



# Laranja TRANSGÊNICA

Transformação de laranja visando resistência ao cancro cítrico usando genes de peptídeos antibacterianos



Brasil é o maior produtor mundial de laranja, com 355 milhões de caixas produzidas em 2000/01, o que corresponde a cerca de 30 % da produção mundial. Além disso, o país é responsável por, aproximadamente, metade da produção mundial de suco concentrado (61° Brix), um dos principais produtos agrícolas exportados pelo Brasil. O volume de recursos movimentados pelo agronegócio citrícola supera R\$ 5 bilhões por ano, gerando cerca de 400 mil empregos diretos, somente no estado de São Paulo, o maior produtor do Brasil.

A citricultura nacional apresenta vários problemas fitossanitários, entre os quais se destacam a larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*), a pinta preta (doença fúngica provocada por *Guignardia citricarpa*), a clorose variegada dos citros (CVC, causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*) e o

cancro cítrico (causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*).

## Cancro cítrico

O cancro cítrico tem provocado grandes prejuízos tanto no Brasil como em outros países produtores de citros. Essa doença afeta toda a parte aérea da planta, causando lesões em frutos, folhas e ramos (Figura 1). Os frutos ficam depreciados e caem precocemente, reduzindo a produção da planta. As portas de entrada para a bactéria do cancro são ferimentos em folhas causados pelo vento ou pelo ataque da larva minadora dos citros.

O controle do cancro cítrico tem sido realizado através de medidas para prevenir a introdução da bactéria e da erradicação das plantas contaminadas. Para isso, são realizadas por agências fiscalizadoras, inspeções periódicas em pomares comerciais e domésticos. As plantas cítricas contaminadas, bem

**João Carlos Bernaldo Filho**  
IAPAR, Laboratório de Biotecnologia,  
bernaldo@iapar.br

**Adilson Kenji Kobayashi**  
IAPAR, Laboratório de Biotecnologia,  
adilson@sercomtel.com.br

**Luiz Filipe Protásio Pereira**  
IAPAR, Laboratório de Biotecnologia,  
lpereira@pr.gov.br

**Luiz Gonzaga Esteves Vieira**  
IAPAR, Laboratório de Biotecnologia,  
lvieira@pr.gov.br

Fotos cedidas pelos autores



**Figura 1.** Frutos de laranja apresentando sintomas de cancro cítrico (Foto gentilmente cedida pelo Dr. Rui Pereira Leite)

**Figura 2.** Expressão do gene marcador *gus* em plantas transgênicas de laranja Pêra



como as não contaminadas, num raio de 30 metros, são cortadas e incineradas. Somente no ano de 1999, foram gastos cerca de R\$ 33 milhões na erradicação de pomares infectados nos Estados de São Paulo e Minas Gerais.

Entretanto, a presença e o progresso epidêmico do cancro cítrico em diversas regiões produtoras de citros ao redor do mundo, e a sua recente introdução e reintrodução em vários países têm levantado dúvidas quanto à eficiência da adoção exclusiva de medidas para impedir a sua introdução em novas áreas e para a erradicação completa da doença em regiões onde ela foi introduzida (Leite, 1990).

O desenvolvimento de variedades cítricas agronomicamente aceitáveis com adequado nível de resistência, é ainda a forma mais econômica e eficiente de controlar o cancro cítrico. Entretanto, o melhoramento de citros é um processo longo, principalmente pelos aspectos botânicos desse gênero. Grande parte das espécies apresenta poliembrião e longo período juvenil, o que dificulta a seleção de genótipos por hibridação. A obtenção de uma nova variedade é um processo que leva em média 30 anos. Os principais avanços têm sido obtidos pela seleção de mutações naturais.

Frente a esses problemas, a transformação genética da laranja mos-

tra-se como uma estratégia de melhoramento muito promissora, podendo ser utilizada para a introdução de novas características em variedades elite, reduzindo o tempo necessário para o lançamento de novos cultivares.

