do broto regenerando a partir do cotilédone transformado; C: Plântula de tomate Micro-Tom a ser transferida para potes com meio de enraizamento..... 36
- Figura 4- Curvas de Melt das curvas padrão realizadas, mostrando que houve apenas um pico de amplificação e, conseqüentemente não há nenhuma amplificação inespecífica. A, B e C: curva padrão 1 a 3, respectivamente ..... 42
- Figura 5- Curva padrão de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* realizada por PCR quantitativo usando FastSybr® Green Master Mix, a partir de diluições serial de concentração do DNA da bactéria..... 43
- Figura 6- Estágios de desenvolvimento dos explantes de laranja ‘Hamlin’ durante o processo de transformação genética. A: Placa de Petri contendo explantes de hipocótilo de laranja ‘Hamlin’ após a transformação genética; B e C: Detalhe do broto regenerando a partir do explante transformado..... 46



Figura 7- Análise de PCR de plantas de tomate Micro-Tom com os genes *PR-8*, *CDR-1* e o vetor pCAMBIA2201. A e B: Plantas transformadas com o gene *PR-8*. Colunas de P1-P15 plantas analisadas. C: Plantas transformadas com o vetor pCAMBIA2201. Colunas de V1-V3 plantas analisadas. D: Plantas transformadas com o gene *CDR-1*. Colunas de C1-C3 plantas analisadas. M = marcador de 1Kb (Thermo Scientific). H<sub>2</sub>O = água miliq - controle da reação. C+ = controle positivo (plasmídeo contendo o gene *PR-8*, o vetor sem gene de interesse e o gene *CDR-1*, correspondem as letras A e B, C, D respectivamente). C- = controle negativo (planta não transformada). O fragmento de 466 pb corresponde ao gene *nptII* e o fragmento de 439 pb corresponde a uma sequência de pares de base interna do gene *CDR-1* ..... 52

Figura 8- Segmentos de folhas jovens de tomate Micro-Tom transgênico após o teste histoquímico do GUS. A: tubos contendo folhas jovens de tomate Micro-Tom com o gene *CDR-1* em álcool 70%. B: detalhe de uma das folhas GUS+ com o gene *CDR-1*. C: tubos contendo folhas jovens de tomate Micro-Tom com o vetor pCAMBIA2201 em álcool 70%. D: detalhe de uma das folhas GUS+ com o vetor pCAMBIA2201 ..... 53

Figura 9- Segmentos de folhas jovens de laranja ‘Hamlin’ transgênicos após o teste histoquímico do GUS. A: fragmentos de folhas dos brotos em álcool 70%. B: detalhe de uma das folhas GUS+ com o gene *CDR-1* ..... 54

Figura 10- Análise de PCR de plantas de laranja ‘Hamlin’ transformadas com o gene *CDR-1*; A e B: PCR realizada com os primers UBI 10 e OCS. C: PCR realizada com os primers *nptII*. M = marcador de 1Kb (fermentas). C+ = controle positivo (plasmídeo contendo o gene *CDR-1*). H<sub>2</sub>O = água miliq-controle da reação. C- = controle negativo (planta não transformada). Colunas de H1-H19 plantas analisadas. O fragmento de 1386 pb corresponde as sequências do gene *CDR-1* + UBI 10 (promotor)+ OCS (terminador)e o fragmento de 466 pb corresponde ao gene *nptII* ..... 55

Figura 11- Análise de *Southern blot* em plantas de laranja ‘Hamlin’ com o gene *CDR-1* (A) e tomate Micro-Tom com o gene *PR-8* (B). Os DNAs foram clivados com a enzima *EcoRI* e hibridizado com a sonda contendo o amplicon do gene *nptII* de 722 pb.

C+ = Controle positivo (sonda). Colunas numeradas correspondem ao DNA de plantas de laranja 'Hamlin' e tomate Micro-Tom transgênicas..... 56

Figura 12- Experimento de seleção de plantas de tomate Micro-Tom transformadas com genes *PR-8*, *CDR-1* e o vetor pCAMBIA2201 sem gene de interesse em T1 pulverizadas com canamicina na concentração de 400 mg L<sup>-1</sup>. A: plântulas T1 de diferentes eventos de transformação não apresentando nenhuma reação a pulverização de canamicina. B: plântulas apresentando reação a canamicina após cinco dias de pulverização. C: plântulas já apresentando reação a canamicina após 12 dias de pulverização. D: apenas as plântulas verdes resistentes a canamicina e E: detalhe de uma plântula com sintomas da canamicina..... 57



**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1- Sequência dos primers <i>foward</i> (F) e <i>reverse</i> (R) desenhados para amplificação de 466 e 439 pb dos genes <i>nptII</i> e <i>CDR-1</i> respectivamente .....	39
Tabela 2- Sequência dos primers <i>foward</i> (RealFor1) e <i>reverse</i> (RTRRev), utilizados para amplificação de 138 pb .....	41
Tabela 3- Sequência dos primers <i>foward</i> (F) e <i>reverse</i> (R) desenhados para amplificação de 466 e 1386 pb, dos genes <i>nptII</i> e UBI10 + <i>CDR-1</i> +OCS respectivamente .....	47
Tabela 4- Transformação genética de tomate Micro-Tom via <i>A. tumefaciens</i> contendo o gene <i>PR-8</i> .....	50
Tabela 5- Transformação genética de tomate Micro-Tom via <i>A. tumefaciens</i> contendo o gene <i>CDR-1</i> , na estirpe EHA 105 .....	51
Tabela 6- Transformação genética de tomate Micro-Tom via <i>A. tumefaciens</i> com o vetor pCAMBIA2201 sem gene de interesse, na estirpe EHA 105 .....	52
Tabela 7- Transformação genética de laranja ‘Hamlin’ com o gene <i>CDR-1</i> via <i>A. tumefaciens</i> , na estirpe EHA105 .....	54



## 1 INTRODUÇÃO

O setor citrícola possui um papel econômico importante na agricultura do país, isto porque o Brasil é um dos países de maior exportação de suco de laranja. Entretanto, no mercado interno, este setor se destaca com as frutas de mesa, entre elas, laranjas, tangerinas e limões.

Desta forma, o Brasil lidera o ranking mundial de produção de laranja, chegando a produzir o equivalente a 18 milhões de toneladas no ano de 2012, atingindo mais que o dobro dos Estados Unidos, o qual mantém o segundo lugar com 8,14 milhões de toneladas. (FAO, 2015). Dentre os principais estados produtores, São Paulo lidera a produção de laranja, sendo considerado o maior pólo mundial citrícola. Isto se deve à instalação de grandes indústrias voltadas à exportação de suco e à proximidade de cidades metrópoles com maior poder aquisitivo (BOTEON; NEVES, 2005).

Entretanto, mesmo diante deste cenário, a citricultura vem passando por diversas dificuldades recentes, as quais estão relacionadas à fitossanidade dos pomares, e no caso da citricultura paulista, se somam as condições climáticas adversas encontradas nos dois últimos anos, como o longo período de estiagem, fazendo com que houvesse diminuição na área plantada de laranja, e por consequência, redução da produção nacional.

No ano de 2014, a área colhida foi de 650.692 hectares, o que corresponde a uma redução de 8,1% e queda na produção de 8,9% em relação ao ano de 2013. No mesmo ano, o estado de São Paulo obteve uma produção em torno de 10 milhões de toneladas, em comparação a 2013, esse dado reflete uma queda de produção de 13,8% (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE, 2015a).

Diversas são as doenças que acometem os pomares citrícolas, dentre elas, citam-se o cancro cítrico, a clorose variegada do citros (CVC), a leprose, a pinta preta e a podridão floral. Porém, atualmente a principal doença que vem se propagando entre as regiões produtoras é o *greening* ou huanglongbing (HLB).

O HLB é considerado a doença mais devastadora da cultura do citros, pois, afeta a planta por completo desde ramos velhos aos novos chegando até os frutos, isto porque o HLB é associado a bactérias que colonizam a planta pelo floema, e são denominadas *Candidatus Liberibacter spp.*, transmitidas por insetos vetores, psílídeos, como *Diaphorina citri* e *Trioza erytraeae*. Quase todas cultivares de citros são suscetíveis, independentemente do porta-enxerto, ao HLB (FUNDECITRUS 2009; BOVÉ, 2006).

Deste modo, e diante do histórico da cultura do citros e suas doenças, alternativas para desenvolvimento de plantas com resistência genética vêm sendo desenvolvidas. Porém as

características genéticas e reprodutivas das plantas cítricas, dentre elas, a apomixia, longo ciclo reprodutivo e alto grau de heterozigiosidade, dificultam a prática do melhoramento genético convencional (SILVA et al., 2005).

Assim, a transformação genética de plantas via *Agrobacterium tumefaciens* tem se demonstrado como uma importante vertente da engenharia genética na busca de plantas resistentes a doenças. Esta metodologia permite a introdução de genes exógenos no genoma da planta.

Somada a esta técnica, o que vem se destacando atualmente é a busca pelo aumento do mecanismo natural de defesa já existente nas plantas usando genes ou componentes derivados das mesmas espécies de plantas ou outros. Dentre os mecanismos de defesa, pode-se destacar a SAR-Resistência Sistêmica Adquirida (FEBRES et al., 2009). O processo da ativação da SAR é iniciado através de um agente indutor fazendo com que os mecanismos de defesa sejam ativos não somente no sítio de indução, mas também em locais distantes, sendo de certa forma generalizada. Assim o termo “adquirido” refere-se quando o elícitor (sinal externo) é um agente patogênico ou parasita (BARROS et al., 2010).

Contudo, apesar dos protocolos existentes para a transformação genética de citros serem eficazes, há a necessidade de se desafiar essas plantas para verificação do desempenho dos genes. Desta forma, se faz necessário o uso de sistemas que possibilitem a avaliação funcional dos genes, onde se faz uso de plantas que tenham como característica principal o ciclo de vida curto e, portanto, caracterizadas como modelos.

Dentre as plantas mais utilizadas como modelo para ensaios com patógenos, citam-se *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabacum*. Porém, o tomate Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* L.) vem se difundindo como alternativa para pesquisas voltadas a interação planta-patógeno (ARIE et al., 2007). Esta cultivar tem diversas características únicas, tais como tamanho pequeno, que lhe permite crescer a uma alta densidade (1.357 plantas m<sup>-2</sup>) e ciclo de vida curto, garantindo frutos maduros e com sementes dentro de 70-90 dias após a semeadura. Tais características são semelhantes às de *Arabidopsis* e, conseqüentemente, permitem que este tomateiro seja considerado uma cultivar modelo para estudos de genômica funcional (SUN et al., 2006).

Assim sendo, objetivou-se com o presente trabalho, a transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*, de tomate Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* L.) e de laranja doce, com os genes que codificam as proteínas *PR-8* e *CDR-1*, isolados a partir de *Citrus simensis*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Citros: Características gerais e econômicas

Os citros pertencem à família Rutaceae, subfamília Aurantioideae, tribo Citreae e subtribo Citrinae (SWINGLE; REECE, 1967). O gênero *Citrus*, subgrupo *Citrus* abrange quatro espécies selvagens alopátricas conhecidas, sendo que duas são tropicais *C. halimii* B.C. Stone (Península Malaia e Borneo) e *C. grandis* Osbeck [= *C. maxima* (Burm.) Merr.] (toranja, do sudeste da Ásia) e as outras duas são subtropicais *C. medica* L. (cidra) e *C. reticulata* Blanco (tangerina, mandarin), desta forma os frutos comercialmente comestíveis referentes a *Citrus* provavelmente são oriundos das três últimas espécies, isto devido a seleção, hibridização e seleção de “complexos agâmicos” (MABBERLEY, 1997).

As plantas de citros cultivadas comercialmente, como variedades copas, estão divididas em cinco grupos: laranjas doces (*C. sinensis* (L.) Osbeck), tangerinas (*C. reticulata* Blanco), limões (*C. limon* (L.) Burm. F.), limas ácidas [*C. aurantifolia* (Christm.) Swing e *C. latifolia* (Yu. Tanaka)] e os pomelos (*C. paradisi* Macfad), sendo que o grupo que apresenta maior expressão é o das laranjas doces, acompanhado das tangerinas, limões e limas ácidas. Algumas espécies cítricas são utilizadas comercialmente como porta-enxerto, entre elas citam-se: limão ‘Cravo’ (*C. limonia* Osbeck), limão ‘Volkameriano’ (*C. volkameriana* V. Tem & Pasq.), tangerina ‘Sunki’ (*C. sunki* hort. ex Tanaka), tangerina ‘Cleópatra’ (*C. reshni* hort. ex Tanaka), laranja azeda (*C. aurantium* L.), trifoliata (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.), e os híbridos citrange ‘Carrizo’ e citrange ‘Troyer’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] e citrumelo ‘Swingle’ [*Citrus paradisi* Macfad. cv. Duncan x *Poncirus trifoliata* (L.) raf.] (PIO et al., 2005; POMPEU JUNIOR, 2005).

Entre os principais produtos agrícolas produzidos no Brasil, a laranja está entre os cinco mais produzidos, com uma média de produção entre os anos de 2000 e 2013 em torno das 18 milhões de toneladas (FAO, 2015). Entre as regiões produtoras, o sudeste se destaca como maior produtor, tendo como participação mais de 50% da produção. Dentre os estados, São Paulo se destaca por concentrar a produção citrícola brasileira. Em 2012, o sudeste contribuiu com 14 milhões de toneladas, desses o equivalente a 13 milhões de toneladas foram produzidos em São Paulo (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE, 2015b).

Além disso, o Brasil lidera a produção mundial de suco de laranja com uma média de 864 mil toneladas durante o período dos anos 2000 a 2013 (FAO, 2015). Desta forma é considerado o principal exportador de suco no mundo. A cada cinco copos de suco de laranja



que são consumidos no mundo, três são provenientes do Brasil, isto porque, o país detém 50% da produção mundial de suco de laranja, exporta 98% do que produz e sua participação no mercado mundial corresponde a 85% (NEVES et al., 2009). Porém, há alguns anos a citricultura vem sofrendo diversos problemas fitossanitários que podem ser considerados um dos grandes gargalos da produção citrícola do país.

Em 2014, a produção de laranja caiu 8,9% e a área colhida foi 8,1% menor em relação ao ano de 2013. O estado de São Paulo, devido aos problemas fitossanitários como CVC (clorose variegada dos citros), a pinta-preta, a leprose, o cancro cítrico e o HLB, teve um decréscimo na produção e em 2014 produziu em torno de 10 mil toneladas. Desta forma, as consequências das perdas econômicas da citricultura paulista, ocorridas desde 2012, se tornaram evidentes (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE, 2015a). Contudo, atualmente, o HLB tem sido considerado um dos principais problemas enfrentados pela citricultura nacional. Sendo assim, o HLB devido aos danos que causa e a dificuldade de manejo, coloca em risco esse setor do agronegócio brasileiro (BELASQUE JUNIOR, 2009).

## 2.2 Huanglongbing (HLB)

Os primeiros relatos dos sintomas do HLB ocorreram nos continentes Asiático e Africano, sendo que até o início dos anos 2000, o continente Americano estava livre da doença. Porém, em março de 2004 e em agosto de 2005, os sintomas foram observados nas duas das maiores regiões produtoras de citros no mundo, São Paulo e Flórida, respectivamente (BOVÉ, 2006).

O HLB é associado a três espécies de bactérias, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Candidatus Liberibacter africanus* e *Candidatus Liberibacter americanus*, e são assim denominadas de acordo com os continentes em que foram primeiramente relatadas. Essas bactérias são Gram-negativas, pertencentes à subdivisão  $\alpha$  de *Proteobacteria* e sua colonização é restrita ao floema das plantas. Devido ao fato de não serem ainda cultivadas em meio de cultura, recebem a nomenclatura *Candidatus*. O inseto vetor que serve como hospedeiro dessas bactérias é o psílídeo, sendo que duas espécies se destacam: *Diaphorina citri* e *Trioza erytrae*. A *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) e *Candidatus Liberibacter americanus* (Lam) são tolerantes a áreas quentes e possuem como inseto vetor, *Diaphorina citri*. Entretanto, a *Candidatus Liberibacter africanus* (LAF) é sensível a áreas quentes e é transmitida por *Trioza erytrae* (BOVÉ, 2006; BELASQUE JÚNIOR, 2009; JAGOEIX et al., 1994; GARNIER et al., 2000; TEIXEIRA et al., 2005 a, b, c).

O HLB afeta a maioria das espécies de citros, portanto, não há cultivares tanto de copa como de porta-enxerto, resistentes a esta doença. Não há métodos de cura para erradicação da mesma. Além disso, a planta ornamental utilizada amplamente no Brasil, conhecida como “murta” (*Murraya paniculata*), é hospedeira dos tipos asiático e americano de *Candidatus Liberibacter* como também do psilídeo *Diaphorina citri* (FAN et al., 2010; FUNDECITRUS, 2009; BELASQUE JÚNIOR, 2009). Assim, estes fatores contribuem para que a doença se expanda cada vez mais nos pomares brasileiros.

