



TRANSFORMAÇÃO DE LARANJA DOCE UTILIZANDO A TÉCNICA “FLORAL DIP”

DANIELE PASCHOAL¹; RODRIGO R. LATADO²; MAISA CURTOLO³

Nº 12.122

RESUMO

O presente estudo objetivou ajustar um método de transformação genética com uso de *A. tumefaciens* chamado “Floral dip” em laranjeira doce. O método originalmente proposto descrevia o cultivo de bactérias, seguido de ressuspensão em meio, contendo sacarose e agente surfactante, visando sua inoculação em flores imaturas para a obtenção de sementes transformadas. Foram utilizadas 10 plantas de uma variedade mutante de laranjeira doce chamada de x11, que possui como característica principal o florescimento precoce de plantas juvenis e a capacidade de florescer várias vezes ao ano. As plantas foram podadas várias vezes para a emissão de novas florações. Investigou-se os principais fatores que afetam a eficiência da transformação pelo método “Floral dip”: estágio de desenvolvimento dos botões florais; adição de sacarose e/ou surfactante no meio de ressuspensão e concentração da bactéria no meio de ressuspensão. Foram realizados 16 experimentos diferentes totalizando 257 flores tratadas. Apenas 29 flores resultaram em frutos desenvolvidos e, destes, 15 foram colhidos e tiveram suas sementes contadas e avaliadas por teste histoquímico de GUS. Os resultados demonstraram que o adjuvante não foi fitotóxico para as flores e nem para os frutos; as densidades óticas de *A. tumefaciens* iguais ou acima de 0,8 não foram muito tóxicas para as flores e para os frutos; a ressuspensão das bactérias e a inoculação em flores usando meio MS sem sacarose apresentou melhores resultados em comparação com o meio contendo sacarose; o tamanho das flores não afetou o pegamento. O teste histoquímico com x-Gluc demonstrou que mais de 30 sementes testadas nenhuma era transformada.

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Biotecnologia, UFSCar, Araras-SP, dani_paschoal21@hotmail.com.

² Orientador: Pesquisador, IAC- Centro de Citricultura Sylvio Moreira, Cordeirópolis-SP.

³ Colaborador: Graduação em Biotecnologia, UFSCar, Araras-SP.

ABSTRACT

The present study aimed to set up a genetic transformation method using *A. tumefaciens* system called "Floral dip" in sweet orange. Originally, the proposed method described the bacteria cultivation followed by resuspension in a medium containing sucrose and surfactant agent, in order to inoculate it into immature flowers and then, obtain transformed seeds. Ten plants of a sweet orange mutant variety called x11, whose major characteristics are the early flowering of juvenile plants and the ability to flowering several times a year, was used in this study. The plants were pruned several times in a period of one year to induce new blooms. We investigated the main factors affecting the transformation efficiency of the "Floral dip" method, as follows: Different size of the flowers; addition of sucrose and/or surfactant in resuspension medium; and concentration of bacteria in resuspension medium. Sixteen different experiments were performed with a total of 257 flowers treated. Only 29 of these flowers resulted in developed fruits. Fifteen fruits were harvested and their seeds were counted followed by evaluation of transformation by histochemical GUS test. The results showed the adjuvant was not phytotoxic neither to flowers nor to fruits, the *A. tumefaciens* optical densities equal to or above 0.8 were not very toxic to flowers and fruits, the bacteria resuspension and its inoculation in flowers using MS medium without sucrose showed better results when compared with medium containing sucrose; and the flower size did not affect the fixation of fruits. Histochemical test with X-gluc revealed that more than 30 seeds tested were all not transformed.

INTRODUÇÃO

Os métodos utilizados na produção de plantas geneticamente modificadas podem ser classificados como diretos e indiretos. Os métodos indiretos requerem a utilização de um vetor biológico para a introdução do DNA na planta. A transferência de genes mediada por *Agrobacterium* tem sido bastante empregada, em razão de sua conveniência e da alta probabilidade de integração de uma ou poucas cópias do gene introduzido (Santarém, 2000).

Usando esse sistema, já foram obtidas plantas transgênicas de laranja doce, entretanto a eficiência de transformação utilizando esse protocolo de regeneração ainda é baixa (Besbalhok et al., 2001).

A falta de metodologia de cultura de tecidos eficiente para as diversas cultivares de laranja doce utilizadas comercialmente no Brasil, tem dificultado o uso da tecnologia de transformação de plantas nessa cultura.

