

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

**Transformação genética de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck)  
com o gene *D4E1* dirigido pelos promotores *CaMV35S* ou *AtPP2***

**Lísia Borges Attílio**

Tese apresentada para obtenção do título de  
Doutora em Ciências. Área de concentração:  
Fitotecnia

**Piracicaba  
2013**

Lísia Borges Atílio  
Engenheira Agrônoma

**Transformação genética de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene  
*D4E1* dirigido pelos promotores *CaMV35S* ou *AtPP2***

Orientador:  
Prof. Dr. FRANCISCO DE ASSIS ALVES  
MOURÃO FILHO

Tese apresentada para obtenção do título de  
Doutora em Ciências. Área de concentração:  
Fitotecnia

**Piracicaba  
2013**

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

Attílio, Lísia Borges

Transformação genética de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene *D4E1* dirigido pelos promotores *CaMV35S* ou *AtPP2* / Lísia Borges Attílio. - - Piracicaba, 2013.

81 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Agrobacterium 2. Expressão gênica 3. Laranja 4. Melhoramento genético vegetal  
5. Plantas transgênicas 6. Resistência genética vegetal I. Título

CDD 634.31  
A859t

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

**Dedico**  
À minha querida filha *Anita*,  
ao meu marido *Castellane*,  
aos meus pais *João* e *Paulina*,  
aos meus irmãos *Allan* e *Dênia*.  
Pelo amor e incentivo



## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em minha vida, por me dar força e perseverança. Obrigada pelos momentos de felicidade, pela oportunidade de realizar este trabalho, pelas dificuldades e experiências ao longo deste doutorado, que também fazem parte do meu aprendizado.

Ao professor Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho, primeiramente pela oportunidade e confiança, também pela paciência, orientação e ensinamentos durante este período.

Ao pesquisador Dr. Ricardo Harakava por todo conhecimento compartilhado, pelo auxílio e apoio imprescindível para realização de todo trabalho.

À professora Dra. Beatriz M. Januzzi Mendes, por disponibilizar seu laboratório para as análises, sempre que necessário, pelas idéias e pelas correções deste material.

Ao pesquisador Dr. José Belasque Júnior pelo indispensável auxílio e informações transmitidas para a realização do bioensaio, por disponibilizar o laboratório e funcionários do Fundecitrus.

Às amigas Tatiane Loureiro da Silva e Luzia Miyata por toda ajuda. Vocês sabem o quanto o auxílio de vocês foi essencial para a realização deste trabalho!

Aos colegas e amigos Alessandra Rigotto, Ernani Pereira Junior, Eveline Tavano, Fabiana Muniz, Filipi Augusto Rodrigues, Flávia Zambon, Leonardo Soriano, Liliane Libório Stipp, Lívia Mendes de Castro, Marina Caputo, Natália Ansante, Paulo Artur, Renata Beatriz Cruz, Rodrigo Cassarotti, por compartilhar experiências, ouvir os problemas, auxiliar nas atividades e pela companhia amigável e alegre.

Aos amigos Fabrício Jaciani e Tamires que conheci durante as análises realizadas no Fundecitrus, pessoas maravilhosas, exemplo de profissionalismo e dedicação. Muito obrigada pela incansável ajuda!

À pós-doutoranda Carolina Munari, do Centro de Citricultura Sylvio Moreira, pela ajuda e informações para o uso dos softwares de análise dos dados de qPCR.

Aos Funcionários do Departamento de Produção Vegetal, Eder Cintra, David Ulrich, Aparecido Serrano e José Volpato, por toda ajuda e cuidados prestados na manutenção das plantas nas estufas.

À secretária do PPG em Fitotecnia Luciane Aparecida Lopes Toledo por todo auxílio prestado.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia pela oportunidade de realização do doutorado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos. Ao Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS) pelo auxílio financeiro.

E em especial agradeço aos meus amores:

Meus pais João Roberto Attílio e Paulina Estela Borges Attílio, pela educação, amor, incentivo e carinho.

Meu irmão Allan Borges Attílio e minha querida cunhada Carla Cristina por todo apoio e incentivo que me permitiram chegar até aqui.

Minha irmã Dênia Borges Attílio e meu cunhado Gustavo Mostaço, por todo apoio e ajuda.

