UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

THAÍSA TESSUTTI PINHEIRO

Transformação genética de laranjeira doce com genes da via biossintética de carotenoides

> Piracicaba 2014

THAÍSA TESSUTTI PINHEIRO

Transformação genética de laranjeira doce com genes da via biossintética de carotenoides

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Dr. Rodrigo Rocha Latado

Piracicaba 2014 AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

> Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Pinheiro, Thaísa Tessutti

Transformação genética de laranjeira doce com genes da via biossintética de carotenoides / Thaísa Tessutti Pinheiro; orientador Rodrigo Rocha Latado. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2014. 136 f. : il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Biologia molecular vegetal 2. Biotecnologia de plantas 3. Enzimas 4. Flor 5. Fruto 6. Genômica 7. Laranja 8. Melhoramento genético vegetal 9. Pigmentos vegetais 10. Transgenes I. Título

CDU 631.528.6 : 634.31

À minha filha **Helena**, por me ensinar o verdadeiro sentido da vida e principalmente, por me fazer sentir esse amor inexplicável

Ao meu marido **Tiago**, pelo apoio, companheirismo, paciência e amor que sempre me concedeu

Aos meus pais **Dorival** e **Marilda** e a minha irmã **Renata**, pelo incentivo, amor e atenção

À **Deus**, minha fortaleza... sempre

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Rodrigo Rocha Latado pela orientação, dedicação, apoio e crescimento que me proporcionou.

Ao Prof. Dr. Antonio Figueira pelos ensinamentos, apoio e por todos os anos de acolhimento em seu laboratório.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) por toda estrutura e oportunidade de realizar minha tese.

À agência de fomento CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudos concedida.

Ao Prof. Márcio Costa pelas construções gênicas cedidas.

À Dr. Maria Jesús Rodrigo Esteve pelas análises de quantificação dos carotenoides.

Aos alunos Rodolfo Maniero, Daniela Bardella e Fernando Ferreira pela amizade e auxílio nos diversos experimentos.

Aos funcionários do Laboratório de Melhoramento de Plantas: Wlamir Godoy, Raquel Orsi e Felippe Buck pela amizade, convivência e auxílio fundamental nas várias fases do desenvolvimento deste trabalho.

Aos técnicos Benedita Inês Rodrigues, Paulo Cassieri e José Benedito Alves por todo auxílio concedido.

Ao Dr. Joni Lima pela amizade, incentivo e contribuições no trabalho.

À equipe da Pós–Graduação do CENA/USP: Neuda Oliveira, Sônia de Campos, Daiane Vieira e Fábio Oliveira; por todo auxílio, presteza e apoio.

À Bibliotecária Marília Garcia Henyei, por toda a ajuda prestada, simpatia e presteza sempre.

À todos os amigos do Laboratório de Melhoramento de Plantas: André Tagliaferro, Eduardo Bressan, Marielle Vitti, Roberto Camargo, Fabiana Monarelli, Flávia Manoel, Gabriela Juliano, Karina Lucas, Luís Damaceno, Jamille Santos e Isabella Possignolo.

Em especial aos amigos Renato Ferreira, Ju Deganelo, Ju Leles, Layanne Souza, Isabela Camargo e Dani Scotton, Felippe Buck e Deborah Nishimura pela amizade, incentivo e apoio.

À minha mãe Marilda e meu pai Dorival, pelo amor, paciência, apoio e incentivo e a minha irmã Renata pela amizade e carinho.

À minha sogra Márcia e ao meu sogro Julimar, pelo carinho e incentivo.

Ao meu marido Tiago, por toda paciência, apoio, confiança e amor. Obrigada por estar ao meu lado!

À minha filha Helena, por fazer com que qualquer dificuldade encontrada seja imperceptível diante dos seus olhinhos cheios de vida...

Muito obrigada!

RESUMO

PINHEIRO, T. T. **Transformação genética de laranjeira doce com genes da via biossintética de carotenoides.** 2014. 136 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

Plantas de Citrus regeneradas de tecidos juvenis demandam um longo período para a análise do fenótipo resultante em flores ou frutos. Este trabalho apresenta o mutante espontâneo de florescimento precoce de laranja doce, denominado 'x11', como modelo para estudos de genômica funcional de Citrus. As frutas cítricas são ricas em carotenoides, pigmentos que possuem grande valor nutricional, como pró-vitamina A (α- ou β-caroteno). Estudos de genômica funcional envolvendo genes da via biossintética dos carotenoides terão resultados rapidamente obtidos utilizando-se variedades com florescimento e frutificação precoce, como a laranjeira doce mutante 'x11'. A laranjeira doce 'Sanguínea-de-Mombuca' (SM) é uma variedade de polpa vermelha que acumula licopeno na polpa dos frutos, podendo ser considerada uma importante ferramenta no estudo da acumulação de carotenoides nos frutos de laranjeiras. Desta maneira, o objetivo deste estudo foi estabelecer a laranjeira 'x11' como planta-modelo em experimentos de transformação genética visando estudos de genômica funcional dos genes PSY (fitoeno sintase), PDS (fitoeno desaturase), CRTISO (carotenoide isomerase), LCY-b (licpeno β -ciclase) e β -caroteno hidroxilase (HYb), envolvidos na biossíntese de carotenoides e utilizar a laranjeira SM como ferramenta no entendimento da acumulação dos carotenoides nos frutos de Citrus. Plantas de laranjeira 'x11' foram transformadas com promotor de expressão preferencial para órgãos reprodutivos de Citrus controlando a expressão de gene repórter (gusA) para a análise da tecido especificidade. Foi realizada a otimização do protocolo de transformação genética de segmentos de epicótilo de laranjeira 'x11' via Agrobacterium. A eficiência de transformação média foi de 18,6%, mas atingiu 29,6% no protocolo otimizado. Das 270 brotações positivas, cinco foram microenxertadas e aclimatizadas. Quatro dessas plantas exibiram as primeiras flores em três meses após o estabelecimento ex vitro, e a outra, dois meses mais tarde, independentemente da época do ano. A coloração histoquímica da atividade do gene gusA foi realizada em segmentos de caule, flores e frutos de plantas transgênicas aclimatizadas, com 5-7 meses de idade, confirmando a expressão constitutiva do gene gusA nesses órgãos. As plantas transformadas com a construção para o teste do promotor de expressão preferencial para órgãos reprodutivos de Citrus continuam em fase de desenvolvimento. Em seguida foi realizada a transformação genética de laranjeira 'x11' para a superexpressão dos genes PDS e LCY-b1 e para a superexpressão do gene LCY-b1 e HYb em laranjeira SM. Também foi realizada a transformação genética de 'x11' para o silenciamento do gene CRTISO e HYb e também para o silenciamento do gene CRTISO, em SM. A quantificação da expressão do gene-alvo em tecido foliar foi correlacionada ao número de cópias do cisgene inseridos em cada planta, revelando que o nível de expressão gênica não foi diretamente ligado ao número de cópias inseridas no genoma. Uma planta de laranjeira 'x11' superexpressando o gene LCYbl frutificou e foi realizada a análise do perfil de carotenoides totais em relação ao fruto de uma planta não transformada. Neste evento houve aumento no teor de carotenoides totais e xantofilas, indicando o potencial da manipulação dos genes codificadores de enzimas da via biossíntese de carotenoides para alterações quantitativas e qualitativas destes pigmentos.

Palavras-chave: *Citrus*. Flor. Fruto. Laranja. Gene. Sistema modelo. Transgênico. Genômica funcional. Biossíntese. Carotenoide. Cisgenia.

ABSTRACT

PINHEIRO, T. T. Functional analysis of genes of the carotenoid biosynthetic pathway in sweet orange. 2014. 136 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

Considering the perennial developmental phase of *Citrus*, plants regenerated from juvenile tissues require long period for analysis of the resulting phenotype in flowers or fruits. Herein, we present the spontaneous sweet orange mutant named 'x11', as a model plant for functional genomics studies in Citrus due to the remarkable feature of early-flowering. Citrus fleshy fruits are rich in carotenoids which are pigments that have great nutritional value, such as provitamin A (α - or β -carotene). Functional genomics studies involving genes related to carotenoids biosynthesis pathway can be rapid generated by using the early flowering mutant, 'x11' in sweet orange background. The fleshy fruit from the sweet orange 'Sanguínea-de-Mombuca' (SM) has a red pulp due to accumulation lycopene that may be considered an important tool to investigate the accumulation of carotenoids in sweet orange fruits. Therefore, the aim of this study was to establish the orange mutant 'x11'as model plants for genetic transformation and functional genomics analysis of key regulatory genes PSY (phytoene synthase), PDS (phytoene desaturase), CRTISO (carotenoid isomerase), LCY-b1 (licopene β -cyclase) and β -carotene hydroxylase (HYb) involved in the biosynthesis of carotenoids and to use the sweet orange SM as a tool in understanding the accumulation of carotenoids in sweet orange fruits. The mutant plants 'x11' were transformed with gene reporter (gusA) under control of specific promoter for reproductive organs in Citrus for the tissue specificity analysis. We report a procedure for efficient regeneration and transformation using epicotyl segment explants of 'x11' and Agrobacterium tumefaciens as a proof-ofconcept. The average transformation efficiency was 18.6%, but reached 29.6% in the best protocol tested. Among 270 positive shoots, five were micrografted and acclimatized. Four of these plants exhibited the first flowers within three months after ex vitro establishment, and the other, two months later, regardless the period of the year. Transgenic plants harboring specific promoter for reproductive organs in Citrus are still under development. We transformed 'x11' for overexpression of PDS or LCY-b1 genes, and to overexpress LCY-b1 or HYb in SM sweet orange. 'x11' was transformed to silence CRTISO or HYb, and CRTISO gene in SM sweet orange. Then, quantification of target gene expression in leaf tissue was performed by correlating this information with the number of copies of cisgene inserted into each plant. According to the results, it is suggested that the level of gene expression is not directly linked to the number of copies inserted into the genome. One transgenic plant of 'x11' overexpressing LCY-b1 produced flowers and fruits and the carotenoid profile analysis indicated an increased in content of total carotenoids and, especially, xanthophylls, clearly indicating the potential to manipulate expression of genes encoding enzymes of the carotenoid biosynthetic pathway to obtain qualitatively and quantitatively changes of these pigments.

Keywords: *Citrus*. Flower. Fruit. Sweet orange. Gene. Model system. Transgenic. Genomics functional. Biosynthesis. Carotenoid. Cisgeny.

1 INTRODUÇÃO GERAL	
2 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DO MUTANTE DE FLORESCIMENTO DE LARANJA DOCE 'x11' COMO MODELO PARA ESTUDOS DE GENÔ FUNCIONAL DE CITRUS Resumo) PRECOCE MICA 17 17
Abstract	18
2.1 Introdução e Justificativas	
2.1.1 Aspectos gerais da laranjeira doce e importância econômica do gênero <i>Ci</i>	<i>trus</i> 19
2.1.2 Melhoramento de citros e variedade 'x11'	
2.1.3 Promotores tecido-preferenciais e laranjeira 'x11' como ferramenta para o	estudos de
genômica funcional	22
2.2 Objetivos	24
2.2.1 Objetivo geral	24
2.2.2 Objetivos específicos	24
2.3 Material e Métodos	25
2.3.1 Material vegetal e fonte de explante	25
2.3.2 Transformação de laranjeira 'x11' para expressão do gene repórter gusA s	sob o
controle do promotor CAMV 35S e otimização de protocolo de transformação.	
2.3.2.1 Vetor de transformação	
2.3.2.2 Transformação genética dos explantes de laranjeira 'x11'	
2.3.3 Transformação de laranjeira 'x11' para expressão do gene repórter gusA s	sob o
controle da região promotora ovário-polpa preferencial	
2.3.3.1 Construção do vetor de expressão dirigido pela região promotora ovário	o-polpa
preferencial	
2.3.4 Confirmação de plantas transgênicas e aclimatização	29
2.3.5 Análise da expressão do transgene por amplificação quantitativa de transc	critos
reversos (RT- qPCR) e estimativa do número de cópias dos transgenes inserido	os por
PCR quantitativo (qPCR)	
2.4 Resultados e Discussão	
2.4.1 Otimização do protocolo e transformação de laranjeira 'x11' com	
pCAMBIA2301	

SUMÁRIO

2.4.2 Transformação de laranjeira 'x11' com pKGWFS7::LepC3	
2.4.3 Caracterização das brotações e plantas transgênicas transformadas com	
pCAMBIA2301 e pKGWFS7::LepC3	
2.4.4 Perspectivas de estudos de genômica funcional em laranja doce	
2.5 Conclusão	45
Referências	

3 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE LARANJEIRAS DOCES COM GENES DA	VIA
BIOSSINTETICA DOS CAROTENOIDES	52
Abstract	. 52
3.1 Introdução e Justificativa	. 54
3.1.1 Carotenoides e sua importância	. 54
3.1.2 Estrutura básica	. 55
3.1.3 Biossíntese de carotenoides em citros	. 57
3.1.4 Regulação da biossíntese e acúmulo de carotenoides em citros	. 59
3.1.5 Manipulação dos genes da via de carotenoides	. 61
3.1.6 Laranjeira mutante 'x11' e SM e a manipulação de genes da via de carotenoides	. 62
3.2. Objetivos	. 63
3.2.1 Objetivo geral	. 63
3.2.2 Objetivos específicos	. 63
3.3 Material e Métodos	. 64
3.3.1 Material vegetal e fonte de explante	. 64
3.3.2 Transformação genética via A. tumefaciens com as construções	
pCAMBIA2301::CitPDS e pCAMBIA2301::CitLCY-b	. 64
3.3.3 Confecção das construções gênicas para superexpressão dos genes LCY-b2 e	
HYb e silenciamento dos genes CRTISO, LCY-b2 e HYb	. 66
3.3.3.1 Busca das sequências e construção dos iniciadores	. 66
3.3.3.2 Extração de RNA e análise da integridade e concentração	. 66
3.3.3.3 Tratamento com DNAse e síntese de cDNA	. 68
3.3.3.4 Amplificação das sequências gênicas e clonagem nos vetores de entrada	. 68
3.3.3.5 Minipreparação do DNA plasmidial por lise alcalina	. 69
3.3.3.6 Sequenciamento dos fragmentos	. 69
3.3.3.7 Recombinação do inserto no vetor binário Gateway®	70

3.3.3.8 Introdução das construções gênicas em Agrobacterium tumefaciens
3.3.4 Transformação genética dos explantes de laranjeira 'x11' e SM, aclimatização e
confirmação de plantas transgênicas73
3.3.5 Análise da expressão do transgene por amplificação quantitativa de transcritos
reversos (RT- qPCR) e estimativa do número de cópias dos transgenes inseridos por
PCR quantitativo (qPCR)74
3.3.6 Análise do perfil de carotenoides
3.3.6.1 Extração e quantificação dos carotenoides totais75
3.3.6.2 Análises dos carotenoides por HPLC77
3.4 Resultados78
3.4.1 Transformação genética via A. tumefaciens com as construções
pCAMBIA2301::CitPDS e pCAMBIA2301::CitLCY-b78
3.4.2 Confecção das construções gênicas para superexpressão dos genes LCY-b2 e
<i>HYb</i> e silenciamento dos genes <i>CRTISO</i> , <i>LCY-b2</i> e <i>HYb</i> 86
3.4.2.1 Busca das sequências e construção dos iniciadores
3.4.2.2 Amplificação das sequências gênicas
3.4.3 Transformação genética dos explantes de laranjeira 'x11' ou SM90
3.4.4 Análise da expressão do transgene por amplificação quantitativa de transcritos
reversos (RT-qPCR) e estimativa do número de cópias dos transgenes inseridos por
PCR quantitativo (qPCR)
3.5. Discussão
3.5.1 Eficiência das transformações genéticas102
3.5.2 Expressão gênica e número de cópias do transgene inseridas no genoma103
3.5.3 Manipulação dos genes da via de carotenoides
3.5.4 Análise do perfil de carotenoides do fruto da planta que superexpressa o gene
<i>LCY-b1</i> 111
3.6. Conclusões
Referências
Apêndices

1. INTRODUÇÃO GERAL

As espécies do gênero *Citrus* são perenes e com ciclo vegetativo longo, o que representa problemas para a execução de programas de melhoramento convencional por meio de cruzamentos controlados. O período de juvenilidade de plantas propagadas por semente pode durar entre 5 e 22 anos, dependendo da espécie. Existe um número limitado de trabalhos envolvendo transformação genética visando o florescimento e frutificação de plantas de *Citrus*. Uma das principais razões é o extenso período de juvenilidade, pois plantas de *Citrus* quando são regeneradas a partir de explantes juvenis, levam muito tempo para análise do fenótipo resultante.

Para facilitar o entendimento de funções de genes em plantas anuais ou perenes, estudos de genômica funcional têm sido conduzidos em plantas modelos (como sistemas ortólogos). Tomate e *Arabidopsis* são os sistemas mais utilizados para a expressão heteróloga de genes de *Citrus*. Mas, apesar da importância dos sistemas modelos, existem diferenças cruciais no desenvolvimento de diferentes espécies, na estrutura das famílias gênicas e nas características das respostas de cada cultivar, que podem gerar resultados contrastantes.

Uma alternativa para investigar funções gênicas em *Citrus* é o uso de plantas que apresentam ciclo juvenil curto. A variedade 'x11' é um mutante espontâneo de laranja doce selecionado no Brasil pelo Dr. Rodrigo R. Latado, em 1998. Esta planta apresenta florescimento precoce, produzindo frutos com uma média de seis sementes, altamente poliembriônicas como a maioria das laranjas doces, com média de três embriões/semente. A variedade apresenta ciclo juvenil curto, com o florescimento de *seedlings* e de plantas obtidas por meio de enxertia de borbulhas adultas a partir de um ou dois anos de cultivo. Ela tem a capacidade de florescer várias vezes no mesmo ano, independentemente de estímulos ambientais, bastando realizar podas. Além disso, estas plantas podem ser facilmente crescidas em condições controladas (casa de vegetação) e as flores podem ser manualmente polinizadas. Estes atributos fazem da laranjeira 'x11' um modelo atraente para estudos de genômica funcional, estudos importantes para a investigação das funções de genes associados ao florescimento e frutificação em um curto período de tempo (1-2 anos).

As frutas cítricas são ricas em carotenoides, pigmentos que possuem grande valor nutricional, como pró-vitamina A (α - ou β -caroteno), que podem entre outras funções, prevenir doenças cardiovasculares e câncer. Os pigmentos carotenoides são essenciais aos

animais e humanos que necessitam incorporá-los pela dieta, por serem, em geral, incapazes de sintetizá-los. Quando ingeridos, os carotenoides são clivados em precursores de vitamina A, que é essencial para o bom funcionamento da visão, crescimento, desenvolvimento, manutenção da integridade celular do tecido epitelial, funções imunológicas e reprodutivas.

Em citros, estudos envolvendo a expressão dos genes *PSY* (fitoeno sintase), *PDS* (fitoeno desaturase), *CRTISO* (carotenoide isomerase), *LCY-b* (licpeno b-ciclase) e *HYb* β -caroteno hidroxilase), os quais são responsáveis pela codificação de enzimas-chave na via de biossíntese de carotenoides, correlacionando o perfil desses pigmentos nas diversas variedades de frutos cítricos, comprovam que a acumulação de carotenoides está altamente relacionada aos produtos da expressão dos genes codificadores das enzimas. Isto sugere que a regulação transcricional é um importante aspecto a ser considerado no acúmulo deste pigmento. Assim, uma possível manipulação destes genes poderia alterar o perfil de carotenoides em citros, realçando a coloração e promovendo o enriquecimento do teor nutricional do fruto.

Embora já haja estudos em andamento sobre a via biossintética dos carotenoides em citros, os resultados poderão ser rapidamente obtidos em estudos de genômica funcional utilizando-se a variedade de florescimento e frutificação precoce, a laranjeira doce 'x11'.

A laranja 'Sanguínea de Mombuca' é uma variedade com polpa com coloração vermelha, resultante da produção de licopeno e maiores teores de β -caroteno e carotenoides totais no suco. Devido a coloração da polpa, a laranjeira SM pode também ser considerada uma importante ferramenta no estudo da via de biossíntese de carotenoides.

O segundo Capítulo do presente trabalho teve como objetivo a otimização do protocolo de transformação genética de laranjeira 'x11', bem como comprovar que esta variedade se apresenta como um genótipo adequado para estudos de genômica funcional de *Citrus*, principalmente em estudos de genes envolvidos nos processos de floração e frutificação, permitindo a rápida avaliação do fenótipo resultante.

O terceiro Capítulo foi referente ao estudo de genômica funcional dos genes envolvidos na via biossintética de carotenoides, com o uso da laranjeira 'x11', que possuem florescimento e frutificação precoce e SM, a qual apresenta polpa com coloração vermelha, o que irá propiciar maior contraste e/ou entendimento da função dos genes envolvidos na biossíntese de carotenoides.

2. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DO MUTANTE DE FLORESCIMENTO PRECOCE DE LARANJA DOCE 'X11' COMO MODELO PARA ESTUDOS DE GENÔMICA FUNCIONAL DE CITRUS

Resumo

Existem muitos trabalhos envolvendo transformação genética de Citrus, porém poucos são associados a características associadas a flores ou frutos. Uma das principais razões para isso é o extenso período de juvenilidade de plantas de Citrus, as quais se forem regeneradas de tecidos juvenis, demandam um longo período para a análise do fenótipo resultante. Este trabalho apresenta o mutante espontâneo de florescimento precoce de laranja doce, denominado 'x11', como plataforma para estudos de genômica funcional de Citrus, particularmente para genes associados a características de flores ou frutos. Para otimizar o processo de obtenção de plantas transgênicas de laranjeira 'x11' provenientes de segmentos de epicótilo e transformados via Agrobacterium, foram testados diversos parâmetros que afetam a eficiência da transformação e regeneração. Plantas de laranjeira 'x11' também foram transformadas com um promotor de expressão preferencial para órgãos reprodutivos de Citrus, controlando a expressão de gene repórter (gusA ou GUS), para a análise da especificidade. A eficiência de transformação média foi 18,6%, mas alcançou 29,6% quando o protocolo foi otimizado. Dentre as 270 brotações positivas, cinco foram microenxertadas e aclimatizadas, seguidas por avaliação da expressão do gene *nptII* e determinação do número de cópias inseridas por qPCR. Quatro dessas plantas apresentaram as primeiras flores três meses após o estabelecimento ex vitro, e a outra, dois meses mais tarde, independente da época do ano. As flores das plantas transgênicas exibiram fertilidade masculina e feminina, com a auto-polinização gerando frutos contendo sementes. A coloração histoquímica da atividade do gene gusA (GUS) foi realizada em segmentos de caule, flores e frutos de plantas transgênicas aclimatizadas, com 5-7 meses de idade, confirmando a expressão constitutiva do gene gusA nesses órgãos. As plantas transformadas com a construção para o teste do promotor de expressão preferencial para órgãos reprodutivos de Citrus continuam em fase de desenvolvimento. A laranjeira doce 'x11' apresentou boa eficiência de transformação, podendo ser considerada como adequada e um bom modelo para estudos de genômica funcional de laranja doce, principalmente visando características relacionadas a flores e frutos.

Palavras-chave: Citrus. Flor. Fruto. Gene. Sistema modelo. Transgênico.

Abstract

There had been many reports on genetic transformation of Citrus for functional genomic studies, but few included genes associated with flower or fruit traits. A major reason for this might derive from the extensive juvenile stage of Citrus plants when regenerated from juvenile explants, which delays the observation of the resulting phenotype. We propose a spontaneous sweet orange early-flowering mutant, named 'x11', as a platform for Citrus functional genomic studies, particularly for genes associated with flower or fruit traits. We report a procedure for efficient regeneration and transformation using epicotyl segment explants of 'x11' and Agrobacterium tumefaciens as a proof-of-concept. 'X11' plants were also transformed with Citrus promoter specific for reproductive organs controlling the expression of a reporter gene (gusA or GUS) for the analysis of specificity. The average transformation efficiency was 18.6%, but reached 29.6% in the best protocol tested. Among 270 positive shoots, five were micrografted and acclimatized, followed by evaluation of *nptII* expression by RTqPCR and determination of the number of copies inserted. Four of these plants exhibited the first flowers within three months after ex vitro establishment, and the other, two months later, regardless the period of the year. Flowers of transgenic plants displayed fertile pollen and gynoecium, with self-pollination inducing fruit development with seeds. Histochemical staining for gusA (GUS) activity using stem segments, flowers and fruits from 5 to 7 months-old acclimatized transgenic plants confirmed the constitutive gusA expression in these organs. Plants transformed with the construct for testing the Citrus promoter specific for reproductive organs still in the development stage. The 'x11' sweet orange is suitable for functional genomics studies with a satisfactory transformation rate, and it can be considered as a good model for functional genomic studies in commercial sweet orange for traits related to flower and fruit.

Keywords: Citrus. Flower. Fruit. Gene. Model system. Transgenic.

2.1. Introdução e justificativas

2.1.1. Aspectos gerais da laranjeira doce e importância econômica do gênero Citrus

A laranjeira doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pertence ao Reino *Plantae*, Divisão *Magnoliophyta*, Classe *Magnoliopsida*, Ordem *Sapindales*, Família *Rutaceae*, Gênero *Citrus* e Espécie *C. x sinensis* (SWINGLE; REECE, 1967).

Normalmente laranjeiras doce são plantas diploides, com nove pares de cromossomos (GUERRA et al., 1997) e genoma de tamanho aproximado de 367 Mb (ARUMUGANATHAN; EARLE, 1991). O genoma desta espécie foi sequenciado e comparações feitas com genomas de outras plantas cítricas sugerem que a laranja doce é resultado de um cruzamento entre toranja (*C. grandis*) e tangerina (*C. reticulata*) (XU et al., 2012; GMITTER JUNIOR et al., 2012).

Laranjeiras doces são consideradas como espécies com sementes poliembriônicas (FROST; SOOST, 1968; CHAPOT, 1975; PRATES, 1977), apresentando taxas de poliembrionia consideradas como elevadas (MOREIRA; GURGEL; ARRUDA, 1947; PRATES, 1977; DOMINGUES et al., 1996; 1998).

As regiões subtropicais e tropicais do sul e sudeste da Ásia, Austrália e África são consideradas como centro de origem das plantas de citros (SWINGLE; REECE, 1967; SCORA, 1975; SOOST; CAMERON, 1975; DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005). As Cruzadas contribuíram para que as plantas de citros fossem levadas para a Europa (CALABRESE, 1990) de onde foram levadas ao Brasil pelos portugueses, no início da colonização (HASSE, 1987).

O Brasil é o maior produtor de laranjas, com balanço mundial de 19.053.000 Toneladas Métricas deste fruto. A produção de frutos cítricos no Brasil é voltada para o mercado externo, sendo os maiores importadores a Europa e Estados Unidos. São Paulo é o maior estado produtor brasileiro de laranjas, detendo cerca de 77% da produção anual deste fruto, no ano de 2012 (AGRIANUAL, 2014).

O sabor de citros está entre os preferidos no mundo, sendo um alimento rico em vitaminas, minerais, fibras e componentes que reduzem riscos de muitas doenças crônicas (FAO, 1999). Alguns estudos já comprovaram que sucos de frutas cítricas podem fornecer muito mais nutrientes por caloria do que muitos dos outros sucos de fruta consumidos

(RAMPERSAUD, 2007), além de possuir atividade antioxidante, podendo bloquear danos ao material genético e prevenir doenças do coração e câncer (SILALAHI, 2002).

2.1.2. Melhoramento de citros e variedade 'x11'

As espécies do gênero *Citrus* são perenes e com ciclo vegetativo longo, o que representa problemas para a execução de programas de melhoramento convencional por meio de cruzamentos controlados (PEÑA et al., 2001). O período de juvenilidade de plantas propagadas por semente pode durar entre 5 e 22 anos, dependendo da espécie (ENDO et al., 2005). Desta maneira, a transformação genética de plantas tem sido considerada uma importante ferramenta para o melhoramento de plantas perenes, por permitir a introdução de características desejáveis em genótipos-elite sem a necessidade de alterar completamente o genótipo, pois não envolve a fase de recombinação na meiose (DENG; DUAN, 2006).

A introdução de genes nas diversas espécies de *Citrus* tem sido conduzida, na sua maioria, envolvendo genes de resistência a estresses bióticos (ZANEK et al., 2008; MENDES et al., 2009; HE et al., 2011; YANG et al., 2011) ou abióticos (CERVERA et al., 2000; FAGOAGA et al., 2007). No entanto, existem poucos estudos relacionados à características associadas aos órgãos reprodutivos, principalmente frutos. Até o presente momento foram relatados trabalhos envolvendo a expressão de genes na casca e na polpa de frutos (COSTA et al., 2002; GUO et al., 2005; TAN et al., 2009) e o silenciamento do gene codificador da *1-aminociclopropano-1-carboxilato sintase* (ACC) em plantas de citrange 'Carrizo', *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., visando controlar os níveis de etileno, levando a uma provável diminuição dos danos causados pelo frio em frutos (WONG et al., 2001). Quanto a flores, foi realizada a transformação de plantas de *Citrus* provenientes de explantes juvenis para a superexpressão dos genes *leafy* (*LFY*) e *apetala 1* (*AP1*), clonados de *Arabidopsis*, visando promover o florescimento e frutificação das plantas logo no primeiro ano após o plantio (PEÑA et al., 2001).

Uma das principais razões para o número limitado de trabalhos envolvendo florescimento e frutificação é o extenso período de juvenilidade das plantas de *Citrus*, pois quando são regeneradas a partir de explantes juvenis, leva-se muito tempo para análise do fenótipo resultante. Explantes derivados de tecidos adultos podem ser usados como alternativa para evitar o extenso período de juvenilidade de *Citrus* (GHORBEL et al., 2000; ALMEIDA

et al., 2003; CERVERA et al., 2005; 2008; HE et al., 2011). No entanto, o uso de explantes originados de tecidos não juvenis é limitado, uma vez que são geralmente mais recalcitrantes à transformação genética e a infecção por *A. tumefaciens*, apresentando baixa eficiência de transformação (TAN et al., 2009), e pela possibilidade de redução da capacidade de enraizamento das plantas regeneradas (MOORE et al., 1992).

Para facilitar o entendimento de funções de genes em plantas anuais ou perenes, estudos de genômica funcional têm sido conduzidos em plantas modelos (como sistemas heerólogos). Tomate e *Arabidopsis* são os sistemas mais utilizados para a expressão heteróloga de genes de *Citrus* (SORKINA et al., 2011; MARQUES et al., 2009). Mas, apesar da importância dos sistemas modelos, existem diferenças cruciais no desenvolvimento de diferentes espécies, na estrutura das famílias gênicas e nas características das respostas de cada cultivar, que podem gerar resultados contrastantes (TALON; GMITTER JUNIOR, 2008).

Uma alternativa para investigar funções gênicas em *Citrus* é o uso de plantas que apresentam ciclo juvenil curto, como a lima 'West Indian' (*C. aurantifolia* Swingle) (KOLTUNOW et al., 2000), *Kumquat* (*Fortunella crassifolia* Swingle) (YANG et al., 2007) ou o mutante espontâneo de *P. trifoliata* que apresenta florescimento precoce, citado por Liang et al. (1999), e usado para transformação genética (TAN et al., 2009; TONG et al., 2009). Estas espécies/genótipos apresentam-se como material vegetal potencial para serem usados em genômica funcional (TAN et al., 2009). Porém, o uso destas variedades para investigação de funções de genes principalmente ligados a frutificação, é menos atraente que o uso de genótipos de laranjeiras doces, pois estes outros genótipos possuem interesse comercial limitado.

A variedade 'x11' é um mutante espontâneo de laranja doce 'Tobias', selecionado no Brasil pelo Dr. Rodrigo R. Latado, em 1998, por apresentar frutos com maior número de sementes. Este mutante apresenta florescimento precoce, produzindo frutos com uma média de seis sementes, altamente poliembriônicas como a maioria das laranjas doces, com média de três embriões/semente (dados não publicados). Também apresenta plantas com ciclo juvenil curto, com o florescimento de *seedlings* e de plantas obtidas por meio de enxertia de borbulhas adultas, a partir de um ou dois anos de cultivo. Ela tem a capacidade de florescer várias vezes no mesmo ano, independentemente de estímulos ambientais, bastando realizar podas. Após cada poda, as brotações emitidas se desenvolvem e apresentam uma flor na porção terminal do ramo 30-40 dias após. Após a poda, o número de dias até a formação de botões florais varia entre 5 e 20 dias, com ramos medindo entre 18 a 24 cm e número médio de folhas variando entre 9 e 12. Pelas análises morfo-anatômicas é possível observar a diferenciação de botão floral em laranja "x11" quando as brotações apresentam 13 mm de comprimento (VOIGT, 2013). Além disso, estas plantas podem ser facilmente crescidas em condições controladas (casa de vegetação) e as flores podem ser manualmente polinizadas.