O método de infiltração a vácuo de *Agrobacterium* em tecidos foi desenvolvido como uma alternativa que possibilitava a transformação de plantas de *Arabidopsis* sem a necessidade de cultura de tecidos (Bechtold et al., 1993). Esta técnica foi originalmente desenvolvida para uso em plantas pequenas, de ciclo curto e que produzem grande número de sementes. A técnica consiste no uso de plantas em estágio de florescimento, que são retiradas do solo, infiltradas por completo em ambiente contendo vácuo e, a seguir, replantadas. A seleção de plantas transformadas era realizada nas sementes maduras, utilizando técnicas de seleção direta, com uso de gene reporter GUS ou GFP. Apesar de eficiente, este método não pode ser recomendado para plantas de maior tamanho, pela dificuldade de retirar a planta do solo e infiltrá-la.

Um método de transformação com *Agrobacterium* e sem a necessidade de infiltração foi proposto por Clough & Bent (1998), chamado de “Floral dip”. Este método é mais simples pois propôs o cultivo de bactérias em meio rico, seguido de centrifugação e ressuspensão em meio com pH ácido e contendo sacarose (5%) e substância surfactante (0,005%). Esta solução contendo as bactérias era adicionada a flores imaturas e resultava na obtenção de sementes transformadas numa frequência que variava entre 0,2 a 1,0% sem, portanto, o uso de cultura de tecidos e nem infiltração (Clough & Bent, 1998).

O ajuste do método de transformação “Floral dip” para variedades de laranja doce pode ser de interesse por possibilitar a ampliação das possibilidades do seu uso, além de possibilitar uma redução de custos, pelo não uso de cultura de tecidos.

No BAG-Citros do Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC encontra-se um acesso de laranjeira x11, um mutante induzido de laranjeira doce, que possui como característica principal o florescimento precoce de plantas juvenis e a capacidade de florescer várias vezes ao ano.

O objetivo deste projeto é ajustar um método eficiente de transformação genética de laranjeira doce x11 pelo método “floral dip”, visando testar diferentes tratamentos, para uso posterior em outras variedades de laranjeira doce e com o uso de genes de trangenese de maior interesse científico.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 10 plantas adultas da laranjeira doce x11 as quais foram podadas duas a duas, uma vez por semana. Os experimentos foram realizados no estágio de florescimento das laranjeiras x11, com a aplicação de solução de bactéria (*A. tumefaciens*) em flores imaturas, isto é, ainda não abertas.

Nestes experimentos o vetor (plasmídeo) usado foi o Pcambia 2301, que contém o gene de seleção que confere resistência ao antibiótico canamicina e gene repórter gene *uidA*, que confere cor azul as células transformadas quando na presença de solução x-Gluc.

Para iniciar os experimentos as bactérias foram previamente cultivadas em meio sólido LB suplementado com canamicina e rifampicina, por 48 horas. Após este período, uma única colônia foi transferida para frasco Erlenmeyer contendo 20 mL de meio LB líquido suplementado com canamicina e rifampicina, com incubação sob agitação de 180 rpm, 28°C por 16 horas, visando a multiplicação. A suspensão bacteriana foi centrifugada a 4 °C, 4000 rpm, por 6 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuspensionado em 20 mL de meio MS líquido, podendo conter ou não sacarose (um dos fatores do teste), o qual foi, em seguida, agitado (vórtex) para que a bactéria entrasse em suspensão.

A concentração da bactéria foi determinada por meio de leitura em espectrofotômetro de densidade ótica (DO), em comprimento de onda A600 e, em seguida, a densidade foi ajustada. Além disso, em alguns tratamentos foi adicionado o

surfactante silwet L-77 na concentração de 0,05%. Assim, em todos os experimentos foi inoculado 1 mL de solução bacteriana em cada botão floral de laranjeira x11.

Com a finalidade de investigar os principais fatores que afetam a eficiência da transformação com uso desta metodologia, foram testados diferentes tratamentos, tais como: a) estádios de desenvolvimento dos botões florais (flor pequena, média ou grande); b) presença ou ausência de sacarose no meio de ressuspensão da bactéria; c) presença ou ausência do surfactante no meio de ressuspensão (silwet L-77 0,05% v/v) e d) diferentes concentrações da bactéria no meio de ressuspensão (DO 0,4; 0,8 ou 1,0).

Após a realização dos cinco primeiros experimentos, percebeu-se a importância da realização de autofecundação das flores inoculadas com solução bacteriana, para ocorrer o pegamento dos frutos. Assim, após o quinto experimento, passou-se a realizar autofecundações nas flores inoculadas.

No decorrer deste estudo foram realizados 16 experimentos, sendo testados vários tratamentos. No final foram inoculadas 257 flores com tamanhos variando entre pequenas (P), médias (M) e grandes (G), com solução bacteriana.