### Transformação genética de citros

Plantas transgênicas de citros já foram obtidas por meio da introdução direta de DNA em protoplastos (Vardi et al., 1990); por co-cultivo de segmentos internodais ou de epicótilo com *Agrobacterium* (Moore et al., 1992; Kaneyoshi et al., 1994; Peña et al., 1995; Gutiérrez et al., 1997; Cervera et al., 1998), e por bombardeamento de partículas em suspensões embriogênicas de nucelo (Yao et al., 1996). Atualmente, o método mais utilizado de transformação genética em citros é a transformação mediada por *Agrobacterium*, utilizando-se segmentos de epicótilo de 1 cm como explantes. Usando esse sistema, já foram obtidas plantas transgênicas de laranja doce (*C. sinensis*) (Peña et al., 1995; Bond & Roose, 1998), *C. aurantifolia* (Peña et al., 1997), *C. aurantium* (Gutiérrez et al., 1997), Carrizo citrange (*C. sinensis* X *Poncirus trifoliata*; Moore et al., 1992), *P. trifoliata* (Kaneyoshi et al., 1994) e grapefruit (*C. paradisi*; Luth & Moore, 1999).

Entretanto, a eficiência de transformação utilizando esse protocolo de regeneração ainda é baixa. Isso se deve, principalmente, ao pequeno número de brotos obtidos por explante e ao grande número de escapes. Além disso, as plantas transgênicas obtidas por esse sistema são juvenis, sendo necessário vários anos para que se possa avaliar algumas de suas características comerciais (produtividade, qualidade de fruto etc). Com vistas a contornar esse problema, Cervera et al. (1998) utilizaram internódios de plantas maduras de laranja doce cultivar Pineapple como explantes para transformação, conseguindo que as plantas transgênicas florescessem após 14 meses.

A falta de técnicas adequadas de cultura de tecidos de cultivares de laranja doce adaptados às nossas condições agroecológicas tem dificultado o uso da tecnologia de transformação de plantas nessa cultura. Visando a minimizar esse problema, o Laboratório de Biotecnologia Vegetal do IAPAR desenvolveu novos protocolos de regeneração de laranja doce Pêra, usando segmentos finos transversais tanto de tecidos juvenis (Bespalhok et al., 2001) quanto de maduros (Kobayashi et al., 2001). Esses novos protocolos permitem a transformação de laranja, tanto através de *Agrobacterium tumefaciens* como também via biobalística. Essa metodologia foi utilizada em experimentos preliminares para a otimização do sistema de transformação, utilizando o plasmídeo pBE2113, que contém o gene *gus* sob controle de promotores constitutivos (Figura 2).

### Uso de peptídeos antibacterianos

Várias estratégias têm sido utilizadas para aumentar a resistência de plantas a doenças bacterianas através da engenharia genética. Entre essas estratégias destacam-se: a produção de peptídeos antibacterianos, a inibição de fatores de virulência e o aumento das defesas naturais e morte celular programada no local da infecção (Mourgues et al., 1998).

Todos os organismos superiores possuem sistemas de proteção contra infecções por microorganismos. Os insetos possuem um eficiente sistema de defesa contra bactérias e outros parasitas. Esse sistema, que foi bastante estu-



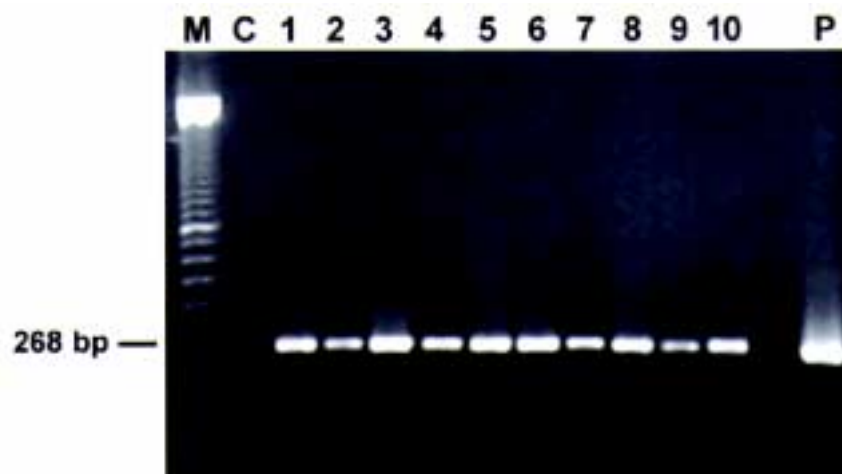
**Figura 3.** Construção usada nos experimentos de transformação

dado em *Hyalophora cecropia*, é responsável pela produção de peptídeos com potente atividade antibacteriana, tais como as cecropinas.