Estes atributos fazem da laranjeira 'x11' um modelo atraente para estudos de genômica funcional, estudos importantes para investigar as funções de genes associados ao florescimento e frutificação e num curto período de tempo (1-2 anos) (Figura 1).



Figura 1 - Planta de laranjeira 'x11' demonstrando o florescimento um ano após a semeadura

2.1.3. Promotores tecido-preferenciais e laranjeira 'x11' como ferramenta para estudos de genômica funcional

Os promotores gênicos mais utilizados na transformação de plantas são os promotores do gene 35S do vírus do mosaico da couve- flor (CaMV), promotor do gene da nopalina sintetase (NOS), octopina sintetase (OCS), de *Agrobacterium tumefaciens*, e o promotor do gene codificador da ubiquitina (Ubi-1) de milho (POTENZA; ALEMAN; SENGUPTA-GOPALAN, 2004). Estes promotores expressam os genes de forma constitutiva, com padrão

variado e baixo, em alguns casos (ZHENG; MURAI, 1997; GREEN et al., 2002). A expressão de promotores constitutivos também não garante que o gene de interesse seja expresso no órgão adequado (NEUTEBOOM et al., 2002), podendo haver expressão em algum momento inoportuno ou em tecidos onde normalmente não seriam expressos, o que pode causar efeitos que prejudicam o crescimento e desenvolvimento normal da planta (HSIEH et al., 2002; KASUGA et al., 1999).

Para resolver problemas relacionados ao uso de promotores constitutivos, a expressão do transgene deve ser adequadamente ajustada ao *backgroud* da planta ou ao tipo de transgene desejado, através da expressão espacial e temporal dos genes candidatos, o que reduz os efeitos adversos (POTENZA; ALEMAN; SENGUPTA-GOPALAN, 2004). O uso de promotores tecido-específicos é uma das principais estratégias para restringir a expressão de transgenes, minimizando os prejuízos causados pelo uso de promotores com expressão constitutiva (POTENZA; ALEMAN; SENGUPTA-GOPALAN, 2004).

Em Citrus foram relatados poucos usos de promotores tecido-específicos, e até o presente momento não houve a descrição de nenhum promotor com especificidade para polpa de frutos, testado efetivamente em frutos de laranjeiras. Recentemente, regiões promotoras preferenciais para órgãos reprodutivos e polpa de Citrus foram isoladas de limão 'Eureka' [Citrus limon (L.) Burm] (SORKINA et al., 2011). Estas regiões promotoras do gene Cl111 (o qual apresenta expressão em ovário e polpa de Citrus), foram isoladas por apresentarem padrão de expressão ovário e polpa-preferenciais, sendo que em órgãos vegetativos, a expressão era nula ou muito baixa. Fragmentos com distintos tamanhos na região upstream ao gene Cl111 foram isolados e fusionados a um vetor de destino para dirigir a expressão do gene gusA (GUS). Estas construções foram testadas de forma transiente em polpa de frutos de laranjeira e usadas para a transformação de tomateiro, em sistema heterólogos, para o estudo da expressão dirigida por estas sequências promotoras (SORKINA et al., 2011). Apesar do resultado ter sido positivo para a expressão do gene gusA em polpa de laranja de forma transiente, e da expressão ser restrita a frutos de tomateiro, a especificidade de nenhuma destas sequências promotoras foram testadas em plantas de citros, devido ao longo período de juvenilidade destas plantas. De acordo com as características apresentadas pela laranjeira 'x11', esta variedade poderia ser empregada como ferramenta para a investigação da especificidade das sequências promotoras ovário ou polpa preferencial, ou de funções gênicas principalmente ligados à órgãos reprodutivos de Citrus, pois em um curto espaço de tempo poderá ser observado o fenótipo desejado. Portanto, a hipótese deste trabalho supõe que a transformação genética de laranjeira `x11´ com um gene repórter (GUS) poderá alterar o fenótipo do fruto, provando que em um curto espaço de tempo genes relacionados a frutificação possam ser estudados e que essa variedade é um modelo adequado para estudos de genômica funcional.

Apesar do progresso significativo no estabelecimento de protocolos de transformação genética de *A. tumefaciens*, alguns genótipos de *Citrus* ainda são recalcitrantes, com baixa eficiência de transformação (COSTA et al., 2002). Portanto, como a taxa de transformação é específica do genótipo, existe a necessidade de se otimizar as condições ideais para a transformação genética em cada genótipo utilizado para a produção de plantas transgênicas (DUTT; GROSSER, 2009). Neste estudo, realizamos a transformação genética do mutante espontâneo de florescimento precoce 'x11' usando *A. tumefaciens* armada com plasmídeo contendo um gene repórter (*gusA*) sob o controle do promotor CaMV 35S, ou sob o controle de uma região promotora ovário-polpa preferencial de *Citrus*, como ferramentas para avaliar o uso do genótipo como plataforma de genômica funcional para a investigação de genes relacionados ao florescimento e frutificação de *Citrus*, particularmente a laranja doce.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo geral

Estabelecer a laranjeira 'x11' como planta-modelo para estudos de genômica funcional de genes relacionados ao florescimento e a frutificação.

2.2.2. Objetivos específicos

1-) Otimizar o protocolo de transformação genética de laranjeira 'x11' para que o processo de transformação e obtenção das plantas transformadas seja realizado no menor espaço de tempo;

2-) Transformar explantes de laranjeira 'x11' com *Agrobacterium tumefaciens* armada com plasmídeo pCAMBIA2301, o qual contem o gene repórter β -glucuronidase (*gusA*), sob o

controle do promotor CAM 35S, para a obtenção e avaliação de frutos transformados geneticamente, num curto espaço de tempo;

3-) Transformar explantes de laranjeira 'x11' com *Agrobacterium tumefaciens* armada com um plasmídeo contendo o gene repórter o β -glucuronidase (*gusA*), sob o controle de uma região promotora possivelmente ovário-polpa preferencial de *Citrus*, para que os frutos sejam analisados para a especificidade da expressão do transgene, num curto espaço de tempo.

2.3. Material e Métodos

2.3.1. Material vegetal e fonte de explante

Sementes de laranjeira 'x11' foram obtidas de plantas mantidas no Banco de Germoplasma do Centro de Citricultura Sylvio Moreira – IAC, Cordeirópolis, SP. Estas plantas eram cultivadas em casa de vegetação e enxertadas sobre limão 'Cravo'. Em câmara de fluxo laminar, a casca das sementes foi removida e os embriões foram desinfetados superficialmente em 50% de hipoclorito de sódio comercial (concentração final de 1-1,5% de cloro ativo) e lavadas três vezes com água destilada. Os embriões foram então germinados em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio MS semi-sólido suplementado com 7 g L⁻¹ de ágar. Os tubos foram mantidos no escuro durante 30 dias, a temperatura de 25 \pm 1 °C, para o alongamento do epicótilo e, após esse período, as plantas foram transferidas para condições de luminosidade (50 µmol m⁻² s⁻¹ com 16 h de fotoperíodo), durante 15 dias. Os segmentos de epicótilo foram cortados no tamanho aproximado de um centímetro de comprimento.

2.3.2. Transformação de laranjeira 'x11' para expressão do gene repórter *gusA* sob o controle do promotor CAMV 35S e otimização de protocolo de transformação

2.3.2.1. Vetor de transformação

O vetor usado foi a *Agrobacterium tumefaciens*, cepa EHA105 (HOOD et al., 1993), contendo o plasmídeo pCAMBIA2301 [http://www.cambia.org.au], para a transformação das plantas de laranjeira 'x11'. O plasmídeo continha como gene de seleção o codificador da Neomicina fosfotransferase (*nptII*) e como gene repórter o β-glucuronidase (*gusA*), ambos sob o controle do promotor CaMV 35S e terminador NOS.

2.3.2.2. Transformação genética dos explantes de laranjeira 'x11'

Para melhorar a eficiência de regeneração e transformação do protocolo de transformação genética de laranjeira 'x11' foram realizados experimentos preliminares onde alguns parâmetros foram avaliados, tais como: concentração de 6- benzilaminopurina (BAP) em meio de regeneração, concentração de canamicina utilizada para seleção de transgênicos, tempo de inoculação dos segmentos de epicótilo com *Agrobacterium*, diferentes temperatura e dias de co–cultivo dos segmentos de epicótilo com *Agrobacterium* (Figura 3; Tabela 1). A eficiência de regeneração e transformação obtidas e as quantidades de explantes avaliados estão descritos na Tabela 1.

No protocolo otimizado e recomendado para que sejam realizados os eventos de transformação genética de laranjeira 'x11', células de *Agrobacterium tumefaciens* foram cultivadas em 20 mL de meio LB (Luria-Bertani, composto de 10 g L⁻¹ triptona, 10 g L⁻¹ NaCl e 5 g L⁻¹ extrato de levedura e 15 g L⁻¹ de Bactoagar) suplementado com 50 mg L⁻¹ de canamicina e 100 mg L⁻¹ de rifampicina, durante 16 h a 28°C em agitador orbital (120 rpm). A suspensão de bactérias foi centrifugada a 13.975 g durante 15 min e o sedimento foi ressuspenso em meio T1 [sais e vitaminas MS, 25 g L⁻¹ de sacarose, 0,5 g L⁻¹ de extrato de malte (Sigma, Saint Louis, MO, EUA) e 0,1 g de L⁻¹ de mio-inositol] suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) e 200 μ M de acetoseringona, pH 5,4, a

Abs₆₀₀= 0,6. Segmentos de epicótilo foram cortados e expostos à suspensão de *Agrobacterium*, sob agitação de 100 rpm. O período de co-cultivo foi 30 min (períodos de cocultivos previamente testados 10 - 30 min). O excesso de suspensão dos explantes foi seco com papel filtro estéril.

Os explantes foram cocultivados com *Agrobacterium* no meio T1, suplementado com 1,5 mg L⁻¹ de BAP, 0,01 mg L⁻¹ de 2,4- D, 100 μ M de acetosiringona e 7 g L⁻¹ de ágar (pH 5,8), no escuro, a 25 ± 1 °C (temperaturas de cocultivo previamente testadas: 22 a 28 °C), por três dias (períodos de cocultivo previamente avaliados: um a quatro dias). Em seguida, os explantes foram transferidos para o mesmo meio T1, mas suplementado com 500 mg de L⁻¹ de cefotaxima e 50 mg L⁻¹ de canamicina (concentrações de canamicina anteriormente testadas para a inibição da regeneração de brotos: 0 a 150 mg L⁻¹). Os explantes foram mantidos a 25 ± 1 °C, ambiente contendo luminosidade de 50 μ mol m⁻² s⁻¹, com 16 h de fotoperíodo, sendo transferidos para novos meios a cada 15 dias, até a regeneração dos brotos.

Três eventos de transformação genética foram realizados utilizando os mesmos procedimentos. Após 45 dias de cultivo, o número de brotos por explante (com mais de 4 mm) foi avaliado e a eficiência de regeneração foi calculada. Todas as brotações foram analisadas individualmente através da coloração histoquímica de gene *gusA* (GUS) (BRASILEIRO; CARNEIRO, 1998). Segundo este protocolo, as amostras foram incubadas no escuro em solução contendo X-gluc, n-n-dimetilformamida, fosfato de sódio e Triton-X, *overnight* a 37 °C e após esse período as amostras foram lavadas em etanol 70 %.

A eficiência de transformação foi estimada pela relação entre o número de brotos GUS- positivos em relação ao número de explantes inoculados, e a percentagem das brotações GUS-positivos foi calculada.

2.3.3. Transformação de laranjeira 'x11' para expressão do gene repórter *gusA* sob o controle da região promotora ovário-polpa preferencial

2.3.3.1. Construção do vetor de expressão dirigido pela região promotora ováriopolpa preferencial

Primeiramente foi realizada a extração de DNA genômico de folhas de limão 'Eureka' que foi usado como molde para a amplificação da região promotora ovário-polpa preferencial. O DNA foi extraído segundo o protocolo descrito por Tao et al. (2004) e o par de *primers* utilizado (TGTCTAGAATGATTTGCAGATGCACTATA e GACCCGGGCATTTTTTTTTTTTTCTATTTCATTCTTTCA) amplificou a região promotora do gene *Cl111* denominada LepC3. Os iniciadores amplificam uma sequência referente a 954 pb, *upstream* ao gene *Cl111* (SORKINA et al., 2011).

As reações de PCR foram realizadas em termociclador GeneAmp 9700 *thermocycler* (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) em volume final de 25 μ L com 25 ng de DNA, 10x *Taq buffer* contendo (NH₄)₂SO₄ [750 mM Tris-HCl, pH 8.8; 200mM (NH₄)₂SO₄]; 2 mM MgCl₂; 200 μ M dNTPs; 0,2 μ M de cada *primer* e 1 U *Taq* polimerase (Fermentas; Burlington, Canadá). As amplificações foram conduzidas a 95°C for 2 min, seguidas por 29 ciclos de 30 s a 95° C; 30 s a 60°C; 40 s a 72°C, seguidas por uma extensão final de 5 min a 72°C. O produto amplificado foi analisado por eletroforese em gel 1% agarose.

Em seguida, a sequência promotora amplificada foi clonada em vetor de entrada pCR8/GW/TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) do sistema Gateway, seguindo as especificações do fabricante (Figura 2).



Figura 2 – Mapa do vetor pCR8/GW/TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA)

Foi realizada a minipreparação do DNA plasmidial seguindo o protocolo proposto por Birboim e Doly (1979). As amostras foram quantificadas em fluorômetro DyNa Quant 200 (Hoeffer). Amplificações utilizando o *primer Forward* da sequência promotora e o *primer* GW2 (GTTGCAACAAATTGATGAGCAATTA- o qual se anela ao vetor de entrada pCR8) foram utilizados para confirmar o sentido correto de inserção da sequencia promotora no vetor de entrada. Cerca de cinco clones foram sequenciados para a confirmação da identidade das sequências clonadas. As sequências foram analisadas por alinhamento pelo *software MultAlin* (<u>http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html</u>); os clones idênticos na análise de similaridade foram agrupadas e um deles foi recombinado ao vetor de destino pKGWFS7 do sistema Gateway, formando a construção pKGWFS7::LepC3. Este vetor de destino possibilita que a região promotora seja inserida anteriormente ao gene *Egfp* e *gusA*, o qual possui o gene marcador de seleção negativo (*ccdB*) e gene de resistência *nptII*. As construções foram eletroporadas em *Agrobacterium tumefaciens*, cepa EHA105 (HOOD et al., 1993) e os eventos de transformação genética foram realizados como descritos no item 2.3.2.2.

2.3.4. Confirmação de plantas transgênicas e aclimatização

A confirmação da transgenia das plantas de laranjeira 'x11' transformadas com pCAMBIA2301 ou com pKGWFS7::LepC3 foi realizada por amplificação do DNA genômico total extraído de folhas das brotações regeneradas, de acordo com o protocolo estabelecido por Doyle e Doyle (1990). Primers específicos para o gene nptII do plasmídeo pCAMBIA2301 (CAATAGCAGCCAGTCCCTTC e AGACAATCGGCTGCTCTGAT -203 pb) pKGWFS7::LepC3 e para 0 gene nptII do plasmídeo (CAATAGCAGCCAGTCCCTTC e GCCCTGAATGAACTCCAAGA - 105 pb) foram desenhados utilizando o software Primer3 (ROZEN; SKALETSKY, 2000). A reação de amplificação foi realizada em termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) em volume final de 25 µl com 25 ng de DNA em tampão da Taq contendo (NH₄)₂SO₄ [75 mM Tris-HCl, pH 8,8; 20 mM de (NH₄)₂SO₄], 2 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada iniciador e 1 U de Taq polimerase (Fermentas, Burlington, Canadá). A reação foi realizada nos seguintes padrões: 95 °C por 2 min, seguido por 29 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 60 °C, 40 s a 72 °C, seguido por extensão final de 72 °C por 5 min. Os produtos amplificados foram detectados por eletroforese em gel de agarose a 1%.

As brotações positivas para a transformação com pCAMBIA2301 foram microenxertadas *in vitro* em plantas de citrange 'Carrizo'. Nos eventos de transformação genética para a análise da região promotora LepC3 as brotações foram primeiramente microenxertadas e depois, foi realizado o teste para a confirmação da transgenia.

As plantas microenxertadas foram transferidas para o meio T1 líquido suplementado com 25 g L ⁻¹ de sacarose, a $25 \pm 1^{\circ}$ C, sob 50 µmol m⁻² s⁻¹ com fotoperíodo de 16 h, durante 15 dias. As plântulas foram aclimatizadas e transferidas para casa de vegetação em vasos de 20 litros com uma mistura 1:1 de solo e substrato. As plantas transformadas com o vetor pCAMBIA2301 e que apresentaram florescimento e frutificação, foram submetidas ao ensaio para coloração histoquímica de GUS.

2.3.5. Análise da expressão do transgene por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT- qPCR) e estimativa do número de cópias dos transgenes inseridos por PCR quantitativo (qPCR)

Cinco plantas transgênicas para a construção pCAMBIA2301 e 10 plantas transgênicas para a construção pKGWFS7::LepC3 foram analisadas pelo método de PCR em tempo real usando *SYBR green*, para determinar a expressão dos transgenes e para estimar o número de cópias inseridas nas plantas transgênicas.

Para o cálculo da expressão do transgene, o RNA total foi extraído a partir das 15 plantas transgênicas de acordo com o protocolo descrito por Tao et al. (2004). A síntese de cDNA foi realizada como descrito por Pinheiro et al. (2011), e as reações de RT-qPCR foram volume final de 10 μL, 1 realizadas em contendo μL de **cDNA** (01:10 v/v); 0,5 µM de cada um dos primers específicos e 5 µL de 2X platinum SYBR -Green RT- qPCR - SuperMix UDG (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). As amplificações foram realizadas em termociclador 3000 RotorGene (Corbett Life Science, Sydney, Austrália), em triplicatas, com incubação inicial a 50 °C durante 2 min e 95 °C por 2 min, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15 s; 60 °C durante 15 s, e 72 °C por 20 s, com detecção de fluorescência no final dos ciclos de extensão. Após o ciclo final, as curvas de *melting* para cada fragmento amplificado foram analisadas entre 72 e 95 °C.

Análises de expressão gênica foram realizadas através do *software* REST *Relative Expression Software Tool* -REST 2005, (versão 1.9.12), (PFAFFL, 2001) para a confirmação da transgenia nas plantas transformadas com pCAMBIA2301 e com pKGWFS7::LepC3 em tecido de foliar. Neste experimento foi usado o gene *nptII* como alvo em cada uma das construções (*primers* descritos acima) e como gene referência foi utilizado o Fator de Iniciação de Tradução de Eucariotos 5A (*IF5A*) [TIGR: TC17010]

(ACTGAAACCGGAAACACCAA e TTTCCTTCAGCAAACCCATC; tamanho do *amplicon* = 89 pb).

As plantas transformadas com pKGWFS7::LepC3 também foram submetidas a análise da expressão do gene *gusA*, em tecido foliar. Neste experimento foram comparadas a expressão entre as plantas pKGWFS7::LepC3 e a planta #4, transformada com pCAMBIA2301, a qual possui o gene *gusA* (TGGCAAAAAACCGAAGAAAAAC e GCACCAACAGAGAGAGAGAAAA, tamanho do *amplicon* = 86 pb) dirigido pelo promotor CAMV 35S. Como gene referência foi utilizado o codificador da Actina (*ACT*) (CCGAGCGTGGTTATTCTTTC e CTGAGCTGGTCTTTGCTGTCT, tamanho do *amplicon* = 123 pb).

Para estimar o número de cópias do transgene, *primers* para o gene *nptII* (descritos acima) e para o gene endógeno da proteína de transferência de lipídeos (*LTP*) [GenBank : AF369931] (ACACCTGACCGCCAAACT e AAGGAATGCTGACT CCACAAG; tamanho do *amplicon* = 115 pb), presente em duas cópias no genoma de *C. sinensis* (SONG et al., 1995; WU; BURNS, 2003), foram utilizados nas reações de amplificação do DNA genômico das 15 plantas presumivelmente transgênicas, mais uma respectiva planta controle. As reações de amplificação de qPCR foram realizadas em triplicatas, para as plantas transformadas com pCAMBIA2301 e em quintuplicatas para as demais plantas, tal como descrito acima no experimento para análise da expressão do transgene *nptII* e do gene *gusA*.

A estimativa do número de cópias do transgene foi realizada como descrito por Mason et al. (2002) e Omar et al. (2008). As curvas de eficiência foram preparadas para o transgene *nptII* e para o gene endógeno *LTP*. Os resultados obtidos das amostras transgênicas foram comparados com a estimativa do controle e a quantidade do transgene foi dividida pelo valor do gene endógeno. Em seguida, o coeficiente r1 (calibrador virtual) foi calculado para o transgene *nptII* utilizando os dados de todas as plantas transgênicas e da planta controle (MASON et al., 2002).

2.4. Resultados e Discussão

2.4.1. Otimização do protocolo e transformação de laranjeira 'x11' com pCAMBIA2301

Experimentos foram previamente realizados para otimizar as condições de transformação genética dos explantes de laranjeira 'x11', incluindo a determinação da concentração ideal de 6- benzilaminopurina (BAP) no meio de regeneração, a concentração de canamicina para seleção dos eventos transgênicos e condições de inoculação e de cocultivo (Figura 3; Tabela 1). A otimização das condições de regeneração e transformação de segmentos de epicótilo de laranja doce 'x11' resultaram em eficiência de regeneração de 104% a 382%, calculados a partir do número de brotações em relação aos explantes inoculados, em experimentos que foram testados as condições ideais de BAP (sem presença da *Agrobacterium*). Considerando os experimentos onde os explantes foram inoculados com *Agrobacterium, a* eficiência de transformação mínima foi de 8,9%, em explantes cocultivados a 28°C, e máxima de 29,7%, em explantes cocultivados por 2 dias.

Cerca de 1.447 explantes foram submetidos ao processo de transformação genética com o plasmídeo pCAMBIA2301, o que resultou em 475 brotações regeneradas, das quais 270 foram positivas para a coloração de GUS. Brotações GUS-positivas foram avaliadas cerca de 45 dias após a inoculação com *A. tumefaciens*, e representaram cerca de 57% do total de brotos analisados, contabilizando uma eficiência de transformação média de 18,6%.

A eficiência de transformação de plantas de *Citrus* é genótipo-dependente, e as taxas relatadas na literatura variam de 2% em laranja doce 'Ridge pineapple' (GUTIÉRREZ et al., 1997), a 87,7%, em *P. trifoliata* (KANEYOSHI et al., 1994). A eficiência de transformação do protocolo definido neste estudo para laranjeira doce 'x11' alcançou em alguns experimentos 29,8% (Tabela 1), superior às taxas relatadas por outras laranjas doces como 'Valência' (23,8%) (BOSCARIOL et al., 2003), 'Hamlin' (25%) (DUTT; GROSSER, 2009), citrange 'Carrizo' (20,6%) (PEÑA et al., 1995), às descritas para lima 'Mexicana' (8 %) (DUTT; GROSSER, 2009), e *Fortunella crassifolia* (3,6 %) (GUTIÉRREZ et al., 1997), e superior também à taxa de eficiência de transformação do mutante de florescimento precoce *P. trifoliata* (20,7 %) (TAN et al., 2009).

Tabela 1 - Resumo das condições de otimização do protocolo de transformação genética dos explantes de laranjeira 'x11'. Avaliação do número de explantes inoculados, explantes com brotações, número total de brotações, eficiência de regeneração das brotações, número de brotos GUS - positivos, eficiência de transformação e percentual de brotações GUS - positivos de laranjeira doce 'x11', obtidos em três experimentos independentes^w

Fatores avaliados	Tratamentos	N°. de explantes cultivados	N°. de explantes que produziram brotações	N°. de brotações regeneradas	Eficiência de regeneração ^x	N° de brotações GUS positivas (%)	Eficiência da transformação (em função dos explantes) ^y
	$0 \text{ mg } L^{-1}$	141	133	146	1.04 (104%) c	-	-
Concentração BAP	0.5 mg L^{-1}	176	171	428	2.40 (240%) b	-	-
3	1.5 mg L^{-1}	163	158	633	3.84 (384%) a	-	-
	3.0 mg L^{-1}	127	124	493	3.82 (382%) a	-	-
Concentração de	$0 \text{ mg } \text{L}^{-1}$	100	96	189	1.89 (189%)	-	-
canamicina	50 mg L^{-1}	100	0	0	0	-	-
	100 mg L^{-1}	100	0	0	0	-	-
	150 mg L ⁻¹	100	0	0	0	-	-
Tempo de	10 min	189	45	92	0.49 (49%) ns	44 (47.8%)	23.3% ns
Inoculação da	20 min	171	38	73	0.43 (43%) ns	36 (49.3%)	21.1% ns
Agrobacterium	30 min	99	19	37	0.37(37%) ns	24 (64.9%)	24.2% ns
Temperatura de	22 °C	165	26	41	0.25 (25%) ns	27 (65.9%)	16.4% ns
co-cultivo	25 °C	172	32	54	0.31 (31%) ns	42 (77.8%)	24.4% ns
	28 °C	168	22	32	0.19 (19%) ns	15 (46.9%)	8.9% ns
	1 dia	134	15	22	0.16 (16%) b	16 (72.7%)	11.9% b
Dias de	2 dias	118	22	49	0.42(42%) a	35 (71.4%)	29.7% a
co-cultivo	3 dias	108	13	27	0.25(25%) ab	11 (40.7%)	10.2% b
	4 dias	123	17	48	0.39 (39%) ab	20 (41.7%)	16.3% ab
Média total dos experimentos de transformação		1447	249	475	0.33	270 (56.8%)	18.6%

*O delineamento experimental usado neste experimento foi completamente casualizado, e os dados de eficiência de regeneração e transformação foram transformados (\sqrt{x} + 0.5) antes da análise da variância (ANOVA), considerando-se como fatores: tratamento, experiência e interação, utilizando o procedimento GLM do SAS versão 6.11;

^xNúmero de brotações em relação aos explantes inoculados;

^yNúmero de brotações GUS + em relação aos explantes inoculados;

^z Número de brotações GUS + em relação a brotações regeneradas.



Figura 3 – Experimentos realizados para a otimização do protocolo de transformação genética de laranjeira 'x11' transformada com pCAMBIA2301. A: avaliação da sensibilidade dos explantes a doses crescentes do antibiótico canamicina. B: concentrações crescentes de BAP. Em C: Tempo de exposição do explante à *A. tumefaciens*. Em D: Temperatura ideal para o co-cultivo. Em E: Avaliação dos dias de co-cultivo
2.4.2. Transformação de laranjeira 'x11' com pKGWFS7::LepC3

Plantas de laranjeira 'x11' foram transformadas para a análise da especificidade da região promotora LepC3. Para isso foram realizados quatro ensaios de transformação genética com a construção pKGWFS7::LepC3, os quais resultaram 704 explantes inoculados e 151 brotações regeneradas (Tabela 2). Dez plantas confirmadas como transgênicas estão sendo cultivadas em casa de vegetação. A eficiência da regeneração e transformação não foram calculadas neste experimento.

Tabela 2 – Descrição do número de explantes submetidos ao processo de transformação genética com a construção pKGWFS7::LepC3, número de brotações regeneradas, microenxertadas e cultivadas em casa de vegetação

	Construção	Variedade	Total de explantes inoculados	Número de brotos regenerados	Número de plantas microenxerta das	Número de plantas aclimatizadas
L	epC3::pKGWFS7	'x11'	704	151	50	10

2.4.3. Caracterização das brotações e plantas transgênicas transformadas com pCAMBIA2301 e pKGWFS7::LepC3

Plantas provenientes do processo de transformação genética com a construção pCAMBIA2301, tiveram suas brotações submetidas a ensaios histoquímicos da atividade do gene *gusA*. Dos 270 brotos considerados GUS-positivos, cinco foram microenxertados *in vitro* em plântulas de citrange 'Carrizo'. Estas plântulas foram aclimatizadas em casa de vegetação. Quatro plantas transgênicas exibiram as primeiras flores três meses após o estabelecimento *ex vitro* (Figura 4E), e a outra, dois meses mais tarde (cinco meses após a aclimatização), independentemente da estação do ano. Todas as plantas apresentaram o mesmo fenótipo, com uma flor terminal em quase todas as hastes desenvolvidas. As flores exibiram estames e gineceu férteis, com auto-polinização induzindo o desenvolvimento de frutos contendo sementes.

A coloração histoquímica para a atividade do *gusA* (GUS) foi realizada em segmentos de caule, flores e frutos das plantas transgênicas aclimatizadas, com cerca de 5-7 meses de idade, confirmando a expressão constitutiva do gene *gusA* nesses órgãos (Figura 4A, B, C e D).



Figura 4 - Tecidos de laranjeira 'x11' #1, transformada com pCAMBIA2301 e expressando gene gusA. A) seção transversal do segmento de caule, B) pedúnculo floral; C) flor após a antese; D) fruto seccionado ao meio, e E) planta transgênica da laranjeira doce 'x11' #1 no estádio de florescimento (esquerda) e laranjeira doce 'Valência' (à direita), três meses após a aclimatização

As análises de PCR das cinco plantas possivelmente transgênicas com a construção pCAMBIA2301 (GUS-positivas) indicaram a presença de um fragmento de 203 pb correspondente ao fragmento amplificado esperado do gene *nptII* (Figura 5).



Figura 5 - Amplificação de fragmento do gene *nptII* (203 pb): L marcador 100 pb (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), C+ controle positivo (plasmídeo pCAMBIA2301), C- controle negativo (planta não transformada), 1-5 plantas transformadas, W- controle negativo da reação

Quando as plantas transformadas com as construções pCAMBIA2301 e pKGWFS7::LepC3 foram analisadas quanto ao número de cópias dos transgenes inseridos, a eficiência de amplificação dos iniciadores para os dois genes *nptII* e *LTP do* plasmídeo pCAMBIA2301 foi de cerca de 100 %. Já a eficiência do *primer* referente ao gene *nptII* do plasmídeo pKGWFS7::LepC3 foi igual a 0,88. O calibrador virtual (coeficiente r1) foi calculado para o gene *nptII* como descrito por Mason et al. (2002), e no presente experimento o valor de r1 calculado foi igual a 0,8 para plantas pCAMBIA2301 e 0,15 para plantas pKGWFS7::LepC3. Dessa maneira estimou-se que entre as cinco plantas possivelmente transgênicas analisadas nos eventos de transformação genética referentes ao plasmídeo pCAMBIA2301, os eventos #1, #3 e #4 apresentaram uma única cópia do transgene *nptII*, enquanto a planta #5 continha duas cópias e a planta #2, quatro cópias (Tabela 3).

Na análise do número de cópias inseridos em plantas de laranjeira 'x11' transformadas com a construção pKGWFS7::LepC3, os eventos #1, #3, #4, #5, #6 e #8 apresentaram apenas uma cópia do transgene inserida no genoma. O número de cópias do transgene no evento #3 (pCAMBIA2301), #2, #7, #9 e #10 (pKGWFS7::LepC3) foram estimados em 0,2; 0,1; 0,5;

0,3 e 0,3 respectivamente, utilizando-se o método descrito por Mason et al. (2002). No entanto, foi demonstrado pela coloração histoquímica de GUS (pCAMBIA2301), amplificação por PCR e análise da expressão do gene *nptII* que estas plantas são transgênicas. Assim, assumiu-se que uma única cópia do transgene *nptII* foi inserida em cada uma destas plantas.

Este tipo de incerteza na estimativa do número de cópias dos transgenes tem sido observado em vários estudos (MASON et al., 2002; DONNARUMMA et al., 2011; WEN et al., 2012). Isto pode ocorrer em alguns casos devido ao fato da reação de qPCR não poder detectar rearranjos do T-DNA durante a inserção no genoma da espécie receptora ou devido à possível ocorrência de uma perda parcial do transgene no cassete de expressão. No entanto, este método pode ser considerado como uma técnica simples, rápida, eficaz e com elevada sensibilidade, em comparação com outros métodos, tais como *Southern blot* e, portanto, é considerada confiável para estimar o número de cópias do transgene (MASON et al., 2002).