Tabela 1. Descrição sucinta dos experimentos incluindo objetivos e tratamentos utilizados.

| Numero do experim. | Objetivo a ser testado | Tratamentos | Outras condições | Polinização das flores |
|--------------------|--|--|---|------------------------|
| 1 | Efeito do tamanho de flor | Flores pequenas, médias e grandes | Meio MS sem sacarose; D.O. 1,0 e sem Silwet | não |
| 2 | Efeito do D.O. da bactéria | D.O. 04 (T2) e 0,8 (T1) | Meio MS sem sacarose; sem Silwet e flores dos três tamanhos | não |
| 3 | Efeito do adjuvante | Com (CC) e sem (SC) adição de Silwet (0,05% v/v) | Meio MS sem sacarose; D.O. 0,8 e flores dos três tamanhos | não |
| 4 | Efeito da adição de sacarose no meio de ressuspensão | Com (T2) e sem (T1) adição de sacarose | Meio MS; D.O. 0,4 e sem Silwet | não |
| 5 | Efeito do tamanho de flor | Flores pequenas, médias e grandes | Meio MS com sacarose; D.O. 0,8 e com Silwet | não |
| 6 | Efeito da adição de sacarose no meio de ressuspensão | Com (F2) e sem (F1) adição de sacarose | Meio MS; D.O. 0,8 e com Silwet | sim |
| 7 | Efeito do tamanho de flor | Flores pequenas, médias e grandes (X1) | Meio MS sem sacarose; D.O. 1,0 e com Silwet | sim |
| 8 | Efeito do tamanho de flor | Flores pequenas, médias e grandes (C1) | Meio MS com sacarose; D.O. 0,8 e com Silwet | sim |
| 9 | Efeito do tamanho de flor | Flores pequenas, médias e grandes (C2) | Meio MS com sacarose; D.O. 0,8 e com Silwet | sim |
| 10 | Efeito do tamanho de flor | Flores pequenas, médias e grandes (C3) | Meio MS sem sacarose; D.O. 0,8 e com Silwet | sim |
| 11 | Efeito do tamanho de flor | Flores pequenas, médias e grandes (L1) | Meio MS sem sacarose; D.O. 0,4 e com Silwet | sim |
| 12 | Efeito do tamanho de flor | Flores pequenas, médias e grandes (L2) | Meio MS com sacarose; D.O. 0,4 e com Silwet | sim |
| 13 | Efeito do tamanho de flor | Flores pequenas, médias e grandes (Y) | Meio MS com sacarose; D.O. 0,1 e com Silwet | sim |
| 14 | Efeito do tamanho de flor | Flores pequenas, médias e grandes (D) | Meio MS com sacarose; D.O. 1,3 e com Silwet | sim |
| 15 | Efeito do tamanho de flor | Flores pequenas, médias e grandes (E) | Meio MS com sacarose; D.O. 1,0 e com Silwet | sim |
| 16 | Efeito do tamanho de flor | Flores pequenas, médias e grandes (H) | Meio MS sem sacarose; D.O. 0,8 e com Silwet | não |

Após 90 dias das inoculações foram avaliados o número de frutos pegos e, após os 150 dias, as sementes foram retiradas e contadas.

Em seguida, a testa e o tégmen das sementes foram retirados para uso em experimentos de identificação de sementes transformadas. As sementes foram colocadas em tubos falcon (15 mL), separadas por tratamento e submetidas à solução contendo x-Gluc. Para isto, primeiramente foram submetidas a condição de pressão negativa (vácuo) de 15 mm Hg, por uma hora, para facilitar a penetração da solução x-Gluc. Em seguida, as sementes foram mantidas a uma temperatura de 37°C, por 24 horas, antes da avaliação da presença de sementes transformadas. A reação foi inativada com a adição de o dobro de volume de etanol 100%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os frutos desenvolvidos a partir das flores inoculadas com *Agrobacterium tumefaciens* ressuspensa em meio MS foram contados. Das 257 flores inoculadas, apenas 29 resultaram em frutos, o que demonstra o efeito tóxico da *Agrobacterium* para as flores de laranjeira. Assim, a taxa média de frutos pegos foi de 11,3% neste estudo.

Nos experimentos 1, 3, 5, em que não foram realizadas polinizações, e nos experimentos 6, 12 e 13, em que foram realizadas polinizações, não foi obtido nenhum fruto, em nenhum tratamento. Na tabela 2 estão citados os resultados de número de frutos pegos em cada experimento.

Tabela 2. Frutos pegos a partir de flores inoculadas com bactéria ressuspensa em meio MS.

| Experimentos | Frutos (tratamentos) |
|--------------|---|
| Exp 2 | T1(G) |
| Exp 4 | T1 (P) T2 (P) |
| Exp 7 | X1 (P) X1 (M) |
| Exp 8 | C1 (P) |
| Exp 9 | C2 (M) |
| Exp 10 | C3 (P) C3 (P) C3 (M) C3(G) |
| Exp 11 | L1 (P) L1 (P) L1 (M) L1 (G) |
| Exp 14 | D (P) D (P) D (P) D (P) D (M) D (M) D (M) D (G) D (G) |
| Exp 15 | E (P) |
| Exp 16 | H (P) H (P) H (M) H (G) |

- (P) flor pequena; (M) flor média e (G) flor grande.