Cecropinas pertencem a uma família de pequenos peptídeos, isolados da hemolinfa de insetos, que exibem atividade lítica e antibactericida contra muitas bactérias gram-positivas e gram-negativas (Boman & Hultmark, 1987). Estruturalmente, esses peptídeos têm uma região N-terminal bastante básica e uma longa seqüência hidrofóbica na região C-terminal. Essas características são necessárias para a ação antibacteriana das cecropinas através da formação de canais nas membranas, provocando o vazamento de componentes celulares e, conseqüentemente, a morte da bactéria (Christensen et al., 1988).

Vários trabalhos de transformação de espécies vegetais com peptídeos antibacterianos foram publicados nos últimos anos. Batata e fumo foram as espécies mais utilizadas, principalmente pela facilidade de cultura de tecidos e a importância das bacterioses. Montanelli & Nascari (1991) transformaram batata com um gene responsável pela produção de cecropina e encontraram resultados positivos contra *Ralstonia solanacearum* em testes preliminares *in vitro* com extratos de plantas transgênicas. Jaynes et al. (1993), utilizando o gene Shiva-1 (um análogo sintético da cecropina), controlado pelo promotor do inibidor de proteinase II de batata, obtiveram alta expressão em plantas transgênicas de fumo que mostraram um aumento de resistência a *R. solanacearum*. Por outro lado, Florack et al. (1995) transformaram fumo com genes de cecropina B, mas não conseguiram aumentar a resistência dessa espécie contra *R. solanacearum* e *P. syringae* pv. *tabaci*. A rápida degradação da cecropina por proteases endógenas foi apontada como responsável pela baixa detecção do peptídeo nas plantas transgênicas, apesar da correta transcrição do gene inserido. Também, Hightower et al. (1994) não conseguiram aumentar a resistência de plantas de fumo a *P. syringae* pv. *tabaci* com a introdução de um gene quimérico de cecropina A/B.

Além das cecropinas, outros tipos de peptídeos têm sido utilizados em plantas com vistas a controlar doenças bacterianas. Norelli et al. (1994) observaram que plantas transgênicas de maçã



**Figure 4.** Análise de PCR de plantas transgênicas de laranja Pêra. O DNA foi isolado de folhas e amplificado com primers específicos para o gene da sarcotoxina dando um produto de 268 pb. Coluna M, marcador 100 pb; coluna C, controle negativo, laranja Pêra não transformada; colunas 1-10, plantas transgênicas; coluna P, plasmídeo PST10

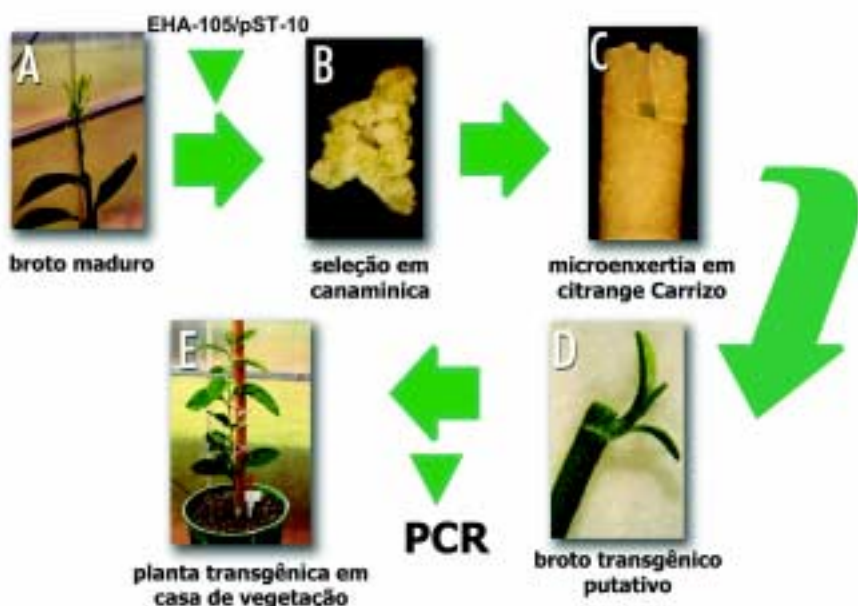
expressando o gene da atacina E mostraram maior resistência a *Erwinia amylovora*. Plantas transgênicas de batatas com resistência a *Erwinia amylovora* foram obtidas por Düring et al. (1993) através da inserção do gene da lisozima do bacteriófago T4.