Tabela 3 – Número de cópias estimado pela técnica de qPCR e assumido do transgene *nptII*, de cinco plantas transgênicas 'x11' transformadas com a construção pCAMBIA2301

Plantas pCAMBIA2301	Número de cópias estimado por qPCR	Número de cópias assumido	
Controle (Não Transformada)	0.0	0	
#1	1.0	1	
#2	4.4	4	
#3	0.2	1*	
#4	1.2	1	
#5	2.2	2	

* Valor assumido com base nos resultados dos experimentos de estimativa de número de cópias de transgene por qPCR, detecção por PCR amplificando fragmento do gene *nptII* e expressão relativa do transgene *nptII* em relação a plantas não transformadas geneticamente e teste histoquímico da atividade de *gusA*

Número de cópias	Número de cópias assumido	
estimado por qPCR		
0.0	0	
1,1	1	
0,1	1*	
1,2	1	
1,1	1	
1,7	2	
0,8	1	
0,5	1*	
0,7	1	
0,3	1*	
0.3	1*	
	Número de cópias estimado por qPCR 0.0 1,1 0,1 1,2 1,1 1,7 0,8 0,5 0,7 0,3 0,3	

Tabela 4 - Número de cópias estimado pela técnica de qPCR e assumido do transgene *nptII*, de dez plantas transgênicas 'x11' transformadas com a construção pKGWFS7::LepC3

* Valor assumido com base nos resultados dos experimentos de estimativa de número de cópias de transgene por qPCR, detecção por PCR amplificando fragmento do gene *nptII*, expressão relativa do transgene *nptII* em relação a plantas não transformadas geneticamente e teste histoquímico da atividade de *gusA*

Para a confirmação da transgenia das plantas transformadas com pCAMBIA2301 foi calculado o nível de acúmulo de transcritos do gene *nptII* em relação a uma planta não transformada. Este experimento demonstrou que a expressão gênica do gene *nptII* variou entre as plantas transgênicas avaliadas. O maior número de transcritos acumulados foi detectado na planta #1 (~135.000 vezes maior do que a planta controle; Figura 4), que continha uma única cópia do transgene, enquanto que o menor número de transcritos foi detectada no evento #5 (Figura 6), com cerca de duas cópias do transgene.

Estudos anteriores indicaram que plantas com maior número de cópias do transgene resultaram em um menor nível de expressão do transgene, expressão instável ou mesmo silenciamento gênico (BELTRÁN et al., 2009; HADI et al., 2012). Por outro lado, a inserção de apenas uma ou duas cópias tenderia a resultar em níveis mais elevados de expressão (FLAVELL, 1994; VAUCHERET et al., 1997).



Figura 6 - Expressão relativa do gene *nptII* no controle (Controle- planta não transformada) e das plantas transgênicas #1, #2, #3, #4 e #5, transformadas com pCAMBIA2301, em relação ao gene codificador da proteína Fator de Iniciação de Tradução de Eucariotos 5A (*IF5A*), usado com gene referência

Para a confirmação da transgenia das plantas transformadas com a construção pKGWFS7::LepC3, a expressão do gene *nptII* foi quantificada em tecido de folhas, também em relação a uma planta não transformada geneticamente. Esta abordagem foi usada pois o gene *nptII* está sob controle do promotor *nos*, independente da expressão do promotor LepC3, que teve a expressão gênica testada em seguida. O maior nível de transcritos acumulados foi de 379 vezes em relação ao controle na planta na planta #3, a qual possui uma cópia do gene inserida no genoma e expressão mínima de 1,7 vezes na planta #1, a qual também possui uma cópia do transgene inserida no genoma (Figura 7).



Figura 7 - Expressão relativa do gene *nptII* no controle (Controle- planta não transformada) e das plantas transgênicas de #1 a #10, transformadas com pKGWFS7::LepC3, planca em relação ao gene codificador da proteína Fator de Iniciação de Tradução de Eucariotos 5A (*IF5A*), usado com gene referência

Ainda em plantas transformadas com pKGWFS7::LepC3, foi realizado o cálculo da expressão relativa do gene *gusA* para comparar a expressão de uma planta que expressa este gene de forma constitutiva, com plantas pKGWFS7::LepC3, que devem expressar preferencialmente em tecidos de ovário e polpa de *Citrus*. Para isso uma planta transformada com pCAMBIA2301, a qual possui o gene *gusA* dirigido pelo promotor CAMV 35S (expressão constitutiva- planta #4), foi usada como controle positivo. Todas os eventos transformados com a construção pKGWFS7::LepC3 tiveram o acúmulo de transcritos do gene *gusA* avaliados em relação a planta controle. Uma planta não transformada geneticamente foi usada como controle negativo da expressão.

Neste experimento o gene *ACT* foi usado como referência e as análises foram realizadas tecido foliar (Figura 8).



Figura 8 - Expressão relativa do gene gusA em tecido foliar nas plantas transformadas com pKGWFS7::LepC3 (de #1 a #10) em relação a planta transformada com pCAMBIA2301, a qual possui o gene gusA sob o controle do promotor CAMV 35S (Controle +). Como controle negativo (Controle -) foi utilizada planta não transformada geneticamente. A expressão relativa foi calculada em relação ao gene codificador da proteína Actina (ACT), usado com gene referência

O resultado da expressão do gene *gusA* em folhas de laranjeira 'x11' transformadas com a construção pKGWFS7::LepC3 em relação a planta transformada com o gene *gusA* sob o controle do promotor 35S, mostrou que a expressão do gene *gusA* em folhas de laranjeiras pKGWFS7::LepC3, em todos os eventos foram inferiores em relação ao controle (Figura 8).

A Figura 9 ilustra os picos de *melting* de amostras da planta #4 (transformada com pCAMBIA2301 e possui o gene *gusA* sob controle do promotor CAMV 35S) e das plantas transformadas com pKGWFS7::LepC3 (as quais possuem o gene *gusA* dirigido pelo promotor ovário-polpa preferencial LepC3).



Figura 9 – Análise dos picos de *melting* em RT-qPCR. Em C+: Pico referente à amplificação do gene *gusA* à partir de plantas transformadas com a construção pCAMBIA2301 (sob o controle do promotor CAMV 35S). Plantas pKGWFS7::LepC3. Plantas transformadas com a construção pKGWFS7::LepC3 mostrando a não amplificação do gene *gusA* em material genético proveniente de folhas. C-: controle negativo da reação

O ensaio histoquímico da atividade do gene *gusA* também foi realizada em folhas de laranjeira pCAMBIA2301 (sob o controle do promotor CAMV 35S) comparadas com folhas de laranjeira pKGWFS7::LepC3. O resultado demonstrou que folhas de laranjeira 'x11', transformadas com pKGWFS7::LepC3 apresentaram com coloração azul muito fraca ou nula (dados não mostrados).

Comparando os dados da atividade histoquímica do gene *gusA* e a análise da expressão relativa deste gene dirigido pela região promotora LepC3, pode-se sugerir que essa região promotora não tem expressão constitutiva, e possivelmente restringiria a expressão do gene a ovário e polpa de frutos de *Citrus*. Porém não é possível afirmar a especificidade desta região promotora sem que seja realizado o teste histoquímico da atividade do gene *gusA* e a análise da expressão relativa deste gene em ovário e polpa de frutos de laranjeira 'x11' transformadas com a construção pKGWFS7::LepC3. A expressão do e o teste histoquímico da atividade do gene *gusA* não foi realizada em ovário e polpa de frutos pois as plantas ainda estão em fase de desenvolvimento.

2.4.4. Perspectivas de estudos de genômica funcional em laranja doce

Com a conclusão do sequenciamento do genoma de importantes espécies de citros (GMITTER JUNIOR et al., 2012, http://www.citrusgenomedb.org), juntamente com a grande disponibilidade de sequências expressas (FUJII et al., 2007; TEROL et al., 2008) e os dados de proteínas (LICCIARDELLO et al., 2011; YUN et al., 2013), há uma urgente necessidade do estabelecimento de uma plataforma de genômica funcional para descobrir as várias funções de genes envolvidos na estrutura, sinalização e vias regulatórias de frutos de laranja doce, foco econômico da produção de *Citrus*. Várias espécies de plantas têm sido utilizadas como modelo ortólogo, tais como *Arabidopsis* e tomate, para investigar as funções de genes de citros (GUO et al., 2005, SORKINA et al., 2011; KIM et al., 2011). No entanto, estes sistemas modelo podem ser diferentes para a função do gene específico ou da regulação de sinalização.

Deste modo, a avaliação de promotores específicos também é dificultada em sistemas modelo ortologos. Além disso, o uso das plantas de florescimento precoce de laranjeira 'x11' permitirá que seja realizada a auto-fertilização e a seleção de plantas homozigóticas para o transgene, o que representará maior estabilidade que a observada em plantas hemizigóticas, derivadas diretamente dos experimentos de transformação genética. Assim, a característica de florescimento precoce representa uma vantagem adicional em comparação a outros experimentos relatados anteriormente envolvendo plantas cítricas, onde as avaliações fenotípicas das plantas transformadas poderão apenas ser realizadas em plantas hemizigotas (BARBOSA-MENDES et al., 2009; YANG et al., 2011; GONG; LIU, 2013).

Nossos resultados indicam que a laranja doce mutante 'x11', com florescimento precoce, é adequada para estudos de genômica funcional. Nós comprovamos que a 'x11' é capaz de florescer e produzir frutos expressando o transgene em um período de cerca de cinco meses após o estabelecimento em casa de vegetação. Foram propostas outras espécies de florescimento e frutificação precoces para serem usadas em estudos de genômica funcional de *Citrus*, tais como uma *P. trifoliata* [L.] Raf (TAN et al., 2009; TONG et al., 2009), *Citrus aurantifolia* (KOLTUNOW et al., 2000) e kumquat (*Fortunella* sp.) (YANG et al., 2007), no entanto, nenhuma destas espécies apresenta grande interesse comercial e eficiência de transformação comparável, tal como a laranjeira 'x11'.

2.5. Conclusão

Os resultados deste estudo demonstraram que o mutante de florescimento precoce de laranjeira 'x11' se apresenta como um genótipo adequado para estudos de genômica funcional de *Citrus*, principalmente em estudos de genes envolvidos nos processos de floração e frutificação, permitindo a rápida avaliação do fenótipo resultante.

Referências

AGRIANUAL. Citrus. São Paulo: FNP Informa Economics, 2014. p. 237-268.

ALMEIDA, W. A. B. et al. Genetic transformation and plant recovery from mature tissues of *Citrus sinensis* L. Osbeck. **Plant Science**, Amsterdam, v. 164, p. 203-211, 2003.

ARUMUGANATHAN, K.; EARLE, E. D. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 9, p. 208–218, 1991.

BARBOSA-MENDES, J. M. Genetic transformation of *Citrus sinensis* cv. Hamlin with *hrpN* gene from *Erwinia amylovora* and evaluation of the transgenic lines for resistance to citrus canker. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 122, p. 109–115, 2009.

BELTRÁN, J. et al. Quantitative analysis of transgenes in cassava plants using real-time PCR technology. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology. Plant, Gaithersburg, v. 45, p. 48-56, 2009.

BIRNBOIM, H.C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Research, London, v. 7, p. 1513-23, 1979.

BOSCARIOL, R. L. et al. The use of the PMI/mannoses lesion system to recover transgenic sweet orange plants (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Plant Cell Reports**, New York, v. 22, p. 122–128, 2003.

BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de C. β -Glucuronidase (GUS). In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de C. (ed.). Manual de transformação genética de plantas. Brasília, DF: EMBRAPA, SPI; CENARGEN, 1998. p. 127-139.

CALABRESE, F. La favolosa storia degli agrumi. Palermo: L'Epos Società Editrice, 1990. p. 82-128.

CERVERA, C. et al. Production of transgenic adult plants from Clementine mandarin by enhancing cell competence for transformation and regeneration. **Tree Physiology**, Victoria, v. 28, p. 55-66, 2008.

CERVERA, M. et al. Generation of citrus plants with the tolerance to salinity gene *HAL2* from yeast. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, Ashford, v. 75, p. 26–30, 2000.

CERVERA, M. et al. Genetic transformation of mature citrus plants. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 286, p. 177-188, 2005.

CHAPOT, H. The citrus plant. In: CIBA-GEIGY AGROCHEMICALS. Citrus. Basle, Switzerland, 1975. p. 6-13. (Technical Monograph, 4).

COSTA, M. G. C.; OTONI, W. C.; MOORE, G. A. An evaluation of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus paradisi* (Macf.) and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic genes. **Plant Cell Reports**, New York, v. 21, p. 365–373, 2002.

DENG, X.; DUAN, Y. Modification of perennial fruit trees. In: FLADUNG, M.; EWALD, D. (Ed.). **Tree transgenesis**: recent developments. Heidelberg: Springer, 2006. p. 47–66.

DOMINGUES, E. T. et al. Estudo da poliembrionia em laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck). In: ENCONTRO CIENTÍFICO DOS PÓS-GRADUANDOS, 2., 1996, Piracicaba. **Resumos...** Piracicaba: CENA/USP, 1996. p. 6.

DOMINGUES, E. T. et al. Poliembrionia em clones de laranja 'pêra' e variedades assemelhadas. **Bragantia**, Campinas, v. 57, n. 2, p. 251-258, 1998.

DONADIO, L. C.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MOREIRA, C. S. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: MATTOS JÚNIOR, D. et al. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico; FUNDAG, 2005. p. 1-18.

DONNARUMMA, F. et al. Transgene copy number estimation and analysis of gene expression levels in *Populus* spp. transgenic lines. **BMC Proceedings**, London, v. 5, p. 152, 2011. (Suppl. 7).

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, Gaithersburg, v. 12, p. 13-15, 1990.

DUTT, M.; GROSSER, J. W. Evaluation of parameters affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 98, p. 331–340, 2009.

ENDO, T. et al. Ectopic expression of an *FT* homolog from *Citrus* confers an early flowering phenotype on trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.). **Transgenic Research**, Heidelberg, v. 14, p. 703–712, 2005.

FAGOAGA, C. et al. Engineering of gibberellin levels in citrus by sense and antisense overexpression of a *GA 20-oxidase* gene modifies plant architecture. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, p. 1407-1420, 2007.

FAO. Nutritional and health benefits of citrus fruits. Rome, 1999. Disponível em: http://www.fao.org/docrep/X2650t/x2650t03.htm>. Acesso em: 08 abr. 2014.

FLAVELL, R. B. Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 91, p. 3490-3496, 1994.

FROST, H. B.; SOOST, R. K. Seed reproduction: development of gametes and embryos. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L. D.; WEBBER, H. J. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley, California: Division of Agricultural Sciences, University of California Press, 1968. v. 2, p. 292-334.

FUJII, H. et al. Profiling ethylene responsive genes in mature mandarin fruit using a citrus 22K oligoarray. **Plant Science**, Amsterdam, v. 173, p. 340–348, 2007.

GHORBEL R. et al. Efficiency genetic transformation of sour orange (*Citrus aurantium* L.) and production of transgenic trees containing the coat protein gene of citrus tristeza virus. **Tree Physiology**, Victoria, v. 20, p. 1183–1189, 2000.

GMITTER JUNIOR, F. et al. Citrus genomics. **Tree Genetics and Genomes**, Heidelberg, v. 8, p. 611-626, 2012.

GONG, X-Q.; LIU, J-H.; Genetic transformation and genes for resistance to abiotic and biotic stresses in *Citrus* and its related genera. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 113, p. 137–147, 2013.

GREEN, J. et al. Analysis of the expression patterns of the Arabidopsis thaliana tubulin-1 and Zea mays ubiquitin-1 promoters in rice plants in association with nematode infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.60, p.197-205, 2002.

GUERRA, M. et al. Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a citrus germplasm bank. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 20, n. 3, 1997. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84551997000300021.

GUO, W. et al. Protoplast transformation and regeneration of transgenic Valencia sweet orange plants containing a juice quality-related pectin methylesterase gene. **Plant Cell Reports**, New York, v. 24, p. 482-486, 2005.

GUTIÉRREZ, E. M. A.; LUTH, D.; MOORE, G. A. 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 Reports**, New York, v. 16, p. 745–753, 1997.

HADI, F. et al. Development of quantitative competitive PCR for determination of copy number and expression level of the synthetic glyphosate oxidoreductase gene in transgenic canola plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v. 15, p. 2-2, 2012.

HASSE, G. A laranja no Brasil 1500-1987: a história da agroindústria cítrica brasileira, dos quintais coloniais às fábricas exportadoras de suco do século XX. São Paulo: Ed. Duprat & Lobe, 1987. 296 p.

HE, Y. et al. Production and evaluation of transgenic sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) containing bivalent antibacterial peptide genes (*Shiva* A and *Cecropin* B) via a novel *Agrobacterium*-mediated transformation of mature axillary buds. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 128, p. 99-107, 2011.

HOOD, E. E. et al. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. **Transgenic Research**, Heidelberg, v. 2, p. 208-218, 1993.

HSIEH, T. H.; LEE, J. T.; CHARNG, Y. Y.; CHAN, M. T. Tomato plants ectopically expressing Arabidopsis CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, p. 618–626, 2002.

KANEYOSHI, J. et al. A simple and efficient gene transfer system of trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.). **Plant Cell Reports**, New York, v. 13, p. 541–545, 1994.

KASUGA, M.; LIU, Q.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. **Nature Biotechnology**, New York, v. 17, p. 287–291, 1999.

KIM, I. J. et al. Citrus *Lea* promoter confers fruit-preferential and stress-inducible gene expression in *Arabidopsis*. Canadian Journal of Plant Science, Ottawa, v. 91, p. 459–466, 2011.

KOLTUNOW, A. M. et al. Regeneration of West Indian limes (*Citrus aurantifolia*) containing genes for decreased seed set. Acta Horticulturae, The Hage, n. 535, p. 81–91, 2000.

LIANG, S. Q.; ZHU, W. X.; XIANG, W. T. Precocious trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) biology characteristic and its stock experiment. **ZheJiang Citrus**, Ontario, v. 16, p. 2–4, 1999.

LICCIARDELLO, C. et al. Analysis of *Citrus sinensis* L. (Osbeck) flesh proteome at maturity time. **Acta Horticulturae**, The Hage, n. 892, p. 343-349, 2011.

MARQUES, M. C. A new set of ESTs and cDNA clones from full-length and normalized libraries for gene discovery and functional characterization in citrus. **BMC Genomics**, London, v. 10, p. 428-444, 2009.

MASON, G. et al. Estimating the number of integrations in transformed plants by quantitative real-time PCR. **BMC Biotechnology**, London, v. 2, p. 20–30, 2002.

MENDES, J. M. et al. Genetic transformation of *Citrus sinensis* cv. Hamlin with *hrpN* gene from *Erwinia amylovora* and evaluation of the transgenic lines for resistance to citrus canker. **Scientia Horticulturae**, Amsterdan, v. 122, p. 109–115, 2009.

MOORE, G. A. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus* stem segments and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, New York, v. 11, p. 238–242, 1992.

MOREIRA, S.; GURGEL, J. T. A.; ARRUDA, L. F. Poliembrionia em *Citrus*. Bragantia, Campinas, v. 7, n. 3, p. 69-105, 1947.

NEUTEBOOM, L. W. et al. Characterization and tissue-regulated expression of genes involved in pineapple (*Ananas comosus* L.) root development. **Plant Science**, Amsterdam, v. 165, p. 1021-1035, 2002.

OMAR, A. A. et al. Estimation of transgene copy number in transformed citrus plants by quantitative multiplex real-time PCR. **Biotechnology Progress**, New York, v. 24, p. 1241-1248, 2008.

PEÑA, L. et al. Constitutive expression of *Arabidopsis LEAFY* or *APETALA1* genes in citrus reduces their generation time. **Nature Biotechnology**, New York, v. 19, p. 263–267, 2001.

PEÑA, L. et al. High efficiency *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of citrus. **Plant Science**, Amsterdam, v. 104, p. 183–19, 1995.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 29, p. 2002–2007, 2001.

PINHEIRO, T. T. et al. Establishing references for gene expression analyses by RT-qPCR in *Theobroma cacao* tissues. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 10, p. 3291-305, 2011.

POTENZA, C.; ALEMAN, L.; SENGUPTA-GOPALAN, C. Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology. Plant, Gaithersburg, v. 40, p. 1–22, 2004.

PRATES, H. S. Poliembrionia em citros. Jaboticabal: UNESP, 1977. 41 p.

RAMPERSAUD, G. C. A comparison of nutrient density scores for 100% fruit juices. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 72, p. S261-S266, 2007.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 132, p. 365-86, 2000.

SCORA, R. W. On the history and origin of Citrus. Bulletin of Torrey Botanical Club, Lawrence, v. 102, p. 369–375, 1975.

SILALAHI, J. Anticancer and health protective properties of citrus fruit components. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, London, v. 11, n. 1, p. 79–84, 2002.

SONG, W. Y. et al. A receptor kinase like protein encoded by the rice disease resistance gene *Xa21*. **Science**, Washington, DC, v. 270, p. 1804–1806, 1995.

SOOST, R. K.; CAMERON, J. W. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J. N. (Ed.). Advances in fruit breeding. West Lafayette, IN: Purdue University Press, 1975. p. 507-540.

SORKINA, A. et al. Isolation of a citrus promoter specific for reproductive organs and its functional analysis in isolated juice sacs and tomato. **Plant Cell Reports**, New York, v. 30, p. 1627-1640, 2011.

SWINGLE, W. T.; REECE, P. C. The botany of *Citrus* and its wild relatives. In: REUTHER, W.; BATCHERLOR, L. D.; WEBBER, W. J. (Ed.). **The citrus industry**. Riverside: University of California Press, 1967. v. 1, p. 190-430.

TALON, M.; GMITTER JUNIOR, F. G. *Citrus* genomics. International Journal of Plant Genomics, New York, v. 2008, art. 528361, 2008. doi:10.1155/2008/528361.

TAN, B. Highly efficient transformation of the *GFP* and *MAC12.2* genes into precocious trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* [L.] Raf), a potential model genotype for functional genomics studies in *Citrus*. **Tree Genetics and Genomes**, Heidelberg, v. 5, p. 529–537, 2009.

TAO, N. et al. An effective protocol for the isolation of RNA from the pulp of ripening citrus fruits. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 22, p. 305a-305f, 2004.

TEROL, J. M. et al. Development of genomic resources for *Citrus clementina*: characterization of three deep-coverage BAC libraries and analysis of 46,000 BAC end sequences. **BMC Genomics**, London, v. 9, p. 423, 2008. doi: 10.1186/1471-2164-9-423.

TONG, Z. et al. Using precocious trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* [L.] Raf.) to establish a short juvenile transformation platform for citrus. **Scientia Horticulturae**, Amsterdan, v. 119, p. 335–338, 2009.

VAUCHERET, H. et al. A transcriptionally active state is required for post-transcriptional silencing (co-suppression) of nitrate reductase host genes and transgenes. **Plant Cell**, Baltimore, v. 9, p. 1495-1504, 1997.

VOIGT, V. Caracterização fenotípica e avaliação da expressão de genes envolvidos na indução e no florescimento da laranjeira 'x11'. 2013. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

WEN, L.; TAN, B.; GUO, W. Estimating transgene copy number in precocious trifoliate orange by TaqMan real-time PCR. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 109, p. 363-371, 2012.

WONG, W. S. Repression of chilling-induced ACC accumulation in transgenic citrus by over-production of antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase RNA. **Plant Science**, Amsterdam, v. 161, p. 969–977, 2001.

WU, Z.; BURNS, J. K. Isolation and characterization of a cDNA ecoding a lipid transfer protein expressed in 'Valencia' orange during abscission. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, p. 1183–1191, 2003.

XU, Q. et al. The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). Nature Genetics, London, v. 45, n. 1, p. 59-66, 2012.

YANG, L. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for *Fortunella crassifolia*. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 51, p. 541–545, 2007.

YANG, L. et al. Transformation of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] with *pthA-nls* for acquiring resistance to citrus canker disease. **Plant Molecular Biology**, The Hague, v. 75, p. 11–23, 2011.

YUN, Z. et al. Comparative proteomic and metabolomic profiling of citrus fruit with enhancement of disease resistance by postharvest heat. **BMC Plant Biology**, London, v. 13, p. 44, 2013. doi: 10.1186/1471-2229-13-44.

ZANEK, M. C. et al. Genetic transformation of sweet orange with the coat protein gene *Citrus* psorosis virus and evaluation of resistance against the virus. **Plant Cell Reports**, New York, v. 27, p. 57-66, 2008.

ZHENG, Z.; NORIMOTO, M. A distal promoter region of the rice seed storage protein glutelin gene enhanced quantitative gene expression. **Plant Science**, Amsterdam, v. 128, p. 59–65, 1997.

3. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE LARANJEIRAS DOCES COM GENES DA VIA BIOSSINTÉTICA DOS CAROTENOIDES

Resumo

As frutas cítricas são ricas em carotenoides, pigmentos que possuem grande valor nutricional, como a pró-vitamina A (α- ou β-caroteno), e que podem, entre outras funções, prevenir doencas cardiovasculares e câncer. Estudos envolvendo a expressão dos genes codificadores de enzimas da via biossintética de carotenoides em Citrus correlacionado ao perfil de acúmulo desses pigmentos, comprovam que a regulação transcricional é um importante aspecto a ser considerado. Isto sugere que a manipulação dos genes da via de carotenoides poderia alterar o perfil desses pigmentos em Citrus, eventualmente realçando a coloração e/ou promovendo o enriquecimento do teor nutricional do fruto. Embora já haja estudos em andamento sobre a via biossintética dos carotenoides em citros, estudos de genômica funcional serão mais rapidamente obtidos utilizando-se variedades com florescimento e frutificação precoce, como a laranjeira doce mutante 'x11'. A laranjeira doce 'Sanguínea-de-Mombuca' (SM) é uma variedade de polpa vermelha que acumula licopeno na polpa dos frutos, ao contrário das laranjeiras de polpa amarela. Esta variedade pode ser considerada como importante ferramenta no estudo da acumulação de carotenoides nos frutos de laranjeiras. Dessa maneira, o objetivo deste estudo foi manipular os próprios genes fitoeno desaturase (PDS), carotenoide isomerase (*CRTISO*), licopeno β -ciclase (*LCY-b1*) e β -caroteno hidroxilase (*HYb*) de laranjeiras (cisgenia) em 'x11' (polpa clara) ou SM, para que o teor de carotenoides fosse alterado, possibilitando o enriquecimento nutricional do fruto e/ou melhor entendimento da via de biossíntese destes pigmentos. Foi realizada a transformação genética de laranjeira 'x11' para a superexpressão dos genes PDS e LCY-b1 e para a superexpressão do gene LCY-b1 e HYb em laranjeira SM. Também foi realizada a transformação genética de 'x11' para o silenciamento do gene CRTISO e HYb e também para o silenciamento do gene CRTISO, em SM. Em todos os experimentos de transformação foram calculadas as eficiências de regeneração e de transformação de plantas, correlacionando-as com os genótipos utilizados no experimento. Explantes de laranjeira SM mostraram ser mais eficientes para a transformação genética por co-cultivo com A. tumefaciens, quando comparados com os de laranjeira 'x11'. Dessa maneira, foi possível concluir que a eficiência da transformação genética é genótipo dependente. Em todos os eventos com a cisgenia comprovada, foi realizada a quantificação da expressão do gene-alvo em tecido foliar, em relação a uma planta não transformada, correlacionando essa informação com o número de cópias do cisgene inseridos em cada planta. De acordo com os resultados, sugere-se que o nível de expressão gênica não está diretamente ligado ao número de cópias inseridas no genoma. Uma planta de laranjeira 'x11' superexpressando o gene LCY-b1 floresceu e frutificou. Neste fruto foi realizada a análise do perfil de carotenoides totais em relação ao fruto de uma planta não transformada. Neste evento houve aumento no teor de carotenoides totais e especialmente de xantofilas, indicando o potencial da manipulação dos genes codificadores de enzimas da via biossíntese de carotenoides para alterações quantitativas e qualitativas, particularmente empregando o mutante de florescimento precoce que acelera a habilidade de avaliar o fenótipo resultante.

Palavras-chave: Carotenoide. Laranja. Cisgenia. Transgene. Gene. Biossíntese. Genômica funcional.

Abstract

Citrus fruits are rich in carotenoids, pigments that have a great nutritional value, as provitamin A (α - or β -carotene), which may prevent cardiovascular diseases and cancers, among other functions. Studies involving the expression of genes encoding enzymes of the carotenoid biosynthetic of Citrus correlated with the accumulation of these pigments, indicating that the transcriptional regulation is a key aspect to be considered. This fact suggests that manipulation of carotenoid pathway genes could alter the profile of these pigments in Citrus, with the possibility to enhance color and promote the nutritional enrichment of the fruit pulp. Although, there are ongoing studies about the carotenoid biosynthetic pathway in *Citrus*, the results could be earlier obtained through functional genomic studies using a variety of sweet orange with early-flowering and fruiting period, such as the 'x11' sweet orange mutant. 'Sanguínea-de-Mombuca' (SM) sweet orange is a red-pulp variety that accumulates lycopene, unlike the yellow pulp sweet orange varieties. This plant is an important tool to investigate the accumulation of carotenoids in sweet orange fruits. Therefore, the objective of this study was to manipulate the expression of the phytoene desaturase (PDS), carotenoid isomerase (CRTISO), lycopene β -cyclase (LCY-b1) or β carotene hydroxylase (HYB) Citrus genes by introducing in 'x11' (yellow pulp) or SM sweet orange to quantitatively and qualitatively alter the carotenoid content and profile. We transformed 'x11' for overexpression of PDS or LCY-b1 genes, and to overexpress LCY-b1 or HYb in SM sweet orange. 'x11' was transformed to silence CRTISO or HYb, and CRTISO gene in SM sweet orange. The efficiency of regeneration and transformation was estimated in all experiments. SM was more efficient for gene transformation by co-cultivation with A. tumefaciens, compared to 'x11'. Quantification of target gene expression in leaf tissues in comparison to a non-transformed control plants were performed in all transgenic plants, considering the number of inserted transgene copies in each plant. The level of gene expression was not directly correlated with the number of copies inserted in the genome. One transgenic plant of 'x11' overexpressing LCY-b1 produced flowers and fruits and the carotenoid profile analysis indicated an increased in content of total carotenoids and, especially, xanthophylls, clearly indicating the potential to manipulate expression of genes encoding enzymes of the carotenoid biosynthetic pathway to obtain qualitatively and quantitatively changes, particularly using the early-flowering sweet orange mutant to accelerate the ability to evaluate the resulting phenotype.

Keywords: Carotenoid. Sweet orange. Cisgeny. Transgene. Gene. Biosynthesis. Functional genomics.

3.1.1. Carotenoides e sua importância

As frutas cítricas são ricas em carotenoides (GROSS, 1987), pigmentos que possuem grande valor nutricional, como pró-vitamina A (α - ou β -caroteno) (GARNER et al., 2000), que podem entre outras funções, prevenir doenças cardiovasculares e câncer (WU et al., 2004). Mais de 600 carotenoides já foram identificados na natureza (FRASER; BRAMLEY, 2004) e a eles são atribuídas inúmeras e importantes funções na vida de plantas e animais. Nas plantas os carotenoides contribuem para a coloração de flores e frutos nos tons do amarelo ao vermelho, facilitando a polinização pelos insetos (TANAKA et al., 2008). Da clivagem oxidativa dos carotenoides origina os apocarotenoides, que atuam como agentes antifúngicos e contribuem com o aroma e o sabor de flores e frutos (AULDRIDGE et al., 2006; LU; LI, 2008). Carotenoides também possuem importância vital às plantas, pois participam da via de síntese do regulador de crescimento ácido abscísico (ABA) (ZEEVAART; CREELMAN, 1988, TANAKA et al., 2008), possivelmente de outros fito-hormônios e possuem funções indispensáveis de coleta de luz e fotoproteção das plantas durante a fotossíntese (GREEN; DURNFORD, 1996; NIYOGI, 2000; TANAKA et al., 2008).

Os pigmentos carotenoides são essenciais aos animais e humanos que necessitam incorporá-los pela dieta, por serem, em geral, incapazes de sintetizá-los. Quando ingeridos, os carotenoides são clivados em precursores de vitamina A (CAZZONELLI; 2011), que é essencial para o bom funcionamento da visão, crescimento, desenvolvimento, manutenção da integridade celular do tecido epitelial, funções imunológicas e reprodutivas (FAO, 2014). A deficiência de vitamina A é um problema de saúde pública em mais da metade dos países. Crianças com carência desta vitamina podem apresentar problemas graves na visão, cegueira e agravamento ou morte por doenças comuns na infância (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

3.1.2. Estrutura básica

Carotenoides são em sua maioria moléculas de pigmentos isoprenoides com cadeias de polienos de 40-carbonos que podem conter grupos terminais cíclicos e serem complementadas com oxigênio, contendo grupos funcionais. Os carotenoides podem ser classificados com base na estrutura química da molécula, dividindo-os em carotenos (os quais possuem apenas hidrocarbonetos) e xantofilas (com grupo oxigenado) (Figura 1). Os grupos terminais determinam a polaridade das moléculas, influenciando na interação de cada carotenoide com as membranas biológicas. Já as cadeias de polieno com alternância de simples e duplas ligações conferem aos carotenoides a propriedade de absorver o excesso de energia de outras moléculas, atuando como um poderoso antioxidante (BRITTON, 1995; NAMITHA; NEGUI, 2010).



Figura 1 - Estrutura molecular dos carotenoides violaxantina, fucoxantina, cataxantina, astaxantina, α -caroteno, γ -caroteno e β -caroteno (NAMITHA; NEGUI, 2010)

3.1.3. Biossíntese de carotenoides em citros

Nos frutos cítricos, os carotenoides são sintetizados e acumulados nos plastídeos (SANDMANN, 2001). É na membrana dessa organela que estão associadas as enzimas da via de biossíntese de isoprenoides, isopentenil pirofosfato isomerase (IPI) e GGPS, que são precursores dos carotenoides, além das enzimas específicas da síntese de carotenoides (CUNNINGHAM; GANTT, 1998).