Com os resultados obtidos foram possíveis tirar algumas conclusões interessantes: a) O adjuvante Silwet, na concentração usada (0,05% v/v), não foi fitotóxico para as flores e nem para os frutos pois nos experimentos 7 ao 16 foram obtidos vários frutos; b) As densidades óticas de *A. tumefaciens* iguais ou acima de 0,8 (0,8, 1,0 e 1,3) não foram muito tóxicas para as flores e para os frutos (experimentos 14 ao 16); c) A ressuspensão das bactérias e a inoculação em flores usando meio MS sem sacarose apresentou melhores resultados em comparação com o meio contendo sacarose, para fins de pegamento de flores e frutos (experimentos 10, 11 e 16) e d) o tamanho das flores (pequena, média ou grande) não impediu o

pegamento das mesmas após a aplicação da solução contendo bactérias (experimentos 7 ao 16).

Os frutos maduros foram colhidos e suas sementes foram extraídas. Os frutos dos experimentos 14, 15 e 16 ainda não foram colhidos já que ainda não se encontram no estágio de maturação adequado. Pode-se verificar os resultados obtidos na Tabela 3.

Tabela 3. Número e tipo de sementes obtidas por fruto, em frutos obtidos a partir de flores inoculadas com bactérias ressuspensas em meio MS.

| Tratamentos | Número de sementes bem desenvolvidas | Número de sementes chochas |
|-------------|--------------------------------------|----------------------------|
| T1 (G) | 0 | 0 |
| T1 (P) | 5 | 4 |
| T2 (P) | 5 | 1 |
| X1 (P) | 2 | 5 |
| X1 (M) | 2 | 2 |
| C1 (P) | 3 | 3 |
| C2 (M) | 3 | 1 |
| C3 (P) | 5 | 1 |
| C3 (P) * | 1 | 0 |
| C3 (M) | 7 | 5 |
| C3 (G) * | 1 | 4 |
| L1 (P) * | 0 | 0 |
| L1 (P) * | 0 | 0 |
| L1 (M) | 4 | 0 |
| L1 (G) * | 0 | 0 |

* frutos muito pequenos, isto é, ainda não maduros.

Os resultados da tabela 3 também possibilitaram tirar algumas conclusões: a) a ressuspensão das bactérias e a inoculação em flores usando meio MS sem sacarose apresentou melhores resultados em comparação com o meio contendo sacarose, para fins de produção de sementes bem desenvolvidas (tratamentos X1, C3 e L1) e b) o tamanho das flores (pequena, média ou grande) não impediu a produção de sementes bem desenvolvidas após a aplicação da solução contendo bactérias.

O teste histoquímico com x-Gluc demonstrou que todas as sementes não eram

transformadas. Este resultado indica que a bactéria não conseguiu romper as barreiras físicas do ovário e nem das anteras, de modo a poder colonizar óvulos e/ou grãos de pólen e poder transferir o T-DNA a estas células germinativas.

A observação da existência de sementes sem qualquer setor transformado nos cotilédones (cotilédones com setores com cor azul) indica que também não houve penetração nos tecidos adjacentes ao óvulo. Caberia apenas observar a polpa e flavedo de frutos para verificar se a *A. tumefaciens* consegue penetrar nos tecidos mais externos do ovário.

Como resultado final, descartamos o uso desta técnica de transformação genética chamada de *Floral dip* para laranjeiras doces, sem que sejam feitos ajustes bem drásticos visando aumentar sua eficiência.

CONCLUSÃO

A técnica de transformação genética testada, chamada de *Floral dip*, não possibilitou a obtenção de nenhuma planta transgênica de laranjeira doce e nem a transformação parcial de sementes.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.

Ao, IAC- Centro de Citricultura Sylvio Moreira e ao Orientador Rodrigo Rocha Latado pela oportunidade de estágio.

REFERÊNCIAS

- BECHTOLD, N.; ELLIS, J.; PELLETIER, G.. *In planta Agrobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult Arabidopsis thaliana plants*. C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences, 316, p. 1194–1199, 1993.
- BESPALHOK FILHO, J. C.; KOBAYASHI, A. K.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E.. Transformação de laranja visando resistência ao cancro cítrico usando genes de peptídeos antibacterianos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, nº 23, Nov/dez, p. 62-66, 2001.



- CLOUGH, S. J.; BENT, A. F.. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal, 16, p. 735-743, 1998.
- SANTARÉM, E. R. Métodos eficientes para a transformação genética de plantas. Revista Ciência e Tecnologia, 15, p. 81-90, 2000.