Os resultados até agora relatados na literatura indicam que a transformação com peptídeos antibacterianos tem grande potencial para ser usada no melhoramento vegetal, principalmente através do uso de construções gên-

cas capazes de expressar esses peptídeos extracelularmente e, também, pela modificação desses peptídeos visando a conseguir a sua maior estabilidade frente à degradação por proteases endógenas.

### Sarcotoxina

A sarcotoxina é um peptídeo antibacteriano isolado de larvas de *Sarcophaga peregrina* pelo grupo do Dr. Natori, Universidade de Tóquio (Japão).



**Figura 5.** Processo de obtenção de plantas transgênicas de laranja Pêra a partir de tecido maduro

Esse peptídeo possui 39 aminoácidos e pertence ao grupo das cecropinas. Em estudos *in vitro*, a sarcotoxina mostrou-se altamente eficiente na inibição do crescimento de algumas bactérias causadoras de doenças em plantas, especialmente para *X. axonopodis* pv. *citri* (Ohshima et al., 1999).

A expressão da sarcotoxina em plantas de tabaco sob controle de um promotor constitutivo aumentou a resistência a duas bactérias fitopatogênicas: *P. syringae* pv. *tabaci* e *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ohshima et al., 1999). Também, plantas de tabaco transformadas com o gene da sarcotoxina sob o controle de um promotor induzido por ácido salicílico (PR1a) apresentaram um aumento na resistência tanto a bactérias fitopatogênicas como a fungos *Rhizoctonia solani* e *Pythium aphanidermatum* (Mitsuhara et al., 2000).

Apesar de ainda serem necessários mais estudos sobre a segurança alimentar da sarcotoxina, resultados recentes mostram que a sarcotoxina tem pouca ação sobre microrganismos benéficos que fazem parte da flora intestinal humana (Mitsuhara et al., 2001).

### Transformação de citros com o gene da sarcotoxina

A obtenção de plantas transgênicas de laranja doce de cultivares plantados no Brasil com o gene da sarcotoxina é uma estratégia muito promissora para aumentar a tolerância à bactéria do cancro cítrico. Assim, foram realizados trabalhos de transformação de plantas de laranja com o gene da sarcotoxina no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do IAPAR. O plasmídeo utilizado para transformação (**pST10**) contém o gene da sarcotoxina (*stx IA*) ligado a um peptídeo sinal que tem a função de exportar o peptídeo para o espaço intercelular sob controle do promotor constitutivo 35S, do vírus do mosaico da couve-flor e o gene da neomicina fosfotransferase (*npt II*), que confere resistência ao antibiótico canamicina (Figura 3). Esse plasmídeo foi cedido ao IAPAR através de um convênio científico com o Instituto Nacional de Recursos Agrobiológicos (NIAR, Japão).

A metodologia de transformação de laranja usou a estirpe EHA-105 de *Agrobacterium tumefaciens* como ve-



**Figura 6.** Plantas inoculadas com isolado de *X. axonopodis* pv. *citri* ( $10^4$  cfu/ml) após 26 dias. Planta não transgênica utilizada como controle (esquerda) e planta transgênica expressando sarcotoxina (direita)

tor para inserção do gene da sarcotoxina. Um aspecto inovador da metodologia é a utilização de segmentos finos de material vegetal maduro para a transformação, o que reduz em, pelo menos, cinco anos o início de produção e avaliação das plantas transgênicas. Em experimentos preliminares, plantas de laranja Pêra regeneradas a partir de tecido maduro floresceram após 12 meses em casa de vegetação.