A via de biossíntese de carotenoides em plantas já foi bem elucidada (Figura 2), sendo que o primeiro passo da biossíntese de carotenoides é a condensação de duas moléculas de geranilgeranil pirofosfato (GGPP; C₂₀) pela enzima fitoeno sintase (PSY), formando o fitoeno incolor (phy, C₄₀). O fitoeno, portanto, é o carotenoide precursor definitivo na via biossintética para a produção de licopeno mediante duas reações de dehidrogenação, pelas enzimas fitoeno desaturase (PDS) e ζ -caroteno desaturase (ZDS). Assim, o fitoeno incolor se transforma no licopeno, que possui coloração vermelha (KATO et al., 2004).

Nos cloroplastos, a isomerização dos pró-licopenos em *trans*-licopenos pode ocorrer na presença de luz, sem a necessidade da ação de enzimas. Porém, em alguns tecidos não fotossintetizantes ou na ausência de luz, pode existir a necessidade de isomerização (BREITENBACH; SANDMANN, 2005; LI et al., 2007). Para isso, duas enzimas estão envolvidas nos processos de isomerização: a ζ-caroteno isomerase (Z-ISO) e a carotenoide isomerase (*CRTISO*) (LI; MURILLO; WURTZEL, 2007; CHEN et al., 2010). A enzima Z-ISO é responsável pela acumulação de ζ-caroteno no escuro, apesar da sua atividade ser necessária também na presença de luz (CHEN et al., 2010). O gene carotenonide isomerase (*CRTISO*) de *Arabidopsis thaliana* e tomate foram isolados por Park et al. (2002) e Isaacson et al. (2002), respectivamente, que codificam para a enzima que catalisa a isomerização dos carotenoides *cis*, em carotenoides *trans*.

O licopeno é considerado como o ponto de ramificação da via carotenogênica, produzindo α - ou β -caroteno. Numa ramificação da via, a síntese de α -caroteno a partir do licopeno requer a ação da enzima licopeno ε -ciclase (LCY- ε). Para a produção da luteína e zeaxantina, o α -caroteno e β -caroteno sofrem hidroxilações sequenciais catalisadas pelas ε caroteno hidroxilase e β -caroteno hidroxilase (HYb). Na outra ramificação, a síntese de β caroteno pode ser obtida a partir do licopeno por meio da ação da enzima licopeno β -ciclase (LCY-b), resultando no γ -caroteno e, em seguida, no β -caroteno. Este último é convertido em zeaxantina (zea), via β -criptoxantina (cry), por meio de duas hidroxilações, que são catalisadas pela HYb. Em seguida, a zeaxantina pode ser convertida em violaxantina pela zeaxantina epoxidase (ZEP) (KATO et al., 2004).



Figura 2 - Via de biossíntese de carotenoides em plantas (TANAKA; SASAKI; OHMIYA, 2008)

Estudos foram realizados em plantas de citros para a determinação de quantos membros e alelos existem em cada família gênica ou como eles se comportam (ALQUÉZAR et al., 2009; CHEN et al., 2010). Apesar de nem todos os membros das famílias gênicas serem expressos ou estruturalmente funcionais (SONG et al., 1997), os resultados mostraram que laranjas doces parecem possuir mais genes e com mais alelos diversificados envolvidos na biossíntese de carotenoides, quando comparadas a outras plantas (CHEN et al., 2010).

O número de cópias dos genes da via de biossíntese de carotenoides presentes no genoma de laranja doce foi analisado (CHEN et al., 2010). O gene *PSY* se apresenta com quatro cópias no genoma de laranja, enquanto *PDS* possui duas cópias e *ZDS*, 11 cópias. (CHEN et al., 2010). Já o gene *HYb* está presente em cinco cópias no genoma, enquanto o gene *LCY-b1* apresenta duas cópias, assim como *LCY-b2* (*CCS*), que também apresenta duas cópias presentes no genoma de laranja. Além disso, todos os genes apresentam alelos em heterozigose (CHEN et al., 2010).

3.1.4. Regulação da biossíntese e acúmulo de carotenoides em citros

A biossíntese de carotenoides e a sua regulação gênica têm sido estudadas em várias espécies de plantas, tais como *Arabidopsis thaliana* (POGSON et al., 1996; PARK et al., 2002), pimenta (*Capsicum annuum*) (BOUVIER et al., 1996; 1998), tabaco (BUSCH et al., 2002), alga (*Haematococcus pluvialis*) (STEINBRENNER; LINDEN, 2001) e principalmente em tomate (GIULIANO et al., 1993; FRASER et al., 1994; RONEN et al., 1999; ISAACSON et al., 2002; GUO et al., 2012; KACHANOVSKY et al., 2012; KILAMBI et al., 2013).

Frutos de tomateiro acumulam licopeno e o mecanismo de acumulação deste carotenoide já foi elucidado (PECKER et al., 1996; RONEN et al., 1999). Durante o amadurecimento de tomate, os níveis de transcritos dos genes *PSY1* e *PDS* aumentam significativamente (GIULIANO et al., 1993; FRASER et al., 1994; CORONA et al., 1996), enquanto os transcritos de *LCY-e* e *LCY-b* desaparecem (PECKER et al., 1996; RONEN et al., 1999). Essa mudança no perfil da acumulação de transcritos coincide com o aumento do carotenoide licopeno, que é acumulado em frutos de tomate (GIULIANO et al., 1993; FRASER et al., 1994; CORONA et al., 1993; FRASER et al., 1994; CORONA et al., 1993; FRASER et al., 1994; CORONA et al., 1996; PECKER et al., 1996; RONEN et al., 1993).

Em citros, a expressão dos genes das enzimas-chave da biossíntese de carotenoides e a sua regulação tem sido investigada em diversas espécies e variedades. A acumulação de carotenoides durante a maturação de frutos de citros está altamente relacionada aos produtos da expressão dos genes envolvidos na via de biossíntese destes pigmentos (IKOMA et al., 2001; KATO et al., 2004; RODRIGO et al., 2004; TAO et al., 2006; LIU et al., 2007) e a composição dos carotenoides varia muito entre os diferentes cultivares (GROSS, 1987; FANCIULLINO et al., 2006).

Estudos em laranjas de polpa amarela, revelaram que, em geral, durante a maturação dos frutos há um aumento da expressão dos genes *PSY*, *PDS*, *ZDS*, *LCYb*, *HYb* e *ZEP* (KATO et al., 2004; RODRIGO et al., 2004), com simultânea diminuição dos níveis de mRNA de *LCY-e* (RODRIGO et al., 2004), o que ocasiona o acúmulo de xantofilas na polpa (KATO et al., 2004) e na casca dos frutos (RODRIGO et al., 2004). Outros estudos incluindo o gene codificador da licopeno β -ciclase 2 (*LCYb-2*), a qual desempenha função fruto específica, apresentaram acumulação de transcritos coincidente com aumento de xantofilas (ALQUÉZAR; ZACARÍAS; RODRIGO, 2009; MENDES et al., 2011).

Plantas de citros que possuem frutos com polpa vermelha, podem acumular, entre outros carotenoides, o licopeno ao invés de xantofilas. Quando comparadas a expressão dos genes da via biossintética de carotenoides de laranjas de polpa amarela, com laranjas de polpa vermelha, a acumulação de transcritos da maioria dos genes da parte superior da via foi maior em laranjas de polpa vermelha (LIU et al., 2007; ALQUÉZAR, RODRIGO; ZACARÍAS, 2008; NISHIMURA, 2012). Quando foi avaliada a expressão do gene *LCY-b*, constatou-se que em laranja de polpa clara, este gene apresentou expressão de forma constitutiva durante o amadurecimento dos frutos, mas em laranjas de polpa vermelha, a acumulação de transcritos aumentou continuamente (ALQUÉZAR, RODRIGO; ZACARÍAS, 2008). Estes estudos sugerem que a acumulação de licopeno nos frutos de laranjas de polpa vermelha acontece por um mecanismo regulatório de *feedback* positivo, e que está diretamente ligado a expressão dos genes codificadores da via de biossintética de carotenoides (ALQUÉZAR, RODRIGO; ZACARÍAS, 2008; LIU et al., 2007; NISHIMURA, 2012).

A comparação do perfil de carotenoides de *grapefruit* de polpa clara, com *grapefruit* de polpa vermelha, apresentou como única diferença o acúmulo do licopeno. Para investigar como ocorre o acúmulo de licopeno em *grapefruit* de polpa vermelha, foi realizada avaliação da acumulação de transcritos dos genes *PSY*, *PDS* e *ZDS* em ambas as cultivares. O resultado do perfil de expressão indicou que em *grapefruit* de polpa vermelha, o gene *PSY* acumula cerca de três vezes mais transcritos em um período intermediário do desenvolvimento do fruto, que coincide com o acúmulo do licopeno. Dessa maneira, foi sugerido que o mecanismo molecular que opera no acúmulo de licopeno seria a ação conjunta do aumento da expressão do gene *PSY* com diminuição da expressão do gene *LCY-b2* (COSTA et al., 2012).

3.1.5. Manipulação dos genes da via de carotenoides

Estudos envolvendo a expressão dos genes da via de carotenoides correlacionando o perfil desses pigmentos nas diversas variedades de frutos cítricos, comprovam que a acumulação de carotenoides está altamente relacionada aos produtos da expressão dos genes codificadores das enzimas pertencentes à via de carotenoides. Isto sugere que a regulação transcricional é um importante aspecto a ser considerado no acúmulo deste pigmento (RÖMER et al., 1993). Assim, uma possível manipulação destes genes poderia alterar o perfil de carotenoides em citros, realçando a coloração e promovendo o enriquecimento do teor nutricional do fruto. A superexpressão ou o silenciamento de genes codificadores de uma ou mais enzimas envolvidas na via metabólica de carotenoides tem sido usada em plantas para promover o aumento nos níveis deste pigmento, consequentemente melhorando a qualidade nutricional de produtos derivados (PAINE et al., 2005; DIRETTO et al., 2007; GUO et al. 2012).

Em grãos de arroz, cereal que é a base da alimentação de populações inteiras, como a asiática, normalmente não existe a pró-vitamina A. Porém a expressão ectópica dos genes *PSY* (clonado a partir de milho) e caroteno desaturase (*crtI*) (clonado da bactéria *Erwinia uredovora*) em plantas de arroz, gerou o arroz transgênico 'Golden Rice 2', com o aumento dos níveis de β -caroteno nos grãos em até 37µg g⁻¹ (PAINE et al., 2005). 'Golden Rice 2' acumulou cerca de 26 vezes mais carotenoides do que 'Golden Rice 1', o qual superexpressava o gene *PSY* clonado a partir de abrótea (BEYER et al., 2002; PAINE et al., 2005).

Em batatas, a expressão dos genes fitoeno sintase (*CrtB*), fitoeno desaturase (*CrtI*) e licopeno β -ciclase (*CrtY*), pertencentes à via metabólica de biossíntese de carotenoides, clonados a partir de *Erwinia* e sob o controle de um promotor tubérculo- específico, gerou plantas que produziram tubérculos de batata com coloração "dourada", com aumento de 3600 vezes a quantidade de β -caroteno, chegando a 47 µg g⁻¹ de peso seco (DIRETTO et al., 2007).

Outros estudos de biofortificação de batatas promoveram o aumentou em 14 vezes o teor de β -caroteno dos tubérculos com o silenciamento dos genes *LCY-e* (DIRETTO et al., 2006). A quantidade de β -caroteno também foi aumentada em até 331 µg por 100 g de peso fresco devido ao silenciamento do gene *HYb* (VAN ECK et al., 2007). Ainda em batatas, o

silenciamento do gene ZEP resultou no aumento do nível de zeaxantina de 4 para 130 vezes, alcançando valores 40 μ g g⁻¹ de peso seco (ROMER et al., 2002). Em canola, a superexpressão do gene *PSY* sob o controle de um promotor específico de sementes, gerou plantas com maiores níveis de carotenoides totais e β - caroteno (SHEWMAKER et al., 1999).

3.1.6. Laranjeira mutante 'x11' e SM e a manipulação de genes da via de carotenoides

Embora já haja estudos em andamento sobre a via biossintética dos carotenoides em citros, os resultados poderão ser mais rapidamente obtidos em estudos de genômica funcional utilizando-se a variedade de florescimento e frutificação precoce, a laranjeira doce 'x11'.

Já a laranja 'Sanguínea de Mombuca' é uma variedade com polpa com coloração vermelha, resultante da produção de licopeno e maiores teores de β -caroteno e carotenoides totais no suco (LATADO et al., 2008). Devido a coloração da polpa, a laranjeira SM pode ser considerada como uma importante ferramenta no estudo da via de biossíntese de carotenoides.

A hipótese deste trabalho é que a manipulação (superexpressão ou silenciamento) de genes da via de carotenoides em laranjeira 'x11' e SM irá proporcionar frutos com melhor teor nutricional e/ou ajudar a esclarecer os mecanismos de controle envolvidos no acúmulo dos carotenoides, incluindo o β -caroteno e o licopeno.

O presente trabalho deu prosseguimento ao estudo intitulado "Caracterização nutricional e molecular de laranjas de polpa vermelha", que foi desenvolvido no *Laboratório de Melhoramento de Plantas* do *Centro de Energia Nuclear na Agricultura CENA/USP* em colaboração com o *Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC* e a *Universidade Estadual Paulista - UNESP - Araraquara*. O estudo teve como objetivo a análise funcional de oito genes pertencentes à via biossintética de carotenoides, correlacionando-os com a quantificação de carotenoides totais, β -caroteno e licopeno em laranjas de polpa vermelha e laranja 'Valência' (amarela). Os dados resultantes deste estudo anterior foram utilizados em alguns experimentos deste estudo.

3.2.1. Objetivo geral

Manipular os genes *PDS*, *LCY-b1* ou *HYb* em laranjeiras 'x11' (polpa amarela) e 'Sanguínea-de-Mombuca' (SM; polpa vermelha) para induzir alterações nos perfis de carotenoides da polpa dos frutos, possibilitando o enriquecimento nutricional do fruto e/ou melhor entendimento da via de biossíntese destes pigmentos.

3.2.2. Objetivos específicos

1-) Superexpressar o gene *PDS* em laranjeira 'x11' para que a maior quantidade de transcritos gerados no início da via por este gene, reflita em maiores níveis de substrato na via de biossíntese de carotenoides, aumentando o teor deste pigmento em plantas geneticamente transformadas.

2-) Silenciar o gene *CRTISO* em laranjeira 'x11' e SM para que seja observado o fenótipo do fruto em plantas de laranjeira, e para que aconteça a acumulação de carotenoides zeta-caroteno e pró-licopeno nos frutos das plantas transformadas.

3-) Superexpressar o gene *LCY-b1* em plantas de laranjeiras 'x11' e SM com o objetivo de que sejam acumulados maiores níveis de carotenoides, especialmente xantofilas.

4-) Superexpressar o gene *HYb* em plantas de laranjeira SM para que sejam acumulados maiores níveis de carotenoides, especialmente xantofilas.

5-) Silenciar o gene *HYb* em plantas de laranjeira 'x11' para que seja acumulados maiores níveis de carotenos.

6-) Confeccionar construção gênica para superexpressão e silenciamento do gene *LCY-b2* para serem usadas em etapas futuras do trabalho.

3.3. Material e Métodos

Este estudo foi desenvolvido parcialmente nos Laboratórios do Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC e no Laboratório de Melhoramento de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP). Neste capítulo foram realizadas transformações genéticas visando a superexpressão ou silenciamento de genes da via de biossíntese de carotenoides em plantas de laranjeira 'x11' e/ou laranjeira 'Sanguínea-de-Mombuca' (SM).

3.3.1. Material vegetal e fonte de explante

Os materiais vegetais utilizados foram plantas juvenis do mutante de florescimento precoce 'x11' e plantas juvenis de laranjeira SM. Sementes provenientes das laranjeiras 'x11' e SM foram obtidas de plantas crescidas em campo. Em câmara de fluxo laminar, a testa foi removida. Os embriões contendo cotilédones foram desinfectados superficialmente em solução 50% de hipoclorito de sódio comercial (concentração final de 1-1,5% de cloro ativo) e lavados três vezes com água destilada. Os embriões foram então germinados em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio MS semi-sólido suplementado com 7 g L⁻¹ de ágar. Os tubos foram mantidos no escuro durante 30 dias a temperatura de 25 ± 1 °C para o alongamento do epicótilo, e após esse período as plantas foram transferidas para condições de luminosidade (50 µmol m⁻² s⁻¹, com 16 h de fotoperíodo) durante 15 dias. Os segmentos de epicótilo foram cortados no tamanho de aproximadamente um centímetro.

3.3.2. Transformação genética via *A. tumefaciens* com as construções pCAMBIA2301::CitPDS e pCAMBIA2301::CitLCY-b

Primeiramente foram realizadas transformações genéticas para a superexpressão dos genes *PDS* em laranjeira 'x11' e superexpressão do gene *LCY-b1* (COSTA et al., 2002) em laranjeira 'x11' e SM. Para isso foram utilizadas as construções gênicas cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. Márcio Costa, do Laboratório de Cultura de Tecidos, da Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA.

Para a realização da transformação das plantas com as construções gênicas, foram usadas a *Agrobacterium tumefaciens* cepa EHA 101 (HOOD et al., 1986), armadas com os plasmídeos pCAMBIA2301 [http://www.cambia.org.au], os quais possuem inseridos na região do T-DNA os genes *PDS* ou *LCY-b1*(clonados de *Citrus*) (pCAMBIA2301::CitPDS e pCAMBIA2301::CitLCY-b), controlados pelo promotor constitutivo CaMV 35S e terminador CaMV35S poly-A. Ambas as construções gênicas possuem o gene Neomicina fosfotransferase II (*nptII*), que confere resistência ao antibiótico canamicina, e o gene β-glucuronidase (*gusA*), como gene repórter (Figura 3).



Figura 3 – Representação do esquema da região de transferência (T-DNA) das construções gênicas usadas nas transformações genéticas de plantas de laranjeira 'x11' e SM para superexpressão dos genes PDS ou LCY-b1 (COSTA et al., 2002)

A transformação genética das plantas de laranjeira 'x11' e SM, bem como os procedimentos para aclimatização e confirmação da transgenia, foram realizados conforme descrito no Capítulo 2, itens 2.3.2.2 e 2.3.4.

Após a confirmação da transgenia, as eficiências de regeneração e transformação foram calculadas para os dois genótipos utilizados e para todas as construções gênicas estabelecidas. A eficiência de regeneração foi calculada pelo número de brotações regeneradas dividido pelo número de explantes inoculados, enquanto a eficiência de transformação foi calculada pelo número de brotações confirmadas como sendo transgênicas dividido pelo número de brotações analisadas.

3.3.3. Confecção das construções gênicas para superexpressão dos genes *LCY-b2* e *HYb* e silenciamento dos genes *CRTISO*, *LCY-b2* e *HYb*

3.3.3.1. Busca das sequências e construção dos iniciadores

As sequências dos genes CRTISO e HYb foram buscadas no banco COMPBIO (http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=orange) NCBI e http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), confirmadas pela ferramenta blast (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) e analisadas no programa ORF Finder (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/) para a visualização do quadro de leitura para transcrição e tradução do gene clonado. A sequência do gene LCY-b2 utilizada para a foi genes construção dos iniciadores buscada no banco de NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov), confirmada pela ferramenta blast e analisada no programa ORF Finder.

Para a construção gênica visando a superexpressão dos genes *LCY-b2* e *HYb*, os iniciadores foram desenhados nas extremidades da sequência codificante, possibilitando a amplificação do gene completo. Na construção gênica para o silenciamento dos genes *CRTISO*, *LCY-b2* e *HYb*, os *primers* foram desenhados para amplificar regiões intermediárias dos genes, para que fragmentos fossem recombinados no sentido *sense* e *antisense* no vetor de destino para a formação do *hairpin* do RNAi (RNA de interferência).

Os iniciadores foram desenhados utilizando-se o programa *on-line Primer3* (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/) e dentre os pares de iniciadores obtidos para cada gene de interesse, foi selecionado aquele com melhor estabilidade, menor número de *hairpins*, dímeros e *cross*-dímeros, pelo programa *on-line NetPrimer* (http://www.premierbiosoft.com/netprimer).

3.3.3.2. Extração de RNA e análise da integridade e concentração

Para a amplificação dos genes ou regiões intermediárias dos genes, foram usados como *template* o cDNA sintetizado a partir do RNA total proveniente de tecidos de polpa de frutos de laranja 'x11', o qual foi extraído com base no protocolo proposto por Tao et al. (2007). Para a extração de RNA, as amostra foram maceradas em nitrogênio líquido,

transferidas para um tudo contendo 50 mL de água ultrapura estéril tratada com 0,01 % DEPC e 30 mL de etanol absoluto, homogeneizadas e centrifugadas a 4.000 g por 5 min a 4°C. Em seguida o sobrenadante foi descartado, e ao *pellet* foi adicionado a uma mistura de 5 mL de tampão de extração (1 % SDS, 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM LiCl; 20 mM EDTA pH 8,0) e 5 mL de fenol, vortexado por 2 min e centrifugado a 4.000 g por 20 min a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo que continha 10 mL de [24:1 (v/v)] clorofórmio: álcool isoamílico, invertido gentilmente por 5 min e centrifugado a 4.000 g por 10 min a 4°C. Esta etapa anterior foi retirada mais uma vez. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo que continha 1/3 de 8 M LiCl, misturado por inversão e incubado a (-) 20°C overnight. Em seguida, foi realizada uma centrifugação de 4.000 g por 20 min a 4°C, sendo o sobrenadante descartado, adicionando-se ao precipitado (pellet) 1 mL de 70% etanol gelado preparado com água ultrapura estéril tratada com 0,01% DEPC e centrifugado a 4.000 g por 5 min a 4°C. Esta lavagem foi realizada mais uma vez, e em seguida o sobrenadante foi descartado e as amostras foram mantidas em temperatura ambiente até a secagem total. Finalmente as amostras foram ressuspendidas em 50 µL de água ultrapura estéril tratada com 0.01 % DEPC e mantidas em freezer a -80° C até o procedimento das etapas seguintes.

Para conferir a integridade e a concentração do RNA, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose com tampão SB (10 mM NaOH pH 8,5; ajustado com ácido bórico) (BRODY; KERN, 2004). Utilizando-se uma alíquota do RNA total, coloridos com de tampão da amostra [50% de formamida; 1X MOPS (20 mM MOPS, pH 7,0; 50 mM acetato de sódio; 1 mM EDTA); 17,5% formaldeído; 0,4 mg mL⁻¹ brometo de etídeo, e *loading buffer* (0,25% azul bromofenol; 0,25 % xileno cianol; 0,1 mM EDTA, pH 8; 50% glicerol)], as amostras foram aquecidas a 65°C por 10 min e colocadas no gelo imediatamente para a eliminação do efeito da estrutura secundária. Para determinação da concentração e pureza do RNA total extraído, uma alíquota do RNA foi diluída em água ultrapura (milli-Q), sendo submetida à leitura óptica no espectofotômetro Ultrospec 1100 pro (Amersham Biosciences) em 260 nm.

3.3.3.3. Tratamento com DNAse e síntese de cDNA

Para digerir ácidos desoxirribonucleicos (DNA) contaminantes da amostra, 2 μ g do RNA total foram tratados com a enzima DNAse I (Fermentas *Life Sciences*). A enzima foi utilizada na concentração de 1 Unidade/microlitro (U/ μ L) com 1 U de RNAse *out*, tampão apropriado e água ultrapura (milli-Q) DEPC autoclavada para volume final de 10 μ L. A reação foi incubada no termociclador GeneAmp PCR *System* 9700 (Applied Biosystems) a 37°C por 30 min. Para que ocorresse a inativação da enzima, foi adicionado 25 mM EDTA, incubado a 65°C por 10 min, e colocado no gelo imediatamente. Para a confirmação de que todo o DNA genômico tenha sido digerido, 1 μ g do RNA total tratado com DNAse, foi separado e submetido a uma reação de PCR usando o *primer* da referente ao gene *ACT* (*For*: CCGAGCGTGGTTATTCTTTC e *Rev*: CTGAGCTGGTCTTTGCTGTCT).

O RNA total restante (1 μ g) tratado com DNAse foi preparado para a síntese acrescentando-se 50 μ M *primer* poli-T (oligo-dT 18 pb), incubado por 5 min à 70°C e resfriado a 4°C por 5 min. Para a transcrição reversa, foi adicionado 3 mM de MgCl₂; 5 μ M de dNTPs ; 2 U de RNAse *out* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA); 1 U da enzima Improm-II *Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e tampão apropriado. A reação de transcrição reversa foi realizada no termociclador GeneAmp PCR *System* 9700 e o programa utilizado foi de 25°C por 5 min, 42°C por 60 min e 70°C por 15 min. Após sintetizados, os cDNAs foram armazenados a -20°C.

3.3.3.4. Amplificação das sequências gênicas e clonagem nos vetores de entrada

Para amplificação dos genes completos ou sequências parciais dos genes, foram realizadas reações de PCR utilizando 1 μ L de cDNA diluído a 1:10 (v/v), *Taq buffer* com (NH₄)₂SO₄ (75 mM Tris-HCl, pH 8.8; 20 mM (NH₄)₂SO₄), 2 mM de MgCl₂, 200 μ M de cada dNTPs, 0,2 μ M de cada iniciador (*Forward* e *Reverse*-Tabela 4) e 1 U da enzima *Taq* polimerase (Fermentas; Burlington, Canadá) totalizando 25 μ L de reação. O programa usado para a amplificação de cada gene está disponível no Apêndice A. Os fragmentos amplificados foram clonados em vetores pCR8/GW/TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

Para a clonagem gênica, foi realizada a ligação dos genes ou fragmento dos genes amplificados por PCR aos vetores pCR8/GW/TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), seguindo as especificações do fabricante. A ligação foi mantida por 5 min. a temperatura ambiente e após esse período, 2 µL da ligação foram transferidos para um tubo contendo células eletrocompetentes de E. coli linhagem DH10B. Para a eletroporação, foram utilizados eletroporador modelo *micropulser* (BioRad) e cubetas de 0,2 mm na qual foi aplicado um pulso de corrente elétrica de 1,8 KV por 3,4 s. Rapidamente as células foram transferidas para um tubo contendo meio líquido SOC (20 mM de glucose, 20 g L^{-1} bacto triptona, 5 g L^{-1} extrato de levedura e 0,5 g L⁻¹ NaCl, 250 mM de KCl pH 7,0 e 2 M MgCl₂) e mantidas a 37°C por 1 h em agitação. O material foi centrifugado sedimentando as bactérias. O sobrenadante foi descartado e o restante ressuspendido e plaqueado em meio LB sólido (Luria-Bertani, composto de 10 g L^{-1} triptona, 10 g L^{-1} NaCl e 5 g L^{-1} extrato de levedura e 15 g L⁻¹ de Bactoagar) contendo 100 μg mL⁻¹ de espectinomicina. As placas foram mantidas a 37°C por cerca de 17 h para o crescimento das colônias com os genes ou fragmentos dos genes de interesse. De cada construção gênica foram selecionadas cerca de 10 colônias que foram crescidas em meio líquido LB com 100 µg mL⁻¹ de espectinomicina, mantidas em agitação constante a 37°C por cerca de 17 h.

3.3.3.5. Minipreparação do DNA plasmidial por lise alcalina

Após finalizada a clonagem, foi realizada a extração do DNA plasmidial através da minipreparação. O protocolo utilizado para o isolamento e purificação do DNA plasmidial das bactérias armadas com os genes ou fragmento dos genes da via de carotenoides, ligados ao vetor pCR8/GW/TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), teve como base a lise alcalina, proposto originalmente por Birboim e Doly (1979).

3.3.3.6. Sequenciamento dos fragmentos

As reações de sequenciamento foram realizadas por empresa terceirizada e os cromatogramas gerados foram examinados para a presença de vetor com o programa Phred/Phrap/Crossmatch (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998) e agrupadas com o Cap3 (HUANG; MADAN, 1999). As sequências também foram analisadas com o *software*

MultAlin (<u>http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html</u>) e em seguida foram submetidas a busca por similaridade no GenBank COMPBIO (<u>http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=orange</u>) e confirmadas pela ferramenta *blast* (<u>http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</u>).

As sequências consenso de nucleotídeos de cada clone obtidos pelo Cap3 foram alinhadas através do *bl2sec*, disponível em <u>http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</u>, e a fidelidade de cada sequência foi confirmada em relação às sequências previamente buscadas no banco de *Citrus*. Os clones com identidade e fidelidade confirmadas, foram selecionados para serem recombinados aos vetores binários do sistema Gateway® (HARTLEY et al., 2000; SASAKI et al., 2004; SASAKI et al., 2008) pK7WG2 ou pK7GWIWG2 (II).

3.3.3.7. Recombinação do inserto no vetor binário Gateway®

Para a recombinação dos genes *CRTISO*, *LCY-b2* e *HYb* clonados no vetor pCR8/GW/TOPO, aos vetores de destino do sistema *Gateway* (para a superexpressão ou silenciamento), cada clone com identidade e fidelidade confirmadas foram crescidos em meio LB líquido com 100 μ g mL⁻¹ de espectinomicina, para a realização da minipreparação do DNA plasmidial, realizada como descrito no item 3.3.3.5. O DNA plasmidial das amostras foi diluído e as sequências referentes aos genes completos (*LCY-b2* e *HYb*), visando a superexpressão, foram recombinadas no vetor pK7WG2 (Figura 4).


Figura 4 – Mapa do vetor pK7WG2

As sequências referentes aos gene *CRTISO*, *LCY-b2* e *HYb*, selecionadas para o silenciamento gênico, foram recombinadas no vetor pK7GWIWG2 (II) (Figura 5). Este vetor permite que um fragmento do gene seja recombinado no sentido *sense* e outro fragmento no sentido *antisense*, intercalados por um íntron, e formando assim o *hairpin* RNAi. Ambos os vetores de destino conferem resistência às bactérias ao antibiótico espectinomicina, seleção das plantas pelo antibiótico canamicina e têm como promotor gênico CaMV 35S e terminador NOS.



Figura 5 – Mapa do vetor pK7GWIWG2 (II)

Para a reação de recombinação (reação LR) das sequências gênicas com os vetores binários pK7WG2 ou pK7GWIWG2 (II), foram utilizados 10 fmol (que deve ser calculado dependendo da concentração e tamanho dos fragmentos clonados) de cada clone de entrada (sequências clonadas dos genes CRTISO, LCY-b2 ou HYb), 20 fmol do vetor de destino pK7WG ou pK7GWIWG2 (II) e tampão TE (pH 8,0) para totalizar 8 µl de reação. Em seguida foi adicionado 2 µl da enzima LR ClonaseTM Plus (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e a reação foi incubada a 25 °C por 16 h. Após esse período foi adicionado 1 µL de proteinase K em cada reação, que foi incubada por 37°C por 10 min. Novamente, células quimicamente competentes foram transformadas para a clonagem dos clones de expressão. Essa etapa foi procedida como descrita no item 3.3.3.4. Em seguida foi realizada a extração do DNA plasmidial com o uso do kit PureLink® HiPure Plasmid Midiprep (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as especificações do fabricante, para a liberação dos cassetes de (pK7GWIWG2(II)::CRTISO, pK7WG::LCY-b2, pK7GWIWG2(II)::LCY-b2, expressão pK7WG::HYb, e pK7GWIWG2(II)::HYb) os quais foram posteriormente eletroporados em A. tumefaciens, para a transformação das plantas de laranjeira 'x11' ou SM.

3.3.3.8. Introdução das construções gênicas em Agrobacterium tumefaciens

gênicas pK7WG::LCY-b2, As construções pK7WG::HYb, pK7GWIWG2(II)::CRTISO, pK7GWIWG2(II)::LCY-b2 e pK7GWIWG2(II)::HYb foram eletroporadas em A. tumefaciens, cepa EHA 105 (HOOD et al.; 1993) sob pulso de corrente elétrica de 2,5 kV. Em seguida foi adicionado 1 mL de meio SOC permanecendo sob agitação por 2 h a 28°C. Da cultura de bactérias transformadas, foi plaqueado cerca de 100 µL em meio LB sólido contendo os antibióticos rifampicina (100 μ g mL⁻¹) e espectinomicina (50 μ g mL⁻¹) que foram incubadas durante 2 dias a 28°C. Cerca de 5-10 colônias foram selecionadas e crescidas em meio LB líquido com os antibióticos rifampicina (100 µg mL⁻¹) e espectinomicina (50 µg mL⁻¹). Após cerca de 16 h foi realizada a minipreparação do DNA plasmidial (como descrito no item 3.3.3.5). O DNA plasmidial extraído foi diluído e submetido a reações de PCR para a confirmação da presença das construções gênicas pK7WG::LCY-b2, pK7WG::HYb, pK7GWIWG2(II)::CRTISO, pK7GWIWG2(II)::LCY-b2, pK7GWIWG2(II)::LCY-b2 e pK7GWIWG2(II)::HYb nas A. tumefaciens submetidas a transformação.