De forma geral, os sintomas da doença incluem amarelecimento e mosqueados das folhas, que podem ser confundidos com sintomas de deficiência nutricional, redução do tamanho da folha e abscisão prematura na região do pecíolo. A mortalidade das plantas pode ocorrer em alguns meses ou até vários anos após a infecção (LIAO; BURNS, 2012). Ainda, o HLB também pode causar assimetria em frutos com inversão de cores e sementes abortadas. Além disso, foram observados acúmulo de amido em folhas infectadas (FAN et al., 2010), e lesões ao floema (KIM et al., 2009). Ao infectar a planta, a bactéria obstrui o floema, interrompendo a distribuição da seiva. Desta forma, plantas jovens não conseguem atingir a produção e plantas adultas chegam à improdutividade em dois a cinco anos (FUNDECITRUS, 2009).

Não existem métodos curativos para o HLB. Portanto, o controle deve ser preventivo e fundamentado na eliminação do inóculo através da erradicação das plantas infectadas e uso de químicos para controle dos vetores. Deste modo, as medidas preventivas que devem ser realizadas impedindo a entrada do HLB em áreas sadias são: evitar o transporte de materiais de propagação de áreas infectadas para não infectadas; inspecionar todos os materiais vegetais de citros externos, garantindo sua sanidade (BOVÉ, 2006; ABDULLAH et al., 2009).

Comparando os dados das safras entre os anos de 2013 e 2014, verifica-se alto índice de erradicação de pomares, isto porque em 2014, a área total ocupada sofreu uma perda de aproximadamente 69 mil hectares. Em 2013 durante o período de junho a dezembro, os pomares erradicados foram convertidos em cultivos de cana-de-açúcar (16%) e grãos (26%), sendo este último dividido entre milho e soja e 5% para outras culturas (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE, 2015a; CONAB, 2013).

Estes dados refletem os problemas fitossanitários que os produtores vêm enfrentando ao longo dos anos, principalmente, com o HLB, o que resultou na redução da área cultivada, fazendo com que ocorram mudanças no cenário citrícola brasileiro. Desta forma a busca por cultivares resistentes a doenças se faz necessária, diante da grave situação enfrentada pelo setor.

### 2.3 Transformação genética em citros e plantas modelo

Ao longo de mais de 20 anos, pesquisas voltadas para a utilização de introdução de genes exógenos, visando a adição de características agronômicas, em plantas de interesse comercial, têm tido grandes progressos. Isto porque a transformação genética surgiu como uma ferramenta de importância na biotecnologia moderna, principalmente, em plantas perenes, as quais possuem fatores limitantes ligados às suas características biológicas e reprodutivas. Desta forma, as plantas transgênicas visam maior produtividade, melhor qualidade de frutos e redução do uso de agrotóxicos. Assim, possuem grandes benefícios diretos e indiretos ao consumidor (GAMBINO e GRIBAUDO, 2012).

A transformação genética em citros consiste em uma técnica de importância expressiva, pois, permite a introdução de genes em casos em que as espécies são sexualmente incompatíveis, acelera o processo para adquirir cultivares melhoradas e também por limitar a adição de genes indesejáveis, os quais são decorrentes do cruzamentos sexuais (MACHADO et al., 2005).

O primeiro relato de transformação genética em citros se deu por volta da década de 80, com o método de transferência direta de DNA. A partir de então, diversas pesquisas foram desenvolvidas com o objetivo de se obterem plantas transgênicas de citros com alta eficiência. Desta forma, surgiram diversas metodologias utilizando diferentes fontes de explantes na transformação genética de citros, tais como: protoplastos, calos embrionários, cotilédones, epicótilos, e bombardeamento de segmentos (XIAO; JI, 2013).

O método mais empregado atualmente para obtenção de plantas transgênicas de citros é a transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, a qual utiliza segmentos de epicótilo de 1 cm como forma de explante (BESPALHOK FILHO et al., 2001). Diversos trabalhos visando à obtenção de plantas transgênicas de citros resistentes a doenças vêm sendo desenvolvidos e publicados (BARBOSA-MENDES et al., 2009; CARDOSO et al., 2010; DUTT; MADHAVARAJ; GROSSER, 2010; MUNIZ et al., 2012; MIYATA et al., 2012). No entanto, faz-se necessário que essas plantas sejam testadas para a validação desses genes em resposta a infecção de patógenos. Porém, essas possuem como característica a juvenilidade, o que dificulta esta prática, pois são necessários anos para a avaliação das características comerciais (BESPALHOK FILHO et al., 2001) como também para a validação de novos genes inseridos em seus genomas.

No entanto, uma alternativa para se verificar o funcionamento desses genes, a favor da planta e contra o patógeno vem sendo recentemente utilizada. A técnica consiste no uso de plantas modelos que passam pelo processo de transformação genética com os genes de

interesse e posteriormente são desafiadas com patógenos a fim de se obter as respostas das plantas em relação à infecção dos organismos fitopatogênicos.

Um organismo modelo, por definição, consiste em uma espécie estudada extensivamente para a compreensão de um fenômeno biológico particular, de modo que as descobertas facilitem o entendimento da interação do fenômeno com outros organismos (DELATORRE; SILVA, 2008).

Dentre as plantas mais utilizadas para essa finalidade destaca-se a *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* L. (tabaco) e mais, recentemente, o tomate Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* L.). Todas essas espécies possuem algumas características em comum, o que faz delas um modelo para estudo de interação planta-patógeno, tais como: porte pequeno, ciclo de vida curto e alta regeneração *in vitro*.

#### **2.4 Micro-Tom: Características gerais**

Cerca de 1000-2000 espécies compõem a família *Solanaceae*, as quais possuem grande variabilidade morfológica e adaptação ecológica. Dentre essas espécies existem diversas culturas hortícolas, que compreendem plantas com frutos, tubérculos e ainda ornamentais, sendo que muitas delas possuem importância econômica (KNAPP, 2002; AOKI et al., 2010).

Dentre as solanáceas, a cultivar miniatura Micro-Tom foi criada para fins ornamentais (SCOTT; HARBSUGH, 1989). No entanto, vem se destacando como modelo nas pesquisas científicas devido às características únicas que possui, diferenciando-a das demais cultivares, tais como: tamanho pequeno (15-20 cm de altura), ciclo de vida rápido (70-90 dias) e fácil transformação, como também alta fertilidade e frutificação mesmo sob iluminação fluorescente. Ainda pode ser cultivada em elevada densidade (maior que 1.357 plantas m<sup>-2</sup>), e produzir três a quatro gerações em um ano (MEISSNER et al., 1997; EMMANUEL; LEVY, 2002; TANKSLEY, 1993).

De acordo com Meissner et al. (1997), o caráter fenotípico do Micro-Tom é resultado de duas principais mutações recessivas: *dwarf* (d) e miniatura (mnt). Pnueli et al. (1998) relataram a existência de mais uma mutação fenotípica associada ao gene *selfpruning* (sp). O gene *selfpruning* é um regulador que interage com proteínas que estão relacionadas na definição do potencial para o crescimento do meristema apical, e está envolvido no controle do crescimento simpodial dos brotos vegetativos e reprodutivos (PNUELI et al., 2001, 1998). O gene *dwarf* está relacionado com a biossíntese dos brassinoesteróides, sugerindo níveis reduzidos destes na planta. Porém, possuem níveis adequados de ácido giberélico (GA). Desta

forma, a interação entre GA e brassinoesteróides é sinérgica, e, portanto, a resposta de GA depende dos brassinoesteróides (BISHOP et al., 1999; MARTI et al., 2006). Em tomate, este gene é expresso em todos os órgãos da planta, sobretudo nos tecidos vegetativos e reprodutivos em fase de expansão (MONTOYA et al., 2005).

Em torno de 60 doenças graves e mais de 110 espécies de patógenos, dentre eles, fungos, bactérias e vírus acometem as plantas de tomate. Dentre as principais doenças fúngicas estão: cancro da haste, murcha por fusarium, mofo cinzento, requeima, oídio, podridão por sclerotonia, ferrugem sul e mancha. Entre as doenças bacterianas, destacam-se a murcha bacteriana e pinta bacteriana. Por fim, as principais doenças causadas por vírus são o mosaico com ou sem necrose causada como, por exemplo, pelo Cucumber mosaic virus (CMV) (JONES et al., 1991; HORST, 2001; TAKAHASHI et al., 2005).

Takahashi e colaboradores (2005) realizaram experimentos de inoculação com o tomate Micro-Tom e um total de 16 organismos patogênicos (8 fungos, 5 bactérias e 3 vírus). Concluíram que o Micro-Tom pode ser considerado um organismo hospedeiro, isto porque cinco fungos, duas bactérias e três vírus foram patogênicos ao tomateiro. Os pesquisadores ainda afirmaram que o Micro-Tom pode ser uma excelente planta modelo de estudo dos mecanismos existentes na interação suscetíveis e resistentes entre plantas e patógeno.

A pinta bacteriana, causada pela *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* é uma doença que pode atingir um amplo espectro de espécies de plantas. Deste modo, *Pseudomonas syringae* está relacionada com doenças economicamente importantes. Ainda, por ser um agente patogênico bacteriano Gram-negativo facilmente cultivado, e permitir diversas técnicas de biologia molecular, desperta um grande interesse científico, pois tais características facilitam sua manipulação e identificação de fatores de virulência e patogenicidade (XIN; HE, 2013; PRESTON, 2000).

Os sintomas da pinta bacteriana ocorrem na parte aérea, apresentando manchas pequenas com aspecto necrótico, cercada por um halo amarelo. Ainda sob condições favoráveis a evolução da doença pode levar à queima e desfolha precoce do tomateiro (JONES et al., 1991; SRISINK; SIVASITHAMPARAM, 1987).

Em Micro-Tom, os sintomas observados quando infectados por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* são o amarelecimento gradual das folhas. Porém as manchas características da doença não são observadas nessa cultivar (TAKAHASHI et al., 2005).

## 2.5 Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) através dos genes *PR-8* e *CDR-1*

As plantas podem ser consideradas hospedeiras potenciais para diversos grupos de patógenos, entre eles, bactérias, fungos, vírus ou até mesmo nematóides (AGRIOS, 1997). Desta forma, para se defender, as plantas possuem diversas barreiras estruturais e até mesmo metabólitos antimicrobianos pré-formados para prevenir ou enfraquecer a infecção dos agentes patogênicos (PIETERSE, 2009).

Mesmo sem um sistema circulatório, as plantas são capazes de ativar uma defesa contra a infecção, não somente no local, mas também sistematicamente (FU; DONG, 2013). Esta capacidade presente nas plantas é ativada normalmente através de um estímulo dado pelo patógeno na infecção desencadeando diversas reações metabólicas na planta para combater o patógeno. Esta ação está relacionada com a Resistência Induzida (RI). A resistência induzida (RI) pode ser definida como um aumento da capacidade de defesa da planta contra um amplo espectro de agentes patogênicos, que é adquirida posteriormente a uma estimulação adequada (RAMAMOORTHY et al., 2001). Desta forma, a RI ocorre naturalmente como resultado da infecção por patógeno, particularmente quando a planta desenvolve uma reação de hipersensibilidade. A RI pode ser dividida em resistência sistêmica adquirida (SAR) e a resistência sistêmica induzida (ISR) (VAN LOON et al., 1998).

Fenotipicamente, esses mecanismos são semelhantes, pois, em ambos os casos, as plantas, após a exposição a um agente indutor (patógeno), têm seus mecanismos de defesa ativados, não apenas no local da indução, mas também em outros distantes, de forma normalmente generalizada. A palavra “adquirida” faz referência quando o elicitador (sinal externo) é um agente patogênico ou parasita, já “induzida” é usado quando esse agente é benéfico, simbiote ou abiótico (BARROS et al., 2010).

A ISR normalmente é induzida por rizobactérias não patogênicas, promotoras do crescimento das plantas (PGPR), pois são capazes de eliminar os microorganismos nocivos no solo e são benéficas às plantas. Desta forma, quando a ISR é ativada, não ocorre sintoma necrótico nas plantas (VAN LOON et al., 1997; VAN LOON et al., 1998).

Assim, na ISR não ocorre o acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (PRPs) e, conseqüentemente, não há alterações na planta. Contudo, a indução da ISR pode não ser dependente da presença de ácido salicílico, e sim estar associada a rotas que envolvem o ácido jasmônico e etileno (PIETERSE et al., 1998; VAN LOON et al., 1998).

A SAR normalmente é ativada em tecidos saudáveis de plantas infectadas localmente, por organismos patogênicos indutores de lesões necróticas. Está associada a níveis altos de ácido salicílico (SA) e é caracterizada pela ativação de um grande conjunto de

genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese (PRPs) as quais possuem atividade antimicrobiana. Confere resistência de longa duração atuando nas plantas em locais distantes do sítio de infecção (PIETERSE et al., 2009; VAN LOON et al., 1997; ZHANG; ZHOU, 2010). Desta forma, pode-se afirmar que a SAR está envolvida com o acúmulo de proteínas (PR) que contribuem para a resistência na planta, ainda a SAR pode ser ativada por indutores químicos na ausência de um organismo patogênico (GORLACH et al., 1996).

As PRs normalmente se acumulam nos tecidos vegetais após entrar em contato com o patógeno ou em resposta ao tratamento com alguns compostos químicos ou a outros tipos de estresse. Desta forma as proteínas-PR podem ser a primeira linha de defesa das plantas, isto porque a ativação dos genes que as codificam é rápida (VAN LOON et al., 1994; WHALEN, 2005).

As PRs estão classificadas em famílias, de acordo com suas sequências de aminoácidos, relações sorológicas e atividade enzimática ou biológica (VAN LOON et al., 1994). Os primeiros relatos das proteínas PR foram feitos em folhas de tabaco sobre a infecção de vírus, descrevendo-se as primeiras famílias de PRs (PR-1 a PR-5). Para tanto, primeiramente, levou-se em conta as propriedades sorológicas e posteriormente dados de sequência (CAMPOS et al., 2007). Atualmente, são conhecidas 17 famílias das PRs, as quais estão numeradas de acordo com a ordem que foram descobertas (VAN LOON; REP; PIETERSEL, 2006). Todas as 17 famílias de PRs possuem genes homólogos dentro do genoma de citros. Dentre estas, a PR-8 está presente em quatro espécies como: *Citrus aurantium*, *C. limonia*, *C. reticulata* e *C. sinensis* (CAMPOS et al., 2007).

Dentre as famílias das PRs, quatro delas (PR-3, PR-4, PR-8 e PR-11) são classificadas como quitinases. Assim, a característica dessas PRs é atuar limitando a atividade, crescimento e propagação de fungos patogênicos (VAN LOON, 1997; VAN LOON; REP; PIETERSEL, 2006).

Desta forma, as quitinases atuam hidrolisando a ligação  $\beta$ -1,4 glicosídica presente em biopolímeros de quitina, a qual compõe a parede celular dos fungos (BRUNNER et al., 1998). Porém as quitinases da classe III, que compreendem a família da PR-8, também possuem atividades de lisoenzimas, podendo atuar contra bactérias patogênicas, funcionando como uma enzima, clivando e hidrolisando os peptideoglicanos bacterianos, elemento estrutural da parede celular das bactérias (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006; FRITIG; HEITZ; LEGRAND, 1998).

Nos anos recentes, pesquisas envolvendo a sinalização e ativação da SAR, através de diversos mecanismos, vêm sendo realizadas. Desta forma, Xia et al. (2004) propôs a

sinalização da SAR por peptídeos, isto porque ao observar a ativação da SAR em *Arabidopsis* a partir da ação da protease aspártica apoplástica - *CDR-1* (Constitutive Disease Resistance 1) as plantas apresentaram resistência a infecção de *Pseudomonas syringae*. Desta forma, esses autores propuseram que o gene *CDR-1* está relacionado a um sistema de sinal de peptídeos envolvidos na ativação dos mecanismos de resistência induzida.

Albrecht e Bowman (2012) ao estudarem respostas entre duas cultivares de citros, em relação à infecção de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las), associada ao HLB, sendo uma tolerante US-897 (*Citrus reticulata* Blanco × *Poncirus trifoliata* L. Raf.) e uma suscetível tangerina 'Cleópatra' (*C. reticulata*) ao patógeno, identificaram diversos genes envolvidos na resistência da planta à infecção. Genes esses, que foram expressos em níveis mais elevados em US-897, independente da infecção, sendo que um desses foi o gene *CDR-1*.