Internódios de mudas de laranja Pêra mantidas em casa de vegetação foram utilizados como explantes iniciais. Esses internódios foram desinfestados, cortados transversalmente em segmentos de 1-2 mm e imersos em meio contendo *Agrobacterium*. Os explantes foram então co-cultivados por 72 horas e transferidos para meio de indução de gemas com 200 mg/l cefotaxima, 200 mg/l timetina e 25 mg/l canamicina. Após três semanas no escuro, os segmentos que apresentavam gemas foram transferidos para meio de alongamento ainda com a presença de antibióticos. Após 3-4 semanas no meio de alongamento, as gemas regeneradas maiores que 1 mm foram microenxertadas em plântulas de Carrizo citrange germinadas *in vitro*. Quando os enxertos apresentavam de 3 a 4 folhas, pequenos segmentos de tecido foliar

foram utilizados para detecção da presença do gene da sarcotoxina através de PCR. Enxertos apresentando a banda correspondente ao gene da sarcotoxina (Figura 4) foram então transplantados diretamente em solo ou novamente enxertados em plantas de limão cravo em casa de vegetação (Figura 5).

Foram obtidos diversos eventos de laranja Pêra transgênica contendo o gene da sarcotoxina. As plantas transgênicas foram clonadas através de enxertia em porta-enxertos de limão cravo para serem inoculadas com a cepa 306 da bactéria de *X. axonopodis* pv. *citri*.

A inoculação das plantas transgênicas com a bactéria do cancro cítrico é feita pelo método de infiltração em folhas novas utilizando-se seringas hipodérmicas. A avaliação da resistência é feita após três semanas através da contagem de lesões por área foliar e do re-isolamento da bactéria.

A análise de Western blot em folhas mostrou que há uma variação na expressão da sarcotoxina nos diferentes eventos. Os resultados da inoculação das plantas transgênicas com a bactéria do cancro cítrico mostraram que as plantas apresentando maiores quantidades de sarcotoxina foram mais

resistentes ao cancro cítrico (Figura 6).

### Considerações finais

O projeto para o desenvolvimento da laranja transgênica foi iniciado em 1999 e tem sido financiado pelo CNPq, através do programa RHAE, e pela Fundação Araucária (Governo do Estado do Paraná). Deverão ser feitos ainda, estudos necessários para se conhecer o efeito da introdução do gene da sarcotoxina nas plantas, na segurança alimentar e o seu impacto no ambiente, antes que essa tecnologia possa ser utilizada de maneira mais ampla. A grande eficiência do protocolo de transformação de laranja desenvolvido torna possível a inserção de novos genes que podem contribuir para minimizar outros problemas da citricultura, tais como o ataque de pragas e a resistência a estresses abióticos.

Além do Instituto Agrônomo do Paraná, através do Laboratório de Biotecnologia, outras instituições brasileiras que atuam no desenvolvimento de plantas transgênicas de laranja são: o Centro de Citricultura do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), em Cordeirópolis (SP), a Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) e o Centro de Energia Nuclear (CENA), da USP, em Piracicaba (SP).

### Referências bibliográficas

Bespallhok F.; Kobayashi, A.K.; Pereira, L.F.P.; Hissano, Z. & Vieira, L.G.E. (2001) *In vitro* adventitious shoot regeneration from sweet orange using thin epicotyl sections. *Crop Breed Appl Biotech* 1:27-34.

Boman, H.G. & Hultmark, D. (1987) Cell-free immunity in insects. *Ann Ver Microbiol* 41:103-126.

Bond, J.E. & Roose, M.L. (1998) *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important citrus cultivar Washington navel orange. *Plant Cell Rep* 18:229-234.

Cervera, M.; Juarez, J.; Navarro, A.; Pina, J.A.; Duran-Vila, N.; Navarro, L. & Peña, L. (1998) Genetic transformation and regeneration of mature tissues of woody fruit plants bypassing the juvenile stage. *Transgenic Res* 7:51-59.

Christensen, B.; Fink, J.; Merrifield, R.B. & Mauzerall, D. (1988) Channel-forming properties of cecropins and

related model compounds incorporated into planar lipid membrane. *Proc Nat Acad Sci USA* 85:5072-5076.

Düring, K.; Porsch, P.; Fladung, M & Lorz, H. (1993) Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora*. *The Plant J* 3: 587-598.

Florack, D.; Allefs, S.; Bollen, R.; Bosch, D.; Visser, B. & Stiekema, W. (1995) Expression of giant silkworm cecropin B genes in tobacco. *Transgenic Res* 4: 132-141.

Gutiérrez-E, M.A.; Luth, D. & Moore, G.A. (1997) Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation in *Citrus* and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Plant Cell Rep* 16: 745-753.