3.3.4. Transformação genética dos explantes de laranjeira 'x11' e SM, aclimatização e confirmação de plantas transgênicas

Após confirmada a integração do cassete de expressão nas *A. tumefaciens*, foi procedida a transformação genética das laranjeira 'x11' ou SM com as construções gênicas pK7WG::HYb, pK7GWIWG2(II)::CRTISO e pK7GWIWG2(II)::HYb. As construções gênicas pK7WG::LCY-b2 e pK7GWIWG2(II)::LCY-b2 não foram utilizadas para transformação genética das plantas de laranjeiras, neste trabalho.

O procedimento de transformação genética, aclimatização e confirmação da transgenia das plantas por PCR, está descrito detalhadamente no Capítulo 2, itens 2.3.2.2 e 2.3.4.

Após a confirmação da transgenia, as eficiências de regeneração e transformação foram calculadas para os dois genótipos utilizados e para todas as construções gênicas estabelecidas. A eficiência de regeneração foi calculada pelo número de brotações regeneradas dividido pelo número de explantes inoculados, enquanto a eficiência de transformação foi calculada pelo número de brotações confirmadas como sendo transgênicas dividido pelo número de brotações avaliadas.

3.3.5. Análise da expressão do transgene por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT- qPCR) e estimativa do número de cópias dos transgenes inseridos por PCR quantitativo (qPCR)

Em média, 10 plantas da variedade ('x11' ou SM) transformadas com cada construção gênica (pCAMBIA2301::CitPDS, pCAMBIA2301::CitLCY-b, pK7WG::HYb, pK7GWIWG2(II)::CRTISO ou pK7GWIWG2(II)::HYb) tiveram a expressão gênica do transgene *nptII* e dos genes alvos (genes da via de carotenoides manipulados) e o número de cópias do transgene inserido analisados por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) e por PCR quantitativo (qPCR).

Para a análise da expressão gênica do gene nptII, foi realizada reações de RT-qPCR, qual а amplificação do fragmento do gene nptII (primers For: na ATACTTTCTCGGCAGGAGCA e Rev: CTGTGCTCGACGTTGTCACT) foi usado como prova da transgenia. Como gene referência foi usado o Fator de Iniciação de Tradução de TC17010] Eucariotos 5A (IF5A)[TIGR: (sequência buscada COMPBIO no (http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=orange), 0 qual foi amplificado através do par de primers For: ACTGAAACCGGAAACACCAA e Rev: TTTCCTTCAGCAAACCCATC.

Os genes da via de carotenoides manipulados para superexpressão ou silenciamento também tiveram a expressão analisadas em relação a plantas não transformadas. Neste experimento como genes referência foram utilizados os codificadores da Actina (*ACT*) (*For*: CCGAGCGTGGTTATTCTTTC e *Rev*: CTGAGCTGGTCTTTGCTGTCT) e da Tubulina (*TUB*) (*For*: TTTGTGACATCCCTCCGACT e *Rev*: TCACCCTCCTGAACATTTCC). Para a análise de transcritos dos genes alvo foram usados os *primers* listados na Tabela 1, descritos por Nishimura, (2012).

Tabela 1 - Primers utilizados na análise da expressão gênica (RT-qPCR) dos genes da via de carotenoides, manipulados para a superexpressão ou silenciamento em plantas de laranjeira 'x11' ou SM (Nishimura, 2012)

Gene	Sequência (5'- 3')	Amplicon (pb)
PDS	TTCCAGTCATCAACATCCACA CGGGGCAAAAACTAACTCC	167
CRTISO	TTGTGCTTGAGGATGACTGG CCTCTGGAGCCAAAGATGAA	96
LCY-b1	GCTGCGGCTCCTATTGTTG CCCTTTGCCTTCTCCTTTCT	127
НУъ	TTTCACGGAGGAGGAGGAG GACGGCAGCAACGAGATAAG	115

As reações de expressão gênica e estimativa do número de cópias dos transgenes inseridos estão descritas com detalhes no Capítulo 2, item 2.3.5.

3.3.6. Análise do perfil de carotenoides

3.3.6.1. Extração e quantificação dos carotenoides totais

A análise do perfil de carotenoides foi realizada pela Dr. Maria Jesús Rodrigo Esteve, no Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia de Pós-Colheita, do Instituto de Agroquímica e Tecnologia de Alimentos IATA- CSIC, Valência, Espanha.

Para a análise do perfil dos carotenoides totais do fruto proveniente de laranjeira 'x11' transformada para a superexpressão do gene *LCY-b1*, foram utilizados cerca de 250 mg polpa liofilizada de um fruto proveniente de uma planta de laranjeira 'x11' transformada com a construção pCAMBIA2301::CitLCY-b, referente a superexpressão do gene *LCY-b1*, e um fruto coletado de laranjeira 'x11' não transformada, usado como controle. Ambos os frutos estavam em estágios equivalentes de desenvolvimento, coletados em julho de 2013.

A extração e quantificação foram realizadas de acordo com protocolo descrito por Rodrigo et al. (2003; 2004) e Carmona et al. (2012). Cerca de 250 mg de polpa liofilizadas dos frutos transgênico e controle foram passadas para um tubo de 15 ml, onde 2 ml de Metanol foram adicionados. A solução foi agitada por 5 mim a 4°C e em seguida foi adicionado 1,5 mL Tris-HCl (50 mM, pH 7,5) (contendo 1 M NaCl), sendo agitado por 5 min at 4°C. Novamente foi adicionado 1,5 mL Tris-HCl (50 mM, pH 7.5) (contendo 1 M NaCl), sendo agitado por 5 min at 4°C. Foi adicionado à solução 4 mL de clorofórmio, agitado por 5 min a 4°C e centrifugado a 3000 g por 5 min a 4°C. A fase inferior foi removida com pipeta Pasteur e a fase aquosa foi re-extraída com clorofórmio até tornar-se incolor. Todo o extrato do clorofórmio foi seco em evaporador rotativo a 40°C. O resíduo seco foi completamente dissolvido por saponificação em 1,8 ml de metanol e 200 mL de 60% (p/v) de KOH, e em seguida foi cuidadosamente coberto com nitrogênio, fechado, e deixado overnight no escuro à temperatura ambiente. Os carotenoides saponificados foram removidos da fase superior adicionando-se 2 mL de água MilliQ e 6 mL de solução A (éter de petróleo:éter dietil, 9:1, v:v). A re-extração foi repetida adicionando-se 3 mL de solução A até a hipofase ficar incolor. O volume recuperado foi transferido ao balão volumétrico e ajustado a 10 mL de solução A. Uma alíquota da solução do extrato foi usada para a quantificação dos carotenoides totais. Os extratos foram reduzidos em evaporador rotativo a 40 °C e transferidos a um tubo de 15 mL com acetona. Para precipitar esteróis presentes nas amostras, o extrato de acetona foi mantido overnight a \pm 20°C e centrifugado a 300 g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um tubo de 1,5 mL, seco sob fluxo de N e mantido a -20 °C até a análise por HPLC. Todo o procedimento foi realizado no gelo e sob luz fraca, para evitar a fotodegradação, isomeração e mudança na estrutura dos carotenoides. Cada amostra foi extraída no mínimo uma vez.

A leitura do espectro de absorção (300-550 nm) dos extratos saponificados foi realizada em temperatura ambiente com Espectofotômetro Diode Array (modelo 8452A Hewlett Packard, Alemanha). Os picos máximos de absorção foram registrados e a quantidade de carotenoides totais foi calculada através da medida da absorbância em 450 nm (DAVIES et al., 1976), usando um coeficiente de extinção β -caroteno de E^{1%} = 2500.

3.3.6.2. Análises dos carotenoides por HPLC

A análise do perfil de carotenoides por HPLC foi realizada como descrito por Rodrigo et al. (2003; 2004) e Carmona et al. (2012). Para o preparo das amostras para a leitura em HPLC, estas foram dissolvidas em metanol: acetona (2:1, v:v). O volume das amostras foi ajustado em 75 µL e a cromatografia foi realizada no sistema de cromatografia líquida Waters, equipado com bomba 600E modelo 996, detector de arranjo de diodos e controlado por Millenium Chromatography Manager (versão 2.0). A coluna C₃₀ (250 mm x 4.6 mm, 5 μm), acoplada a pré-coluna C₃₀ (20 mm x 4.0 mm x 5 μm) (YMC Europe GMBH, Germany) foi usada com metanol, água e éter metil-terc-butílico (MTBE). Os pigmentos foram analisados usando gradiente ternário de eluição descrito por Rouseff et al. (1996). Para isso, a composição do solvente inicial foi 90% metanol, 5% água e 5% MTBE e foi mudando de forma linear para 95% MeOH e 5% MTBE durante 12 min. Nos próximos 8 min, a composição do solvente mudou para 86% MeOH e 14% MTBE. Depois de alcançar esta concentração, o solvente foi gradualmente mudando para 75% metanol e 25% MTBE em 30 min. A composição final foi alcançado em 50 minutos e consistiu de 50% metanol e 50% MTBE. As condições iniciais foram restabelecidas em 2 minutos e equilibradas novamente durante 15 minutos antes de a próxima injeção. A taxa do fluxo foi de 1 mL min⁻¹. A temperatura da coluna foi estabelecida em 25°C e o volume de injeção foi 25µl. Cada determinação analítica foi repetida pelo menos duas vezes. O agrupamento de detectores de fotodiodos foi configurado em 250-540 nm. Os padrões de β-caroteno, α-caroteno e licopeno foram Sigma-Aldrich (Espanha). Os padrões de β -criptoxantina, luteína e zeaxantina foram obtidos da Extrasynthese (França).

3.4. Resultados

3.4.1. Transformação genética via *A. tumefaciens* com as construções pCAMBIA2301::CitPDS e pCAMBIA2301::CitLCY-b

O presente trabalho foi iniciado com a transformação genética de plantas de laranjeira 'x11' para a superexpressão dos genes fitoeno desaturase (*PDS*) ou licopeno β -ciclase (*LCY-b1*) e com a transformação genética de laranjeiras Sanguínea-de-Mombuca (SM) para a superexpressão do gene *LCY-b1*.

A fonte de explante utilizada nos eventos de transformações genéticas foi segmentos de epicótilo de laranjeiras 'x11' e SM (Figura 6A). Como vetores da transformação genética foram utilizadas *A. tumefaciens* cepa EHI 101 (HOOD et al., 1986) armadas com o plasmídeo pCAMBIA contendo na região do T-DNA o gene *PDS* (pCAMBIA2301::CitPDS) ou *LCY-b1* (pCAMBIA2301::CitLCY-b), inseridos sob o controle do promotor CAMV 35S e possuem o gene *gusA* (GUS) como repórter (Figura 3) (COSTA et al., 2002).

Para introduzir o gene PDS para superexpressão em plantas de laranjeira 'x11', foram realizados três experimentos de transformação genética plasmídeos com os pCAMBIA2301::CitPDS. Cerca de 130 explantes foram inoculados em cada ensaio, totalizando 398 explantes co-cultivados. Do total de explantes co-cultivados, houve a regeneração de 163 brotações com mais de 4 mm. A eficiência de regeneração das brotações foi avaliada, chegando a 0,4 (40%) (Tabela 2). Para a confirmação da transgenia das plantas com a construção pCAMBIA2301::CitPDS, 82 brotações foram submetidas à ensaios histoquímicos da atividade da enzima β -glucuronidase (GUS) (Figura 6B e 6C) e reações de amplificação (PCR) um fragmento do gene nptII (117 pb) (Figura 7). Dos 82 brotos avaliados para a transgenia, 12 foram confirmados como transgênicos através do teste de GUS e PCR (amplificação do gene nptII), o que representou eficiência de transformação genética de 0,14 (14%) (Tabela 2).

Tabela 2 - Transformação genética de laranjeira 'x11' para superexpressão do gene PDS (pCAMBIA2301::CitPDS) e LCY-b1 (pCAMBIA2301::CitLCY-b) em laranjeira 'x11' e de laranjeira SM para superexpressão do gene LCY-b1 (pCAMBIA2301::CitLCY-b), descrevendo a eficiência de regeneração e de transformação das plantas para cada construção utilizada

Construções	Variedade	Total de explantes inoculados	Número de brotos regenerados	Brotações analisadas	Número de plantas PCR positivas	Eficiência de regeneração	Eficiência de transformação
pCAMBIA2301::CitPDS	ʻx11'	398	163	82	12	0,40	0,14
pCAMBIA2301::CitLCY-b	'x11'	460	161	79	11	0,35	0,13
pCAMBIA2301::CitLCY-b	SM	272	131	92	25	0,48	0,27



Figura 6 – A: Segmentos de epicótilo com brotações regeneradas a partir do processo de transformação genética de laranjeira 'x11' superexpressando o gene *LCY-b1*. B e C: Brotações originadas de segmentos de epicótilo de laranjeira 'x11' transformadas geneticamente com a construção gênica pCAMBIA2301::CitPDS e submetidas ao processo de coloração histoquímica da atividade de GUS. D: Brotações regeneradas de segmentos de epicótilo de laranjeira SM superexpressando o gene *LCY-b1*. E e F: Microenxertia das brotações em citrange 'Carrizo'. G e H: Plantas laranjeira 'x11' superexpressando o gene *LCY-b1*em processo de aclimatação. I: laranjeira 'x11' transformada geneticamente com a construção pCAMBIA2301::CitPDS apresentando frutificação



Figura 7 - Amplificação de fragmento do gene *nptII* (117 pb): M marcador 100 pb (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 1-5 plantas geneticamente transformadas transformadas com a construção pCAMBIA2301::CitPDS e B- controle negativo da reação

As 12 brotações positivas para a superexpressão do gene PDS em plantas laranjeira 'x11' foram microenxertadas em plantas de citrange 'Carrizo' (Figura 6E e 6F) e aclimatizadas em casa de vegetação (Figura 6G e 6H). Houve perda de uma planta no período totalizando transformadas de aclimatização, 11 plantas com a construção pCAMBIA2301::CitPDS. Após a aclimatização das plantas, borbulhas foram sobreenxertadas em plantas adultas de laranjeira e algumas apresentaram florescimento em cerca de 6 meses. As flores provenientes das plantas geneticamente transformadas foram polinizadas manualmente e até o presente momento, três frutos estão em fase de desenvolvimento (Figura 6I). Após o amadurecimento destes frutos, será realizada a análise do perfil de carotenoides individuais dos frutos provenientes das plantas transgênicas, em comparação às plantas não transformadas, seguido da análises da expressão dos vários genes envolvidos na biossíntese de carotenoides na polpa dos frutos.

O gene *LCY-b1* foi superexpressado em plantas de laranjeira 'x11' e SM. Em laranjeira 'x11' foram realizadas três repetições dos ensaios de transformação, utilizando-se em cada repetição cerca de 150 explantes. O total de explantes co-cultivados foi de 460, os quais regeneraram 161 brotações com mais de 4 mm. A eficiência da regeneração foi calculada chegando a 0,35 ou 35% (Tabela 2). Das 161 brotações regeneradas, 79 foram avaliadas através de PCR e do ensaio histoquímico da atividade de *gusA*. Através dos dois testes (PCR e atividade de *gusA*), 11 plantas foram consideradas positivas para a transgenia, o

que resultou em eficiência de transformação igual a 0,13 ou 13% (Tabela 2). As 11 plantas de laranjeira 'x11' confirmadas como transgênicas para a superexpressão do gene *LCY-b1* foram microenxertadas em plantas de citrange 'Carrizo', aclimatizadas em casa de vegetação e estas tiveram borbulhas sobreenxertadas em plantas adultas de laranjeira. Duas destas plantas floresceram e foram polinizadas manualmente.

Uma planta de laranjeira 'x11' transformada com a construção pCAMBIA2301::CitLCY-b (#6) gerou um fruto que foi avaliado para o perfil de carotenoides totais (Figura 8 B).



Figura 8 – Em A: Fruto de laranjeira 'x11' controle (não transformada geneticamente). Em B: fruto proveniente de laranjeira 'x11' transformada para a superexpressão do gene LCY-b1

A avaliação dos carotenoides individuais e dos totais foi realizada no fruto proveniente da laranjeira 'x11' transformada para a superexpressão do gene *LCY-b1* (planta #6) e em um fruto proveniente de laranjeira 'x11' não transformada, usada como controle, ambos coletados no mesmo período e com estágios de desenvolvimento equivalentes.

O fruto proveniente da planta #6 (transformada para a superexpressão do gene *LCY-b1*), acumulou mais carotenoides totais, apresentando média de 31,83 μ g g⁻¹ enquanto que o fruto proveniente da laranjeira 'x11' controle não transformada acumulou média de 20,93 μ g g⁻¹ (Tabela 3, Figura 9). Esse valor equivale a um aumento de aproximadamente 52% no teor de carotenoides totais acumulados na polpa do fruto transformado geneticamente, em relação ao fruto controle.



Figura 9 – Concentração de carotenoides totais em fruto de laranjeira 'x11' não transformada e fruto de laranjeira 'x11' superexpressando o gene *LCY-b1*

A análise de carotenoides individuais presentes na polpa dos frutos de plantas transformadas, em relação a frutos da planta controle, demonstrou que houve aumento de auroxantina 1 (de 0,48 μ g g⁻¹ para 0,71 μ g g⁻¹), auroxantina 2 (de 0,31 μ g g⁻¹ para 0,4 μ g g⁻¹), neocromo (tipo) (de 0,13 μ g g⁻¹ para 0,99 μ g g⁻¹), violaxantina (*cis*) (de 3,58 μ g g⁻¹ para 12,59 μ g g⁻¹), violaxantina (*trans*) (de 0,66 μ g g⁻¹para 2,31 μ g g⁻¹), zeaxantina (de 1,42 μ g g⁻¹para 2,44 μ g g⁻¹), anteraxantina (de 2,05 μ g g⁻¹para 7,31 μ g g⁻¹) e β -criptoxantina (de 0,62 μ g g⁻¹para 1,03 μ g g⁻¹) (Tabela 3; Figura 10).

Nesta mesma análise também observou-se que houve a diminuição de alguns carotenoides nos frutos da planta transformada para a superexpressão do gene *LCY-b1*. O carotenoide neocromo (tipo) estava presente nos frutos da planta controle na concentração de 0,67 μ g g⁻¹ e nos frutos transformados chegou a 0,48 μ g g⁻¹. A luteoxantina diminuiu de

1,74 μ g g⁻¹para 1,01 μ g g⁻¹, carotenoides (mix) nos frutos não transformados estavam presente na concentração de 1,3 μ g g⁻¹ caindo para 0,46 μ g g⁻¹. Houve diminuição também nos carotenoides luteoxantina (de 1,82 μ g g⁻¹ para 1,23 μ g g⁻¹ e de 0,61 μ g g⁻¹ para 0), luteína (de 4,1 μ g g⁻¹ para 1,18 μ g g⁻¹) Mutatoxantina (de 0,47 μ g g⁻¹ para 0 e de 1,24 μ g g⁻¹ para 0,69 μ g g⁻¹) e zeinoxantina (de 0,41 μ g g⁻¹ para 0,09 μ g g⁻¹) (Figura 10; Tabela 3).



Figura 10 – Perfil dos carotenoides acumulados em fruto de laranjeira 'x11' superexpressando o gene *LCY-b1* em relação ao controle 'x11'

Tabela 3 - Análise do perfil de carotenoides totais obtidos do fruto proveniente de laranjeira 'x11' transformada com a construção pCAMBIA2301::CitLCY-b para a superexpressão do gene *LCY-b1* (↑ LCY-b1), em relação ao perfil de carotenoides totais obtidos do fruto de laranjeira 'x11' controle. DP: Desvio padrão. PS: Peso seco

		'x1	11'	(↑) LCY-b1			
Carotenoides	$\lambda_{max}\left(nm ight)$ I-II -III	Média µg g ⁻¹ PS	DP	Média µg g ⁻¹ PS	DP		
Auroxantina1	350-363-389	0,48	189	0,71	147		
Auroxantina 2	370-393-413	0,31	106	0,40	65		
Neocromo (tipo) All-trans-Violaxantina	cis-327-405-429-456 cis-327-405-428-456 417-437-468	0,67 0,13 0,66	426 230 131	0,48 0,99 2,32	66 228		
Luteoxantina (tipo)	421-447	1,74	101	1,01	882		
Mix	mix 402-425-s	1,30	158	0,46	80		
9-cis-Violaxantina	cis 327-415-433-464	3.59	398	12,59	396		
Luteoxantina (tipo)	418-442	0,61	131	0	0		
Luteoxantina (tipo)	416-442	1,82	1594	1,23	635		
Mutatoxantina (tipo)	s-426-452	0.47	35	0	0		
Luteína Mutatoxantina	s-420-452 s-443-472 s-427-452	4,10 1,24	224 74	1,18 0,69	2050 1192		
Zeaxantina	s-450-478	1,42	101	2,44	52		
Anteraxantina	s-440-469	2,05	168	7,31	278		
Zeinoxantina	s-444.7-473.9	0,41	110	0,09	82		
β-criptoxantina	s-450-478	0,62	66	1,03	165		
Fitoeno	285	Traços	0	0	0		
β-caroteno Carotenoides Totais	s-450-478	20,93	0	0 31,83	0 1606		

A Figura 11 ilustra o perfil de carotenoides alterado após a superexpressão do gene *LCY-b1*.



Figura 11 – Perfil de carotenoides obtido no fruto proveniente de laranjeira 'x11' superexpressando o gene *LCY-b1*

Plantas de laranjeira SM também foram transformadas para a superexpressão do gene *LCY-b1*. Foram realizados dois ensaios de transformação genética com 140 explantes inoculados por vez. Destes, houve a regeneração de 131 gemas adventícias (Figura 6 D), resultando na eficiência de regeneração de 0,48 ou 48% (Tabela 2). Das 131 brotações, 92 foram avaliadas para a transgenia por PCR e pelo teste histoquímico da atividade de *gusA*, comprovando que 25 plantas são positivas para a superexpressão do gene *LCY-b1* e apresentando eficiência de transformação de 0,27 ou 27% (Tabela 2). As 25 plantas possivelmente transgênicas foram microenxertadas em plantas de citrange 'Carrizo', porém apenas 14 foram aclimatizadas e estão sendo cultivadas em casa de vegetação. Onze plantas morreram durante a microenxertia. Quatro destas plantas foram sobreenxertadas em plantas adultas de laranjeira, porém ainda não foram geradas flores e nem frutos.

3.4.2. Confecção das construções gênicas para superexpressão dos genes *LCY-b2* e *HYb* e silenciamento dos genes *CRTISO*, *LCY-b2* e *HYb*

Nessa etapa do trabalho foi realizada confecção das construções gênicas para superexpressão dos genes *LCY-b2* e *HYb*, recombinados no plasmídeos pK7WG2, e para o silenciamento dos genes *CRTISO*, *LCY-b2* e *HYb*, os quais tiveram fragmentos recombinados no vetor pK7GWIWG2(II), dirigidos pelo promotor CaMV 35S.

3.4.2.1. Busca das sequências e construção dos iniciadores

Primeiramente as sequências utilizadas como molde para a confecção das construções gênicas foram obtidas em bancos de dados, pois no início deste trabalho o genoma de *Citrus* ainda não estava sequenciado. Os genes buscados foram carotenoide isomerase (*CRTISO*), licopeno β -ciclase 2 (*LCY-b2*), β -caroteno hidroxilase (*HYb*). Para todos os genes foram identificadas as sequências correspondentes. As sequências foram buscadas por meio de palavras-chaves e a identidade de cada uma delas foi confirmada com o uso da ferramenta *blast*.

As sequências obtidas no banco de genes COMPBIO, correspondentes aos genes *CRTISO*, *LCY-b2* e *HYb* foram usadas como molde para o desenho dos iniciadores específicos. Para a superexpressão dos genes *LCY-b2* e *HYb* foram desenhados *primers* para a amplificação do gene completo. Para o silenciamento dos *CRTISO*, *LCY-b2* e *HYb*, foram desenhados iniciadores que amplificam regiões intermediárias do gene. Os iniciadores estão apresentados na Tabela 4, juntamente com o acesso da sequência gênica e o tamanho do *amplicon*. Na Figura 12 estão identificadas as regiões amplificadas para cada construção gênica de silenciamento.

Superexpressão Gene Sequência (5'-3') Amplicon Acesso LCY-b2 ATGGCAACTCTTCTTAGCCC FJ516403 1512 TCAAATGGTTTCAAGGGCA HYb ATGGCGGTCGGACTATTG DQ228870.1 936 TTATTTTGGAACCCTGTTGTAT Silenciamento Gene Sequência (5'-3') Amplicon Acesso CRTISO ATGGGTGTTAAAGCTGAGGTTCTG 603 XR371035.1 TCATGCCATACTCCTTAACCAAGC AAGTGTGGGAATGGGTTGTGG LCY-b2 FJ516403 304 TCAAATGGTTTCAAGGGCA DQ228870.1 302 HYb TGGCAAAAACCGAAGAAAAC AGCAAATGTGCCAAACATTTCAGCTAA

Tabela 4 – Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes ou fragmentos dos genes *CRTISO*, *LCY-b2* e *HYb*, pertencentes a via de carotenoides

ATGTTCATCTTGTGTGCCCCTTTCCATACCTGAATTAAATTTCACTCCTTCACTTAATAAACCATAATTCTCAGGTTTGATTCACCAAAATAGGTCGAAATTATCGTGTAGCGGTAAGTCGACGTTGGTGGGGTAGCGGTTGGGGGAAGTCACTAAGGTCAGTGTTGGTGGGGGAAGTCACTAGGGGGAACCCAAGGTCGGGGGAACCCAAGGTCGCCAATGGTCACCCAGTGAGGGGGAACCCAAGGGGGGAACCCAAGGGGGGGAACCAAGGGGGG
>HYB(DQ228870.1)
ATGGCGGTCGSACTATTGGCCGCCATAGTCCCGAAAGCCTTCTGTCTCGTCACAACAAACTTCAACCCTCTTCGCTCCTCACAACAAAACCCGGTCCCCTTTTTGCCCCTCCGGTAGGAGAGAGA
>LCY-b2(FJ516403)
ARGCARCTCTTCTTAGCCGTTTTCCCTTCTCCTTTAGCTAAGTTTCGCAAATATTGATTCAACATCATCACCCTTCATTTCCCTTTTCCCATATGGCCGCCGCAAAATGGCAGTGTTCAAGAATGGCTGGGACCGCGCAAATGGCAGAGTCATCAAGAGTTTGATGCCGGACCGGCGCCGCGCCGGCCTCGGGACCGGGGGGGG

Figura 12 - Sequências referentes aos genes *CRTISO*, *LCY-b2* e *HYb* identificando as regiões amplificadas e utilizadas na construção do *hairpin* para o silenciamento gênico

3.4.2.2. Amplificação das sequências gênicas

Os genes completos *LCY-b2* e *HYb* e as sequências parciais dos genes *CRTISO*, *LCY-b2* e *HYb* foram amplificados por PCR, ligados aos vetores pCR8/GW/TOPO e clonados. A confirmação da inserção do fragmento amplificado no sentido 5'-3' e da clonagem das sequências gênicas no vetor pCR8/GW/TOPO foi realizada por meio de reações de PCR que amplificam parte do vetor e parte da sequência inserida.

O sequenciamento das sequências gênicas clonadas no vetor pCR8/GW/TOPO foi realizado e os cromatogramas obtidos foram examinados. A sequência referente a cada gene foi alinhada com a sequência buscada no banco COMPBIO (Apêndice B) e os clones que apresentaram perfeita similaridade foram selecionados para serem recombinados no vetor de destino. Os genes *LCY-b2* e *HYb* foram recombinados nos plasmídeos pK7WG2 para a

superexpressão, dando origem as construções gênicas pK7WG2:: LCY-b2 e pK7WG2 HYb (Figura 13A e B). Para o silenciamento dos genes *CRTISO*, *LCY-b2* e *HYb* foram confeccionadas as construções gênicas pK7GWIWG2(II)::CRTISO, pK7GWIWG2(II)::LCY-b2 e pK7GWIWG2(II)::HYb (Figura 13C, D e E). Finalizadas as construções gênicas, estas foram inseridas em *A. tumefaciens* para a transformação genética das plantas de 'x11' ou SM. Para a confirmação da inserção de cada construção gênica em *A. tumefaciens* foram realizadas reações de PCR amplificando os genes ou fragmento de genes possivelmente inseridos.



Figura 13 – Esquema representativo das construções utilizadas para transformação laranjeira 'x11' ou SM. A) pK7WG2::LCY-b2. B) pK7WG2::HYb. C) pK7GWIWG2(II)::CRTISO. D) pK7GWIWG2(II)::LCY-b2. E) pK7GWIWG2(II)::HYb. P35S: Promotor CaMV 35S. CRTISO, LCY-b2 e HYb: genes pertencentes a via biossintética de carotenoides. *CmR*: gene de resistência a Clorafenicol. T35S: terminador 35S. Kan: gene codificador da Neomicina fosfotransferase II (*nptII*)

3.4.3. Transformação genética dos explantes de laranjeira 'x11' ou SM

A construção pK7WG2:: HYb para a superexpressão do gene *HYb* foi usada na transformação genética de plantas laranjeira SM. A transformação genética das plantas de laranjeira 'x11' foi realizada em dois experimentos com 100 e 131 explantes inoculados cada, os quais produziram 114 brotações, com eficiência de regeneração de 0,49 (49%). Das 114 brotações obtidas, 22 foram analisadas para a transgenia por meio de PCR. Doze brotações apresentaram resultado positivo para transformação com a construção pK7WG2:: HYb, apresentando eficiência de transformação de 0,54 (54%) (Tabela 5). Desses eventos de transformação de SM para a superexpressão do gene *HYb*, resultaram 10 plantas sobreenxertadas em plantas adultas de laranjeira. Essas plantas estão sendo cultivadas em casa de vegetação até a obtenção dos frutos.

Plantas de laranjeira 'x11' e SM foram transformadas para o silenciamento do gene *CRTISO* por meio da construção gênica pK7GWIWG2(II)::CRTISO. Para o silenciamento do gene *CRTISO* em plantas de laranjeira 'x11' foram inoculados 1123 segmentos de epicótilos, gerando 212 brotações (eficiência de regeneração de 0,18-18%), das quais 24 foram analisadas para a transgenia por meio de PCR, amplificando fragmento do gene *nptII*. Das 24 brotações analisadas 11 foram PCR positivas, apresentando eficiência de transformação de 0,41 (41%) (Tabela 5). Todas as brotações PCR positivas para o silenciamento do gene *CRTISO* foram sobreenxertadas em plantas adultas de laranjeira e estão sendo cultivadas em casa de vegetação.

Plantas de laranjeira SM também foram transformadas com a construção gênica pK7GWIWG2(II)::CRTISO, visando o silenciamento do gene *CRTISO*. Para isso foram inoculados 1731 explantes que geraram 293 brotações, apresentando eficiência de regeneração de 0,16 (16%). Das 293 brotações obtidas, 12 foram avaliadas por PCR para a presença do gene *nptII*, e 9 mostraram-se positivas para a transgenia. A eficiência da transformação das plantas de laranjeira SM com a construção pK7GWIWG2(II)::CRTISO foi de 0,75 (75%) (Tabela 5). Das 9 plantas positivas para a transgenia, apenas 6 foram sobreenxertadas em plantas adultas de laranjeira pois três plantas morreram na fase de estabelecimento *ex vitro*.

Plantas de laranjeira 'x11' foram transformadas para o silenciamento do gene *HYb* e, para isso, foram inoculados 2155 explantes. O total de brotações regeneradas foi de 720 e a eficiência de regeneração foi de 0,33 (33%). Destas, 31 brotações foram analisadas por PCR para a presença do gene *nptII*. Das brotações analisadas, 30 foram positivas para a transgenia o que gerou valor de eficiência de transformação de 0,09 (9%) (Tabela 5). As brotações PCR positivas para a amplificação do gene *nptII* foram estabelecidas *ex vitro* e, destas, três foram sobreenxertadas em plantas adultas de laranjeira. Tabela 5 - Dados referentes à transformação genética de laranjeira SM para superexpressão do gene *HYb* (HYb::pK7WG2), para o silenciamento de do gene *CRTISO* (pK7GWIWG2(II)::CRTISO) e de transformação de laranjeira 'x11' para o silenciamento do gene *CRTISO* (pK7GWIWG2(II)::CRTISO) e *HYb* (pK7GWIWG2(II)::HYb), descrevendo a eficiência de regeneração e de transformação para cada construção. A eficiência da transformação foi calculada a partir de plantas PCR positivas para o gene *nptII*

Construção /		Total de	Número		Número de	Eficiência da	Eficiência da
superexpressão	Variedade	explantes	explantes total de		plantas PCR	regeneração	transformação
		inoculados	brotos	analisadas	positivas		
pK7WG2::HYB	SM	231	114	22	12	0,49	0,54
Construções / silenciamento	Variedade	Total de explantes inoculados	Número total de brotos	Brotações analisadas	Número de plantas PCR positivas	Eficiência da regeneração	Eficiência da transformação
pK7GWIWG2(II)::CRTISO	ʻx11'	1123	212	24	10	0,18	0,41
pK7GWIWG2(II)::CRTISO	SM	1731	293	12	9	0,16	0,75
pK7GWIWG2(II)::HYB	'x11'	2155	720	31	3	0,33	0,09

3.4.4. Análise da expressão do transgene por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) e estimativa do número de cópias dos transgenes inseridos por PCR quantitativo (qPCR)

As plantas de laranjeiras 'x11' e SM transformadas para a superexpressão dos genes *PDS*, *LCY-b1 e HYb* e silenciamento dos genes *CRTISO* e *HYb*, e que tiveram a transgenia confirmada por amplificação do gene *nptII*, foram submetidas à análise da expressão do transgene por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR). Esse experimento foi realizado com o objetivo de confirmar a transgenia (amplificando o transgene *nptII*) e constatar se a superexpressão ou silenciamento dos genes da via de carotenoides estaria ocasionando maiores níveis de transcritos, quando comparadas às plantas controle, não transformadas. A estimativa do número de cópias dos transgenes inseridos também foi calculada por meio do método de PCR quantitativo (qPCR).