Portanto, o gene *CDR-1* codifica uma protease aspártica apoplástica capaz de ativar os mecanismos de resistência, mediada por ácido salicílico através da liberação de um peptídeo. Ainda, os níveis elevados de expressão de *CDR-1* podem resultar em alta expressão de diversos genes relacionados com a defesa e maior resistência a bactérias e fungos patogênicos, tanto em *Arabidopsis* como em arroz (XIA et al., 2004; PRASAD et al., 2009).





### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos de transformação genética e análises moleculares foram realizados no Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas, no Departamento de Produção Vegetal, na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”- USP/ESALQ, Campus de Piracicaba/SP.

#### 3.1 Obtenção das construções gênicas

Para realização dos experimentos de transformação genética foram utilizadas duas construções gênicas.

##### 3.1.1 Construção gênica contendo gene *PR-8*

Esta construção foi elaborada pelo grupo de pesquisa da USP/ESALQ, em trabalhos anteriores. Desta forma, o gene *PR-8* foi identificado no banco de dados CITEST (*Citrus Expressed Sequence Tags*) e clonado a partir de *Citrus sinensis*. Possui 903 pb e foi clonado no vetor pCAMBIA2201, dirigido pelo promotor 35S, em substituição ao gene repórter *uidA*. Posteriormente, esse vetor binário foi inserido nas estirpes EHA 105 e GV 3101 de *Agrobacterium tumefaciens* (Figura 1).

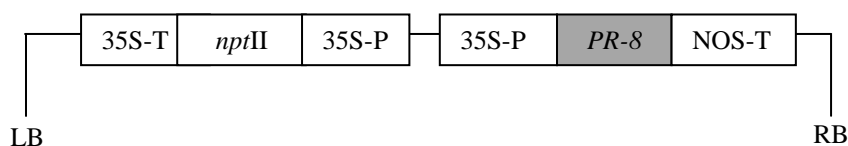


Figura 1- Representação esquemática do vetor de expressão pCAMBIA2201/35S::*CsPR-8* contendo o gene *CsPR-8*. *nptII*: gene que confere resistência a canamicina. 35S-P: promotor constitutivo CaMV35S. 35S-T: terminador. NOS-T: terminador. LB: borda esquerda. RB: borda direita

##### 3.1.2 Construção gênica contendo gene *CDR-1*

O gene *CDR-1* foi selecionado pelo grupo de pesquisa coordenado pela Dra. Juliana Freitas-Astúa (Embrapa Mandioca e Fruticultura), com base em pesquisas relacionadas à avaliação de expressão diferencial de genes em materiais infectados e não infectados com HLB (ALBRECHT e BOWMAN, 2012). Possui 1281 pb, e foi isolado a partir de *Citrus sinensis*. Foi clonado no vetor pCAMBIA2301, sob controle do promotor constitutivo Ubi10 [Ubiquitina 10 de *Arabidopsis thaliana* (MEHLMER et al.,2012)], contendo o gene repórter *uidA*, gene GUS, pela empresa DNA Cloning Service (Alemanha), inserido na estirpe EHA 105 de *Agrobacterium tumefaciens* (Figura 2).

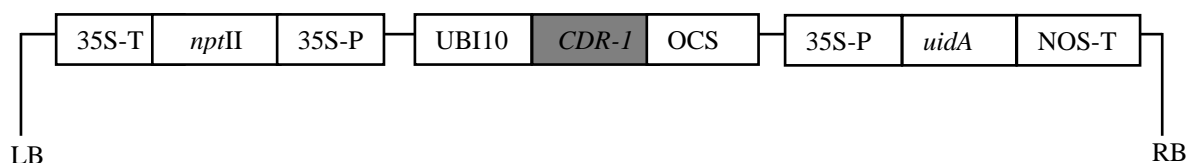


Figura 2- Representação esquemática do vetor de expressão pCAMBIA2301/UBI10::*CsCDR-1* contendo o gene *CsCDR-1*, dirigido pelo promotor UBI10. 35S-T: terminador. *nptII*: gene que confere resistência a canamicina. 35S-P: promotor constitutivo CaMV35S. UBI10: promotor constitutivo de *Arabidopsis thaliana*. OCS: terminador. *uidA*: gene GUS. NOS-T: terminador. LB: borda esquerda. RB: borda direita

### 3.2 Transformação genética de tomate Micro-Tom via *Agrobacterium tumefaciens*

A metodologia utilizada foi adaptada do protocolo desenvolvido por PINO e colaboradores (2010).

#### 3.2.1 Obtenção do material vegetal

As sementes foram extraídas de frutos maduros de tomate Micro-Tom, e colocadas em mistura de água acrescida de fermento biológico por 12 horas, ou até a realização da fermentação, para a extração da mucilagem. Após este procedimento, as sementes foram lavadas em água corrente e secas em temperatura ambiente.

Posteriormente, foi realizada a assepsia em solução comercial de hipoclorito de sódio e água 30% (v/v) mais duas gotas de detergente comercial, por 15 minutos. Em seguida, as sementes foram lavadas três vezes em água estéril e incubadas em frascos contendo meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) (Anexo B) com a metade da concentração dos sais, 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose, metade da concentração de vitamina B5 (Gamborg) e 2,3 g L<sup>-1</sup> de phytigel. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem.

Foram incubadas cerca de 26 sementes por frasco contendo 30 ml de meio, os frascos foram mantidos por 4 dias a 25 ± 1°C no escuro, e em seguida transferidos por mais 4 dias para fotoperíodo de 16h de luz em sala de crescimento a 25 ± 1°C.

#### 3.2.2 Cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* para experimentos de transformação genética

As colônias de *A. tumefaciens*, estirpe EHA 105 e GV 3101, contendo o plasmídeo pCAMBIA2201 com o gene *PR-8*, a estirpe EHA 105 contendo o plasmídeo pCAMBIA2301 com o gene *CDR-1* e a estirpe EHA 105 contendo apenas o vetor pCambia2201, sem o gene de interesse, foram cultivadas em meio YEP sólido (Anexo C), acrescido dos antibióticos

canamicina ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) e rifampicina ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ), em placas de Petri no período de 2-3 dias a  $27^\circ\text{C}$ , no escuro.

Após esse período, foi preparado o pré-inóculo da bactéria. Uma colônia isolada foi transferida para tubo (Falcon®, 10 ml) contendo 5 ml de meio YEP líquido (Anexo C) com os antibióticos canamicina ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) e rifampicina ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) mantida a rotação 100 rpm, a  $28^\circ\text{C}$ , por 36 horas. Posteriormente, para o preparo do inóculo, foram transferidos 100  $\mu\text{l}$  dessa suspensão para 45 ml de meio YEP líquido (Anexo C), em erlenmeyers de 250 ml, com os antibióticos canamicina ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) e rifampicina ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ), mantida a rotação de 180 rpm, a  $28^\circ\text{C}$ , durante 16 horas.

Após o crescimento, foi determinada a absorvância da suspensão bacteriana em espectrofotômetro ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ). A absorvância da suspensão, ao atingir um valor entre 0,2-0,3, foi transferida para tubos (Falcon®, 50 ml) e centrifugada por 15 minutos, a 4.000 rpm, a  $15^\circ\text{C}$ . Em seguida, o sobrenadante foi descartado, e o precipitado formado ressuspenso em meio MS líquido (MURASHIGE e SKOOG, 1962) (Anexo B), em volume adequado para obter uma concentração bacteriana final de  $3 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$  para ser utilizado na transformação genética.

### 3.2.3 Transformação genética

Para realização da transformação genética, foram utilizados como fonte de explante os cotilédones, após oito dias da incubação das sementes. Os cotilédones foram divididos transversalmente em duas seções, e as pontas distais e proximais foram retiradas. Em seguida, foram acondicionados um total de 20 explantes por placa de Petri com a face abaxial em contato com meio de cultura RIM (meio MS com  $0,4 \mu\text{M}$  de ANA) suplementado com  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose,  $7 \text{ g L}^{-1}$  de ágar e  $100 \mu\text{M}$  de solução de acetoseringona e pH ajustado para 5,8. Acrescentou-se  $1 \text{ mL}^{-1}$  de acetoseringona na suspensão bacteriana e após 10 minutos, uma gota da suspensão foi colocada em contato com cada explante, cobrindo-o totalmente. O material foi incubado por 10 minutos à temperatura ambiente. Após este procedimento, a suspensão bacteriana foi retirada com auxílio de pipeta de Pasteur estéril, e os cotilédones foram secos em folhas de papel de filtro esterilizado para retirar o excesso de solução (Figura 3A).

Os explantes foram cultivados por 2 dias (co-cultivo) a  $24^\circ\text{C}$  em ausência de luz. Após co-cultivo, os cotilédones foram transferidos para meio de cultura SIM (meio MS com  $5 \mu\text{M}$  de BAP), suplementado com vitamina B5,  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose,  $3,5 \text{ g L}^{-1}$  de ágar,

acrescido de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de canamicina e  $300 \text{ mg L}^{-1}$  timentin, cultivados sob fotoperíodo de 16 h de luz a  $27^\circ\text{C}$  por 2-3 semanas (Figura 3B).

### 3.2.4 Seleção de brotos regenerantes, enraizamento de plântulas e aclimatização

Após 2 a 3 semanas, realizou-se um sub-cultivo. Os brotos bem desenvolvidos (1-2 cm) foram separados e transferidos para frascos contendo 30 ml de meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) isento de regulador vegetal e suplementado com  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de canamicina e  $300 \text{ mg L}^{-1}$  timentin, durante 2 a 3 semanas (Figura 3C).

Posteriormente, as plântulas que não continham raízes foram transferidas para frascos contendo 30 ml de meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) (Anexo B) isento de regulador vegetal e suplementado com  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de canamicina e  $300 \text{ mg L}^{-1}$  timentin, e sub-cultivados até o surgimento de raízes.

As plântulas que apresentaram raízes de 3-5 cm foram separadas para aclimatização, sendo transferidas para vasos plásticos (0,5 L de capacidade) contendo substrato Multiplant 1075 (terra do paraíso) e vermiculita (média) na proporção de 2:1 previamente autoclavados, e revestidas com sacos plásticos para a manutenção da umidade relativa. Posteriormente, foram acondicionadas em sala de crescimento em fotoperíodo de 16 h de luz a  $27^\circ\text{C}$ . A aclimatização iniciou-se após 3 dias do transplântio, com a retirada do plástico por 15-20 minutos ou até observado o início da murcha das folhas. Tal processo foi repetido todos os dias por 2 a 3 semanas.

As plantas foram consideradas aclimatizadas quando após um período de 8 horas não houve murcha das folhas. Em seguida ao processo de aclimatização, as plantas foram transferidas para casa de vegetação onde foram autopolinizadas para produção de sementes T1 e, posteriormente, T2.



Figura 3- Estágios de desenvolvimento dos cotilédones de tomate Micro-Tom durante o processo de transformação genética e cultivo. A: Placa de Petri contendo explantes cotiledonares de tomate após a transformação genética; B: detalhe do broto regenerando a partir do cotilédone transformado; C: Plântula de tomate Micro-Tom a ser transferida para potes com meio de enraizamento

### 3.2.5 Seleção das linhagens T1 e T2 das plantas transgênicas por canamicina

Após a produção das linhagens T1, as sementes foram extraídas dos frutos maduros, tratadas e semeadas em bandejas na estufa. Após 14 dias da semadura, foi pulverizado até o ponto de escorrimento, 400 mg L<sup>-1</sup> de canamicina por 5 dias nas mudas.

As plantas que demonstraram total resistência à canamicina foram transferidas para vasos e cultivadas até a produção de frutos e obtenção de T2. (FREITAS-ASTUA et al., 2003; XIANG, HAN; OLIVER, 1999; WEIDE; KOORNNEEF; ZABEL, 1989).

### 3.2.6 Obtenção do isolado bacteriano

A estirpe de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* foi obtida a partir do isolado ICMP 2844 da coleção do Instituto Biológico, número de acesso 836. O isolado bacteriano foi recuperado com a adição de 200µl de caldo nutriente (Anexo F), mantida por 30 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, 100 µl da suspensão formada foi pipetada em placa de Petri contendo meio B de King, mantida a 28°C, no escuro, por 2 dias.

Após este período, confirmou-se por fluorescência a presença de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* na placa anteriormente preparada. Em seguida, uma pequena quantidade do isolado bacteriano recuperado, foi transferido para meio NA líquido, a 28°C, por 16 horas. Ao fim desta etapa, o material bacteriano foi conservado em glicerol (50%) e mantido em ultrafreezer vertical a -80°C.

### 3.2.7 Cultivo e seleção de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

Para a seleção da bactéria, foi realizado primeiramente um experimento de inoculação em plantas de tomateiro comercial (cultivar Alambra), a fim de verificar a patogenicidade do patógeno bem como as lesões típicas causadas pela sua inoculação. Assim, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 24 horas, e posteriormente inoculadas com uma suspensão composta por colônias bacterianas e solução salina, com absorvância de 0,3 e medida em espectrofotômetro a 600nm. O processo de inoculação ocorreu através da pulverização da suspensão em todas as folhas, tanto na parte abaxial como na adaxial. Em seguida, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 48h, e após este período, identificaram-se os primeiros sintomas característicos da doença (pinta bacteriana) causada pela bactéria.

Posteriormente, escolheu-se a folha com maior número de lesões para o isolamento da bactéria. A mesma foi cortada em segmentos de 1 cm, na região de transição do tecido

sadio para o doente. Em seguida, foi realizada a assepsia do material vegetal. Primeiramente, os fragmentos da folha foram mantidos em álcool 70% por 1 minuto. Após este período, os fragmentos foliares foram transferidos para solução de hipoclorito de sódio (3:1), durante 1 minuto. Em seguida, foram lavados três vezes em água destilada esterilizada e, posteriormente macerados.

A seguir, plaqueou-se 100µl da suspensão obtida em meio B de King (Anexo E). A placa foi mantida a 28°C por 2 dias, no escuro. Após este período, uma pequena parte da suspensão cultivada em placa de Petri foi inserida em meio NA líquido (Anexo D), e mantida a 28°C, por 16 horas. Após este procedimento, uma alíquota de 800 µl desta suspensão obtida foi acrescentada a igual volume de glicerol (50%) e conservada em ultrafreezer.

Porém, para garantir melhor êxito na inoculação com a bactéria, fez-se necessário a realização de novo experimento com soluções bacterianas de 5 colônias isoladas e diferentes, provenientes do cultivo do isolado acima obtido, em meio B de King (Anexo E), em placa de Petri, por 2 dias 28°C. As colônias foram subcultivadas separadamente, em tubo de ensaio contendo meio B de King (Anexo E), a 28°C por 2 dias.

Em seguida realizou-se um experimento de inoculação com plantas de tomateiro comercial (cultivar Alambra). Foram inoculadas 5 plantas e cada colônia subcultivada resultou em uma suspensão. Desta forma, as cinco plantas foram inoculadas com colônias diferentes. Contudo, os procedimentos durante este experimento foram os mesmos realizados no primeiro.

Após 10 dias de inoculação os sintomas e agressividade da doença em cada planta foram observados, e a escolha da colônia a ser utilizada nos futuros experimentos de inoculação, foi realizada de acordo com a planta que apresentou maior número de sintomas em suas folhas e com maior intensidade.

### **3.3 Análises moleculares em plantas transgênicas de tomate Micro-Tom**

#### **3.3.1 Teste histoquímico de GUS**

Para a detecção da atividade do gene *uidA* (GUS), seguiu-se a metodologia apresentada por Brasileiro e Carneiro (1998). Foram utilizados pequenos segmentos de tecido foliar (5 mm) das plantas de tomate Micro-Tom transformadas com o gene *CDR-1*. O material foi inoculado em solução de X-GLUC (5-bromo-4-cloro-3-indolil glucuronida), a 37°C, em ausência de luz, por 16 horas. Posteriormente, o material foi lavado com álcool etílico (70%)

para a retirada da clorofila, facilitando, portanto a visualização da reação pela presença da coloração azul no tecido vegetal.

### 3.3.2 Confirmação da transgenia por *Polymerase Chain Reaction* - PCR

A PCR (reação em cadeia da polimerase) foi utilizada para a constatação da transgenia, em plantas regeneradas de tomate Micro-Tom. A coleta dos fragmentos foliares das plantas de tomate Micro-Tom ocorreu durante o processo de enraizamento, aclimatização e até mesmo quando se encontravam na estufa. Também foi realizada a PCR para a identificação do gene *vir* da região Ti do plasmídeo de *Agrobacterium*, para assim se confirmar a ausência da bactéria nas plantas.

