



## ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO TRANSGENE DREB EM PORTA-ENXERTOS DE CITROS

Marcelle Balduino de **Almeida**<sup>1a</sup>; Raquel Luciana Boscarol **Camargo**<sup>1b</sup>;

<sup>1</sup> Instituto Agronômico de Campinas, Centro de Citricultura Sylvio Moreira

Nº 13123

**RESUMO** – O objetivo deste trabalho foi analisar o perfil de expressão do transgene DREB em plantas transformadas, por meio de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), para confirmar se houve a superexpressão do gene. O gene clonado usado na transformação genética é homólogo ao fator de transcrição DREB (“dehydration responsive element binding”) que está envolvido na resposta da planta ao estresse hídrico. A primeira parte deste projeto consistiu na coleta do material vegetal das plantas transgênicas das variedades de porta-enxertos citrumelo Swingle (*Citrus paradisi* Macfad. cv Duncan x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) e tangerina Cleópatra (*Citrus reshni* Hort. ex Tanaka) para extração do RNA. O RNA total foi extraído com o reagente QIAzol (Qiagen) e tratado com DNaseI (Promega). Após este tratamento, foi feita a quantificação e síntese do cDNA. A segunda parte do projeto consistiu na avaliação da expressão gênica no PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). Os ensaios foram conduzidos no aparelho ABI PRISM 7500 Fast Sequence Detection System (Applied Biosystem) através do sistema SYBR-green de detecção. O perfil de expressão das plantas transgênicas foi comparado com uma planta controle não transformada e assim foi possível confirmar a superexpressão em catorze delas. As plantas selecionadas estão sendo propagadas por estaca e serão avaliadas sob condições de estresse hídrico.

**Palavras-chaves:** Superexpressão, RT-qPCR, transformação genética, estresse hídrico

<sup>a</sup> Bolsista CNPq: Graduação em Biotecnologia, UFSCar, Araras – SP, mbabiotec@gmail.com, <sup>b</sup>Orientador



**ABSTRACT** - *The objective of this work was to analyze the profile of transgene expression in transformed DREB plants through real time quantitative PCR (RT-qPCR) to confirm the overexpression of the gene. The cloned gene used in genetic transformation is homologous to the transcription factor DREB ("dehydration responsive element binding") that is involved in plant response to water stress. The first part of this project consisted in to collect plant tissue from transgenic rootstocks Swingle citrumelo (*Citrus paradisi* Macfad. cv Duncan x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) and Cleopatra mandarin (*Citrus reshni* Hort. Ex Tanaka) to proceed the RNA extraction. The RNA was extracted using QIAzol reagent (Qiagen) and treated with DNaseI (Promega). After this treatment the RNA was quantified before the cDNA synthesis. The second part of this work was to analyze the gene expression in the real-time quantitative PCR (RT-qPCR). The assays were conducted in the Fast ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems) using SYBR-green. The expression profile of transgenic plants was compared with a non-transformed plant and it was possible to confirm the overexpression in fourteen of them. The selected plants are being propagated by cuttings and will be evaluated under water stress conditions.*

**Key-words:** Overexpression, RT-qPCR, genetic transformation, water stress

## 1 INTRODUÇÃO

Entre os estresses abióticos, a seca é considerada o de maior efeito sobre a produtividade agrícola, sendo o fator que rege a distribuição das espécies no mundo (KRAMER & BOYER, 1995; XU et al., 2007). Sendo a citricultura brasileira conduzida praticamente sem irrigação, o desenvolvimento de novos porta-enxertos tolerantes à seca em substituição ao limoeiro Cravo torna-se essencial. O porta-enxerto interfere em alguns fatores na variedade copa como crescimento, tamanho, precocidade de produção, produtividade, coloração da casca e dos frutos, teor de açúcares e de ácidos, tolerância à salinidade, à seca e ao frio, e a estresses bióticos. (POMPEU JUNIOR, 2005).

O uso de fatores de transcrição já foi relatado para obtenção de resistência aos estresses abióticos e bióticos. Shinozaki et al. (2003) relatam que estes fatores são fundamentais para a regulação dos genes, pois interagem com elementos cis presentes nos promotores. Por exemplo, os fatores de transcrição DREB (Dehydration Responsive Element Binding) interagem com C-repeats/DRE (A/GCCGAC) e tem um papel importante no controle da expressão de genes induzidos por seca e/ou frio, sendo independentes da via do ácido abscísico (ABA). Alguns



## VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

exemplos da super-expressão de genes *DREB* em plantas indicam um aumento na tolerância à seca, salinidade e frio (WANG et al., 2008, LIU et al., 2008).