Foram analisadas a expressão dos transgenes *nptII* e dos genes da via de carotenoides de 10 plantas de laranjeira 'x11' transformadas com a construção pCAMBIA2301::CitPDS, 9 plantas de laranjeira 'x11' transformadas com a construção pK7GWIWG2(II)::CRTISO, 6 plantas de laranjeira SM transformadas com a construção pK7GWIWG2(II)::CRTISO, 10 plantas de laranjeira 'x11' transformadas com a construção pCAMBIA2301::CitLCY, 13 plantas de laranjeira SM transformadas com a construção pCAMBIA2301::CitLCY, 3 plantas de laranjeira 'x11' transformadas com a construção pCAMBIA2301::CitLCY, 3 plantas de laranjeira 'x11' transformadas com a construção pCAMBIA2301::CitLCY, 3 plantas de laranjeira 'x11' transformadas com a construção pK7WG2::HYB e 10 plantas de laranjeira SM transformadas com a construção pK7WG2::HYB e 10 plantas de laranjeira SM transformadas com a construção pK7WG2::HYB e 10 plantas de laranjeira SM transformadas com a construção pK7WG2::HYB e 10 plantas de laranjeira SM transformadas com a construção pK7WG2::HYB e 10 plantas de laranjeira SM transformadas com a construção pK7WG2::HYB e 10 plantas de laranjeira SM transformadas com a construção pK7WG2::HYB.

O RNA total, extraído de folha das plantas possivelmente transgênicas, foi analisado em gel de agarose e a razão A260/A280 se encontrava entre 1,8-2,0, sendo de boa qualidade para que os resultados da expressão gênica fossem considerados robustos. O RNA foi tratado com DNase I e para a realização de um controle negativo, uma alíquota de cada uma das amostras de RNA tratado com DNase I foi submetida a amplificação com *primer* amplificador do gene *ACT*, para comprovar a ausência de genômico nas amostras tratadas. A visualização em gel de agarose garantiu a ausência de DNA nas amostras do RNA total tratados com DNase I, podendo apenas ser visualizado a banda de 89 pb referente a amplificação do *ACT* no genômico da amostra utilizada como controle positivo (não mostrado).

Após a confirmação da ausência de contaminação por DNA genômico nas amostras de RNA provenientes das plantas confirmadas como transgênicas por PCR, foi realizada a síntese de cDNA. Todas as amostras obtidas foram submetidas a reações de RT-PCR para a amplificação do gene *ACT*, confirmando a eficiência da síntese de cDNA.

A quantificação relativa dos transcritos derivados da expressão do gene *nptII* foi realizada utilizando-se os *primers* referentes ao gene *nptII* e ao gene referência *IF5A*.

Para a confirmação da especificidade da amplificação dos genes *nptII* e *IF5A*, foi realizada a análise da temperatura de dissociação do produto de PCR na curva de *melting* (Figura 14). A curva do gene endógeno *IF5A*, mostrou um padrão específico de temperatura de *melting* com pico de \pm 77,3°C em todas as amostras de cDNAs de plantas, exceto nas amostras sem cDNA molde (Figura 14). A curva do gene alvo *nptII*, indicou temperatura de desnaturação semelhante a do gene *IF5A*, apresentando pico de \pm 83,3°C em todas as amostras de cDNAs das plantas não transformadas, ou seja, nas plantas controle e nas amostras sem cDNA molde (Figura 14).



Figura 14 – Curva de *melting* gerada pela amplificação dos genes *nptII* e *IF5A*.Em C-: planta não transformada. Em B: controle negativo da reação

A eficiência de amplificação foi calculada com um *pool* de amostras de cDNA das diversas plantas transgênicas e controles, mostrando valores de 0,99 para o gene *IF5A* e 0,9 para o gene *nptII*. Já o acúmulo de transcritos dos genes da via de carotenoides superexpressados ou silenciados em plantas de laranjeira 'x11' ou SM foi realizado utilizando os *primers* descritos na Tabela 1. Como genes referência foram usados os codificadores da proteína actina (*ACT*) e da proteína tubulina (*TUB*). Os picos de *melting* e a eficiência dos *primers* referentes aos genes da via de carotenoides foram previamente analisados, sendo confirmadas, a especificidade das amplificações e a qualidade dos iniciadores.

Primeiramente todas as plantas de laranjeiras 'x11' ou SM transformadas com as construções pCAMBIA2301::CitPDS, pK7GWIWG2(II)::CRTISO, pCAMBIA2301::CitLCY-b, pK7WG:: HYb ou pK7GWIWG2(II)::HYb e positivas para RT-PCR, foram avaliadas quanto à acumulação de transcritos do transgene *nptII*. Os gráficos foram ajustados para que as plantas não transformadas (controle) apresentassem valor de expressão igual a 1.

Na avaliação da expressão do gene *nptII* nas plantas de laranjeira 'x11' transformadas com a construção pCAMBIA2301::CitPDS a expressão gênica variou de 9 vezes na planta #7, até 81.874 vezes na planta #10 (Figura 15A). As plantas de 'x11' transformadas com pK7GWIWG2(II)::CRTISO apresentaram expressões gênicas que variaram de 419 vezes na planta #9, a 2.226 vezes na planta #1 (Figura 15B). Já as plantas SM transformadas com a construção para o silenciamento do gene *CRTISO* apresentaram expressões gênicas de *nptII* variando de 262 vezes na planta #5, a 4.989 vezes na planta #7 (Figura 15C).

Nas plantas 'x11' transformadas com a construção pCAMBIA2301::CitLCY-b os valores de expressão do transgene chegaram a 43.471 vezes na planta #8 e nas plantas transformadas SM transgênicas de laranjeira construção gênica com a pCAMBIA2301::CitLCY-b o valor máximo de expressão foi de 8.222 vezes no evento #9 (Figuras 15D e 15E). A transformação das plantas 'x11' com a construção para o silenciamento do gene HYb, apresentou valor mínimo de expressão do transgene nptII de 2.746 vezes na planta #3 e valor máximo de expressão de 20.900 vezes no evento #1 (Figura 15F). Considerando as plantas de laranjeira SM transformadas para a superexpressão do gene HYb, o valor máximo obtido foi de 34.049 vezes na planta #9, em relação ao controle.

*

y,e

29

\$

"?)



Figura 15 - Expressão relativa do gene *nptII* em relação ao gene referência *IF5A*, analisados a partir de amostras de folhas de plantas de laranjeiras 'x11' ou SM. Em A: Expressão relativa do transgene PDS para superexpressão em plantas de laranjeira 'x11'. Em B: Expressão relativa do transgene CRTISO para silenciamento em plantas de laranjeira 'x11'. Em C: Expressão relativa do transgene CRTISO para silenciamento em plantas de laranjeira SM. Em D: Expressão relativa do transgene LCY-b1 para superexpressão em plantas de laranjeira 'x11'. Em E: Expressão relativa do transgene LCY-b1 para superexpressão em plantas de laranjeira SM. Em F: Expressão relativa do transgene HYb para silenciamento em plantas de laranjeira 'x11'. Em G: Expressão relativa do transgene HYb para superexpressão em plantas de laranjeira SM

Após a confirmação da transgenia por meio da quantificação da expressão do transgene *nptII*, foi realizada a quantificação dos transcritos dos transgenes da via de carotenoides, os quais foram manipulados nas plantas de laranjeira 'x11' ou SM (Figura 16). A análise do número de cópias dos transgenes inseridos em evento também foi calculada (Tabela 6).

Nas plantas de laranjeira 'x11' transformadas para a superexpressão do gene *PDS*, houve acúmulo de transcritos nos eventos #1, #7, #8, #9 e #10. Os demais eventos não apresentaram níveis de transcritos maiores que o controle. O maior acúmulo de transcritos foi detectado na planta #10, com expressão gênica cerca de 38 vezes maior que o controle não transformado, apresentando 6 cópias do transgene inseridas no genoma (Figura 16 A; Tabela 6).

Nas plantas de laranjeira 'x11' que foram submetidas ao processo de silenciamento gênico de *CRTISO*, nos eventos #5, #8 e #9 houve acúmulo de transcritos superior ao controle. Estas plantas possuem 1, 4 e 1 cópia do transgene inseridas no genoma, respectivamente. Porém, nos demais eventos, houve acúmulo de transcritos menor que o controle. O evento #2 apresentou valor de transcritos igual a 0,3 vezes em relação ao controle, apresentando 3 cópias do transgene inseridas no genoma (Figura 16 B; Tabela 6).

Já em plantas de laranjeira SM transformadas para o silenciamento do gene *CRTISO*, os eventos #4 e #5 apresentaram os menores níveis de transcritos (0,1 e 0,3) em relação ao controle. Estes eventos apresentaram 1 e 2 cópias do transgene inseridas no genoma (Figura 16 C; Tabela 6). Os outros 5 eventos também apresentaram acúmulo de transcritos menores que o controle, com número de cópias do transgene inseridas no genoma igual a 1.

Plantas de laranjeira 'x11' superexpressando o gene *LCY-b1* apresentaram acúmulo de transcritos nos eventos #7, #8 e #9, sendo 3, 4 e 2 vezes mais expressos do que o controle, respectivamente. Os outros eventos não apresentaram acúmulo de transcritos superior ao controle. Os eventos #7, #8 e #9 apresentaram 1, 9 e 3 cópias estimadas inseridas no genoma (Figura 16 D; Tabela 6).

Na análise do acúmulo de transcritos do gene *LCY-b1* em laranjeira SM, os eventos de #9, #10, #11, #12 e #13 apresentaram acúmulo de transcritos, variando de 1 (#9) a 4 (#13) vezes a mais que o controle. Estes apresentaram 3, 4, 8, 4, e 4 cópias do transgene inseridas, respectivamente (Figura 16 E; Tabela 6). Os demais eventos não apresentaram acúmulo de transcritos maiores que o controle e o número de cópias variou de 4 nas plantas #1, #2, #4 e #5 a 18 na planta #7.

Das 3 plantas de 'x11' transformadas para o silenciamento do gene *HYb*, os eventos #2 e #3 apresentaram menos transcritos em relação ao controle (0,4) (Figura 16 F; Tabela 6). Todas as plantas apresentaram uma cópia do transgene inseridas no genoma.

Na transformação genética para a superexpressão do gene *HYb* em laranjeira SM os eventos #1, #4, #8, #9 e #10 apresentaram acúmulo de transcritos maior que o controle. Nos demais eventos o acúmulo de transcritos foi menor que o controle. O evento #10 alcançou 437 vezes mais transcritos que o controle e apresentou 3 cópias do transgene inseridas no genoma (Figura 16 G; Tabela 6). Os demais eventos apresentaram 1 cópia do transgene inseridas no genoma.



Expressão relativa do gene PDS em laranjeira Α

> Figura 16 - Expressão relativa dos genes da via de carotenoides manipulados nos processos de transformação genética em relação aos genes referência ACT e TUB, analisados a partir de amostras de folhas de plantas de laranjeiras 'x11' ou SM. A: Expressão relativa do transgene PDS para superexpressão em plantas de laranjeira 'x11'. B: Expressão relativa do transgene CRTISO para silenciamento em plantas de laranjeira 'x11'. C: Expressão relativa do transgene CRTISO para silenciamento em plantas de laranjeira SM. D: Expressão relativa do transgene LCY-b1 para superexpressão em plantas de laranjeira 'x11'. E: Expressão relativa do transgene LCY-b1 para superexpressão em plantas de laranjeira SM. F: Expressão relativa do transgene HYb para silenciamento em plantas de laranjeira 'x11'. G: Expressão relativa do transgene HYb para superexpressão em plantas de laranjeira SM

		Controle	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13
Genes	Variedade														
$(\uparrow) PDS$	ʻx11'	0	10	1	1	2	4	10	72	1	1	6	-	-	-
$(\Omega) CRTISO$	ʻx11'	0	3	3	2	1	1	2	3	4	1	-	-	-	-
$(\Omega) CRTISO$	SM	0	1	1	1	1	2	1	1	-	-	-	-	-	-
(†) <i>LCY-b1</i>	ʻx11'	0	1	5	4	1	1	11	1	9	3	-	-	-	-
(\uparrow) LCY-b1	SM	0	4	4	11	4	4	11	18	5	3	4	8	4	4
(Ω) HYb	ʻx11'	0	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$(\uparrow) HYb$	SM	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	-	-	-

Tabela 6 - Número de cópias assumido dos transgenes *PDS*, *CRTISO*, *LCY-b1 e HYb*, superexpressados ou silenciados em plantas de laranjeira 'x11' ou SM. O símbolo (\uparrow) significa que o gene foi superexpressado e (Ω) o gene foi silenciado

3.5. Discussão

3.5.1. Eficiência das transformações genéticas

O presente trabalho teve como objetivo a transformação genética de plantas de laranjeiras 'x11' ou SM para a superexpressão ou silenciamento de genes codificadores das enzimas da via de biossíntese de carotenoides. Para a transformação de laranjeira 'x11' e SM, foi realizada a escolha do uso de segmentos de epicótilo como fonte de explante (Figura 8A). Plantas provenientes de tecidos juvenis também apresentam características juvenis, como extenso período de juvenilidade e intenso crescimento vegetativo (ALMEIDA et al., 2003, CERVERA et al., 2005; CERVERA et al., 2008, HE et al., 2011). Porém a cultivar 'x11' usada neste trabalho, apresenta florescimento e frutificação precoce, o que torna possível a visualização do fenótipo nos frutos num curto espaço de tempo. Em laranjeira SM, apesar de ser uma variedade com extenso período vegetativo quando se utiliza tecidos juvenis para a transformação, ela foi utilizada por produzir frutos com polpa vermelha.

Os genes manipulados neste trabalho foram *PDS*, *CRTISO*, *LCY-b1 e HYb* de citros. Primeiramente foi realizada a superexpressão do gene *PDS* em laranjeira 'x11' e a superexpressão do *LCY-b1* em laranjeira 'x11' e SM, por meio de *Agrobacterium tumefaciens*, armadas com os plasmídeos pCAMBIA2301::CitPDS ou pCAMBIA2301::CitLCY-b1. Nesta etapa do trabalho, a eficiência de transformação das plantas de laranjeira 'x11' transformadas para a superexpressão do gene *PDS* e *LCY-b1* apresentaram valores mais baixos (14% e 13%, respectivamente) em relação às plantas de laranjeira SM transformadas para a superexpressão do gene *LCY-b1* (27%).

Na segunda etapa do trabalho foi realizada a superexpressão do gene HYb em laranjeira SM e o silenciamento dos genes *CRTISO*, em 'x11' e SM, e silenciamento de *HYb*, em laranjeira 'x11'. Na análise destas plantas, os valores alcançados nas transformações do genótipo 'x11' também foram mais baixos (41% no silenciamento de *CRTISO* e 9% no silenciamento de *HYb*) em relação a SM (54% na superexpressão de *HYb* e 75% para o silenciamento de *CRTISO*).

Esses resultados sugerem que apesar da laranjeira 'x11' ter uma eficiência de transformação superior às taxas relatadas por outras laranjas doces (como já discutido no Capítulo 2), o genótipo SM é mais eficiente quanto a transformação genética, quando comparado a 'x11'.

Diversos fatores influenciam a eficiência da regeneração ou transformação de plantas de Citrus, tais como quantidade dos hormônios vegetais utilizados (TAN et al., 2009; MOORE et al., 1992; BOND; ROOSE, 1998; MENDES et al., 2010; YANG et al., 2011; DUTT et al., 2011; DUTT; GROSSER, 2009; TONG et al., 2009), adição de componentes fenólicos (STACHEL et al., 1985), período de inoculação com a bactéria, temperatura de crescimento e genótipo e cepa da bactéria (CERVERA et al., 1998; COSTA; OTONI; MOORE, 2002; ALMEIDA et al., 2003a; DUTT; GROSSER, 2009; PEÑA et al., 1997, GHORBEL et al., 2001; YANG et al., 2011; ALI et al., 2012; MENDES et al., 2002). O tamanho do inserto localizado na região de T-DNA que foi integrado à planta transformada também é considerado fator influente na taxa de transformação de plantas (GELVIN, 2003). Apesar destas variáveis influenciarem a eficiência da transformação genética, o genótipo também deve ser considerado, pois este é um fator de extrema importância na transformação de Citrus (DUTT; GROSSER, 2007; TAN et al., 2009; DONMEZ et al., 2013). No presente estudo, essa característica parece prevalecer sobre as demais consideradas, pois, as variáveis estavam padronizadas e não houve relação com o tamanho do T-DNA inserido. Esse resultado corrobora estudos que consideram que a eficiência de transformação é genótipo-dependente (DUAN et al., 2007; TAN et al., 2009).

3.5.2. Expressão gênica e número de cópias do transgene inseridas no genoma

Após a obtenção das plantas transgênicas com genes da via de carotenoides manipulados, foi realizada a caracterização genética através RT-qPCR e qPCR de todos os eventos. A acumulação de transcritos de cada gene manipulado foi sempre comparada com a de uma planta controle (não transformada), para que fossem consideradas as diferenças na expressão. O número de cópias inseridas em cada evento também foi analisado por qPCR e essas informações serão futuramente correlacionadas ao perfil de carotenoides de cada planta transgênica. Esse estudo será realizado com o objetivo de constatar se o efeito do número de cópias inseridos no genoma tem relação com o maior acúmulo de carotenoides.

Das dez plantas avaliadas para a superexpressão do gene *PDS* em laranjeira 'x11', apenas quatro apresentaram níveis de transcritos superiores ao da planta não transformada, variando de 1 a 38 vezes mais que o controle. Quando relacionado o acúmulo de transcritos e número de cópias do transgene inseridas no genoma, percebeu-se que no evento com maior acúmulo de transcritos (38 vezes), o número de cópias inseridas no genoma também era alto (6 cópias). Por outro lado, no evento com menor acúmulo de transcritos, apenas 1 cópia do transgene estava inserida no genoma.

No genoma de laranja estão presentes naturalmente duas cópias do gene *PDS* (CHEN et al., 2010). Quando analisada a expressão deste gene em diversos tecidos de laranja, o gene *PDS* mostrou expressão aumentada em tecido foliar quando comparada com polpa do fruto (NISHIMURA et al., 2012). Dessa maneira mudanças no padrão de expressão gênica podem ocorrer, se a expressão do *PDS* for analisada na polpa dos frutos que serão gerados das plantas transgênicas, e não em folhas, como realizado nesta etapa do trabalho.

Nas plantas de laranjeira 'x11' transformadas para a superexpressão do gene *LCY-b1*, dentre os nove eventos avaliados, quatro mostraram acumulação de transcritos maior que o controle (eventos #6, #7, #8 e #9). O maior acúmulo de transcritos (5 vezes maior em relação ao controle) foi constatado na planta com uma cópias do T-DNA inseridos no genoma (#7). Já nas plantas de SM transformadas para a superexpressão de *LCY-b1*, o maior nível de transcritos (4 vezes maior que o controle), foi visualizado no evento #13, que apresentou 4 cópias do transgene inseridas no genoma. O gene *LCY-b1* está presente em duas cópias no genoma de laranja (CHEN et al., 2010), e na análise da expressão deste gene na polpa dos frutos durante o desenvolvimento do fruto, o padrão de acúmulo de transcritos foi baixo e constante (ALQUÉZAR; ZACARIAS; RODRIGO, 2009). Na análise da expressão de *LCYb1* em diversos tecidos de laranja 'Pera', o acúmulo de transcritos foi maior em quase todos os órgãos avaliados do que na polpa do fruto (NISHIMURA et al., 2012). Isto indica que a expressão gênica no fruto pode ser diferente da verificada em folha, como realizada no presente trabalho.

Níveis mais elevados de transcritos e alto número de cópias do transgene inseridas no genoma, também foi verificado na análise do gene *HYb*, superexpressado em plantas de SM, que apresentou o evento com nível mais elevado de transcritos: cerca de 437 vezes superior ao controle (em folhas de laranjeira 'x11') (evento #10). O número de cópias do transgene inseridas neste evento foi igual a 3. Cinco cópias do gene *HYb* estão presentes de forma endógena no genoma de laranja (CHEN et al., 2010). Na avaliação da expressão deste gene em diferentes tecidos/órgãos, o acúmulo de transcritos foi menor em polpa quando comparado

aos demais tecidos (NISHIMURA et al., 2012). Isso sugere que possíveis diferenças poderão ser percebidas quando for avaliada a expressão do gene *HYb* na polpa dos frutos provenientes das plantas transformadas para a superexpressão ou silenciamento deste gene.

Muitos trabalhos relatam que maiores níveis de expressão gênica estão relacionados a uma ou poucas cópias de T-DNA presentes no genoma (DAY et al., 2001; VAUCHERET; FAGARD, 2001; BELTRÁN et al., 2009; HADI et al., 2012). Nesta etapa do presente estudo, considerando as plantas transformadas para a superexpressão dos genes da via de carotenoides, independente da construção gênica utilizada, a maioria das plantas com nível de expressão mais alto, também apresentaram número elevado de cópias inseridas no genoma. Em plantas de soja avaliadas para a expressão do gene *GFP*, os maiores níveis de transcritos foram obtidos em plantas que possuíam os maiores números de cópias do transgene inseridas no genoma (até 7 cópias) (HERNANDEZ-GARCIA et al., 2010). Em *Arabdopsis* também foi demonstrado que plantas com até 4 cópias do transgene inseridas no genoma, expressaram mais *GFP*, do que plantas com número de cópias do mais baixo (SCHUBERT et al., 2004).

Ainda nesta etapa do trabalho, foi observado que algumas plantas de laranjeira 'x11' ou SM geneticamente transformadas e que apresentavam 1 ou 2 cópias do T-DNA inseridos no genoma, apresentaram níveis mais baixos ou nulos de expressão. Este fato pode ter ocorrido devido ao silenciamento gênico ocorrido por metilação ou 'efeito de posição' do T-DNA na única cópia do gene exógeno introduzida no genoma (MEYER; HEIDMANN, 1994; KUMPATLA et al., 1998; HADI et al., 2012).

Na avaliação da expressão gênica em plantas onde o gene alvo foi silenciado, o número de eventos expressando o transgene foi maior. Plantas de SM silenciadas para o gene *CRTISO* apresentaram todos os eventos com menores níveis de transcritos, em relação ao controle. Isto sugere que, menos transcritos deste gene estão sendo detectados e o mecanismo de silenciamento pode ser o responsável por isso. Nestas plantas, o menor acúmulo de transcritos foi observado no evento #4, que apresentou acúmulo de transcritos de 0,1 vez em relação ao controle e número de cópias do transgene inseridas no genoma igual a 1. Já nas plantas 'x11' que tiveram o gene *CRTISO* silenciado, três plantas (#5, #8 e #9) apresentaram níveis de transcritos maiores que o controle, o que comprova que o silenciamento gênico está sendo eficiente na maioria dos eventos estudados (#1, #2, #3, #4, #6 e #7). Os três eventos nos quais o gene parece não estar sendo silenciado, foram inseridos no máximo 4 cópias e, no mínimo, 1 cópia do transgene no genoma. Nas demais plantas, onde o silenciamento gênico pode estar sendo efetivo, o número de cópias variou entre 1 e 2. A planta com menor acúmulo de transcritos foi o evento #2 com 1 cópia do transgene inserida no genoma.

Em laranjas doces, na avaliação da expressão do gene *CRTISO* nos diversos tecidos de laranja 'Pera', houve aumento no número de transcritos em todos os tecidos em relação ao controle, a polpa (NISHIMURA et al., 2012). Dessa maneira, quando a expressão do gene *CRTISO* for avaliada em polpa dos frutos provenientes das plantas transgênicas, é possível que haja diferença do padrão de expressão encontrado em folhas, como realizado nesta etapa do trabalho.

Das três plantas de laranjeira 'x11' transformadas para o silenciamento do gene HYb, dois eventos apresentaram níveis de transcritos inferiores ao controle (#2 e #3). Nestes, o números de cópias do transgene inseridos no genoma foi igual a 1.

Como já discutido acima, o número de cópias inseridas no genoma parece influenciar nos níveis de expressão (KUMPATLA et al., 1998; DAY et al., 2001; VAUCHERET; FAGARD, 2001; BELTRÁN et al., 2009; HADI et al., 2012). Porém considerando a variação nos resultados obtidos nas plantas transformadas para o silenciamento gênico, não foi possível relacionar expressão gênica e número de cópias do T-DNA inseridas no genoma.

No Capítulo 2 foi discutido que, quanto menor o número de cópias inseridas no genoma das plantas transgênicas, maior foi a expressão gênica obtida. Nesta etapa do estudo, quando consideradas as plantas transformadas para a superexpressão dos genes da via de carotenoides, na maioria dos eventos, ocorreu justamente o contrário. Quanto mais elevado o número de cópias inseridas no genoma, maior o acúmulo de transcritos. Ainda, relacionando o acúmulo de transcritos ao número de cópias inseridas no genoma das plantas transformadas para o silenciamento gênico, esse resultado não mostrou o mesmo padrão apresentado no Capítulo 2 nem o obtido na avaliação das plantas transformadas para superexpressão. Estas plantas não mostraram relação entre número de cópias e expressão gênica.

Essa discrepância entre os resultados sugere que o nível de expressão gênica parece não ter relação com o número de cópias inseridas no genoma. Schubert et al. (2004) realizou um estudo com linhagens de *Arabidopsis* transformadas para o silenciamento dos genes *gusA*, *GFP* ou *SPT* (streptomicina fosfotransferase). Todas as linhagens de *Arabidopsis* transformadas com um dos três genes apresentavam diversos números de cópias do transgene inseridos no genoma e a expressão destes genes variava entre os eventos com o mesmo número de cópias. Esse resultado sugeriu que a eficiência da expressão gênica é controlada por fatores alheios ao número de cópias do transgene inserido em cada evento. O que poderia estar interferindo na expressão desses genes e nos fenótipos obtidos seria a natureza da região
codificante, como por exemplo, a constituição dos códons presentes nesta região. É também proposto um sistema de 'defesa do genoma' em que RNAs seriam sensíveis a concentrações limite de presença de transcritos de alguns genes, ocasionando assim a transcrição em menor escala de determinados genes. Desta maneira é possível que este mecanismo também esteja operando sob as diferentes construções gênicas inseridas nas plantas de *Citrus* transformadas para manipulação dos genes da via de carotenoides.

Ainda, na expressão de um gene exógeno inserido no genoma de plantas transgênicas, variações na expressão podem ser atribuídas a diversos fatores como 'efeito de posição' do T-DNA inserido, como a natureza da cromatina adjacente ao T-DNA (MEYER et al., 1992; MEYER, 1995), metilação (METTE et al., 2000; DAY et al., 2000), presença de sequências invertidas ou repetidas em tandem (STAM et al., 1997a; 1997b; WATERHOUSE et al., 1998; CHUANG; MEYEROWITZ, 2000; METTE et al., 2000; SIJEN et al., 2001) e composição AT/CG do transgene (MATZKE; MATZKE, 1998), além de fatores ambientais (MEYER et al., 1992).

Dessa maneira, como os dados obtidos nesta etapa do trabalho foram contrastantes, para que fosse elucidado os mecanismos atuantes na variação da expressão gênica nas plantas de laranjeira 'x11' ou SM transformadas com os genes da via de carotenoides, seria necessário realizar um estudo mais aprofundado em cada evento obtido, considerando mais variáveis, como cada construção gênica utilizada ou local de inserção do T-DNA.

Em alguns eventos avaliados, foi demonstrado que o número de cópias do transgene inserida no genoma foi muito alto (acima de 10 cópias). Alto número de cópias inseridas no genoma de transgênicos é comum quando se usa a técnica de biolística para a obtenção de plantas transgênicas (HANSEN; WRIGHT, 1999; REDDY; DINKINS; COLLINS et al., 2003). Já com o uso de *Agrobacterium* para a produção de transgênicos, o número máximo de cópias presentes no genoma das plantas transgênicas relatado na literatura é em média menor que 10, com alta frequência de uma cópia (BUTAYE, et al., 2004; HANSEN; WRIGHT, 1999; KOPREK et al., 2001; GELVIN, 2003; REDDY; DINKINS; COLLINS et al., 2003).

A técnica de qPCR para quantificação de cópias inseridas no genoma de plantas transgênicas é considerada robusta e adequada para esse tipo de experimento (INGHAM et al., 2001; MASON et al., 2002; BUBNER et al., 2004; SHOU et al., 2004; OMAR et al., 2008; HADI et al., 2012). Porém existem casos, como em alguns destes resultados, que o número de inserções do T-DNA parece estar superestimado, como por exemplo 72 cópias do transgene inseridas no evento #7 para a superexpressão do gene *PDS* em plantas de 'x11'. Este tipo de resultado pode ser obtido se o DNA submetido ao procedimento de qPCR

apresentar algum tipo de contaminação ou degradação (CANKAR et al., 2006). Desta maneira alguns destes eventos serão reavaliados quanto ao número de cópias do transgene inseridos no genoma.

3.5.3. Manipulação dos genes da via de carotenoides

Carotenoides possuem inúmeros benefícios a saúde, sendo fundamentais na síntese de vitamina A (MAYNE, 1996; CAZZONELLI; 2011; FAO, 2014; WHO, 2014), e nas funções antioxidantes (STAHL; SIES, 2003). Os carotenoides são moléculas envolvidas na eliminação de duas espécies reativas de oxigênio: os oxigênios moleculares *singlet* ($^{1}O_{2}$) e os radicais peróxidos, sendo que, o que determina esta ação antioxidante é o padrão de duplas ligações que a molécula possui. Desta maneira β -caroteno, zeaxantina, α -caroteno e principalmente o licopeno, são considerados altamente ativos na eliminação de $^{1}O_{2}$ (STAHL; SIES, 2003). O objetivo deste trabalho foi a manipulação dos genes da via de carotenoides visando o melhoramento nutricional dos frutos de *Citrus*, aumentando os teores de carotenoides totais e, principalmente, os mais importantes a saúde humana, como o zeaxantina, β -caroteno e licopeno.

Plantas de laranjeira 'x11' foram transformadas para a superexpressão do gene *PDS* para que o perfil de carotenoides fosse incrementado, com aumento dos níveis de β -caroteno, visualizado em um curto espaço de tempo. Como o gene *PDS* codifica uma enzima chave na biossíntese de carotenoides, pois age convertendo o fitoeno em ζ -caroteno mediando duas reações sequenciais de dehidrogenação (MATTHEWS; LUO, WURTZEL, 2003), o silenciamento ou superexpressão deste gene já foi realizado em algumas espécies. Investigando a função do gene *PDS*, plantas de *Arabidopsis* mutantes defectivas para este gene apresentaram nanismo (QIN et al. 2007) e albinismo nas folhas, por acumular fitoeno, que é substrato da enzima PDS (NORRIS; BARRETTE; DELLAPENNA, 1995; NORRIS et al. 1998). Por outro lado, a superexpressão do gene *CRTI (PDS* clonado de bactéria) em plantas de arroz, resultaram no aumento dos níveis de β -caroteno (SCHAUB et al., 2005), que é o esperado nas plantas de 'x11' transformadas para a superexpressão deste gene. Em tomate, o acúmulo de licopeno (BRAMLEY, 2002; CUNNINGHAM, 2002) e de demais carotenoides da via (FRASER et al., 2002) acontece durante o desenvolvimento do fruto com o aumento da expressão gênica de *PSY* e *PDS*. Na investigação do acúmulo de β -caroteno em melão, a

expressão dos genes *PSY* e *PDS* também aumentaram no final do amadurecimento do fruto (TUAN et al., 2011). Em *Citrus*, o gene *PDS* também foi superexpressado em plantas de *Citrus paradisi* (Macf.) (COSTA; OTONI; MOORE, 2002), porém o extenso período de juvenilidade não permitiu a análise do fenótipo. Com o uso da mesma construção gênica, as plantas de 'x11' foram transformadas geneticamente e os frutos estão em fase final de maturação. Desta maneira será possível visualizar o fenótipo da superexpressão do gene *PDS* em laranja doce, em breve.