Meu marido pela compreensão e apoio. Obrigada por todas as renúncias que fez para que eu pudesse conquistar este objetivo. Seu apoio incondicional tornou possível a realização deste trabalho.

Minha querida filha Anita, que veio como um presente de Deus em minha vida com sua alegria contagiante. Filha, obrigada por entender minhas ausências, “para que eu pudesse cuidar das plantinhas”.

Minha grande amiga Elisângela Dupas, por todo auxílio, conselhos, ensinamentos, pelo carinho de sempre e pela amizade ao longo destes anos.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente tenham contribuído para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE TABELAS.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Aspectos gerais da Citricultura.....	19
2.2 Cancro cítrico.....	21
2.3 Huanglongbing.....	24
2.4 Transformação genética de citros.....	28
2.5 Promotores de expressão gênica.....	30
2.6 Peptídeo antimicrobiano D4E1.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Material vegetal.....	37
3.2 Construções gênicas.....	38
3.3 Manutenção dos isolados de <i>Agrobacterium</i> .....	41
3.4 Preparo do inóculo para transformação genética.....	41
3.5 Transformação genética, seleção e regeneração.....	42
3.6 Enxertia <i>in vitro</i> .....	43
3.7 Análises moleculares.....	43
3.7.1 Análise de <i>Southern blot</i> .....	45
3.7.2 Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real.....	46
4 RESULTADOS.....	51
4.1 Transformação genética e aclimatização das plantas.....	51
4.2 Análises moleculares.....	54
4.2.2 Análise de <i>Southern blot</i> .....	56
4.2.3 Análise da expressão do transgene por PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	59
5 DISCUSSÃO.....	61
6 CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS.....	69





## RESUMO

### Transformação genética de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene *D4E1* dirigido pelos promotores *CaMV35S* ou *AtPP2*

O Brasil é o maior produtor de laranja doce do mundo. O histórico da citricultura brasileira é marcado por uma sucessão de doenças causadas por diferentes agentes etiológicos. Entre as principais doenças que afetam a cultura, têm levado a maiores prejuízos, as bacterianas, com destaque para o cancro cítrico causado por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e o *Huanglongbing* associado a três espécies de “*Candidatus Liberibacter*”. Devido à ausência de cultivares de laranja doce resistentes a estas doenças, a transformação genética é uma alternativa promissora para obtenção de plantas resistentes. Uma das estratégias no uso da transgenia para conferir ação contra bactérias é a inserção de genes que codificam peptídeos antimicrobianos como o D4E1, um peptídeo sintético, que tem apresentado eficiência no controle de doenças fúngicas e bacterianas de várias culturas, *in vivo* e *in vitro*. Este trabalho foi realizado com o objetivo de obter plantas transgênicas de laranja doce das cultivares ‘Hamlin’, ‘Pêra’ e ‘Valência’, via *Agrobacterium tumefaciens*, expressando o gene *D4E1*, dirigido pelos promotores *CaMV35S* (*Cauliflower mosaic virus 35S promoter*) de expressão constitutiva ou pelo *AtPP2* (*Arabidopsis thaliana phloem protein 2*) com expressão preferencial no floema, visando obter plantas resistentes a doenças bacterianas. Foram obtidas 13 plantas transgênicas da cultivar ‘Hamlin’, 10 da cultivar ‘Pêra’ e 8 da cultivar ‘Valência’, contendo a construção gênica *CaMV35S/D4E1* e 19 plantas transgênicas da cultivar ‘Hamlin’, 6 da cultivar ‘Pêra’ e 15 da cultivar ‘Valência’ contendo a construção gênica *AtPP2/D4E1*. As plantas transgênicas apresentaram um a três eventos de inserção do T-DNA no genoma. Os níveis de expressão do transgene dirigido pelo promotor de expressão preferencial no floema foi menor comparado ao das plantas contendo o transgene dirigido pelo promotor de expressão constitutiva. Os resultados da expressão do transgene permitem selecionar plantas com maior expressão de cada uma das construções gênicas, para que, futuramente, estas sejam multiplicadas e avaliadas quanto à resistência ao cancro cítrico e ao HLB.

Palavras chave: Peptídeos antimicrobianos; Transgenia; Resistência a doenças; Melhoramento genético

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