A partir da identificação e caracterização de um gene homólogo a *DREB* (*CitDREB*) no genoma de citros (*Citrus sinensis*) foi construído um vetor binário contendo este gene sob o controle do promotor constitutivo CaMV35. Este vetor foi utilizado para transformação genética de duas variedades de porta-enxertos: citrumelo Swingle e tangerina Cleópatra, visando à incorporação de maior resistência à deficiência hídrica.

Após a obtenção das plantas transformadas é necessário confirmar se o gene inserido está sendo altamente expresso. Assim, o objetivo do presente trabalho foi analisar o perfil de expressão do transgene através de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) para selecionar as plantas com superexpressão para posteriores testes em condição de estresse hídrico.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

Um total de 17 plantas transgênicas contendo o gene *CitDREB*, das variedades citrumelo Swingle [*Citrus paradisi* Macfad. cv Duncan X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] e tangerina Cleópatra (*Citrus reshni* Hort. ex Tanaka) que estão mantidas na casa de vegetação do Centro de Citricultura Sylvio Moreira foram utilizadas para a avaliação de expressão do transgene.

### Extração de RNA e preparo do cDNA

O RNA das plantas transformadas foi extraído das folhas com o reagente QIAzol (Qiagen) e posteriormente foi tratado com DNaseI (Promega) para remoção de DNA contaminante. Cada amostra de RNA foi quantificada no aparelho Nanodrop antes do preparo do cDNA. Após quantificados, 1 µg do RNA foi utilizado para a síntese do cDNA, na reação: 13 µl (1 µg) de RNA, adicionado de 1 µl de Oligo (dT) primer, foi deixado 5 minutos a 70°C e 5 minutos no gelo e posteriormente foi adicionado: 6 µl do tampão 5X, 3,6 µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1,5 µl de DNTPs (10 mM), 1,5 µl da enzima Impron RT, 0,75 µl de RNase OUT e 2,65 µl de H<sub>2</sub>O DEPC. Esta reação foi mantida no termociclador a 25°C por 5 minutos, 42°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos.



## VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

### Expressão gênica (Real Time-PCR)

Para o PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) os ensaios foram conduzidos no aparelho ABI PRISM 7500 Fast Sequence Detection System (Applied Biosystem) através do sistema SYBR-green de detecção (WITTWER et al., 1997).

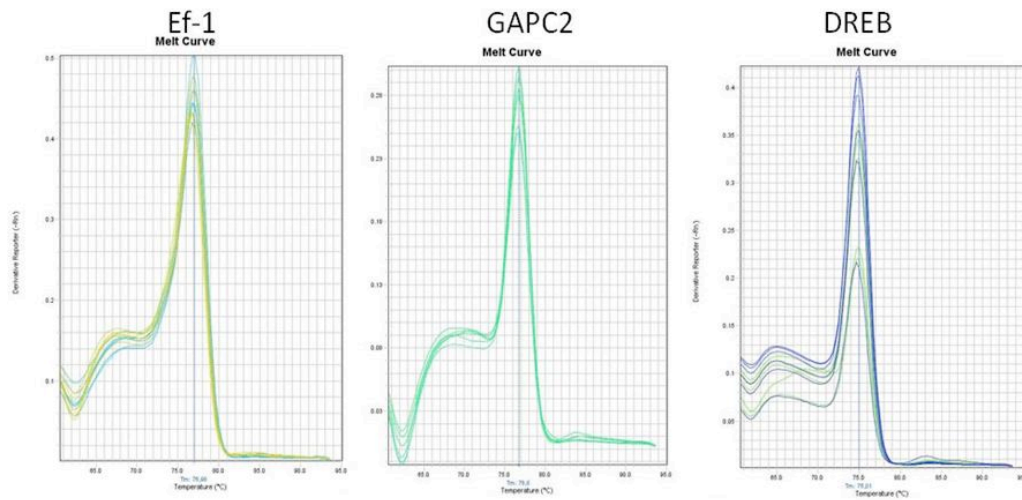
A amplificação por PCR foi feita com um volume final de 25 µl, utilizando 12,5 µL SYBR® Green PCR Master Mix (Promega), cDNA obtido a partir de 1 µg de RNA purificado e 0,75 µl (5 µM) de cada primer (direto e reverso). As reações foram realizadas seguindo o ciclo de 50°C por 2 min, 10 min a 95°C e 40 ciclos de 15s a 95°C e 1 min a 60°C. As amplificações foram feitas em duplicatas utilizando sempre controle sem cDNA para detectar possíveis contaminações e o controle negativo (planta não-transformada). Dois pares de primers foram utilizados para os controles endógenos (Ef-1 e GAPC2) e um para o gene em estudo. Estes primers foram testados primeiramente para verificação de sua especificidade na reação no RT-qPCR descrita acima.