O DNA utilizado para a análise foi extraído de folhas jovens através do método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990). Os primers utilizados para a amplificação do fragmento dos genes *nptII* e *CDR-1* estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1- Sequência dos primers *forward* (F) e *reverse* (R) desenhados para amplificação de 466 e 439 pb dos genes *nptII* e *CDR-1* respectivamente

Gene	Sequência	Amplicon (pb)
<i>nptII</i>	F: 5' GCCGAGAAAGTATCCATCAT 3'	466
	R: 5' AGAAGAACTCGTCAAGAAGGC 3'	
<i>CDR-1</i>	F: 5' CTCTGTTTCGCTTGTTACTCAA 3'	439
	R: 5' TTGAGTAACAAGCGAAACAGAG 3'	

As análises foram executadas em termociclador de acordo com a seguinte programação: para as plantas transformadas com o gene *CDR-1*: 1 ciclo de 10 segundos a 98°C, seguido de 30 ciclos de 1 segundo a 98°C, 5 segundos a 58°C, 15 segundos a 72°C e por fim, 1 ciclo de 1 minuto a 72°C. Para plantas transformadas com o gene *PR-8*, fez-se a análise com os primers do gene *nptII*, de acordo com a programação a seguir: 1 ciclo de 10 segundos a 98°C, seguido de 30 ciclos de 1 segundo a 98°C, 5 segundos a 56°C, 15 segundos a 72°C e por fim, 1 ciclo de 1 minuto a 72°C. As plantas transformadas com a construção contendo apenas o vetor pCAMBIA2201 foram analisadas com os primers do gene *nptII*, seguindo a programação descrita acima para tal gene.

Todas as plantas transgênicas também foram analisadas com primers específicos para o gene *virG* de *Agrobacterium* (NEGROTTO et al., 2000), a fim de verificar a ocorrência de contaminação com a bactéria que pudesse modificar os resultados encontrados. O programa



utilizado foi: 1 ciclo de 10 segundos a 98°C, seguido de 30 ciclos de 1 segundo a 98°C, 5 segundos a 53°C, 15 segundos a 72°C e por fim, 1 ciclo de 1 minuto a 72°C.

Os produtos da reação foram pipetados em gel de agarose 1% corado por brometo de etídio, separados e amplificados por eletroforese. Em seguida, foram fotografados e visualizados em luz ultravioleta através do programa EDAS120 (Kodak, Rochester, NY, EUA).

### 3.3.3 Análise de *Southern blot*

A análise de *Southern blot* foi realizada para a confirmação do número de cópias inseridas no genoma das plantas obtidas. Folhas novas foram coletadas das plantas inseridas na casa de vegetação para a análise. Para a extração do DNA, macerou-se 1,4 grama de folha em almofariz, com nitrogênio líquido. Posteriormente, realizou-se a extração do DNA em duas etapas. Primeiramente, o DNA foi extraído através do método CTAB, no qual ao final é adicionada RNase concentrada por 16 horas, permanecendo em temperatura ambiente. Em seguida, o DNA obtido anteriormente, foi submetido à segunda extração na qual se utilizou fenol e purificou-se com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Após a purificação, o DNA foi precipitado com acetato de amônio e álcool absoluto, e resuspendido com água miliQ acrescentando-se RNase líquida.

Após a extração, o DNA total foi quantificado por fluorimetria, através do equipamento Qubit<sup>TM</sup> Fluorometer (Invitrogen) e o reagente Quanti<sup>TM</sup> dsDNA BR assay Kit, de acordo com as instruções do fabricante. A quantidade de DNA utilizado para a análise foi de 10 µg a 30 µg, sendo este submetido à reação de digestão, contendo 30 U da enzima *EcoRI*, por 16 horas a 37°C. Após este período, o DNA foi precipitado com acetato de amônio e álcool absoluto e resuspendido com água MiliQ. Posteriormente, adicionou-se sacarose na suspensão obtida e, em seguida, as amostras foram alocadas em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, a 35 volts, por 16 horas.

Em seguida, após a separação dos fragmentos através da eletroforese, realizaram-se as lavagens do gel, utilizando soluções de tampões apropriados segundo o protocolo de *Southern blot* (SOUTHERN, 1975). Ao fim do processo de lavagem, o gel foi transferido para membrana de nylon Amersham Hybond<sup>TM</sup> -N<sup>+</sup>, sendo que a membrana foi fixada a 80°C por duas horas.

A sonda utilizada para marcação da membrana foi produzida através de um plasmídeo pCAMBIA2201 contendo o gene *nptII*, a partir do produto da PCR, o qual foi aplicado em gel de agarose. Posteriormente, o fragmento amplificado foi purificado com

auxílio do Kit QIAEX<sup>®</sup> II Gel Extraction (Qiagen). Em seguida, o fragmento da sonda foi marcado com o Kit AlkPhos Direct Labelling Reagents (Amersham<sup>™</sup> GE Healthcare Life Sciences).

Para a hibridização da membrana com a sonda, foi utilizado tampão de hibridização a 60°C, durante 16 horas, sob rotação. Após este período, realizou-se a reação de detecção através do kit CDP-Star<sup>™</sup> Detection Reagente (Amersham<sup>™</sup>). O excedente do agente de detecção foi removido por evaporação. A membrana foi envolvida em filme plástico (Amersham Hyperfilm<sup>™</sup> MP), alocada em cassete de revelação em contato com a chapa fotográfica por um período de 1h30min e, em seguida, prosseguiu-se com a revelação.

### 3.3.4 Construção da curva padrão de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* pela técnica de qPCR

A construção da curva padrão de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* foi realizada a partir da extração do DNA total da bactéria. Células de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* foram mantidas em meio NA líquido (Anexo D) por 16 horas a 28°C, em seguida a suspensão bacteriana foi centrifugada e o DNA total da bactéria foi extraído através do método do CTAB e armazenado em ultrafreezer vertical a -80°C. O DNA extraído foi quantificado em NanoDrop. Em seguida, o DNA foi diluído em diferentes concentrações 10, 1, 0,1, 0,01 e 0,001 ng. Para a reação de amplificação do DNA da bactéria foram utilizados os primers RealFor1 e RTRRev (FANELLI; CARIDDI; FINETTI-SIALER, 2007) (Tabela 2), e kit FastSybr<sup>®</sup> Green Master Mix (life). Para o mix da reação utilizou-se 0,4 µL de cada primer, 6 µL do FastSybr<sup>®</sup>, 3,2 µL de água e 1 µL de DNA diluído. Cada amostra foi testada em triplicata e foram adicionadas três amostras como controle negativo (água).

Tabela 2- Sequência dos primers *foward* (RealFor1) e *reverse* (RTRRev), utilizados para amplificação de 138 pb

Primer	Sequência	Amplicon (pb)
RealFor1	5'GGGTCCGACGTCCTTGAGTGATTTC3'	
RTRRev	5'CTGAGCAGGTGCGGGGAT3'	138

A reação foi realizada no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR Products (versão 2.0.5) (Applied Biosystems). O aparelho foi utilizado no modo FAST, com a seguinte programação: 1 ciclo inicial a 95°C (20 segundos), 40 ciclos de desnaturação a 95°C (3 segundos) e, anelamento e extensão a 62°C por 30 segundos, seguido da curva de Melting (Figura 4), com um ciclo a 95°C (15 segundos) para a desnaturação das duplas fitas

amplificadas, e aquecida de 60 a 95°C, onde são realizadas medidas de fluorescência contínua e por fim, são submetidas a 60°C por 15 segundos.

Foram realizadas 3 curvas padrão, a eficiência dos primers na reação para a confecção das curvas foram 94,25%, 102,77% e 97,47%. Calcularam-se as médias dos pontos das três curvas para assim estabelecer uma única curva padrão, isto porque podem ocorrer variações nas análises, devido ao erro de pipetagem, e conseqüentemente nas curvas (Figura 5).

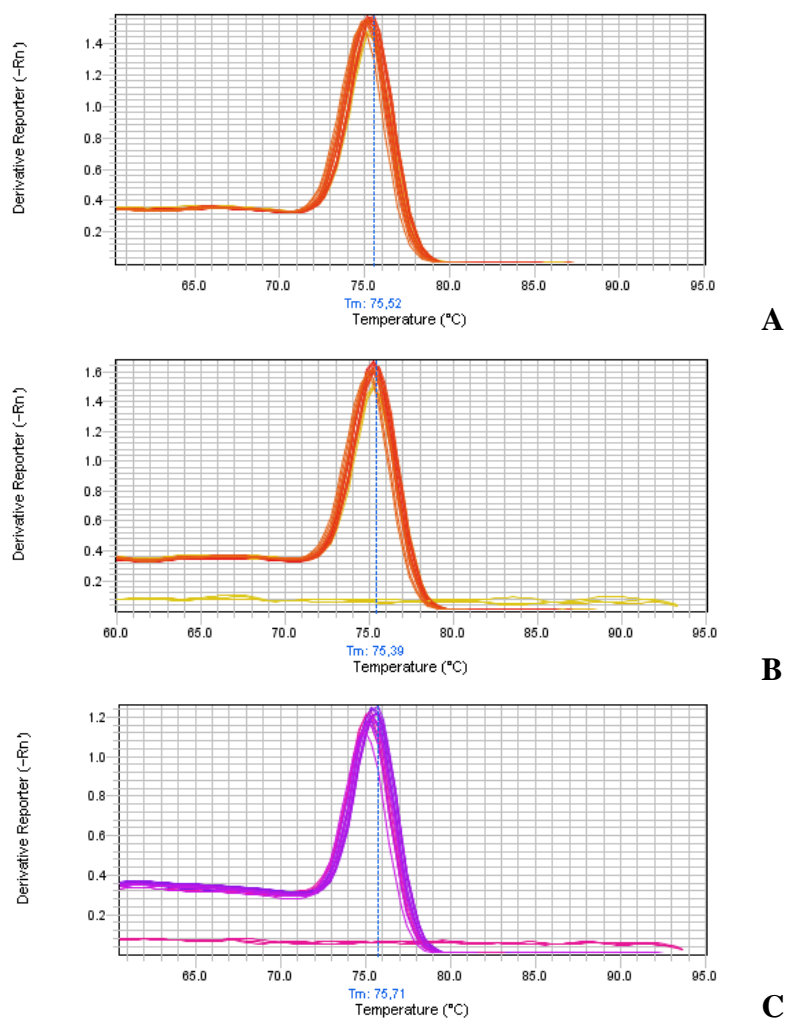


Figura 4- Curvas de Melt das curvas padrão realizadas, mostrando que houve apenas um pico de amplificação e, conseqüentemente não há nenhuma amplificação inespecífica. A, B e C: curva padrão 1 a 3, respectivamente

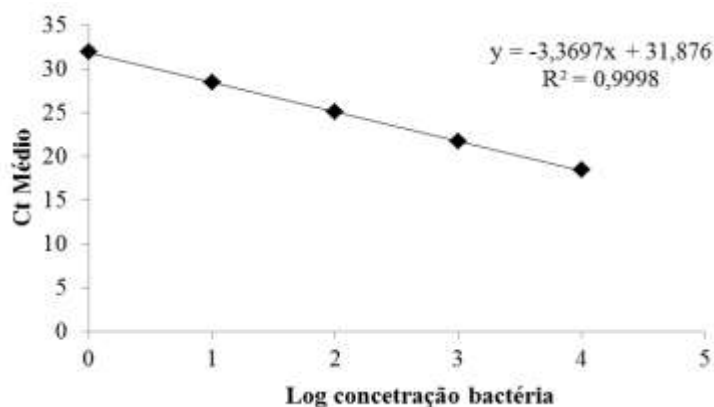


Figura 5- Curva padrão de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* realizada por PCR quantitativo usando FastSybr<sup>®</sup> Green Master Mix, a partir de diluições serial de concentração do DNA da bactéria

### 3.4 Transformação genética de laranja ‘Hamlin’ via *Agrobacterium tumefaciens*

#### 3.4.1 Obtenção do material vegetal

As sementes foram extraídas dos frutos maduros de laranja ‘Hamlin’ (*Citrus sinensis*), proveniente da coleção do Departamento de Produção Vegetal, na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”- USP/ESALQ, Campus de Piracicaba, SP, lavadas em água corrente e secas a temperatura ambiente. Após a extração, foram retirados os tegumentos e realizou-se o processo de assepsia em solução comercial de hipoclorito de sódio e água (2:1) v/v por 15 minutos.

Realizada a assepsia, as sementes foram lavadas três vezes em água estéril e incubadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) (Anexo B), acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 2 g L<sup>-1</sup> de phytigel mantidas a 27±2°C, em ausência de luz durante 60 dias até a emergência das plântulas. Posteriormente, foram mantidas em fotoperíodo de 16 horas de luz e temperatura 25±2°C por 15 dias.

#### 3.4.2 Cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* para experimentos de transformação genética

As colônias de *A. tumefaciens*, estirpe EHA 105, contendo o plasmídeo pCambia2301 com o gene *CDR-1*, foram cultivadas em meio YEP sólido (Anexo C), acrescido dos antibióticos canamicina (100 mg L<sup>-1</sup>) e rifampicina (50 mg L<sup>-1</sup>), em placas de Petri no período de 2-3 dias a 27°C no escuro.

Após esse período, três colônias da bactéria foram transferidas para 50 ml de meio YEP líquido (Anexo C), com os antibióticos canamicina ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) e rifamicina ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ), e cultivadas em erlenmeyers de 250 ml, a 180 rpm,  $28^\circ\text{C}$  a 16 horas.

Posteriormente, a absorbância da suspensão bacteriana foi determinada em espectrofotômetro ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ). Ao atingir valor 0,5-0,6 de absorbância, a solução bacteriana foi transferida para tubos (Falcon®, 50 mL) e centrifugada por 15 minutos, a 4.800 rpm, a  $15^\circ\text{C}$ . Em seguida, o sobrenadante foi descartado, e o precipitado formado foi ressuspenso em meio MS líquido (MURASHIGE e SKOOG, 1962), em volume adequado para obter uma concentração bacteriana final de  $5 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$  e assim ser utilizada na transformação genética.

### 3.4.3 Transformação genética

Para a realização da transformação genética, foram utilizados como fonte de explante, segmentos de epicótilo, os quais foram acondicionados em placa de Petri contendo meio de cultura MS líquido, suplementado com  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose e pH ajustado para 5,8. Posteriormente, a solução de meio MS líquido foi retirada com o auxílio de uma pipeta de Pasteur estéril, adicionando-se a suspensão bacteriana. O material foi incubado por 15 minutos à temperatura ambiente. Após esse procedimento, a suspensão bacteriana foi retirada com auxílio de pipeta de Pasteur estéril, e os explantes foram secos em folha de papel absorvente esterilizado.

Os explantes secos foram transferidos para placas de Petri contendo o meio de cultura MT (MURASHIGE e TUCKER, 1969) (Anexo A), suplementado com  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose,  $8 \text{ g L}^{-1}$  de ágar, pH 5,8, acrescido de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP (benzilaminopurina), e cultivados por 2 dias (co-cultivo) a  $24^\circ\text{C}$  em ausência de luz (Figura 6A).

Após co-cultivo, os explantes foram transferidos para meio de cultura MT suplementado com sacarose  $30 \text{ g L}^{-1}$ , ágar  $8 \text{ g L}^{-1}$ , BAP  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , canamicina ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) e cefatoxima sódica ( $500 \text{ mg L}^{-1}$ ), pH ajustado para 5,8. Os explantes foram subcultivados a cada 15 dias, por um período de 30 dias, a  $27^\circ\text{C}$  em ausência de luz, e em seguida o material foi transferido para a sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas de luz e a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ .

### 3.4.4 Enraizamento das brotações

Para indução do enraizamento, as brotações adventícias regeneradas (Figura 6 B e C) após a transformação genética foram transferidas para frascos contendo 20 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) (Anexo B), suplementados com  $30 \text{ g L}^{-1}$  de

sacarose,  $8\text{ g L}^{-1}$  de ágar,  $0,5\text{ mg L}^{-1}$  ANA (alfa-naftalenoacético) e de  $0,5\text{ mg L}^{-1}$  de IBA (ácido indolbutírico). As brotações foram cultivadas na sala de crescimento a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , sob fotoperíodo de 16 horas, durante 30 dias.

### 3.4.5 Enxertia *in vitro* e aclimatização

As brotações adventícias foram enxertadas em plântulas de porta enxerto citrange ‘Carrizo’ [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck] obtidas *in vitro*. A enxertia consistiu na introdução, em condições assépticas, de um ápice caulinar de laranja ‘Hamlin’ com duas a três folhas, excisado da brotação regenerada, sobre o porta-enxerto decapitado, onde foi realizado corte do tipo garfagem fenda cheia, para inserção do ápice meristemático.

