



PLANTAS TRANSGÊNICAS DE CITROS LIVRES DE MARCADORES SELETIVOS

Maria Clara da Costa **Teixeira**¹; Marcos Antonio **Machado**²; Raquel Luciana **Boscariol-Camargo**³

Nº 22129

RESUMO – A transformação genética em plantas visa a produção de espécies resistentes aos estresses bióticos e abióticos que afetam a produção, e, consequentemente, a agricultura como um todo. Neste trabalho, explantes de laranja doce Hamlin e Valência, e de citrange Carrizo foram transformados por *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando o vetor pRCNG, objetivando a aplicação de uma tecnologia “marker-free” para a excisão do gene seletivo remanescente da transformação genética, indesejável após a identificação e obtenção dos transformantes, pois dificulta os trâmites para liberação comercial e a aceitação do público. Para isso, segmentos dos brotos transformados foram colocados em agitação durante sete horas em meio de cultura MS contendo dexametasona (1mM), para a indução das recombinases presentes no vetor de expressão e consequente remoção do *nptII*, gene de resistência ao antibiótico canamicina. Ao fim desse processo, foram plaqueados em meio MS contendo 5-fluorocitosina (12,5 mg. L⁻¹) e cefotaxima (250 mg. L⁻¹), permanecendo nesse meio até regeneração de novas plântulas. Amostras histológicas foram coletadas e colocadas em contato com X-Gluc, 37°C, por 16 horas, a fim de realizar o teste histoquímico de Gus, para a confirmação da remoção do gene seletivo. A eficiência de transformação e de regeneração após tratamento com dexametasona foram avaliadas. Foram obtidas 11 plantas transformadas da variedade Hamlin e 23 de Carrizo. A excisão do gene seletivo foi confirmada também por PCR em 9 plantas de Carrizo, que apresentou melhor desempenho nos parâmetros avaliados, com 8,6% de eficiência de transformação enquanto Hamlin foi de 1,3%. Este é o primeiro trabalho em citros a usar esta tecnologia de remoção de marcador seletivo.

Palavras-chaves: transformação genética, remoção de marcador, gene seletivo, *Agrobacterium*

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Ciências Biológicas, FHO, Araras-SP; claratxera@gmail.com

2 Colaborador: Pesquisador do Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, Cordeirópolis-SP.

3 Orientadora: Pesquisadora do Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, Cordeirópolis-SP; raquel@ccsm.br.



ABSTRACT – *Genetic transformation in plants aims to produce species resistant to biotic and abiotic stresses that affect production and, consequently, agriculture. In this work, explants of Hamlin and Valencia sweet orange and Carrizo citrange were transformed by Agrobacterium tumefaciens, using the pRCNG vector, aiming at the application of a marker-free technology for the excision of the selective gene remaining from the undesirable genetic transformation after identification and obtaining of transformants, as it hampers the procedures for commercial release and public acceptance. For that, segments of the transformed shoots were placed in agitation for seven hours in MS culture medium containing dexamethasone (1mM), for the induction of the recombinases present in the expression vector and consequent removal of the nptII, gene of resistance to the antibiotic kanamycin. At the end of this process, they were plated in MS medium containing 5-fluorocytosine (12.5 mg. L⁻¹) and cefotaxime (250 mg. L⁻¹), remaining in this medium until the regeneration of new seedlings. Histological samples were collected and placed in contact with X-Gluc, 37°C, for 16 hours, to perform the Gus histochemical test to confirm the removal of the selective gene. Transformation and regeneration efficiency after dexamethasone treatment were evaluated. Eleven transformed plants from the Hamlin variety and 23 from Carrizo were obtained. The selective gene excision was also confirmed by PCR in 9 Carrizo plants, which showed better performance in the evaluated parameters, with 8.6% of transformation efficiency while Hamlin was 1.3%. This is the first work to use this selective marker removal technology in citrus.*

Keywords: *genetic transformation, marker-free, selective gene, Agrobacterium*