Para normalizar as amostras de possíveis diferenças na concentração de cDNA, foram utilizados dois controles endógenos. Uma reação prévia apenas com os controles endógenos foi feita para normalizar o Ct (primeiro ciclo de amplificação em que a fluorescência emitida do produto de PCR é detectada acima do 'threshold'). Para normalização foi utilizada a seguinte equação:  $\Delta Ct = Ct(\text{gene alvo}) - Ct(\text{controle endógeno})$ . O nível de expressão do gene alvo foi calculado através da equação:  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{amostra}) - \Delta Ct(\text{calibrador})$ . O calibrador é o valor obtido para uma amostra específica, sendo feita a seguir a quantificação relativa das amostras.

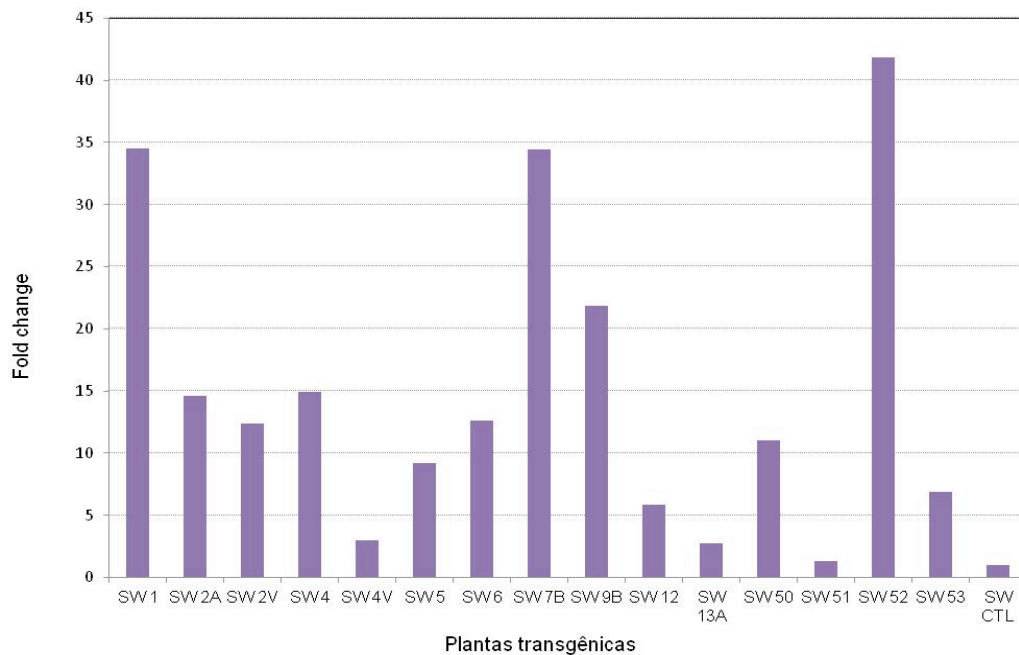
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A validação dos primers mostrou sua especificidade de amplificação ao alvo, pois resultou um único sinal de amplificação, não havendo produto inespecífico para os primers Ef-1, GAPC2, e CitDreb, após análise da curva de dissociação (Figura 1). Assim, estes primers puderam ser utilizados nas análises de expressão em todas as plantas.

A partir das análises dos dados obtidos por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), observou-se um aumento na expressão da maioria das plantas transgênicas em relação à planta não transformada (Figuras 2 e 3). A expressão da planta não transformada (controle) se refere à expressão do gene DREB endógeno de cada espécie.