Os brotos enxertados foram acondicionados em tubos de ensaio, contendo 10 ml de meio MS sólido (MURASHIGE e SKOOG, 1962) (Anexo B), suplementados com  $30\text{ g L}^{-1}$  de sacarose,  $8\text{ g L}^{-1}$  de ágar, cultivados em sala de crescimento a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , sob fotoperíodo de 16 horas, durante 20 dias até a total cicatrização da enxertia e desenvolvimento do broto.

Posteriormente, os brotos enxertados foram removidos do tubo de ensaio, e as raízes foram lavadas em água corrente, para a remoção do excedente de meio de cultura. Em seguida, foram acondicionados em vasos plásticos (0,5 L de capacidade) contendo substrato Multiplant 1075 (terra do paraíso), previamente autoclavado, e revestidas com sacos plásticos para a manutenção da umidade relativa. Posteriormente, foram acondicionadas em sala de crescimento em fotoperíodo de 16 h de luz a  $27^\circ\text{C}$ . Após alguns dias do transplântio, adicionou-se em torno de  $0,6\text{ g L}^{-1}$  de fertilizante de liberação lenta (OSMOCOTE), na formulação de 19-06-10, sobre o substrato em cada vaso.

A aclimatização iniciou-se 7 dias após do transplântio, com a retirada do plástico por 15-20 minutos ou até observado o início da murcha das folhas. Tal processo foi repetido todos os dias por 3-4 semanas. O tempo da retirada do plástico aumentou de forma gradual durante este processo. As plantas foram consideradas aclimatizadas quando após um período de 8 horas não houve murcha das folhas. Posteriormente ao processo de aclimatização, as plantas foram transferidas para casa de vegetação e transplântadas em vasos de 5 L de capacidade.



Figura 6- Estágios de desenvolvimento dos explantes de laranja ‘Hamlin’ durante o processo de transformação genética. A: Placa de Petri contendo explantes de hipocótilo de laranja ‘Hamlin’ após a transformação genética; B e C: Detalhe do broto regenerando a partir do explante transformado

### 3.5 Análises moleculares em plantas transgênicas de laranja ‘Hamlin’

#### 3.5.1 Teste histoquímico - GUS

O teste histoquímico em brotos de laranja ‘Hamlin’ foi realizado conforme descrito no item 3.3.1.

#### 3.5.2 Confirmação da transgenia por *Polymerase Chain Reaction* - PCR

A PCR (reação em cadeia da polimerase) também foi utilizada para a constatação da transgenia em plantas de laranja ‘Hamlin’. A coleta dos fragmentos foliares das plantas de laranja ‘Hamlin’ ocorreu durante o processo de aclimatização e quando as mesmas se encontravam na estufa.

O DNA utilizado para a análise foi extraído de folhas jovens através do método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990). Devido ao gene *CDR-1* ser clonado de *C. sinensis*, foi necessário o uso do primer *Reverse* do terminador OCS juntamente com o primer *Forward* do promotor UBI10, bem como em alguns casos, quando não ocorria a presença de bandas para algumas plantas, houve a necessidade de se utilizar primers do gene *nptII*. Os primers utilizados para a amplificação do fragmento do UBI10 +*CDR-1*+ OCS e do gene *nptII* (Tabela 3).

Tabela 3- Sequência dos primers *forward* (F) e *reverse* (R) desenhados para amplificação de 466 e 1386 pb, dos genes *nptII* e UBI10 +*CDR-1*+OCS respectivamente

Gene	Sequência	Amplicon (pb)
<i>nptII</i>	F: 5' GCCGAGAAAGTATCCATCAT 3'	466
	R: 5' AGAAGAACTCGTCAAGAAGGC 3'	
UBI10	F: 5' GCGATCGAATTTGTCGATTA 3'	1386
OCS	R: 5' CAACGTGCACAACAGAATTG 3'	

As análises foram executadas em termociclador de acordo com a seguinte programação: 1 ciclo de 3 minutos a 94°C, seguido de 36 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C, 40 segundos a 72°C e por fim, 1 ciclo de 7 minutos a 72°C.

Os produtos da reação amplificados foram separados por eletroforese. As amostras foram pipetadas em gel de agarose 1% corado por brometo de etídio, em seguida foram fotografados e visualizados em luz ultravioleta através do programa EDAS120 (Kodak, Rochester, NY, EUA).

### 3.5.3 Análise de *Southern Blot*

A análise de *Southern blot* nas plantas transgênicas de laranja 'Hamlin' foi realizada conforme descrito no item 3.3.3.





## 4 RESULTADOS

### 4.1 Transformação genética de tomate Micro-Tom

Para a obtenção de plantas transgênicas de tomate Micro-Tom com o gene *PR-8*, foi necessário a realização de um grande número de experimentos de transformação genética. No entanto, a porcentagem de plantas obtidas foi baixa em relação a trabalhos anteriores envolvendo essa cultivar de tomate (CHETTY et al., 2013; CRUZ-MENDÍVIL et al, 2011). Houve também contaminações dos explantes durante o cultivo *in vitro*, fato que colaborou para o baixo valor de eficiência de transformação obtida neste trabalho. Desta forma, foi necessária a introdução de pouco mais de nove mil explantes, que resultaram em menos de trinta plantas positivas confirmadas por PCR. Nesses experimentos, foram utilizadas estirpes diferentes de *Agrobacterium tumefaciens*, isto porque, há relatos de transformações genéticas em tomate Micro-Tom (CHETTY et al., 2013) realizadas com a estirpe GV 3101 obtiveram maiores valores de eficiência de transformação em relação a EHA 105 (Tabela 4). Porém os dados encontrados neste trabalho não confirmam essas afirmações, pois, os experimentos realizados com a estirpe GV 3101 obtiveram eficiências de transformações menores que os realizados com a estirpe EHA 105.

Nos experimentos de transformação genética, realizados com o gene *CDR-1* e com o vetor pCAMBIA2201, foi utilizada somente a estirpe EHA 105, pois, como não houve valores de eficiência de transformação maiores com a estirpe GV 3101 nos experimentos anteriores com o gene *PR-8*, não se utilizou essa estirpe com as construções contendo o gene *CDR-1* e o vetor pCAMBIA2201. As transformações genéticas com o vetor pCAMBIA2201 foram realizadas para controle das transformações realizadas com os genes de interesse. Houve um grande número de contaminações nas transformações genéticas realizadas, tanto com o gene *CDR-1* como também com o vetor pCAMBIA2201, assim como nos experimentos realizados com o gene *PR-8*, o que influenciou no número de plantas e eficiência de transformação obtidas. Para o gene *CDR-1*, foram introduzidos mais de quatro mil explantes e para o vetor pCAMBIA2201 o número de explantes foi maior, em torno de cinco mil (Tabelas 5 e 6).

Após a transformação genética, foi realizado o teste histoquímico do GUS nos segmentos foliares de brotos regenerados obtidos nos experimentos com o gene *CDR-1* e pCAMBIA2201 (Figura 8).

Tabela 4- Transformação genética de tomate Micro-Tom via *A. tumefaciens* contendo o gene *PR-8*

Experimento	Estirpe	Explantes introduzidos	Explantes responsivos	Plantas aclimatizadas	PCR+*	Eficiência de transformação (%)**
1	EHA 105	200	64	3	1	0,50
2	EHA 105	159	28	2	1	0,63
3	EHA 105	101	18	4	2	1,98
4	EHA 105	135	8	0	0	0
5	EHA 105	262	14	0	2	0,76
6	EHA 105	256	35	6	5	1,95
7	EHA 105	653	0	0	0	0
8	EHA 105	299	3	0	0	0
9	EHA 105	220	27	1	0	0
10	EHA 105	260	9	2	0	0
11	EHA 105	320	28	2	0	0
12	EHA 105	720	30	2	0	0
13	EHA 105	147	0	0	0	0
14	EHA 105	360	0	0	0	0
15	EHA 105	300	44	0	0	0
16	EHA 105	180	0	0	0	0
17	EHA 105	340	5	0	0	0
18	EHA 105	160	10	0	0	0
19	EHA 105	399	23	0	0	0
20	EHA 105	180	8	0	0	0
21	EHA 105	129	6	0	0	0
22	EHA 105	216	5	0	0	0
23	EHA 105	400	25	0	0	0
24	EHA 105	440	2	0	0	0
25	EHA 105	360	0	0	0	0
26	GV 3101	340	9	0	3	0,88
27	GV 3101	298	4	0	0	0
28	GV 3101	260	12	4	3	1,15
29	GV 3101	124	2	0	0	0,00
30	GV 3101	140	16	2	2	1,43
31	GV 3101	380	25	7	6	1,58
32	GV 3101	175	11	1	1	0,57
33	GV 3101	400	19	3	2	0,50
Total		9313	490	39	28	0,30

\* número de plantas PCR positivas por transformação genética.

\*\* Eficiência de transformação = quantidade de plantas PCR+ dividido pelo número total de explantes introduzidos multiplicado por 100.

Tabela 5- Transformação genética de tomate Micro-Tom via *A. tumefaciens* contendo o gene *CDR-1*, na estirpe EHA 105

Experimento	Explantos introduzidos	Explantos responsivos	Plantas aclimatizadas	PCR+/GUS+*	Eficiência de transformação (%)**
1	120	18	0	0/0	0
2	420	20	0	0/1	0
3	180	19	0	0/0	0
4	400	2	0	0/0	0
5	307	5	0	0/0	0
6	436	19	0	0/0	0
7	280	14	1	1/1	0,36
8	120	4	0	0/0	0
9	200	12	0	0	0
10	120	11	1	1/1	0,83
11	175	0	0	0	0
12	360	23	0	0	0
13	340	21	2	1/3	0,29
14	360	4	0	0/0	0
15	360	16	0	0/0	0
16	300	34	1	1/1	0,33
17	210	12	0	0	0
Total	4688	234	5	4/7	0,085

\* número de plantas PCR, GUS positivas por transformação genética.

\*\*Eficiência de transformação = quantidade de plantas PCR+ dividido pelo número total de explantes introduzidos multiplicado por 100.

Na análise de PCR, tanto para o gene *PR-8* quanto para o vetor pCAMBIA2201, as plantas que apresentaram fragmentos com 466 pb, são consideradas transgênicas, sendo obtidas 13 plantas de tomate Micro-Tom PCR positivas com o gene *PR-8* e 2 para a construção sem o gene de interesse (Figura 7 A, B e D). Por outro lado, as plantas que apresentam fragmento com 439 pb são transgênicas para o gene *CDR-1*, resultando em 3 plantas de tomate Micro-Tom PCR positivas (Figura 7 C).

Tabela 6- Transformação genética de tomate Micro-Tom via *A. tumefaciens* com o vetor pCAMBIA2201 sem gene de interesse, na estirpe EHA 105

Experimento	Explantos introduzidos	Explantos responsivos	Plantas aclimatizadas	PCR+/GUS+*	Eficiência de transformação (%)**
1	185	16	0	0/0	0
2	216	20	1	0/0	0
3	311	8	2	0/0	0
4	140	0	0	0	0
5	360	0	0	0	0
6	120	15	0	0/0	0
7	120	8	0	0/0	0
8	380	0	0	0	0
9	280	8	0	0/0	0
10	260	7	0	0/0	0
11	180	4	0	0/0	0
12	340	4	0	0/0	0
13	220	4	0	0/0	0
14	420	4	0	0/0	0
15	400	0	0	0	0
16	380	12	0	0/0	0
17	200	11	0	0/0	0
18	280	0	0	0	0
19	400	23	3	2/4	0,50
Total	5192	144	6	2/4	0,039

\* número de plantas PCR, GUS positivas por transformação genética.

\*\* Eficiência de transformação = quantidade de plantas PCR+ dividido pelo número total de explantes introduzidos multiplicado por 100.

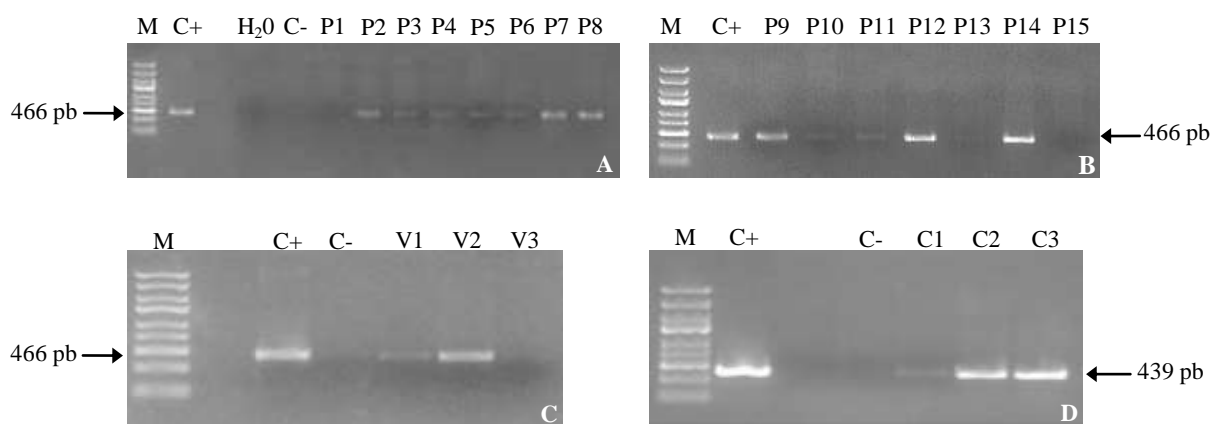


Figura 7- Análise de PCR de plantas de tomate Micro-Tom com os genes *PR-8*, *CDR-1* e o vetor pCAMBIA2201. A e B: Plantas transformadas com o gene *PR-8*. Colunas de P1-P15 plantas analisadas. C: Plantas transformadas com o vetor pCAMBIA2201. Colunas de V1-V3 plantas analisadas. D: Plantas transformadas com o gene *CDR-1*. Colunas de C1-C3 plantas analisadas. M = marcador de 1Kb (Thermo Scientific). H<sub>2</sub>O = água miliq - controle da reação. C+ = controle positivo (plasmídeo contendo o gene *PR-8*, o vetor sem gene de interesse e o gene *CDR-1*, correspondem as letras A e B, C, D respectivamente). C- = controle negativo (planta não transformada). O fragmento de 466 pb corresponde ao gene *nptII* e o fragmento de 439 pb corresponde a uma sequência de pares de base interna do gene *CDR-1*

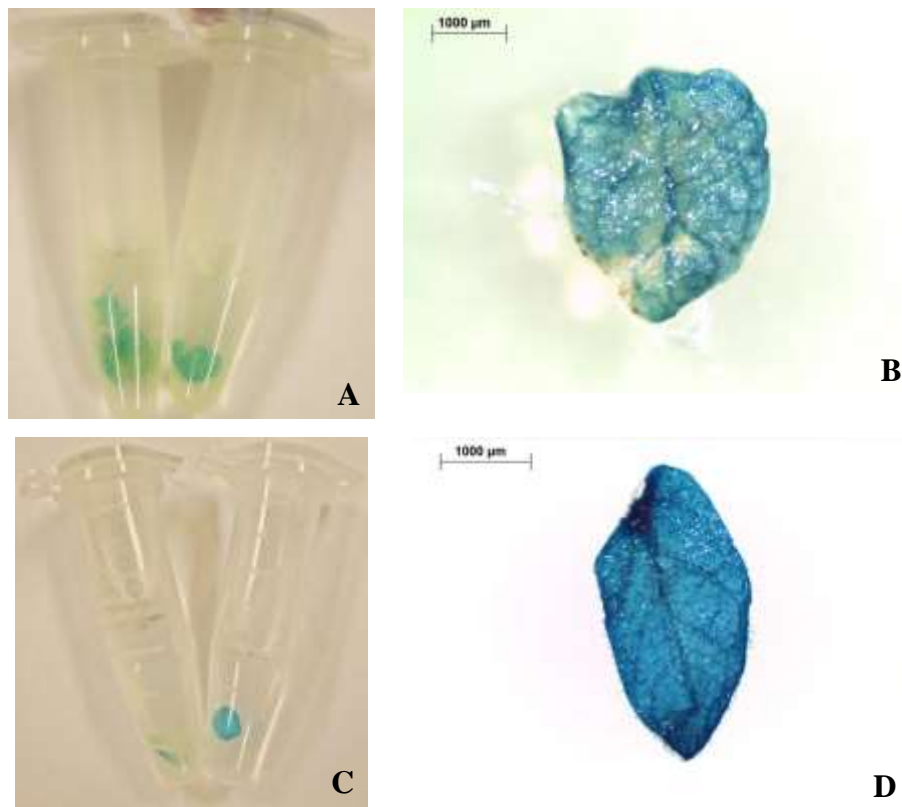


Figura 8- Segmentos de folhas jovens de tomate Micro-Tom transgênico após o teste histoquímico do GUS. A: tubos contendo folhas jovens de tomate Micro-Tom com o gene *CDR-1* em álcool 70%. B: detalhe de uma das folhas GUS+ com o gene *CDR-1*. C: tubos contendo folhas jovens de tomate Micro-Tom com o vetor pCAMBIA2201 em álcool 70%. D: detalhe de uma das folhas GUS+ com o vetor pCAMBIA2201

#### 4.2 Transformação genética de laranja ‘Hamlin’

Nos experimentos de transformação genética de laranja ‘Hamlin’ com o gene *CDR-1* não houve alto índice de contaminação do material *in vitro*, ou seja, em somente um dos experimentos os explantes sofreu contaminação durante o processo de cultivo, causando a perda de quase todo material e, conseqüentemente, afetando a eficiência de transformação.