Para que ocorra nas plantas a conversão das cadeias de carbono C40 dos carotenoides 15-*cis*-fitoeno, em todos os *trans*-licopenos, é necessário que ocorra uma isomerização geométrica da molécula pelas enzimas desaturases PDS e ZDS e pelas isomerases CRTISO e Z-ISO (PARK et al., 2002; ISAAC et al., 2002; LI; MURILLO; WURTZEL, 2007, CHEN et al., 2010). A isomerização dos carotenoides influencia no comprimento de onda e intensidade de absorção de luz (GIULIANO; GILIBERTO; ROSATI, 2002), além de aumentar a biodisponibilidade e atividade biológica das funções antioxidante e antitumoral (CHASSE et al., 2001).

O mutante espontâneo de tomateiro *tangerine* é caracterizado por possuir coloração do fruto laranja, ao invés do vermelho, derivado do carotenoide licopeno que está comumente presente em outras variedades de tomate. Esse mutante também acumula pró-licopeno, ao invés de trans-licopenos, e apresenta folhas jovens amareladas, além de coloração amarelo pálido nas flores. Estudos demonstraram que o fenótipo do tangerine é causado devido a uma perda de função do gene CRTISO (PARK et al., 2002; ISAAC et al., 2002). O silenciamento do gene CRTISO foi realizado em plantas de laranjeira 'x11' e SM. Estas plantas ainda não floresceram, mas estão em fase de desenvolvimento em casa de vegetação. No entanto, ao analisar a parte vegetativa destas plantas, verifica-se a coloração normal em folhas e caules. Isso acontece, pois em tecidos fotossintetizantes a função de isomerização da CRTISO é realizada pela luz. Porém em flores ou frutos, a função desta enzima é indispensável para a síntese dos carotenoides totais (ISAAC et al., 2002). Desta maneira, apenas será possível ver o potencial efeito desta manipulação genética nos frutos provenientes das plantas transformadas geneticamente. A variedade 'x11' produz laranja de polpa clara, que acumula mais xantofilas do que carotenos. Com essa manipulação, espera-se que ao invés de acumular xantofilas estas passem a acumular ζ-caroteno e pró-licopeno, e assim, a coloração da polpa do fruto seja ainda mais clara do que já apresentada, devido a ausência de cor dos carotenoides acumulados.

As laranjas SM são classificadas como laranjas de polpa vermelha por acumular licopeno ao invés de xantofilas (LATADO et al., 2008). Com o silenciamento do gene *CRTISO* nesta variedade, espera-se que a coloração dos frutos, que no tipo selvagem é avermelhada, passe a ser bem pálida ou ausente de cor. Essa mudança na coloração da polpa dos frutos deverá se muito nítida nesta variedade devido ao contraste de cores, e será essencial para o estudo da função do gene *CRTISO* em plantas de laranja, pois até o presente momento não há publicações em relação ao assunto.

A enzima HYb catalisa a conversão de β -caroteno em zeaxantina, que por sua vez pode ser convertida em anteraxantina e violaxantina (ou anteraxantina) pela enzima ZEP. A conversão de violaxantina em neoxantina finaliza o ciclo das β -xantofilas (NORTH et al., 2007). Com o objetivo de aumentar o teor de β -xantofilas em plantas de tomate, foi realizada a superexpressão do gene *HYb* (D'AMBROSIO STIGLIANI; GIORIO, 2011). Os frutos de tomate destas plantas apresentaram, durante o desenvolvimento, coloração amarela ao invés de verde. Isto aconteceu devido a ausência de clorofila *a* e ao aumento dos teores de violaxantina e neoxantina, que se mostraram de 3 a 7 vezes maiores do que no controle (D'AMBROSIO STIGLIANI; GIORIO, 2011).

No presente trabalho, o gene *HYb* foi superexpresso em plantas de laranjeira SM, que normalmente acumulam licopeno nos frutos, apesar de existirem concomitantemente xantofilas no perfil total de carotenoides. Com a superexpressão de *HYb* espera-se que o substrato que antes se acumulava como licopeno, seja também convertido em β -xantofilas, especialmente zeaxantina, tornando a coloração do fruto menos intensa e parecida com laranjas de polpa clara.

O gene *HYb* quando silenciado em batatas, ocasionou o aumento teor de β -caroteno em cerca de 38 vezes e carotenoides totais em 4,5 vezes (DIRETTO et al., 2006). Neste trabalho, o gene *HYb* foi silenciado em plantas de laranjeira 'x11', que é uma laranjeira de polpa clara e acumula xantofilas. Espera-se que esta manipulação genética ocasione o enriquecimento nutricional do fruto destas plantas, com aumento de β -caroteno e carotenoides totais.

Ainda não foi possível a análise da provável mudança do teor de carotenoides nos frutos de plantas obtidas da manipulação do gene *HYb* pois estas ainda estão em fase de desenvolvimento, na casa de vegetação.

3.5.4. Análise do perfil de carotenoides do fruto da planta que superexpressa o gene *LCY-b1*

Em laranja doce, foram identificados dois genes responsáveis pela codificação da enzima LCY-b, a qual é responsável pela formação de dois anéis cicloexanos nas extremidades do licopeno (PECKER et al., 1996). A atividade de LCY-e dará origem ao δ -caroteno, o qual é substrato para a LCY-b catalisar α -caroteno. A enzima LCY-b também catalisa a formação do β -caroteno a partir do licopeno (HARJES et al., 2008).

Em plantas de laranja doce foram identificados dois genes *LCY-b*, denominados *LCY-b1 e LCY-b2*. Ambos os genes possuem duas cópias presentes de forma endógena em laranja doce (CHEN et al., 2010). O gene *LCY-b1* é caracterizado por apresentar expressão gênica em folha, raiz, pétalas e em tecidos do fruto de forma constante e baixa, enquanto o *LCY-b2* apresenta expressão preferencial em frutos (ALQUÉZAR; ZACARÍAS; RODRIGO, 2009).

No presente trabalho, foi realizada a superexpressão do gene *LCY-b1* em plantas de laranjeiras 'x11' ou SM. As plantas de SM continuam em fase de desenvolvimento e futuramente pretende-se que os frutos, que no tipo selvagem acumulam licopeno na sua polpa, passem a acumular β -caroteno. Este fato ocorreu em plantas de tomateiro que ao ser superexpressado o gene *LCY-b* (de *Narcissus pseudonarcissus* ou *Citrus*), apresentaram aumento nos teores de β -caroteno e nos carotenoides totais (APEL; BOCK, 2009; GUO et al., 2012). Porém, uma das plantas de laranjeira 'x11' transformadas para superexpressão do gene *LCY-b1* (evento #6) que expressam quantidades de transcritos maiores que o controle (1,4 vezes superior ao controle), floresceu e frutificou. O fruto proveniente desta planta foi analisado para o perfil de carotenoides totais e apresentou mudanças no perfil deste pigmento.

O fruto da planta 'x11' superexpressando o gene *LCY-b1* apresentou acumulação dos carotenoides sintetizados do lado β da via, com diminuição dos carotenoides do lado α (Figura 11). Resultado semelhante foi obtido por Guo et al. (2012) quando expressou *LCY-b1* clonado de *Citrus* em tomateiro e por Apel e Bock (2009), expressando o gene *LCY-b* clonado de *Narcissus pseudonarcissus* em tomateiro. Nestes experimentos também houve diminuição de luteína, com aumento de carotenoides do lado oposto da via. Outra semelhança nos resultados obtidos com a superexpressão do *LCY-b* em tomateiro e em 'x11' foi o aumento dos carotenoides totais nas plantas transformadas. Analisando a resposta desta planta 'x11' e de tomate transgênicas com o gene em questão, existe a possibilidade de que a

superexpressão de *LCY-b* engatilhe um mecanismo regulatório de *feedback* positivo. Neste mecanismo, quanto mais substrato é catalisado (no caso licopeno), por haver mais enzimas (no caso *LCY-b*), mais as demais enzimas da via são estimuladas a catalisarem mais reações, aumentando o fluxo de carotenoides sintetizados na via.

Outra possibilidade seria que o aumento de carotenoides totais nas plantas que superexpressam *LCY-b* poderia acontecer por *down regulation* dos genes que continuam a via, não ocorrendo a degradação dos carotenoides finais. No caso do tomateiro, pode ter ocorrido a baixa regulação do gene *ZEP* decorrente do fluxo da via, o que acarretou em baixos níveis de ABA (sintetizado por *ZEP*) nos frutos transgênicos (GUO et al., 2012).

A diferença entre os resultados obtidos da superexpressão de LCY-b em laranjeira 'x11' e os outros dois estudos realizados por Guo et al. (2012) e Apel e Bock (2009), foi que em tomateiro ambas as plantas transgênicas geradas aumentaram os níveis de β-caroteno, fato que não aconteceu em Citrus, que apresentou aumento de xantofilas. Frutos de tomate acumulam licopeno (GIULIANO et al., 1993; FRASER et al., 1994; RONEN et al., 1999; ISAACSON et al., 2002; GUO et al., 2012; KACHANOVSKY et al., 2012; KILAMBI et al., 2013) no final do amadurecimento, enquanto laranjas doce de polpa clara acumulam xantofilas (MOLNÁR; SZABOLCS, 1980; LEE; CASTLE, 2001; KATO et al., 2004). O tipo de carotenoide acumulado no fruto de cada espécie pode representar diferenças na atividade ou quantidade dessas enzimas presentes. Sabe-se que em tomate, no final do amadurecimento do fruto, há redução na quantidade de transcritos de LCY-b, o que seria uma das causas do acúmulo de licopeno (PECKER et al., 1996; RONEN et al., 1999). Já em laranjas de polpa clara, foi demonstrado que, ao contrário de tomate, no final do desenvolvimento dos frutos há um aumento do acúmulo de transcritos codificantes de enzimas responsáveis pela síntese de xantofilas (RODRIGO et al., 2004; KATO et al., 2004). Essas flutuações na quantidade de transcritos refletem nas quantidades das enzimas que estariam presentes catalisando os substratos, ou seja, estaria atuando um mecanismo de regulação transcricional. Outra hipótese seria que no caso de *Citrus*, as enzimas HYb e ZEP, responsáveis pela formação de xantofilas, podem ser mais ativas que as mesmas enzimas em tomate, fazendo que o fluxo de carotenoides continue na via.

Os carotenoides, principalmente xantofilas, estão envolvidos em processos vitais às plantas como síntese do regulador de crescimento ácido abscísico (ABA) (ZEEVAART; CREELMAN, 1988, TANAKA et al., 2008) e mecanismos de coleta de luz e fotoproteção das plantas durante a fotossíntese (GREEN; DURNFORD, 1996; NIYOGI, 1999; TANAKA et al., 2008). Plantas de tomate (FRAY et al., 1995) e *Citrus* (COSTA; OTONI; MOORE, 2002)

que tiveram o gene PSY manipulado por promotor constitutivo apresentaram nanismo devido ao redirecionamento dos precursores da via giberelina para síntese de carotenoides. No presente estudo, era esperado que a manipulação do gene LCY-b1 com promotor constitutivo em plantas de laranjeira 'x11' pudesse afetar o aparato fotossintético das plantas por interferir na biossíntese de xantofilas. Porém, as plantas obtidas neste processo de transformação genética não apresentaram alterações aparentes no fenótipo foliar, apesar da polpa do fruto do evento analisado ter ocorrido a diminuição de luteína, que é o carotenoide mais abundante no aparato fotossintético das plantas superiores (FORMAGGIO; CINQUE; BASSI, 2001). A explicação possível para esse fato seria de que a alteração do teor de luteína pode não ter ocorrido nos tecidos vegetativos da planta assim como ocorreu na polpa do fruto, fazendo com que a fotossíntese e a cor das folhas não tenham sido afetadas. Outra explicação seria a de que, assim como relatado por Pogson et al. (1996), uma eventual redução no teor de luteína nas folhas da planta transformada, poderia ser compensada por outros carotenoides, como violaxantina, que poderiam estar presentes em quantidades aumentadas nestas plantas. Outra hipótese possível seria que a luteína, mesmo estando presente em menor concentração, pode ainda exercer suas funções, não ocasionando mudanças no fenótipo foliar das plantas transgênicas.

O presente trabalho apresenta vantagens para o melhoramento de *Citrus*, pois os resultados do fenótipo em fruto da superexpressão do gene *LCY-b* de *Citrus* havia sido relatado apenas em tomate (GUO et al., 2012), sendo portanto, um estudo de expressão heteróloga. Problemas com expressão heteróloga foram brevemente discutidos no Capítulo 2 e tratando-se do gene *LCY-b*, clonado de *Erwinia herbicola*, e expresso em tomateiro, essa alteração não proporcionou mudanças no perfil de carotenoides dos frutos (APEL; BOCK, 2009).

O fruto de laranjeira 'x11' superexpressando *LCY-b1* avaliado nesta etapa do trabalho foi proveniente do evento #6 que apresentou 11 cópias do transgene inseridas no genoma e expressão gênica cerca de 1,4 vezes superior em relação ao controle. Outros eventos transformados com a mesma construção gênica apresentaram valores mais altos de acumulação de transcritos, com cerca de 5 vezes mais transcritos que o controle. Desta maneira espera-se que o efeito da mudança no perfil de carotenoides das plantas com maior acúmulo de transcritos de *LCY-b1* seja mais nítido, melhorando nutricionalmente ainda mais os frutos de laranjeira.

O melhoramento nutricional obtido nesta planta de laranjeira 'x11' com a superexpressão do gene *LCY-b* é de grande relevância, pois pela primeira vez foi constatado

que a qualidade nutricional pode ser melhorada em frutos e consequentemente no suco de laranja, que estão entre os mais consumidos no mundo (FAO, 2014).

3.6. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos nos experimentos executados nesta tese, foi possível concluir que:

1-) As eficiências de regeneração e de transformação obtidas neste trabalho foram genótipo-dependentes, sendo mais eficazes para a variedade SM quando comparadas as da laranjeira 'x11'.

2-) Com os métodos utilizados neste trabalho foi possível obter em média 10 plantas de laranjeira 'x11' ou SM, transformadas para a superexpressão dos genes *PDS*, *LCY-b1* e *HYb* e para o silenciamento dos genes *CRTISO* e *HYb*.

3-) O método de qPCR para quantificação do número de cópias do transgene inseridos no genoma das plantas transformadas geneticamente pode ser considerado como rápido e de fácil uso.

4-) Não foi possível observar correlação entre acúmulo de transcritos do gene-alvo e o número de cópias do transgene inseridos em cada planta geneticamente transformada nas diversas construções gênicas utilizadas.

5-) A laranjeira 'x11' é uma variedade que produz plantas com florescimento precoce, mesmo após a cultura de tecidos juvenis e, por este motivo, pode ser usada de forma eficiente para estudos de genômica funcional.

6-) No fruto proveniente de laranjeira 'x11' transformada para superexpressão de *LCY-b1*, a superexpressão deste gene ocasionou aumento dos carotenoides do lado β da via, além do aumento dos carotenoides totais.

Referências

APEL, W.; BOCK, R. Enhancement of carotenoid biosynthesis in transplastomic tomatoes by induced lycopene-to-provitamin a conversion. **Plant Physiology**, Rockville, v. 151, p. 59–66, 2009.

ALI, S. *Agrobacterium*-mediated transformation of rough lemon (*Citrus jambhiri Lush*) with yeast HAL2 gene. **BMC Research Notes**, London, v. 5, p. 285, 2012.

ALMEIDA, W. A. B. et al. Genetic transformation and plant recovery from mature tissues of *Citrus sinensis* L. Osbeck. **Plant Science**, Amsterdam, v.164, p. 203-211, 2003.

ALQUÉZAR, B.; RODRIGO, M. J.; ZACARÍAS, L. Carotenoid biosynthesis and their regulation in citrus fruits. **Tree and Forestry Science and Biotechnology**, Ikenobe, Japan, v. 2, p. 23–35. 2008a.

ALQUÉZAR, B.; ZACARÍAS, L.; RODRIGO, M. J. Molecular and functional characterization of a novel chromoplast-specific lycopene β -cyclase from citrus and its relation to lycopene accumulation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, p. 1783–1719, 2009.

AULDRIDGE, M. E.; MCCARTY, D. R.; KLEE, H. J. Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. **Current Opinion in Plant Biology**, London v. 9, p. 315–321, 2006.

BELTRÁN, J. et al. Quantitative analysis of transgenes in cassava plants using real-time PCR technology. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology. Plant, Gaithersburg, v. 45, p. 48-56, 2009.

BEYER, P. et al. Golden rice: introducing the β -Carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency. **Journal of Nutrition**, Springifield, v. 32, p. 506S-510S. 2002.

BOND, J. E.; ROOSE, M. L. *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important citrus cultivar Washington navel orange. **Plant Cell Reports**, New York, v. 18, p. 229–234, 1998.

BOUVIER, F. et al. Xanthophyll biosynthesis: cloning, expression, functional reconstitution, and regulation of β -cyclohexenyl carotenoid epoxidase from pepper (*Capsicum annuum*). **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 271, p. 28861-28867, 1996.

BOUVIER, F.; BACKHAUS, R. A.; CAMARA, B. Induction and control of chromoplastspecific carotenoid genes by oxidative stress. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, p. 30651–30659, 1998.

BRAMLEY, P. M. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 2107–2113, 2002.

BREITENBACH, J.; SANDMANN, G. ζ -Carotene *cis* isomers as products and substrates in the plant *poly-cis* carotenoid biosynthetic pathway to lycopene. **Planta**, Berlin, v. 220, n. 5, p. 785–793, 2005.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **FASEB** Journal, Bethesda, v. 9, p. 1551–1558, 1995.

BRODY, J. R.; KERN, S. E. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, Natick, v. 36, p. 214-216, 2004.

BUBNER, B.; GASE, K.; BALDWIN, I. T. Two-fold differences are the detection limit for determining transgene copy numbers in plants by real-time PCR. **BMC Biotechnology**, London, v. 4, p. 14, 2004. doi: 10.1186/1472-6750-4-14

BUSCH, M.; SEUTER, A.; HAIN, R. Functional analysis of the early steps of carotenoid biosynthesis in tobacco. **Plant Physiology**, Rockville, v. 128, p. 439–453, 2002.

BUTAYE, K. J. M. et al. Stable high-level transgene expression in *Arabidopsis thaliana* using gene silencing mutants and matrix attachment regions. **Plant Journal**, Oxford, v. 39, p. 440-449, 2004.

CANKAR, K. et al. Critical points of DNA quantification by real-time PCR – effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. **BMC Biotechnology**, London, v. 6, p. 37, 2006.

CARMONA, L.; ZACARÍAS, L.; RODRIGO, M. J. Stimulation of coloration and carotenoid biosynthesis during postharvest storage of 'Navelina' orange fruit at 12 °C. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 74, p. 108–117, 2012.

CAZZONELLI, C. I. Carotenoids in nature: insights from plants and beyond. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 38, p. 833–847, 2011.

CERVERA, C. et al. Production of transgenic adult plants from Clementine mandarin by enhancing cell competence for transformation and regeneration. **Tree Physiology**, Victoria, v. 28, p. 55-66, 2008.

CERVERA, M.; JUAREZ, J.; NAVARRO, L.; PENA, L. Genetic transformation of mature citrus plants. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 286, p. 177-188, 2005.

CERVERA, M. et al. *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Citrange: Factors Affecting Transformation and Regeneration. **Plant Cell Reports**, New York, v. 18, p. 271-278, 1998.

CHASSE G.A., et al. An ab initio computational study on selected lycopene isomers. **Journal of the Molecular Structure: THEOCHEM**, Amsterdam, v. 571, p. 27–37, 2001.

CHEN, C. et al. Identification of novel members in sweet orange carotenoid biosynthesis gene families. **Tree Genetics and Genomes**, Heidelberg, v. 6, p. 905–914, 2010.

CHEN, Y.; LI, F.; WURTZEL, E. T. Isolation and characterization of the Z-ISO gene encoding a missing component of carotenoid biosynthesis in plants. **Plant Physiology**, **Rockville**, v. 153, p. 66-79, 2010.

CHUANG, C. F.; MEYEROWITZ, E. M. Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in Arabidopsis thaliana. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 97, p. 4985–4990, 2000.

CORONA, V. et al. Regulation of a carotenoid biosynthesis gene promoter during plant development. **The Plant Journal**, Oxford, v. 9, p. 505–512, 1996.

COSTA, M. G. C. et al. Characterization and developmental expression of genes encoding the early carotenoid biosynthetic enzymes in *Citrus paradisi* Macf. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 39, p. 895–902, 2012.

COSTA, M. G. C.; OTONI, W. C.; MOORE, G. A. An evaluation of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus paradisi* (Macf.) and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic genes. **Plant Cell Reports**, New York, v. 21, p. 365–373, 2002.

CUNNINGHAM, F. X. J.; GANTT, E. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, Palo Alto, v. 49, p. 557–583, 1998.

CUNNINGHAM, F. X. JR. Regulation of carotenoid synthesis and accumulation in plants. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 74, p. 1409-1417, 2002.

DAI, S. et al. Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by Agrobacteriummediated transformation and particle bombardment. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 7, p. 25-33, 2001.

D'AMBROSIO, C.; STIGLIANI, A. L.; GIORIO, G. Overexpression of CrtR-b2 (carotene beta hydroxylase 2) from *S. lycopersicum* L. differentially affects xanthophyll synthesis and accumulation in transgenic tomato plants. **Transgenic Research**, Heidelberg, v. 20, p. 47-60, 2011.

DAVIES, B. H. Carotenoids. In: GOODWIN, T. W. (ed.). Chemistry and biochemistry of plant pigments. London: Academic Press, 1976. p. 150–153.

DAY, C. D.; LEE, E.; KOBAYASHI, J.; HOLAPPA, L.D.; ALBERT, H.; OW, D.W. Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced. **Genes and Development**, New York, v. 14, p. 2869–2880, 2000.

DIRETTO G. et al. Metabolic engineering of potato carotenoid content through tuber-specific overexpression of a bacterial mini-pathway. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 2, p. 350, 2007.

DIRETTO, G. et al. Metabolic engineering of potato tuber carotenoids through tuber-specific silencing of lycopene epsilon cyclase. **BMC Molecular Biology**, London, v. 6, p. 13, 2006.

DONMEZ, D. et al. Genetic transformation in citrus. **Scientific World Journal**, New York, v. 2013, p. 1-8, 2013.

DUAN, Y. X. et al. High efficient transgenic plant regeneration from embryogenic calluses of Citrus sinensis. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 51, p. 212–216, 2007.

DUTT, M.; GROSSER, J. W. Evaluation of parameters affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 98, p. 331–340, 2009.

DUTT, M.; VASCONCELLOS, M.; GROSSER, J.W. Effects of antioxidants on Agrobacterium-mediated transformation and accelerated production of transgenic plants of Mexican lime (*Citrus aurantifolia Swingle*). Plant Cell Tissue and Organ Culture, Dordrecht, v. 107, p. 79–89, 2011.

EWING, B.; GREEN, P. Base calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 186-194, 1998.

EWING, B. et al. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 175-185, 1998.

FANCIULLINO, A. L. et al. Carotenoid diversity in cultivated citrus is highly influenced by genetic factors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 4397–4406, 2006.

FAO. Nutritional and health benefits of citrus fruits. Rome, 2014. Disponível em: <<u>http://www.fao.org/docrep/X2650t/x2650t03.htm</u>>. Acesso em: 01 abr. 2014.

FORMAGGIO, E.; CINQUE, G.; BASSI, R. Functional architecture of the major Lightharvesting Complex from Higher Plants. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 314, p. 1157-1166, 2001.

FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 43, p. 228–265, 2004.

FRASER, P. D. et al. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, p. 405–413, 1994.

FRASER P. D. et al. Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 99, p. 1092–1097, 2002.

GARNER, P. T. et al. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. **Food Chemistry**, Barking, v. 68, p. 471–474, 2000.

GELVIN, S. B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "Gene-Jockeying" tool. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 67, p. 16-37, 2003.

GHORBEL, R. et al. Additional copies of *virG* from pTiBo542 provide a supertransformation ability to *Agrobacterium tumefaciens* in *Citrus*. Physiological and Molecular Plant Pathology, London, v. 58, p. 103-110, 2001.

GIULIANO, G.; BARTLEY, G. E.; SCOLNIK, P. A. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. **Plant Cell**, Baltimore, v. 5, p. 379–387, 1993.

GIULIANO, G.; GILIBERTO, L.; ROSATI, C. Carotenoid isomerase: a tale of light and isomers. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 7, p. 427-9, 2002.

GREEN, B. R.; DURNFORD, D. G. The Chlorophyll-Carotenoid Proteins of Oxygenic Photosynthesis. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, Palo Alto, v. 47, p. 685-714, 1996.

GROSS, J. Pigment in fruits. London: Academic Press, 1987. 303 p.

GUO, F. et al. Effect of the Citrus Lycopene β -Cyclase Transgene on Carotenoid Metabolism in Transgenic Tomato Fruits. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 2, p. 32221, 2012.

HADI, F. et al. Development of quantitative competitive PCR for determination of copy number and expression level of the synthetic glyphosate oxidoreductase gene in transgenic canola plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v. 15, p. 2-2, 2012.

HANSEN, G.; WRIGHT, M. S. Recent advances in the transformation of plants. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 4, p. 226-231, 1999.

HARJES, C. E. et al. Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification. **Science**, Washington, DC, v. 319, p. 330–333, 2008.

HARTLEY, J. L.; TEMPLE, G. F.; BRASCH, M. A. DNA Cloning Using in vitroSite-Specific Recombination. Genome Research, Woodbury, v. 10, p. 1788-1795, 2000.

HERNANDEZ-GARCIA, C.M. et al. High level transgenic expression of soybean (*Glycine max*) GmERF and Gmubi gene promoters isolated by a novel promoter analysis pipeline. **BMC Plant Biology**, London, v. 10, p. 237, 2010.

HE, Y. et al. Production and evaluation of transgenic sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) containing bivalent antibacterial peptide genes (*Shiva* A and *Cecropin* B) via a novel *Agrobacterium*-mediated transformation of mature axillary buds. **Scientia Horticulturae**, Amsterdan, v. 128, p. 99-107, 2011.

HOOD, E. E. et al. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. **Transgenic Research**, Heidelberg, v. 2, p. 208-218, 1993.

HOOD E. E.; HELMER, G. L.; FRALEY, R. T.; CHILTON, M. D. The hyper-virulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 168, p. 1291–1301, 1986.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, Woodbury, v. 9, p. 868-77, 1999.

IKOMA, Y. et al. Expression of a phytoene synthase gene and characteristic carotenoid accumulation during citrus fruit development. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 111, p. 232–238, 2001.

INGHAM, D. J. et al. Quantitative real-time PCR assay for determining transgene copy number in transformed plants. **BioTechniques**, Natick, v. 31, p. 132-140, 2001.

ISAACSON, T. et al. Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of β -carotene and xanthophylls in plants. **Plant Cell**, Baltimore, v. 14, p. 333–342, 2002.

KACHANOVSKY, D. E. et al. Epistasis in tomato color mutations involves regulation of phytoene synthase 1 expression by cis-carotenoids. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 109, p. 19021–19026, 2012.

KATO, M. et al. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in **citrus** fruit. **Plant Physiology**, Rockville, v. 134, p. 824–837, 2004.

KILAMBI, H. V. et al. Chromoplast-specific carotenoid-associated protein appears to be important for enhanced accumulation of carotenoids in hp1 tomato fruits. **Plant Physiology**, Rockville, v. 161, p. 2085-101, 2013.

KOPREK, T. et al. Transposon-mediated single-copy gene delivery leads to increased transgene expression in barley. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, p. 1354-1362, 2001.

KUMPATLA, S.P. et al. Genome intruder scanning and modulation systems and transgene silencing. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 3, p. 97-104, 1998.

LATADO, R. R. et al. Laranjas de polpa vermelha. Caracterização de frutos e do suco dos frutos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 20., 2008, Vitória, ES. **Anais...** Vitória, ES: Tec Art Editora Ltda., 2008. v.1.

LEE, H. S.; CASTLE, W. S. Seasonal changes of carotenoid pigments and color in Hamlin, Earlygold, and Budd Blood orange juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, p. 877–882, 2001.

LI, F.; MURILLO, C.; WURTZEL, E. T. Maize **Y9** encodes a product essential for 15-cis zetacarotene isomerization. **Plant Physiology**, Rockville, v. 144, p. 1181–1189, 2007.

LIU, Q. et al. A novel bud mutation that confers abnormal patterns of lycopene accumulation in sweet orange fruit (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, p. 4161-4171, 2007.

LU, S.; LI, L. Carotenoid metabolism: biosynthesis, regulation, and beyond. Journal of Integrative Plant Biology, Carlton South, v. 50, p. 778–785b, 2008.

MASON, G. et al. Estimating the number of integrations in transformed plants by quantitative real-time PCR. **BMC Biotechnology**, London, v. 2, p. 20–30, 2002.

MATTHEWS, P. D.; LUO, R.; WURTZEL, E. T. Maize phytoene desaturase and zetacarotene desaturase catalyse a poly-Z desaturation pathway: implications for genetic engineering of carotenoid content among cereal crops. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, p. 2215–2230, 2003.

MATZKE, M. A. et al. RNA-based silencing strategies in plants. Current Opinion in Genetics and Development, London, v. 11, p. 221–227, 2001.

MAYNE, S. T. Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. **FASEB** Journal, Bethesda, v. 10, p. 690-701, 1996.

MCGINNIS, S.; MADDEN, T. L. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. **Nucleic Acids Research**, London, v. 32, p. 20–25, 2004.

MENDES, B. M. J, et al. Reduction in susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. citri in transgenic *Citrus sinensis* expressing the rice Xa21 gene. **Plant Pathology**, London, v. 59, p. 68-75, 2010.

MENDES, A. F. S. et al. Expression and phylogenetic analysis of two new lycopene β -cyclases from *Citrus paradisi*. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 141, p. 1-10, 2011.

MENDES, B. M. J. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus Hamlin cultivar (*Citrus sinensis* L. Osbeck) epicotyl segments. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, p. 955-961, 2002.

METTE, M. F. et al. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. **EMBO Journal**, Oxford, v. 19, p. 5194–5201, 2000.

MEYER, P.; HEIDMANN, I. Epigenetic variants of a transgenic petunia line show hypermethylation in transgene DNA: an indication for specific recognition of foreign DNA in transgenic plants. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 243, p.390-399, 1994.

MEYER, P. et al. Endogenous and environmental factors influence 35S promoter methylation of a maize A1 gene construct in transgenic petunia and its colour phenotype. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 231, p. 345-352, 1992.

MEYER, P. Understanding and controlling transgene expression. **Trends in Biotechnology -Tibtech**, Cambridge, v. 13, p. 332-337, 1995.

MOLNAR, P.; SZABOLCS, J. β -Citraurin epoxide, a new carotenoid from Valencia orange peel. **Phytochemistry**, Oxford, v. 19, p. 633–637, 1980.

MOORE G. A. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus* stem segments and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, New York, v. 11, p. 238–242, 1992.

NAMITHA, K. K.; NEGI, P. S. Chemistry and Biotechnology of Carotenoids. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Boca Raton, v. 50, p. 728–760, 2010.

NISHIMURA, D. S. **Perfil transcricional dos genes envolvidos na via de biossíntese de carotenoides e quantificação dos metabólitos em laranjas de polpa vermelha**. 2012. 133 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

NIYOGI, K. K. Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, Palo Alto, v. 50, p. 333–359, 1999.

NORRIS, S. R.; BARRETTE, T. R.; DELLAPENNA, D. Genetic dissection of carotenoid synthesis in arabidopsis defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. **Plant Cell**, Baltimore, v. 7, p. 2139–2149, 1995.

NORRIS, F. A. et al. SopB, a protein required for virulence of Salmonella dublin, is an inositol phosphate phosphatase. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 95, p. 14057-14059, 1998.

NORTH, H. M. et al. The Arabidopsis ABA-deficient mutant aba4 demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. **Plant Journal**, Oxford, v. 50, p. 810–824, 2007.

OMAR, A. A. et al. Estimation of transgene copy number in transformed citrus plants by quantitative multiplex real-time PCR. **Biotechnology Progress**, New York, v. 24, p. 1241-1248, 2008.

PAINE, J. A. et al. Improving the nutritional value of Golden Rice through increased provitamin A content. **Nature Biotechnology**, New York, v. 23, p. 482–487, 2005.

PARK, H. et al. Identification of the carotenoid isomerase provides insight into carotenoid biosynthesis, prolamellar body formation, and photomor-phogenesis. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 14, p. 321–332, 2002.

PECKER, I. et al. Cloning and characterisation of the cDNA for lycopene β -cyclase from tomato reveals a decrease in its expression during tomato ripening. **Plant Molecular Biology**, The Hague, v. 30, p. 806–819, 1996.

PEÑA L. et al. Genetic Transformation of Lime (*Citrus aurantifolia Swing*): Factors Affecting Transformation and Regeneration. **Plant Cell Reports**, New York, v. 16, p. 731-737, 1997.