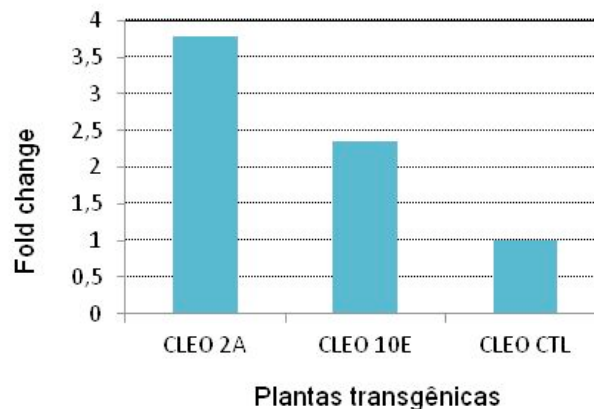
**Figura 1** - Curva de dissociação no teste de amplificação dos primers para os controles endógenos e gene *CitDREB*.



**Figura 2.** Expressão do gene *CitDreb* em plantas transgênicas de citrumelo Swingle (SW 1 a 53). SW CTL = planta controle (não transformada).



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013  
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo



**Figura 3.** Expressão do gene *CitDreb* em plantas transgênicas de tangerina Cleópatra (Cleo 2A e 10E). CLEO CTL = planta controle (não transformada).

Dentre as dezessete plantas em estudo foram selecionadas catorze plantas que apresentaram uma expressão maior quando comparada ao seu controle, sendo que quatro apresentaram um aumento da expressão acima de vinte vezes (Figura 2). A expressão de plantas de Cleópatra foi um pouco menor que em Swingle, mas as plantas transgênicas também apresentaram valores superiores ao controle e, portanto, estão superexpressando o transgene (Figura 3). Espera-se que essa maior expressão torne estas plantas mais tolerantes ao estresse hídrico, o que será avaliado em futuros experimentos.

Algumas plantas apresentaram uma expressão menor do gene em comparação ao controle, o que pode ser causado por silenciamento, local de inserção do transgene, número de cópias inserido, entre outros. Isso já foi relatado anteriormente em citros por Zhang et al. (2010) e Yang et al. (2011).

#### 4 CONCLUSÃO

As plantas transgênicas contendo o gene *CitDREB* apresentaram alta expressão do transgene. A metodologia de avaliação utilizada (RT-qPCR) permitiu identificar níveis de expressão variando de 2 a mais de 40 vezes em relação ao controle, comprovando a superexpressão do transgene em estudo. Catorze plantas puderam ser selecionadas para serem multiplicadas e avaliadas em experimentos com déficit hídrico. Estes experimentos comprovarão se estas plantas serão mais tolerantes ao estresse hídrico.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013  
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

## 5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.

Ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, pela oportunidade de estágio.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Kramer, P. J.; Boyer, J. S. **Water relations of plants and soils**. San Diego: Academic, 1995. 495p.

Liu, L.; Zhu, K.; Yang, Y.; Wu, J.; Chen, F. e Yu, D. Molecular cloning, expression profiling and trans-activation property studies of a DREB2-like gene from chrysanthemum (*Dendranthema vestitum*). **Journal of Plant Research**, v.121, ed.2, p.215–226, 2008.

Pompeu Júnior, J. Porta-enxertos. In: Mattos Junior, D.; De Negri, J. D.; Pio, R. M.; Pompeu Júnior, J. (Org.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico/FUNDAG, p. 63-104, 2005.

Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Seki, M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, v.6, p.410–417, 2003.

Wang, Q.; Guan, Y.; Wu, Y.; Chen, H.; Chen, F.; Chu, C. Overexpression of a rice OsDREB1F gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both *Arabidopsis* and rice. **Plant Molecular Biology**, v.67, p.589–602, 2008.

Wittwer, C. T.; Herrmann, M. G.; Moss, A. A.; Rasmussen, R. P. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. **Biotechniques**, v.22, n.1, p.130-1, 134-8, 1997.

Xu, C.; Jing, R.; Mao, X.; Jia, X.; Chang, X. A wheat (*Triticum aestivum*) protein phosphatase 2A catalytic subunit gene provides enhanced drought tolerance in tobacco. **Annals of Botany**, v. 99, p. 439-450, 2007.

Yang L, Hu C, Li N, Zhang J, Yan J, Deng Z. Transformation of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] with pthA-nls for acquiring resistance to citrus canker disease **Plant Molecular Biology**, 75:11–23, 2011.

Zhang, X.; Francis, M.I.; Dawson, W.O.; Graham, J.H.; Orbovic´,V.; Triplett, E.W.; Mou, Z. Over-expression of the *Arabidopsis* NPR1 gene in citrus increases resistance to citrus canker. **European Journal of Plant Pathology**, 129: 91-100, 2010.