Como o protocolo para a transformação genética de citros já se encontra estabelecido e com alta eficiência de funcionamento, não foram necessários muitos experimentos de transformação genética para obtenção de plantas transgênicas de laranja ‘Hamlin’. Desta forma, em torno de 700 explantes foram introduzidos para a obtenção de mais de 15 plantas transgênicas (Tabela 7). Após a transformação genética, realizou-se o teste histoquímico de GUS em segmentos de folhas jovens regenerados (Figura 9).

Na análise de PCR, as plantas que possuem um fragmento com 1386 pb (Figura 10 A e B) e 466 pb (figura 10 C), são consideradas PCR positivas, assim foram obtidas 19 plantas transgênicas de laranja ‘Hamlin’ com o gene *CDR-1*.

Tabela 7- Transformação genética de laranja ‘Hamlin’ com o gene *CDR-1* via *A. tumefaciens*, na estirpe EHA105

Experimento	Explantos introduzidos/responsivos	Brotos enxertados	Plantas aclimatizadas/Plantas estufa	GUS+/PCR+*	Eficiência de transformação (%)**
1	151/25	17	17/10	23/9	5,96
2	193/20	2	2/1	2/1	0,52
3	242/22	16	16/5	16/5	2,06
4	126/9	4	4/4	4/4	3,17
Total	712/76	39	39/20	45/19	2,66

\* número de plantas PCR, GUS positivas por transformação genética.

\*\* Eficiência de transformação = quantidade de plantas PCR+ dividido pelo número total de explantes introduzidos multiplicado por 100.

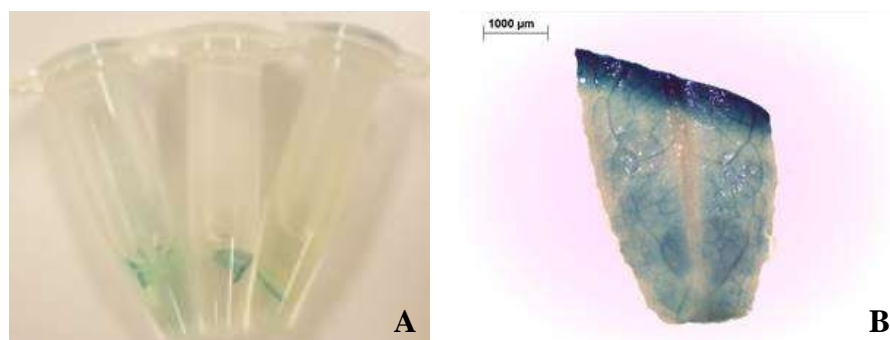


Figura 9- Segmentos de folhas jovens de laranja ‘Hamlin’ transgênicos após o teste histoquímico do GUS. A: fragmentos de folhas dos brotos em álcool 70%. B: detalhe de uma das folhas GUS+ com o gene *CDR-1*

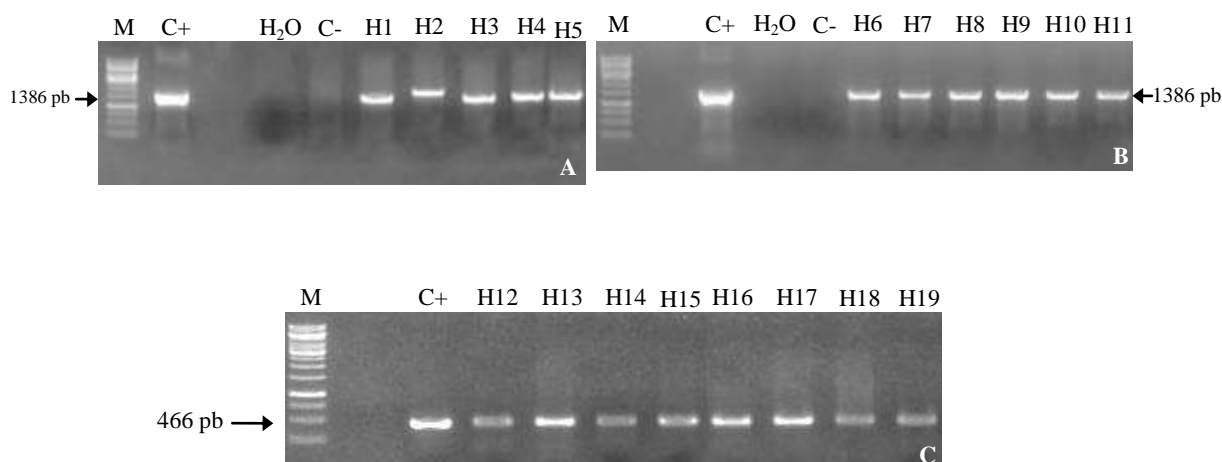


Figura 10- Análise de PCR de plantas de laranja ‘Hamlin’ transformadas com o gene *CDR-1*; A e B: PCR realizada com os primers UBI 10 e OCS. C: PCR realizada com os primers *nptII*. M = marcador de 1Kb (fermentas). C+ = controle positivo (plasmídeo contendo o gene *CDR-1*). H<sub>2</sub>O = água miliq-controle da reação. C- = controle negativo (planta não transformada). Colunas de H1-H19 plantas analisadas. O fragmento de 1386 pb corresponde as sequências do gene *CDR-1* + UBI 10 (promotor)+ OCS (terminador)e o fragmento de 466 pb corresponde ao gene *nptII*

#### 4.3 Análise de *Southern blot* em plantas de tomate Micro-Tom e de laranja ‘Hamlin’

Posteriormente à realização da análise de PCR nas plantas transgênicas, foram coletados materiais para a análise de *Southern blot*, tanto para as plantas de laranja ‘Hamlin’ como para os tomates Micro-Tom, porém foi respeitado o ciclo de desenvolvimento de cada planta. Buscou-se utilizar sempre folhas com tecidos jovens. Entretanto, devido às plantas de tomate Micro-Tom apresentarem um ciclo rápido, frutificando rapidamente, fez com que a qualidade do DNA fosse baixa, o que por sua vez interferiu nesta análise, pois, a maioria das plantas não puderam ser avaliadas mais de uma vez, devido sua senescência e consequentemente diminuição da qualidade do material genético.

Assim, em torno de 20 plantas transgênicas de tomate foram analisadas pela técnica de *Southern blot*. Dessas, apenas 3 plantas com o gene *PR-8* foram confirmadas pela análise, e o número de cópias inseridas variou entre 1 e 3 (Figura 11 B).

Dentre as plantas de laranja ‘Hamlin’ com o gene *CDR-1*, 13 foram avaliadas e apenas 1 planta foi confirmada pela análise, apresentando 1 número de cópia (Figura 11 A).



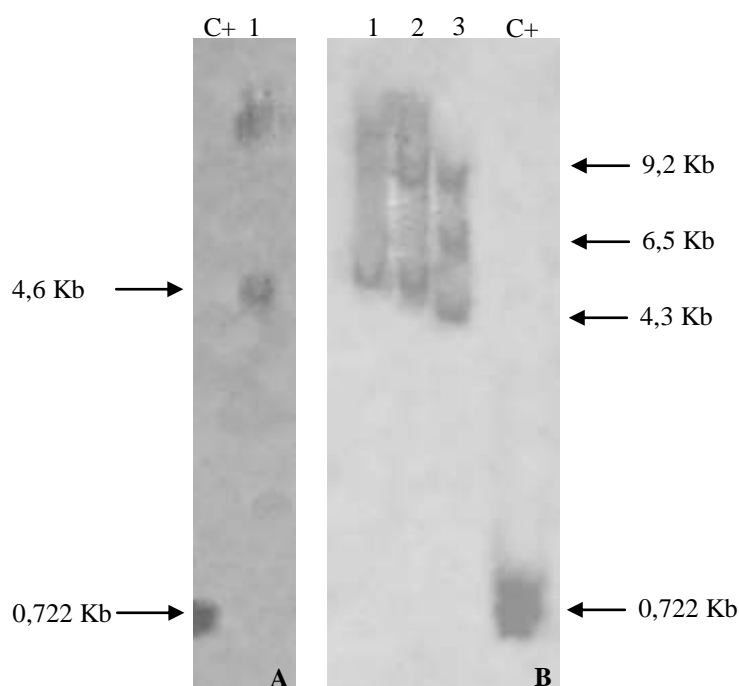


Figura 11- Análise de *Southern blot* em plantas de laranja ‘Hamlin’ com o gene *CDR-1* (A) e tomate Micro-Tom com o gene *PR-8* (B). Os DNAs foram clivados com a enzima *EcoRI* e hibridizado com a sonda contendo o amplicon do gene *nptII* de 722 pb. C+ = Controle positivo (sonda). Colunas numeradas correspondem ao DNA de plantas de laranja ‘Hamlin’ e tomate Micro-Tom transgênicas

#### 4.4 Seleção de plantas transgênicas T1 por canamicina

O experimento de seleção de plantas transgênicas T1 de tomate Micro-Tom, foi realizado com 21 eventos de transformação, sendo que desses, 15 plantas foram transformadas com o gene *PR-8*, 3 com o gene *CDR-1* e 3 com o vetor pCAMBIA2201 sem gene de interesse.

As linhagens T1 que apresentaram resistência a canamicina foram 10 eventos com o gene *PR-8*, 3 com o gene *CDR-1* e 1 evento com o vetor, totalizando 14 eventos. Alguns eventos do gene *PR-8* e do vetor vazio apresentaram alta mortalidade das sementes germinadas (Figura 12).

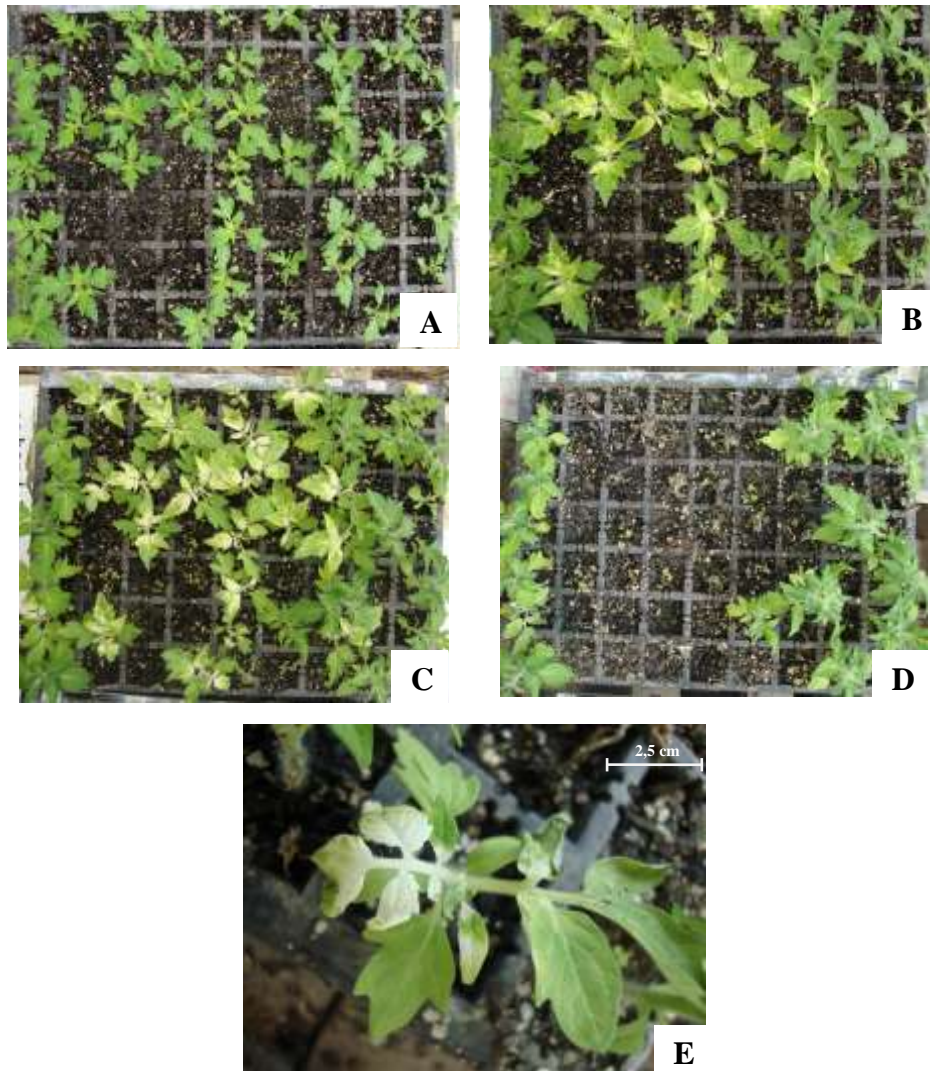


Figura 12- Experimento de seleção de plantas de tomate Micro-Tom transformadas com genes *PR-8*, *CDR-1* e o vetor pCAMBIA2201 sem gene de interesse em T1 pulverizadas com canamicina na concentração de  $400 \text{ mg L}^{-1}$ . A: plântulas T1 de diferentes eventos de transformação não apresentando nenhuma reação a pulverização de canamicina. B: plântulas apresentando reação a canamicina após cinco dias de pulverização. C: plântulas já apresentando reação a canamicina após 12 dias de pulverização. D: apenas as plântulas verdes resistentes a canamicina e E: detalhe de uma plântula com sintomas da canamicina



## 5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, os valores de eficiência de transformação em plantas de tomate Micro-Tom variaram de 0,5-1,9%, e desta forma, não corroboram com os dados encontrados em trabalhos semelhantes, como o de CHETTY et al. (2013), que ao transformarem a cultivar Micro-Tom, obtiveram valores de eficiência de transformação que variaram de 15 a 65%, esses valores foram calculados do mesmo modo como os calculados neste trabalho, ou seja, dividiu-se o número de plantas transgênicas PCR positivas pelo número de explantes inoculados, multiplicado por 100.

Porém, há autores que diferem no modo de cálculo da eficiência de transformação, como CRUZ-MENDÍVIL e colaboradores (2011) que transformaram a mesma cultivar, e obtiveram uma eficiência de transformação de 19%, a qual foi calculada através do número de explantes infectados com *Agrobacterium* e plantas PCR positivas.

Os trabalhos realizados com DAN et al. (2006) e QIU et al. (2007) encontraram valores de eficiência de transformação que variaram 19-37%, porém o modo de cálculo da eficiência de transformação em ambos os trabalhos foi expressa pela porcentagem do número de plantas regeneradas pelo número total de explantes introduzidos.

Mesmo havendo diferenças no modo de obtenção dos valores de eficiência de transformação, os valores entre os trabalhos desenvolvidos pelos autores acima descritos foram próximos entre si. Entretanto, todos são valores maiores que os encontrados neste trabalho.

Diversos fatores durante o processo de transformação genética podem afetar a sua eficiência em produzir plantas transgênicas. Dentre eles, citam-se o tipo do explante (tamanho e idade), meio de cultura, quantidade de inóculo bacteriano, tempo de inoculação, tempo de co-cultivo e estirpe bacteriana (KHUONG et al., 2013; BHATIA et al., 2004; SIVANKALYANI et al., 2014; CHETTY et al., 2013). Desta forma, os parâmetros acima descritos podem ter influenciado nos resultados obtidos nos experimentos de transformação genética em tomate Micro-Tom, isto porque há uma variação entre os protocolos existentes para tal finalidade.

A utilização das estirpes GV 3101 e EHA 105 neste trabalho, bem como o número de plantas obtidas através das transformações realizadas com as mesmas, contradizem com os valores encontrados em trabalhos publicados comparando ambas as estirpes. CHETTY e colaboradores (2013), em experimentos de transformação genética com tomate Micro-Tom testaram as diferentes estirpes de *Agrobacterium*, dentre elas a GV 3101 e a EHA 105. Seus resultados indicam que, com a GV3101 a eficiência de transformação foi maior (65%) que a

EHA 105 (40%), porém a quantidade de escapes foi maior na GV 3101. Ainda, a EHA 105 foi mais eficiente do que GV 3101 na transferência de T-DNA em inserções únicas de *nptII* e *uidA* no genoma de transgenes de tomate. No entanto, os mesmos autores concluíram que o valor de eficiência de transformação somado ao menor número de inserções em plantas transformadas utilizando EHA 105, a torna uma estirpe ideal para trabalhos em genômica funcional e aplicações biotecnológicas em tomates.