Hightower, R.; Baden, C.; Penzes, E. & Dunsmuir, P. (1994) The expression of cecropin peptide in transgenic tobacco does not confer resistance to *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*. *Plant Cell Rep* 13: 295-299.

Jaynes, J.M.; Nagpala, P.; Destefano-Beltran, L.; Hong-Hung, J.; Kim, J.; Denny, T. & Cetiner, S. (1993) Expression of a cecropin B lytic peptide analogue in transgenic tobacco confers enhanced resistance to bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Sci* 8:43-53.

Kaneyoshi, J.; Kobayashi, S.; Nakamura, Y.; Shigemoto, N. & Doi, Y. (1994). A simple and efficient gene transfer system of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.). *Plant Cell Rep* 13: 541-545.

Kobayashi, A.K.; Bespallhok F., J.C.; Pereira, L.F.P.; Molinari, H.B.C.; Galvão, R.M & Vieira L.G. (2001) *Agrobacterium*-mediated transformation of sweet orange cv. Pêra (*Citrus sinensis* L. OSBECK) with sarcotoxin antibacterial peptide gene. *IV Latin-American Meeting on Plant Biotechnology*, Goiânia, GO, p. 125-125.

Leite, R.P. (1990) Cancro cítrico: prevenção e controle no Paraná. Circular N° 61, Fundação Instituto Agrônomo do Paraná, Londrina, Pr, 51p.

Luth, D. & Moore, G. (1999) Transgenic grapefruit plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Cell Rep* 57:219-222.

Mitsuhara, I.; Matsufuru, H.; Ohshima, M.; Kaku, H.; Nakajima, Y.; Murai,

N.; Natori, S. & Ohashi, Y. (2000) Induced expression of sarcotoxin IA enhanced host resistance against both bacterial and fungal pathogens in transgenic tobacco. *Mol Plant Microbe In* 13:860-868.

Mitsuhara, I.; Nakajima, Y.; Natori, S.; Mitsuhara, T. & Ohashi, Y. (2001) *In vitro* growth inhibition of human intestinal bacterial by sarcotoxin IA, an insect bactericidal peptide. *Biotechnol Lett* 23:569-573.

Montanelli, C. & Nascari, G. (1991) Introduction of an antibacterial gene in potato (*Solanum tuberosum* L.) using a binary vector in *Agrobacterium rhizogenes*. *J Genet Breed* 45: 307-316.

Moore, G.A.; Jacono, C.C.; Neidigh, J.L.; Lawrence, S.D. & Cline, K. (1992) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus* stem segments and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep* 11:238-242.

Mourgues, F.; Brisset, M. & Chevreau, E. (1998) Strategies to improve plant resistance to bacterial diseases through genetic engineering. *Tibtech* 16:203-210.

Norelli, J.L.; Aldwinckle, H.S.; Destefano-Beltran, L. & Jaynes, J.M. (1994) Transgenic 'Malling 26' apple expressing the attacin E gene has increased resistance to *Erwinia amylovora*. *Euphytica* 77: 123-128.

Ohshima, M.; Mitsuhara, I.; Okamoto, M.; Sawano, S.; Nishiyama, K.; Kaku, H.; Natori, S. & Ohashi, Y. (1999) Enhanced resistance to bacterial diseases of transgenic tobacco plants overexpressing sarcotoxin IA, a bactericidal peptide of insect. *J Biochem* 125: 431-435.

Peña, L.; Cervera, M.; Juárez, J.; Navarro, A.; Pina, J.A. & Durán-Vila, N. (1995) *Agrobacterium*-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep* 14:616-619.

Peña, L.; Cervera, M.; Juárez, J.; Navarro, A.; Pina, J.A. & Navarro, L. (1997) Genetic transformation of lime (*Citrus aurantifolia* Swing.): factors affecting transformation and regeneration. *Plant Cell Rep* 16:731-737.

Vardi, A.; Bleichman, S. & Aviv, D. (1990) Genetic transformation of *Citrus* protoplasts and regeneration of transgenic plants. *Plant Sci* 69:199-206.

Yao, J-L.; Wu, J-H.; Gleave, A.P. & Morris, B.A.M. (1996) Transformation of citrus embryogenic cells using particle bombardment of transgenic embryos. *Plant Sci* 113:175-183.