Além de se utilizar amplamente diferentes estirpes de *Agrobacterium* (EHA105 e GV3101) no processo de transformação genética em tomate, as concentrações do inóculo também podem variar entre 0,2 a 0,6 em uma absorbância de 600nm-OD<sub>600</sub> (GAO et al., 2009; KRASNYANSKI et al., 2001; QIU et al., 2007). A concentração de inóculo utilizada para os experimentos de transformação genética em tomate Micro-Tom descrita neste projeto está dentro desse intervalo.

Os explantes provenientes de cotilédones, como os utilizados nos experimentos de transformação genética neste trabalho, são comumente utilizados nesse procedimento para os tomateiros comuns, outro tipo de explante usado em geral para essas plantas, são explantes provenientes de hipocótilos (SUN et al., 2015). Entretanto, em relação ao Micro-Tom, diversos trabalhos utilizam cotilédones como fonte de explante para experimentos de transformação genética (SUN et al., 2006; GUO et al., 2012; DAN et al., 2006; QUIU et al., 2006 e CHETTY et al., 2013). Ainda, Mamidala e Nanna (2011) afirmam que dentre os tipos de explantes testados (cotilédone, hipocótilo e segmentos de folha), os explantes a partir de cotilédones e segmentos de folhas apresentaram melhores resultados de regeneração para experimentos nos quais não houve a transformação genética. Esses mesmos autores afirmam que a regeneração dos explantes provenientes de cotilédones de Micro-Tom foi melhor quando utilizados 1 e 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de IAA.

O tempo de co-cultivo também é um fator importante na eficiência de transformação, pois, pode influenciar diretamente a transferência do T-DNA da bactéria para a planta. Nesta fase, os cuidados devem ser tomados para o melhor desempenho da bactéria ao infectar os segmentos de explantes. Portanto, o tempo dos explantes em co-cultivo e a temperatura do ambiente onde estão alocados são determinantes para que a população bacteriana não prejudique os tecidos vegetais e ao mesmo tempo transfira o gene de interesse no genoma da planta. Para os experimentos de transformação genética com tomate Micro-Tom realizados durante este trabalho, o tempo de co-cultivo foi de dois dias em temperatura de 28°C, a qual é ideal para o desenvolvimento da bactéria.

Porém, GUO et al. (2012), em experimento de transformação genética com tomate Micro-Tom, ao analisarem o tempo de co-cultivo, concluíram que o tempo correspondente a um dia foi adequado para o co-cultivo, diferentemente dos valores encontrados em trabalhos de transformação genética de tomate Micro-Tom. Esses autores ainda enfatizam que isso pode estar relacionado com os genótipos de tomate e diferentes tecidos das plantas.

No que se refere aos experimentos de transformação genética em laranja ‘Hamlin’, as eficiências de transformação encontradas neste trabalho foram calculadas a partir do número de plantas PCR positivas e explantes introduzidos obtendo-se valores de 2,06 a 5,96%, e assim corroboram com os valores encontrados em trabalhos anteriores para esta cultivar. Entre os dados encontrados nas publicações, os valores da eficiência de transformação calculados a partir dos mesmos dados que este trabalho, possuem uma alta variação, podendo serem observados valores de 0,6 a 18% (MUNIZ et al., 2012; MENDES et al., 2010). Ainda há trabalhos que calculam as eficiências da através da quantidade de brotos GUS positivos /GFP positivos e explantes inoculados, e seus valores variam de 6,0 a 25% (MIYATA et al., 2012; DUTT e GROSSER, 2009).

A variação entre esses dados pode ser explicada pelo fato de que diversos fatores podem afetar a eficiência de transformação. A condição de inoculação por *Agrobacterium*, condições em co-cultivo, e um sistema eficiente de regeneração após a infecção são parâmetros importantes que afetam o processo de transformação genética (DUTT e GROSSER, 2009).

O tempo utilizado para a inoculação dos explantes com *Agrobacterium* neste trabalho está coerente para a cultivar ‘Hamlin’, conforme demonstrado por Mendes et al. (2002). Estes autores afirmam que o tempo de inoculação pode afetar a transformação genética em laranja ‘Hamlin’ via *Agrobacterium tumefaciens* e, desta forma, concluem que o tempo de 15 minutos é o ideal para a inoculação.

Ainda, o genótipo de plantas de citros podem influenciar a organogênese *in vitro*, independente da região do epicótilo que o explante é extraído e da presença ou ausência de citocinina (SCHINOR et al., 2006). Almeida et al. (2003), em trabalhos de organogênese e transformação genética com segmentos internodais e discos de folhas de diferentes cultivares de laranja, concluíram que a laranja ‘Hamlin’ foi a melhor cultivar em resposta a transformação genética, confirmando que as laranjas doces apresentam uma capacidade morfogenética genótipo-dependente e alta afinidade com *Agrobacterium*.

Dutt e Grosser (2009), ao realizarem experimentos de transformação genética em diferentes cultivares de citros (Carrizo, Duncan, Hamlin e Lima comum), e a avaliação da

capacidade de integração do gene de interesse no DNA vegetal via *Agrobacterium*, classificaram as cultivares em três categorias. Assim, a laranja ‘Hamlin’ foi considerada moderada a difícil para o processo de transformação genética.

Os brotos escapes, ou seja, brotos regenerados e não transgênicos estão ligados à dificuldade para obtenção de plantas transgênicas de citros (MIYATA et al., 2011). A regeneração de brotos escapes pode chegar a 95% (YANG et al., 2000). A seleção ineficiente que resulta em formação de brotos escapes pode ser atribuída à proteção das células não transformadas exercida pelas células transformadas, localizadas em sua proximidade, a partir de um agente seletivo, bem como à persistência de *Agrobacterium* e sua resistência à canamicina em explantes inoculados em um longo período de tempo (DOMÍNGUEZ et al., 2004). Neste trabalho, não houve a presença de grande número de brotos escapes que pudessem afetar o número de plantas transgênicas obtidas.

O número de cópias do transgene, inseridos no DNA genômico das plantas de tomate Micro-Tom e laranja ‘Hamlin’, submetidas à transformação genética e analisadas pela técnica de *Southern Blot* neste trabalho estão de acordo com o observado em outros trabalhos de transformação genética de tomate Micro-Tom (CHETTY et al., 2013; DAN et al., 2006; SUN et al., 2006) e de laranja ‘Hamlin’ (BARBOSA-MENDES et al., 2009; MENDES et al., 2010; MIYATA et al., 2012).

## 6 CONCLUSÃO

- A obtenção de plantas transgênicas de tomate Micro-Tom com os genes *PR-8*, *CDR-1* e o vetor pCAMBIA2201 sem o gene de interesse, somente foi possível devido ao grande número de experimentos realizados.
- As transformações genéticas com plantas de laranja ‘Hamlin’ foram realizadas com êxito e o número de plantas transgênicas obtidas com o gene *CDR-1* ficaram dentro do esperado para esta cultivar.





## REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, T.L.; SHOKROLLAH, H.; SIJAM, K.; ABDULLAH, S.N.A. Control of Huanglongbing (HLB) disease with reference to its occurrence in Malaysia. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 8, n.17, p. 4007-4015, 2009.
- ALBRECHT, U.; BOWMAN, K.D. Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Plant Science**, Limerick, v. 185-186, p. 118-130, 2012.
- ALMEIDA, W.A.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; PINO, L.E.; BOSCARIOL, R.L.; RODRIGUEZ, A.P.M.; MENDES, B.M.J. Genetic transformation and plant recovery from matura tissues of *Citrus sinensis* L. Osbeck. **Plant Science**, Limerick, v. 164, p. 203-211, 2003.
- AOKI, K.; YANO, K.; SUZUKI, A.; KAWAMURA, S. Large-scale analysis of full-length cDNAs from the tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivar Micro-Tom, a reference system for the Solanaceae genomics. **BMC Genomics**, London, v. 11, p. 210, 2010.
- ARIE, T.; TAKAHASHI, H.; KODAMA, M.; TERAOKA, T. Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. **Plant Biotechnology**, Sheffield, v. 24, p. 135-147, 2007.
- BARBOSA-MENDES, J.M.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; BERGAMIN FILHO, A.; HARAKAVA, R.; BEER, S.V.; MENDES, B.M.J. Genetic transformation of *Citrus sinensis* cv. Hamlin with hrpN gene from *Erwinia amylovora* and evaluation of the transgenic lines for resistance to citrus canker. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 122, p. 109-115, 2009.
- BARROS, F.C.; SAGATA, E.; FERREIRA, L.C.C.; JULIATTI, F.C. Indução de Resistência em plantas contra Fitopatógenos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 2, p. 231-239, 2010.
- BELASQUE JUNIOR, J.; BERGAMIN FILHO, A.; BASSANEZI, R.B.; BARBOSA, J.C.; FERNANDES, N.G.; YAMAMOTO, P.T.; LOPES, S.A.; MACHADO, M. A.; LEITE JUNIOR, R.P.; AYRES, A.J.; MASSARI, C.A. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 3, p. 137-145, 2009.
- BHATIA, P.; ASHWATH, N.; SENARATNA, T.; MIDMORE, D. Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 78, p. 1-21, 2004.
- BISHOP, G.J.; NOMURA, T.; YOKOTA, T.; HARRISON, K.; NOGUCHI, T.; UJIOKA, S.; TAKATSUTO, S.; JONES, J.D.G.; KAMIYA, Y. The tomato dwarf enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, p. 1761-1766, 1999.
- BOTEON, M.; NEVES, E.M. Citricultura brasileira: aspectos econômicos. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JR., J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônomico; Fundag, 2005. cap. 2, p. 19-36.

BOVÉ, J.M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v.88, p. 7-37, 2006.

BRASILEIRO, M.C.A.; CARNEIRO, C.T.V. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, Cenargen, p. 309, 1998.

BRUNNER, F.; STINTZI, A.; FRITIG, B.; LEGRAND, M. Substrates tobacco chitinases. **Plant Journal**, Oxford, v. 14, p. 225-234, 1998.

CAMPOS, M.A.; ROSA, D.D.; TEIXEIRA, J.E.C.; TARGON, M.L. P.N.; SOUZA, A.A.; PAIVA, L.V.; MACHADO, D.R.S.; MACHADO, M.A. *PR* gene families of citrus: Their organ specific-biotic and abiotic inducible expression profiles based on ESTs approach. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 30, n.3 (suppl), p. 917-930, 2007.

CARDOSO, S.C.; BARBOSA-MENDES, J.M.; BOSCARIOL-CAMARGO, R.L.; CHRISTIANO, R.S.C.; FILHO, A.B.; VIEIRA, M.L.C.; MENDES, B.M.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A. Transgenic Sweet Orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) Expressing the attacin A Gene for Resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 28, n. 2, p.185-192, 2010.

CHETTY, V. J.; CEBALLOS, N.; GARCIA, D.; NARVÁEZ-VÁSQUEZ, J.; LOPEZ, W.; OROZCO-CÁRDENAS, M.L. Evaluation of four *Agrobacterium tumefaciens* strains for the genetic transformation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Micro-Tom. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 32, p. 239-247, 2013.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira- Laranja (Safra 2013/2014) – Primeira Estimativa (São Paulo e Triângulo Mineiro-Maio, 2013. Disponível em:<  
[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_05\\_14\\_09\\_38\\_01\\_boletim\\_laranja\\_1\\_2013.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_05_14_09_38_01_boletim_laranja_1_2013.pdf)>. Acesso em: 31 jan.2015.

CRUZ-MENDÍVIL, A.; RIVERA-LÓPEZ, J.; GERMÁN-BÁEZ, L.J.; LÓPEZ-MEYER, M.; HERNÁNDEZ-VERDUGO, S.; LÓPEZ-VALENZUELA, J.A.; REYES-MORENO, C.; VALDEZ-ORTIZ, A. A Simple and Efficient Protocol for Plant Regeneration and Genetic Transformation of Tomato cv. Micro-Tom from Leaf Explants. **HortScience**, Alexandria, v. 46, n. 12, p. 1655-1660, 2011.

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, p. 432-441, 2006.

DELATORRE, C.A.; SILVA, A.A. *Arabidopsis thaliana*: Uma pequena planta um grande papel. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 31, n. 2, p. 58-67, 2008.

DOMÍNGUEZ, A.; CERVERA, M.; PÉREZ, R.M.; ROMERO, J.; FAGOAGA, C.; CUBERO, J.; LÓPEZ, M.M.; JUÁREZ, J.A.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Characterisation of regenerants obtained under selective conditions after *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus explants reveals production of silenced and chimeric plants at unexpected high frequencies. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 14, p. 171-183, 2004.

DUTT, M.; MADHAVARAJ, J.; GROSSER, J.W. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation and plant regeneration from a complex tetraploid hybrid citrus rootstock. **Scientia Horticulturae**, Lake Alfred, v. 123, p. 454-458, 2010.

DUTT, M.; GROSSER, J. W. Evaluation of parameters affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 98, p. 331–340, 2009.

EMMANUEL, E.; LEVY, A.A. Tomato mutants as tools for functional genomics. **Current Opinion in Plant Biology**, Rehovot, v. 5, p. 112-117, 2002.

FAN, J.; CHEN, C.; BRLANSKY, R.H.; GMITTER JR, F.G.; LI, Z.G. Changes in carbohydrate metabolism in *Citrus sinensis* infected with ‘Candidatus *Liberibacter asiaticus*’. **Plant Pathology**, San Diego, v. 59, p. 1037-1043, 2010.

FAO - FAOSTAT. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em: 03 abr. 2015.

FANELLI, V.; CARIDDI, C.; FINETTI-SIALER, M. Selective detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* using dot blot hybridization and real-time PCR. **Plant Pathology**, San Diego, v. 56, p. 683-691, 2007.

FEBRES, VJ.; KHALAF, A.; GMITTER JR, F.; MOORE, G.A. Production of Disease Resistance in Citrus by Understanding Natural Defense Pathways and Pathogen Interactions. **Global Science Books**, Isleworth, v. 3, n. 2, p. 30-39, 2009.

BESPALHOK FILHO, J.C.; KOBAYASHI, A.K.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. Laranja Transgênica: Transformação de laranja visando resistência ao cancro cítrico usando genes de peptídeos antibacterianos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.4, n. 23, p. 62-66, 2001.

FREITAS-ASTUA, J.; ASTUA-MONGE, G.; POLSTON, J.E.; HIEBERT, E. A simple and reliable method for the screening of transgenic tobacco plants. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 7, p. 893-896, 2003.

FRITIG, B.; HEITZ, T.; LEGRAND, M. Antimicrobial protein in induced plant defense. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 10, n. 1, p. 16-22, 1998.

FU, Z. Q.; DONG, X. Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 64, p. 839-863, 2013.

FUNDECITRUS - FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. Manual técnico – greening. 2009. Disponível em:<  
[http://sistemas.cda.sp.gov.br/greening/lnk\\_greening\\_ctr/downloads/greening.pdf](http://sistemas.cda.sp.gov.br/greening/lnk_greening_ctr/downloads/greening.pdf)>. Acesso em: 31 jan.2015.

GAMBINO, G.; GRIBAUDO, I. Genetic transformation of fruit trees: current status and remaining challenges. **Transgenic Research**, London, v. 2, p. 1163-1181, 2012.

GARNIER, M.; BOVÉ J.M.; CRONJE C.P.R.; SANDERS, G.M.; KORSTEN, L.L.E.; ROUX, H.F. Presence of “*Candidatus Liberibacter africanus*” in the Western Cape province of South Africa. In: CONFERENCE OF INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 14.,2000. Riverside.**Proceedings...** Riverside 2000. p. 369-372.

GAO, N.; SHEN, W.; CAO, Y.; SU, Y.; SHI, W. Influence of bacterial density during preculture on *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 98, p. 321-330, 2009.

GORLACH, J.; VOLRATH, S.; KNAUF-BEITER, G.; HENGY, G.; BECKHOVE, U.; KOGEL, K.; OOSTENDORP, M.; STAUB, T.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. **Plant Cell**, Baltimore, v. 8, p. 629-643, 1996.

GUO, M.; ZHANG, Y.L.; MENG, Z.J.; JIANG, J. Optimization of factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of Micro-Tom tomatoes. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto , v. 11, n. 1, p. 661-671, 2012.

HORST, R.K. **Westcott’s plant disease handbook**. Boston:Kluwer, 2001. p. 878-881.

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 4.ed. San Diego: Academic Press, 1997. 635p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Disponível em:<[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Fasciculo\\_Indicadores\\_IBGE/estProdAgr\\_201411.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Fasciculo_Indicadores_IBGE/estProdAgr_201411.pdf)>. Acesso em: 03 abr. 2015 (a).

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Disponível em:<[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Producao\\_Agricola\\_Municipal\\_\[anual\]/2012/Tabelas\\_pdf/Tabela04.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Producao_Agricola_Municipal_[anual]/2012/Tabelas_pdf/Tabela04.pdf)>. Acesso em: 03 abr. 2015 (b).

JAGOEIX, S.; BOVE, J. M.; GARNIER, M. The Phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the Proteobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington. v. 44, p. 379-386, 1994.

JONES, J.B.; JONES J.P.; STALL, R.E.; ZITTER T.A. Compendium of Tomato Diseases. **American Phytopathological Society**, Sant Paul, v. 7, n. 1, p. 73, 1991.

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, p. 1441-1454, 2013.

KIM, J.S; SAGARAM, U.S; BURNS, J.K; LI, J.L; WANG, N. Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection: microscopy and microarray analyses. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, n. 1, p. 50-57, 2009.

KNAPP, S: Tobacco to tomatoes: a phylogenetic perspective on fruit diversity in the Solanaceae. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 2001-2022, 2002.

KRASNYANSKI, S.F.; SANDHU, J.; DOMIER, L.L.; BUETOW, D.E.; KORBAN, S.S. Effect of an enhanced CAMV 35S promoter and a fruit-specific promoter on *Uida* gene expression in transgenic tomato plants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 37, p. 427-433, 2001.

LIAO, H.L.; BURNS, J.K. Gene expression in *Citrus sinensis* fruit tissues harvested from huanglongbing-infected trees: comparison with girdled fruit. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.63, n. 8, p. 3307-3319, 2012.

MABBERLEY, D.J. A classification of edible *Citrus* (Rutaceae). **Teloepa**, v. 7, p. 167-172, 1997.

MACHADO, M.A.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A.M.; OLIVEIRA, A.C. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JR., J. (Ed.). Citros. Campinas: Instituto Agronômico; Fundag, 2005. p. 221-277.

MAMIDALA, P.; NANNA, R.S. Effect of genotype, explant source and medium on *in vitro* regeneration of tomato. **International Journal of Genetics and Molecular Biology**, Lagos, v. 3, n. 3, p. 45-50, 2011.

MARTI, E.; GISBERT, C.; BISHOP G.J.; DIXONM. S.; GARCÍA-MARTÍNEZ J. L. Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. **Journal of Experimental Botany**, Madison, v.57, p. 2037-2047, 2006.

MEHLMER, N.; PARVIN, N.; HURST, C.H.; KNIGHT, M.R.; TEIGE, M.; VOTHKNECHT, U.C. A toolset of a equorin expression vectors for in planta studies of subcellular calcium concentrations in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n.4, p. 1751-1761, 2012.

MEISSNER, R.; JACOBSON, Y.; MELAMED, S.; LEVYATUV, S.; SHALE, V.; ASHRI, A.; ELKIND, Y.; LEVY, A. A new model system for tomato genetics. **Plant Journal**, Oxford, v.12, p. 1465-1472, 1997.

MENDES, B.M.J.; BOSCARIOL, R.L.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; ALMEIDA, W.A.B. *Agrobacterium*-medianted genetic transformation of 'Hamlin' sweet orange. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 7, p. 955-961, 2002.

MENDES, B.M.J.; CARDOSO, S.C.; BOSCARIOL-CAMARGO, R.L.; CRUZ, R.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; BERGAMIN FILHO, A. Reduction in susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. citri in transgenic *Citrus sinensis* expressing the rice Xa21 gene. **Plant Pathology**, Oxford, v.59, p. 68-75, 2010.

- MIYATA, L.Y.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; FILHO, J.A.S.; ZAMBON, F.; BASSAN, M. M.; MENDES, B.M.J.; HARAKAVA, R. Eficiência de transformação genética de Citrange ‘Carrizo’ com duas construções gênicas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 1, p. 311-315, 2011.
- MIYATA, L.Y.; HARAKAVA, 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.
- MONTOYA T.; NOMURA T.; YOKOTA T.; FARRAR K.; HARRISON K.; JONES JGD.; KANETA T.; KAMIYA Y.; SZEKERES M.; BISHOP, G.J. Patterns of Dwarf expression and brassinosteroid accumulation in tomato reveal the importance of brassinosteroid synthesis during fruit development. **The Plant Journal**, Waterbury, v. 42, p. 262-269, 2005.
- MUNIZ, F.R.; DE SOUZA, A.J.; STIPP, L.C.L.; SCHINOR, E.; FREITAS, W.; HARAKAVA, R.; STACH-MACHADO, D.R.; REZENDE, J.A.M.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J. Genetic transformation of *Citrus sinensis* with *Citrus tristeza virus* (CTV) derived sequences and reaction of transgenic lines to CTV infection. **Biologia Plantarum**, Praga, v. 56, p. 162-166, 2012.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- MURASHIGE, T.; TUCKER, D.P.H. Growth factor requirement of citrus tissue culture. **Proceedings of the First International Citrus Symposium**, Riverside, v.3, p.1155-1169, 1969.
- NEGROTTO, D.; JOLLEY, M.; BEER, S.; WENCK, A.R.; HANSEN, G. The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, p. 798-803, 2000.
- NEVES, M. F.; TROMBIN, V.G.; MILAN, P.; LOPES, F.F; CRESSONI, F.; KALAKI, R. (ED). **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto. Markestrat – CitrusBR, 2009.
- PIETERSE, C. M. J.; LEON-REYES, A.; SJOERD, V. E.; SASKIA, C. M. V.W. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. **Nature Chemical Biology**, New York, v. 5, n. 5, p. 308-316, 2009.
- PIETERSE, C.M.J.; VAN WEES, S.C.M.; VAN PELT, J.A.; KNOESTER, M.; LAAN, R.; GERRITS, H.; WEISBEEK, P.J.; VAN LOON, L.C. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 10, p. 1571-1580, 1998.
- 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**, 2010. Disponível em: <<http://www.plantmethods.com/content/6/1/23>>. Acesso em: 06 abril 2015.

- PIO, R.M.; FIGUEIREDO, J.O.; STUCHI, E.S.; CARDOSO, S.A.B. Variedades copas. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JR., J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico; Fundag, cap. 3, p. 39-60, 2005.
- PNUELI, L.; GUFINGER, T.; HAREVEN, D.; BEN-NAIM, O.; RON, N.; ADIR, N.; LIFSCHITZ, E. Tomato SP-interacting proteins define a conserved signaling system that regulates shoot architecture and flowering. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 13, p. 2687-2702, 2001.
- PNUELI, L.; CARMEL-GOREN, L.; HAREVEN, D.; GUTFINGER, T.; ALVAREZ, J., GANAL. M.; ZAMIR, D.; LIFSCHITZ, E. The *SELF-PRUNING* gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the orthologue of CEN and TFL1. **Developmental Biology**, Washington, v. 125, p. 1979-1989, 1998.
- POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JR., J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico; Fundag, cap. 4, 2005. p. 63-104.
- PRASAD, B.D.; CREISSEN, G.; LAMB, C.; CHATTOO, B.B. Overexpression of rice (*Oryza sativa* L.) Os CDR1 leads to constitutive activation of defense responses in rice and Arabidopsis, **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 22, p. 1635-1644, 2009.
- PRESTON, G.M. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: the right pathogen, of the right plant, at the right time. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 1, n. 5, p. 263-275, 2000.
- QIU, D.; DIRETTO, G.; TAVARZA, R.; GIULIANO, G. Improved protocol for Agrobacterium mediated transformation of tomato and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic gene CsZCD. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 112, p. 172-175, 2007.
- RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, Guildford, v. 20, p. 1-11, 2001.
- SCHINOR, E.H.; PAOLI, L.G.; AZEVEDO, F.A.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J. Organogênese *in vitro* a partir de diferentes regiões do epicótilo de *citrus* sp. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 3, p. 463-466, 2006.
- SCOTT, J.W.; HARBAUGH, B.K. Micro-Tom- a miniature dwarf tomato. **Florida Agricultural Experiment Station Circular**, Gainesville, v.370, p. 1-6, 1989.
- SILVA, R.P.; SOUZA, E.S.; REBOUÇAS, F.S.; ALMEIDA, W.A.B.; Otimização de protocolos para regeneração de plantas *in vitro* de Tangerina 'Cleópatra' (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.) **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal., v. 27, n. 3, p. 484-487, 2005.
- SIVANKALYANI, V.; TAKUMI, S.; THANGASAMY, S.; ASHAKIRAN, K.; GIRIJA, S. Punctured-hypocotyl method for high-efficient transformation and adventitious shoot regeneration of tomato. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 165, p. 357-364, 2014.



SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 98, p. 503-517, 1975.

SRISINK, S.; SIVASITHAMPARAM, K. Epiphytic populations of *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* on tomato seedlings in a nursery. **Plant Protection Quarterly**, Meredith, v. 2, n. 4, p. 158-160, 1987.

SUN, H.J.; UCHII, S.; WATANABE, S.; EZURA, H. A Highly Efficient Transformation Protocol for Micro-Tom, a Model Cultivar for Tomato Functional Genomics. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, 3 ed, v. 47, p. 426-431, 2006.

SUN, S.; KANG, X.P.; XING, X.J.; XU, X.Y.; CHENG, J.; ZHENG, S.W.; XING, G.M. Agrobacterium-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* L. cv. Hezuo 908) with improved efficiency. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, Bulgaria, p. 861-868, 2015.

SWINGLE, W.T.; REECE, P.C. The botany of citrus and its wild relatives. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (Ed.). **The Citrus Industry**. Riverside, v.1, p.190-430, 1967.

TAKAHASHI, H.; SHIMIZU, A.; ARIE, T.; ROSMALAWATI, S.; FUKUSHIMA, S.; KIKUCHI, M.; HIKICHI, Y.; KANDA, A.; TAKAHASHI, A.; KIBA, AKINORI.; OHNISHI, K.; ICHINOSE, Y.; TAGUCHI, F.; YASUDA, C.; KODAMA, M.; EGUSA, M.; MASUTA, C.; SAWADA, H.; SHIBATA, D.; HORI, K.; WATANABE, Y. Catalog of Micro-Tom tomato responses to common fungal, bacterial, and viral pathogens. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 71, p. 8-22, 2005.

TANKSLEY, S.D. Linkage map of tomato (*Lycopersicon esculentum*). In: O'BRIEN, J (Ed.) Genetic maps: locus maps of complex genomes. **Cold Spring Harbor**, New York, p 639-660, 1993.

TEIXEIRA, D.C.; AYRES, A.J.; DANET, J.L.; JAGOUEIX, E.S.; SAILLARD, C.; BOVE, J.M. First Report of a huanglongbing-like disease of citrus in São Paulo State Brazil, and association of a new *Liberibacter* species, *Candidatus Liberibacter americanus*, with the disease. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, p. 107, 2005 (a).

TEIXEIRA, D.C.; DANET, J.L.; EVEILLARD, S.; MARTINS, E.C.; JESUS J.R.; W.C.; YAMAMOTO, P.T.; LOPES, S.A.; BASSANEZI, E.B.; AYRES, A.J.; SAILLARD, C.; BOVE, J.M. Citrus huanglongbing in São Paulo, Brazil: PCR detection of the *Candidatus Liberibacter* species associated with the disease. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 19, p. 173-179, 2005 (b).

TEIXEIRA, D.C.; SAILLARD, C.; EVEILLARD, S.; DANET, J. L.; AYRES, A. J.; BOVE, J. M. *Candidatus Liberibacter americanus* sp. nov., associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo, Brazil. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 55, p. 1857- 1862, 2005 (c).

VAN LOON, L.C.; REP, M.; PIETERSE, C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p. 135-162, 2006.

- VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M.; PIETERSE, C.M.J. Mechanisms of PGPR induced resistance against pathogens. In: **International Conferences: WORKSHOP ON PLANT-GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA**, 1997. Sapporo, **Proceedings...** Sapporo, 1997. p.50-57.
- VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M.; PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v.36, p. 453-483, 1998.
- VAN LOON, L.C.; PIERPOINT, W.S.; BOLLER, T.; CONEJERO, V. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.12, p. 245-264, 1994.
- WEIDE, R.; KOORNNEEF, M.; ZABEL, P. A simple, nondestructive spraying assay for the detection of an active kanamycin resistance gene in transgenic tomato plants. **Theoretical and Applied genetics**, Berlin, v.78, p. 169-172, 1989.
- WHALEN, M.C. Host defense in a developmental context. **Molecular Plant Pathology**, Beltsville, v.6, n.3, p.347-360, 2005.
- XIA, Y.; SUZUKI, H.; BOREVITZ, J.; BLOUNT, J.; GUO, Z.; PATEL, K.; DIXON, R.A.; LAMB, C. An extracellular aspartic protease functions in Arabidopsis disease resistance signaling. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 23, p. 980-988, 2004.
- XIAO, Q.G.; JI, H. L. Genetic transformation and genes for resistance to abiotic and biotic stresses in *Citrus* and its related genera. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 113, p. 137-147, 2013.
- XIANG, C.; HAN, P.; OLIVER, D.J. *In solium* Selection for Arabidopsis Transformants Resistant to Kanamycin. **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v.17, p. 59-65, 1999.
- XIN, X.F.; HE, S.Y. *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* DC3000: A Model Pathogen for Probing Disease Susceptibility and Hormone Signaling in Plants. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 51, p. 473-498, 2013.
- YANG, Z.N.; INGELBRECHT, I.L.; LOUZADA, E.; SKARIA, M.; MIRKOV, T.E. Agrobacterium-mediated transformation of the commercially important grapefruit cultivar Rio Red (*Citrus paradisi* Macf.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, p. 1203-12011, 2000.
- ZHANG, J.; ZHOU, J.M. Plant Immunity Triggered by Microbial Molecular Signatures. **Molecular Plant**, Saint Paul, v.3, n.5, p.783-793, 2010.



**ANEXOS**



**ANEXO A - Soluções estoque do meio MT (MURASHIGE e TUCKER, 1969)**

<b>Macronutrientes</b>	<b>(50x) g.L<sup>-1</sup></b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	82,5
KNO <sub>3</sub>	95,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	18,5
KO <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0
<b>Cálcio</b>	<b>(50x) g.L<sup>-1</sup></b>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	22,0
<b>Micronutrientes</b>	<b>(100x) g.L<sup>-1</sup></b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,62
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	2,23
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,86
KI	0,083
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,025
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0025
<b>Ferro</b>	<b>(100x) g.L<sup>-1</sup></b>
NaEDTA	3,73
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,78
<b>Vitaminas</b>	<b>(100x) g.L<sup>-1</sup></b>
Thiamina-HCL	1,0
Pyridoxina-HCL	1,0
Ácido Nicotínico	0,5
Glicina	0,2
Inositol	10,0

**ANEXO B - Soluções estoque do meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962)**

<b>Macronutrientes</b>	<b>(50x) g.L<sup>-1</sup></b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	82,5
KNO <sub>3</sub>	95,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	18,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,5
<b>Cálcio</b>	<b>(50x) g.L<sup>-1</sup></b>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	22,0
<b>Micronutrientes</b>	<b>(100x) g.L<sup>-1</sup></b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,62
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	2,23
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,86
KI	0,083
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,025
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0025
<b>Ferro</b>	<b>(100x) g.L<sup>-1</sup></b>
NaEDTA	3,73
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,78
<b>Vitaminas</b>	<b>(100x) g.L<sup>-1</sup></b>
Thiamina-HCL	0,01
Pyridoxina-HCL	0,05
Ácido Nicotínico	0,05
Glicina	0,2

**ANEXO C -Meio de cultura YEP**

<b>YEP sólido</b>	<b>(g.L<sup>-1</sup>)</b>
Peptona	10,0
Extrato de Levedura	10,0
NaCl	5,0
Ágar	15,0

<b>YEP líquido</b>	<b>(g.L<sup>-1</sup>)</b>
Peptona	10,0
Extrato de Levedura	10,0
NaCl	5,0

**ANEXO D - Meio de cultura NA**

<b>NA líquido</b>	<b>(g.L<sup>-1</sup>)</b>
Extrato de Carne	1,0
Extrato de Levedura	2,0
Peptona	5,0
NaCl	5,0

**ANEXO E - Meio de cultura B de King**

<b>B de King</b>	<b>(g.L<sup>-1</sup>)</b>
Peptona	20,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 3H <sub>2</sub> O	1,5
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	5,0
Glicerol	10 ml
Ágar	18,0



**ANEXO F- Caldo Nutriente**

	<b>(g.L<sup>-1</sup>)</b>
Peptona	5,0
Extrato de carne	3,0
NaCl	1,0