PINHEIRO, T. T. et al. Establishing references for gene expression analyses by RT-qPCR in *Theobroma cacao* tissues. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 10, p. 3291-305, 2011.

POGSON, B. et al. Arabidopsis carotenoid mutants demonstrate that lutein is not essential for photosynthesis in higher plants. **Plant Cell**, Baltimore, v. 8, p. 1627–1639, 1996.

QIN F. et al. Regulation and functional analysis of ZmDREB2A in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L. **Plant Journal**, Oxford, v. 50, p. 54–69, 2007.

REDDY, M. S.; DINKINS, R. D.; COLLINS, G. B. Gene silencing in transgenic soybean plants transformed via particle bombardment. **Plant Cell Reports**, New York, v. 21, p. 676-683, 2003.

RODRIGO, M. J. et al. Characterization of Pinalate, a novel *Citrus sinensis* mutant with a fruit-specific alteration that results in yellow pigmentation and decreased ABA content. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, p. 727-738, 2003.

RODRIGO, M. J.; MARCOS, J. F.; ZACARIAS, L. Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (*Citrus sinensis* L.) during fruit development and maturation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton, v. 52, p. 6724-6731, 2004.

RÖMER, S. et al. Expression of the genes encoding the early carotenoid biosynthetic enzymes in *Capsicum annuum*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 196, p. 1414-1421, 1993.

ROMER, S. et al. Genetic engineering of a zeaxanthin-rich potato by antisense inactivation and co-suppression of carotenoid epoxidation. **Metabolic Engineering**, Brugge, v. 4, p. 263–272, 2002.

RONEN, G. et al. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant *Delta*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 17, p. 341–351, 1999.

ROUSEFF, R.; RALEY, L. Application of diode array detection with a C-30 reversed phase column for the separation and identification of saponified orange juice carotenoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Easton, v. 44, p. 2176–2181, 1996.

SANDMANN, G. Carotenoid biosynthesis and biotechnologicalapplication. Archives of Biochemistry and Biophysics, New York, v. 385, p. 4–12, 2001.

SASAKI Y. et al. Evidence for high specificity and efficiency ofmultiple recombination signals in mixed DNA, cloning by the Multisite Gateway system. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 107, p. 233-243, 2004.

SASAKI, Y. et al. Multi-gene gateway clone design for expression of multiple heterologous genes in living cells: Eukaryotic clones containing two and three ORF multi-gene cassettes expressed from a single promoter. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 10, p. 103-112, 2008.

SCHAUB, P. et al. Why is golden rice golden (yellow) instead of red? **Plant Physiology**, Rockville, v. 138, p. 441–450, 2005.

SCHUBERT, D. et al. Silencing in Arabidopsis T-DNA transformants: the predominant role of a gene-specific RNA sensing mechanism versus position effects. **Plant Cell**, Baltimore, v. 16, p. 2561-2572, 2004.

SHEWMAKER, C. K. et al. Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. **The Plant Journal**, Oxford, v. 20, p. 401–412, 1999.

SIJEN, T. et al. Transcriptional and posttranscrip- tional gene silencing are mechanistically related. **Current Biology**, London, v. 11, p. 436–440, 2001.

SONG, W. Y. et al. Evolution of the rice Xa21 disease resistance gene family. **Plant Cell**, Baltimore, v. 9, p. 1279–1287, 1997.

STACHEL, S. E. et al. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cell that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature**, London, v. 318, p. 624–62, 1985.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular Aspects of Medicine**, Oxford, v. 24, p. 345–351, 2003.

STAM, M. et al. Post- transcriptional silencing of chalcone synthase in Petunia by inverted transgene repeats. **Plant Journal**, Oxford, v. 12, p. 63–82, 1997a.

STAM, M. et al. The silence of genes in transgenic plants. **Annals of Botany**, Oxford, v. 79, p. 3–12, 1997b.

STEINBRENNER, J.; LINDEN, H. Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, p. 810–817, 2001.

TAN, B. et al. Highly efficient transformation of the GFP and MAC12.2 genes into precocious trifoliate orange (*Poncirus trifoliate* [L.] Raf), a potential model genotype for functional genomics studies in *Citrus*. **Tree Genetics and Genomes**, Heidelberg, v. 5, p. 529–537, 2009.

TANAKA, T. et al. Citrus compounds inhibit inflammation- and obesity-related colon carcinogenesis in mice. **Nutrition and Cancer**, Philadelphia, v. 60, p. S70–S80, 2008.

TAO, L. et al. Engineering a beta-carotene ketolase for astaxanthin production. **Metabolic Engineering**, Brugge, v. 8, p. 523–531, 2006.

TAO, N. et al. Expression of phytoene synthase gene (*Psy*) is enhanced during fruit ripening of Cara Cara navel Orange (*Citrus sinensis* Osbeck). **Plant Cell Reports**, New York, v. 26, p. 837-843, 2007.

TONG, Z. et al. Using precocious trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* [L.] Raf.) to establish a short juvenile transformation platform for citrus. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 119, p. 335–338, 2009.

TUAN P. A. et al. Carotenoid content and expression of phytoene synthase and phytoene desaturase genes in bitter melon (*Momordica charantia*). Food Chemistry, Barking, v. 126, p. 1686–1692, 2011.

VAN ECK, J. et al. Enhancing beta-carotene content in potato by RNAi- mediated silencing of the beta-carotene hydroxylase gene. **American Journal of Potato Research**, Orono, v. 84, p. 331–342, 2007.

VAUCHERET, H.; FAGARD, M. Transcriptional gene silencing in plants: Targets, inducers and regulators. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 17, p. 29-35, 2001.

YANG, L. et al. Transformation of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] with *pthA-nls* for acquiring resistance to citrus canker disease. **Plant Molecular Biology**, The Hague, v. 75, p. 11–23, 2011.

WATERHOUSE, P. M.; GRAHAM, M. W.; WANG, M. B. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 95, p. 13959-13964, 1998.

WHO. **Nutrition**. Micronutrient deficiencies. Geneva, 2014. Disponível em: <<u>http://www.who.int/nutrition/topics/vad/en/index.html</u>>. Acesso em: 01 abr. 2014.

WU, K. et al. Plasma and dietary carotenoids, and the risk of prostate cancer: a nested casecontrol study. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention**, Denville, v. 13, p. 260– 269, 2004.

ZEEVAARL, J. A. D.; CREELMAN, R. A. Metabolism and physiology of abscisic acid. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, Palo Alto, v. 39, p. 439-473, 1988.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Programação utilizada para a amplificação dos genes completos ou fragmentos de genes utilizados na confecção das construções gênicas ou na confirmação da transgenia das plantas de laranjeiras 'x11' e SM transformadas geneticamente. A termociclagem para cada gene ou fragmento de gene foi obtida através do *software Mutation Discovery* (http://mutationdiscovery.com/md/MD.com/home_page.jsp)

<i>CRTISO</i> (Fragmento - 603 pb)	<i>HYb</i> (gene completo -936 pb)
95,0°C 2 min	95,0°C 2 min
95,0°C 30 seg	95,0°C 30 seg
$60,5^{\circ}C$ 30 seg $\left\{ \begin{array}{c} 29 \text{ x} \\ \end{array} \right.$	58, (decrescendo $0,5^{\circ}C$ a cada ciclo - 30 seg) $14 x$
72,0°C 70 seg	72,0°C 100 seg
72,0°C 5 min	95,0°C 30 seg
4 0°C	51,4°C 30 seg $\}$ 19 x
7,0 C	72,0°C 100 seg
	72,0°C 5 min
	4,0°C

HYb (fragmento – 299 pb) *LCY-b2* (gene complete – 1512 pb) 95,0°C 2 min 95,0°C 2 min 95,0°C 30 seg 59,1°C (decrescendo 0,5°C a cada ciclo - 30 seg) $\left.\begin{array}{c} 95,0^{\circ}\text{C} \quad 30 \text{ seg} \\ \\ 58 \quad (\text{decrescendo } 0,5^{\circ}\text{C } a \\ \text{cada} \quad \text{ciclo } - 30 \text{ seg}) \end{array}\right\}$ 14 x 14 x 72,0°C 30 seg 72,0°C 160 seg 95,0°C 30 seg 95,0°C 30 seg 51,8°C 30 seg { 19 x 52,1°C 30 seg $\}$ 19 x 72,0°C 30 seg 72,0°C 160 seg 72,0°C 5 min 72,0°C 5 min 4,0°C 4,0°C



APÊNDICE B – Alinhamento das sequências dos genes buscadas no banco COMPBIO ou ncbi às sequências dos clones provenientes das reações de sequenciamento que foram utilizadas nas construções gênicas. O clone sublinhado foi usado na confecção das construções gênicas

1- *CRTISO* (TC19375) – Fragmento do gene

CRTISO (TC19375) CRTISO-clone3 R CRTISO-clone1_F CRTISO-clone2_F CRTISO-clone3_F CRTISOclone2_R CRTISO-clone1_R	1 1 1 1 1	$\label{eq:static_constraint} \begin{split} & \texttt{ATGGGTGTTAAAGCTGAGGTTCTGCCACCTGACCACCTGACCACCACCACTTTTGTGCTTGAG} \\ & \texttt{ATGGGTGTTAAAGCTGAGGTTCTGCCACCTGACCACGATTGCCACCATTTGTGCTTGAG} \\ & \texttt{CGGKAMMGAATTGC} \\ & \texttt{CCATTTTGTGCCTTGAG} \\ & \texttt{CCATTTTGTGCCTTGAG} \\ & \texttt{CCCATTTTGTGCCTTGAG} \\ & \texttt{CCCATTTTGTGCCTTGAG} \\ & \texttt{ATGGGTGTTAAAGCTGAGGTTCTGCCACCTGACACAGATTGCCACCATTTTGTGCTTGAG} \\ & \texttt{ATGGGTGTTAAAGCTGAGGTTCTGCCACCTGACACAGATTGCCACCATTTTGTGCCTTGAG} \\ & \texttt{ATGGGTGTTAAAGCTGAGGTTCTGCCACCTGACACAGATTGCCACCATTTTGTGCTTGAG} \\ & \texttt{ATGGGTGTTAAAGCTGAGGTTCTGCCACCTGACACAGATTGCCACCATTTTGTGCCTTGAG} \\ & \texttt{ATGGGTGTTAAAGCTGAGGTTCTGCCACCTGACACAGATTGCCACCATTTTGTGCCTTGAG} \\ & ATGGGTGTTAAAGCTGAGGTTCTGCCACCTGACACAGATTGCCACCATTTTGTGCCTTGAG \\ & \texttt{ATGGGTGTTAAAGCTGAGGTTCTGCCACCTGACACAGATTGCCACCATTTTGTGCCTTGAG \\ & \texttt{ATGGGTGTTAAAGCTGAGGTTCTGCCACCTGACACAGATTGCCACCATTTTGTGCTTGAGCTGACCACCACCATTTTGTGCTTGAG \\ & \texttt{ATGGGTGTTAAAGCTGAGGTTCTGCCACCTGACACCACGATTGCCACCATTTTGTGCTTGAG \\ & \texttt{ATGGGTGTTAAAGCTGAGGTTCTGCCACCTGACACGATTGCCACCACCATTTTGTGTGCTTGAG \\ & \texttt{ATGGGTGTTAAAGCTGAGGTTCTGCCACCTGACACAGATTGCCACCACCACCACCATTTGTGTGCTTGAG \\ & \texttt{ATGGGTGTTAAAGCTGAGGTTCTGCCACCTGACACAGATTGCCACCACCACCACCACTTGCCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACCA$
CRTISO(TC19375) CRTISO-clone3 R CRTISO-clone1 F CRTISO-clone2_F CRTISO-clone3_F CRTISOclone2_R CRTISO-clone1_R	61 32 31 30 61	GATGACTGGA-ACAGACTGGAGGAGCCTTATGGAAGTATATTTTTAAGCATTCCAACAGT GATGACTGGA-ACAGACTGGAGGAGCCTTATGGAAGTATATTTTTAAGCATTCCAACAGT GATGACTGGAAGCAGACTGGAGGAGCCTTATGGAAGTATATTTTTAAGCATTCCAACAGT GATGACTGGA-GCAGACTGGAGGAGCCTTATGGAAGTATATTTTTAAGCATTCCAACAGT GATGACTGGA-ACAGACTGGAGGAGCCTTATGGAAGTATATTTTTAAGCATTCCAACAGT GATGACTGGA-GCAGACTGGAGGAGCCTTATGGAAGTATATTTTTAAGCATTCCAACAGT GATGACTGGA-GCAGACTGGAGGAGCCTTATGGAAGTATATTTTTAAGCATTCCAACAGT
CRTISO(TC19375)	120	TCTTGATTCATCTTTGGCTCCAGAGGGGCAACATATTCTTCACATATTTACAATTTGTTC
CRTISO-clone3_R	120	TCTTGATTCATCTTTGGCTCCAGAGGGGGCAACATATTCTTCACATATTTACAATTTGTTC
CRTISO-clone1_F	92	TCTTGATTCATCTTTGGCTCCAGAGGGGGCAACATATTCTTCACATATTTACAATTTGTTC
CRTISO-clone2_F	90	TCTTGATTCATCTTTGGCTCCAGAGGGGGCAACATATTCTTCACATATTTACAATTTGTTC
CRTISO-clone3_F	89	TCTTGATTCATCTTTGGCTCCAGAGGGGCAACATATTCTTCACATATTTACAATTTGTTC
CRTISOclone2_R	120	TCTTGATTCATCTTTGGCTCCAGAGGGGCAACATATTCTTCACATATTTACAATTTGTTC
CRTISO-clone1_R	120	TCTTGATTCATCTTTGGCTCCAGAGGGGCAACATATTCTTCACATATTTACAATTTGTTC
CRTISO(TC19375)	180	CATAGAGGACTGGGAGGGACTGGCTCAAAAGGACTATGATGCAAAGAAGGAGCTTGTGGC
CRTISO-clone3 R	180	CATAGAGGACTGGGAGGGACTGGCTCAAAAGGACTATGATGCAAAGAAGGAGCTTGTGGC
CRTISO-clone1_F	152	CATAGAGGACTGGGAGGGACTGGCTCAAAAGGACTATGATGCAAAGAAGGAGCTTGTGGC
CRTISO-clone2_F	150	CATAGAGGACTGGGAGGGACTGGCTCAAAAGGACTATGATGCAAAGAAGGAGCTTGTGGC
CRTISO-clone3 F	149	CATAGAGGACTGGGAGGGACTGGCTCAAAAGGACTATGATGCAAAGAAGGAGCTTGTGGC
CRTISOclone2 R	180	CATAGAGGACTGGGAGGGACTGGCTCAAAAGGACTATGATGCAAAGAAGAAGGAGCTTGTGGC
CRTISO-clone1_R	180	CATAGAGGACTGGGAGGGACTGGCTCAAAAGGACTATGATGCAAAGAAGGAGCTTGTGGC
CRTISO(TC19375) CRTISO-clone3 R CRTISO-clone1 F CRTISO-clone2 F CRTISO-clone3_F CRTISOclone2_R CRTISO-clone1_R	240 240 212 210 209 240 240	AGATGAAATAATCAATAGACTGGAGAACAAACTGTTTCCTGGGCTTAAACAATCAAT
CRTISO(TC19375)	300	TTTTAGGGAGATTGGGTCACCAAAGACACACCGGCGGTATCTAGCTCGCGATCAGGGTAC
CRTISO-clone3_R	300	TTTTAGGGAGATTGGGTCACCAAAGACACACCGGCGGTATCTAGCTCGCGATCAGGGTAC
CRTISO-clone1_F	272	TTTTAGGGAGATTGGGTCACCAAAGACACACCGGCGGTATCTAGCTCGCGATCAGGGTAC
CRTISO-clone2_F	270	TTTTAGGGAGATTGGGTCACCAAAGACACACCGGCGGTATCTAGCTCGCGATCAGGGTAC
CRTISO-clone3_F	269	TTTTAGGGAGATTGGGTCACCAAAGACACACCGGCGGTATCTAGCTCGCGATCAGGGTAC
CRTISOclone2_R	300	TTTTAGGGAGATTGGGTCACCAAAGACACACCGGCGGTATCTAGCTCGCGATCAGGGTAC
CRTISO-clone1_R	300	TTTTAGGGAGATTGGGTCACCAAAGACACACCGGCGGTATCTAGCTCGCGATCAGGGTAC
CRTISO(TC19375)	360	CTATGGGCCAATGCCTCGTGGAACACCCAAGGGCTTGTTGGGCATGCCATTTAACACAAC
CRTISO-clone3 R	360	CTATGGGCCAATGCCTCGTGGAACACCCAAGGGCTTGTTGGGAATGCCATTTAACACAAC
CRTISO-clone1 F	332	CTATGGGCCAATGCCTCGTGGAACACCCAAGGGCTTGTTGGGAATGCCATTTAACACAAC
CRTISO-clone2_F	330	CTATGGGCCAATGCCTCGTGGAACACCCAAGGGCTTGTTGGGAATGCCATTTAACACAAC
CRTISO-clone3_F	329	CTATGGGCCAATGCCTCGTGGAACACCCAAGGGCTTGTTGGGAATGCCATTTAACACAAC
CRTISOclone2_R	360	CTATGGGCCAATGCCTCGTGGAACACCCAAGGGCTTGTTGGGAATGCCATTTAACACAAC
CRTISO-clone1_R	360	CTATGGGCCAATGCCTCGTGGAACACCCAAGGGCTTGTTGGGAATGCCATTTAACACAAC
CRTISO(TC19375)	420	AGGGATAAATGGTCTTTACTGTGTTGGAGATAGCTGCTTTCCAGGACAAGGTGTAATAGC
CRTISO-clone3_R	420	AGGGATAAATGGTCTTTACTGTGTTGGAGATAGCTGCTTTCCAGGACAAGGTGTAATAGC
CRTISO-clone1_F	392	AGGGATAAATGGTCTTTACTGTGTTGGAGATAGCTGCTTTCCAGGACAAGGTGTAATAGC

CRTISO-clone2 F	390	AGGGATAAATGGTCTTTACTGTGTTGGAGATAGCTGCTTTCCAGGACAAGGTGTAATAGC
CRTISO-clone3 F	389	AGGGATAAATGGTCTTTACTGTGTTGGAGATAGCTGCTTTCCAGGACAAGGTGTAATAGC
CRTISOclone2 B	420	АСССАТАААТССТСТТТАСТСТСТССАСАТАССТССТТТССАССА
CRTISO-clonel R	420	
citing croner_it	420	
CRTISO (TC19375)	480	тсттсстттттстссастаатстсссстсатссастасстсататтссссттсас
CRTISO-clope3 P	180	ПОТТОСТТИТЕТО ТОСЛО ТИМ ТО ТОСОССТСИТСОМОТНОСТОСТОИТИ ГОСОССТСИ.
CDELCO clone1 E	400	
CRTISO-CLONEL_F	452	
CRIISO-clone2 F	450	TGTTGCTTTTTCTGGAGTAATGTGCGCTCATCGAGTAGCTGCTGATATTGGGCTTGAGAA
CRTISO-clone3 F	449	TGTTGCTTTTTCTGGAGTAATGTGCGCTCATCGAGTAGCTGCTGATATTGGGCTTGAGAA
CRTISOclone2 R	480	TGTTGCTTTTTCTGGAGTAATGTGCGCTCATCGAGTAGCTGCTGATATTGGGCTTGAGAA
CRTISO-clone1 R	480	TGTTGCTTTTTCTGGAGTAATGTGCGCTCATCGAGTAGCTGCTGATATTGGGCTTGAGAA
CRTISO (TC19375)	540	GAAGTCCCCAGTACTGGATGCTGGTCTCCTTCGATTACTTGCTTG
CRTISO-clone3 R	540	GAAGTCCCCAGTACTGGATGCTGGTCTCCTTCGATTACTTGCTTG
CRTISO-clone1 F	512	GAAGTCCCCAGTACTGGATGCTGGTCTCCTTCGATTACTTGCTTG
CRTISO-clone2_F	510	GAAGTCCCCAGTACTGGATGCTGGTCTCCTTCGATTACTTGCTTG
CRTISO-clone3 F	509	GAAGTCCCCAGTACTGGATGCTGGTCTCCTTCGATTACTTGCTTG
CPTISOclope2 P	540	
CDTISOCIONEZ K	540	
CKIISU-CIONEL_K	540	6746100004614016641
	600	
CKIT20(ICI23/2)	000	

CRTISO(TC19375)600ATGACRTISO-clone3_R600ATGACRTISO-clone1 F572ATGACRTISO-clone2 F570ATGACRTISO-clone3_F569MA---CRTISOclone2_R-----CRTISO-clone1_R-----

2- *LCY-b2* (FJ516403) - Gene Completo

LCY-b2(FJ516403) LCY-b2-clone3 F LCY-b2-clone1 F LCY-b2-clone2 F LCY-b2-clone1 R LCY-b2-clone2 R LCY-b2-clone3 R	1 1 1 1 1 1	ATGGCAACTCTTCTTAGCCCGTTTTCTCCTTCTCCTTTAGCTAAAGTTTCGCAAATAATT ATGGCAACTCTTCTTAGCCCGTTTTCTCCTTCTCCTTTAGCTAAAGTTTCGCAAATAATT ATGGCAACTCTTCTTAGCCCGTTTTCTCCTTCTCCTTTAGCTAAAGTTTCGCAAATAATT ATGGCAACTCTTCTTAGCCCGTTTTCTCCTTCTCCTTTAGCTAAAGTTTCGCAAATAATT
LCY-b2(FJ516403) LCY-b2-clone3_F LCY-b2-clone1_F LCY-b2-clone2_F LCY-b2-clone1_R LCY-b2-clone2_R LCY-b2-clone3_R	61 61 61 1 1	GATTCAACATCATCACCTTCATTTTCCCTATTTCCATTAGGCCGCCAAAATGCATGTTCA GATTCAACATCATCACCTTCATTTTCCCTATTTCCATTAGGCCGCCAAAATGCATGTTCA GATTCAACATCATCACATTCATTTTCGCTATTTCCATTAGGCCGCCAAAATGCATGTTCA GATTCAACATCATCACATTCATTTTCGCTATTTCCATTAGGCCGCCAAAATGCATGTTCA GATTCAACATCATCACATTCATTTTCGCTATTTCCATTAGGCCGCCAAAATGCATGTTCA
LCY-b2(FJ516403) LCY-b2-clone3 F LCY-b2-clone1 F LCY-b2-clone2_F LCY-b2-clone1_R LCY-b2-clone2 R LCY-b2-clone3_R	121 121 121 121 121 1 1 1	AGAAAGGCGGATCATCATCATCATCACAGGATCCGGACAAGCAAG
LCY-b2(FJ516403) LCY-b2-clone3_F LCY-b2-clone1 F LCY-b2-clone2 F LCY-b2-clone1 R LCY-b2-clone2_R LCY-b2-clone3_R	181 181 181 181 1 1 1 1	GAGTTGACACCGGAGTCGCTACCTGAATTCTTAGACTTTGATCTCCCCTGGTTTCATCCG GAGTTGACACCGGAGTCGCTACCTGAATTCTTAGACTTTGATCTCCCCTGGTTTCATCCG GAGTTGACACCGGAGTCGCAACCTGAATTCTTAGTCTTTGATCTCCCCTGGTTTCATCCG GAGTTGACACCGGAGTCGCAACCTGAATTCTTAGTCTTTGATCTCCCCTGGTTTCATCCG
LCY-b2(FJ516403) LCY-b2-clone3 F LCY-b2-clone1_F LCY-b2-clone2_F LCY-b2-clone1_R LCY-b2-clone2_R LCY-b2-clone3_R	241 241 241 241 1 1	TCCGATCGTATTCGATATGACGTGATCATCATTGGCACTGGACCAGCCGGCCTCCGTCTA TCCGATCGTATTCGATATGACGTGATCATCATTGGCACTGGACCAGCCGGCCTCCGTCTA TCCGATCGTATTCGATATGACGTGATCATCATTGGCACTGGACCTGCCGGCCTCCGTCTA TCCGATCGTATTCGATATGACGTGATCATCATTGGCACTGGACCTGCCGGCCTCCGTCTA

LCY-b2(FJ516403) LCY-b2-clone3 F LCY-b2-clone1 F LCY-b2-clone2_F LCY-b2-clone1_R LCY-b2-clone2_R LCY-b2-clone3_R	01 GCTGAGCAAGTCTCATCGCGTCATAGTGTCTCAAGGTATGTTGTGTTGATCCTTCA 01 GCTGAGCAAGTCTCATCGCGTCATAGTCTCAAGGTATGTTGTGTGTTGATCCTTCA 01 GCTGAGCAAGTCTCATCGCGTCATGGTATCAAGGTATGTTGTGTGTG	CCTCTT CCTCTT CCTCTT CCTCTT
LCY-b2(FJ516403) LCY-b2-clone3_F LCY-b2-clone1 F LCY-b2-clone2 F LCY-b2-clone1 R LCY-b2-clone2_R LCY-b2-clone3_R	51 TCTACGTGGCCTAACAACTATGGAGTTTGGGTTGATGAGTTTGAAGACATAGGA 51 TCTACGTGGCCTAACAACTATGGAGTTTGGGGTTGATGAGTTTGAAGACATAGGA 51 TCTACGTGGCCTAACAACTATGGAGTTTGGGGTTGATGAGTTTGAAGACATAGGA 51 TCTACGTGGCCTAACAACTATGGAGTTTGGAGTTGGAGGTTGAAGACATAGGA 1	CTTGTA CTTGTA CTTATA CTTATA
LCY-b2(FJ516403) LCY-b2-clone3 F LCY-b2-clone1_F LCY-b2-clone2_F LCY-b2-clone1_R LCY-b2-clone2 R LCY-b2-clone3_R	21 GACTGTTTGGACAAAACTTGGCCGATGACTTGTGTTTTTATTAATGATCACAAG 21 GACTGTTTGGACAAAACTTGGCCGATGACTTGTGTTTTTTTATTAATGATCACAAG 21 GACTGTTTGGACAAAACTTGGCCGATGACTTGTGTGTTTTTATTAATGATCACAAG 21 GACTGTTTGGACAAAACTTGGCCGATGACTTGTGTGTTTTTTTT	ACCAAG ACCAAG ACCAAG ACCAAG
LCY-b2(FJ516403) LCY-b2-clone3_F LCY-b2-clone1_F LCY-b2-clone2 F LCY-b2-clone1 R LCY-b2-clone2_R LCY-b2-clone3_R	81 TATCTAGACAGGCCCTACGGTCGTGTTAGTAGAAATATTTTGAAGACAAAGTTA 1 TATCTAGACAGGCCCCTACGGTCGTGTTAGTAGAAATATTTTGAAGACAAAGTTA 1 TATCTAGACAGGCCCTACGGTCGTGTTAGTAGAAATATTTTGAAGACAAAGTTA 1 TATCTAGACAGGCCCTACGGTCGTGTTAGTAGAAATATTTTGAAGACAAAGTTA 1 TATCTAGACAGGCCCCTACGGTCGTGTTAGTAGAAATATTTTGAAGACAAAGTTA 1 TATCTAGACAGGCCCTACGGTCGTGTTAGTAGAAATATTTTGAAGACAAAGTTA 1 TATCTAGACAGGCCCCTACGGTCGTGTTAGTAGAAATATTTTGAAGACAAAGTTA 1 TATCTAGACAGGCCCCTACGGTCGTGTTAGTAGAAATATTTTGAAGACAAAGTTA 1 TATCTAGACAGGCCCCTACGGTCGTGTTAGTAGAAATATTTTGAAGACAAAGTTA 1 TATCTAGACAGGCCCCTACGGTCGTGTTAGTAGAAATATTTTGAAGACAAAGTTA 1 TATCTAGACAGGCCCCTACGGTCGTGTTAGTAGAAATATTTTGAAGACAAAGTTA	TTAGAG TTAGAG TTAGAG TTAGAG
LCY-b2(FJ516403) LCY-b2-clone3_F LCY-b2-clone1_F LCY-b2-clone2 F LCY-b2-clone1 R LCY-b2-clone2 R LCY-b2-clone3_R	11 AATTGTGTTTCAAATGGA-GTTAAGTTTCATAAGGCTAAAGTTTGGCACGTGAA 11 AATTGTGTTTCAAATGCA-GTTAAGTTTCATAACGCTAAAGTTTGGCACGTGAA 11 AATTGTGTTTTAAATGCC-GTTACGTTTCATAACGCTAAAGTTTGGCATGTGAA 11 AATTGTGTTTTAAATGCCCGTTACGTTTCATAACGCTAAAGTTTGGCATGTGAA 11 AATTGTGTTTTAAATGCCCGTTACGTTTCATAACGCTAAAGTTTGGCATGTGAA 11 AATTGTGTTTTAAATGCCCGTTACGTTTCATAACGCTAAAGTTTGGCATGTGAA 11	TCATCA TCATCA TCATCA TCATCA ATCATCA
LCY-b2(FJ516403) LCY-b2-clone3 F LCY-b2-clone1 F LCY-b2-clone2 F LCY-b2-clone1 R LCY-b2-clone2 R LCY-b2-clone3 R	00 GGAGTTCGAGTCTTCGATTGTTGTGATGATGAGGAATGAGATTAACGCTAGC 00 GGAGTTCGAGTCTTCGATTGTTTGTGATGATGAGGATGAGATTAACGCTAGC 00 GGAGTTCGAGTCTTCGATTGTTGTGATGAGAGGAATGAGATTAACGCTAGC 01 GGAGTTCGAGTCTTCGATTGTTGTGATGAGAATGAGATAACGCTAGC 01 TGGAGTTCGAGTCTTCGATTGTTGTGATGAGATGAGATAACGCTAGC 11 GGAGTTCGAGTCTTCGATTGTTGTGATGAGATGAGATAACGCTAGC 12	TTGATT TTGATT TTGATG TTGATG TTGATT T-GATT T-GAAT
LCY-b2(FJ516403) LCY-b2-clone3_F LCY-b2-clone1_F LCY-b2-clone2 F LCY-b2-clone1 R LCY-b2-clone2_R LCY-b2-clone3_R	68 GTTGATGCTAGTGGCTTTGCTAGTAGTTTGTGAGTATGATAAGCCAAGAAAC 68 GTTGATGCTAGTGGCTTTGCTAGTAGTTTTGTTGAGTATGATAGCCAAGAAAC 65 -TGATGCTAGTGGCTTTGCTAGTAGTTTT-GTTGACTATGATAGCCAAGAAT 67 -TGATGCTAGTGGACTTGCTAGTAGTATTTGCTGACTATGATAGCCAAGAT 67 -TGATGCTAGTGGACTTGCTAGTAGTATTTGCTGACTATGATAGCCAAGAT 67 -GTGATGCTAGTGGCCTGGCTAGTAGTTTTGCTGACTATGATAGCCAAGAT 67 -GTGATGCTAGTGGCCTGGCTAGTAGTTTTGCTGACTATGATAGCCAAGAT 67 -GTGATGCTAGTGGCCTGGCTAGTAGTTT-GTGACTTTGGATAGCCAAGAT 67 -GTGATGCTAGCGCCCGCCTGGCTAGTAGTTT-GTGACTTAGATAGCCAAGAAAC 60 G-TGATGCTAGCGCCCCGCTGGCTAGTAGTTT-GTGACT-AGATAGCCAAGAAAC 60 G-TGATGCTAGCGC-CTGCCTAGTAGTTT-GTGACT-AGATAAGC-AGATAACC-AGATACC-AGATACC-AGATACC-AGATACC-AGATACC-AGATACC-AGATACC-AGATACC-AGATACC-AGATACC-AGATACC-AGATACC-AGATACC-AGATACC-AGACACC-ACC-ACC-ACC-ACC-ACC-ACC	CATGGA CATGCA CATGCA CATGCA CATGCA CATCGA CATCGA 2ATGA
LCY-b2(FJ516403) LCY-b2-clone3 F LCY-b2-clone1_F LCY-b2-clone2_F LCY-b2-clone1_R LCY-b2-clone2 R LCY-b2-clone3_R	18 TACCAAATTGCTCATGGCATTTTAGCTGAGGGTTGAGAGTCACCCTTTTGATTA 18 TACAAACTGCTCATGGCATTT-AGCTGAGGT-GAAAGTCACCGTTT-CATCA 18 TA-CTAACTGCTCATGGCATT-AGCTGAGGT-GAAAGTCACCGTTTGCATCA 18 TA-CTAACTGCTCATGGATT-AGCTGAGGT-GAAAGTCACCGTTGGATTCA 11 TAACAAACTGCTCATGGATT-AACTGAGGTGGAAAGTCACCC-TTCGATCAC 11 TAACAAACTGCTCATGGATT-AACTGAGGTGGAAAGTCACC-TTCGATCAC 12 TAGCCAACTGCTCATGGATTT-AGCTGAGGT-GACGACCCACCCGTTTGATTTA 13 TAGC-AACTGCTCATGGATTT-AGCTGAGGT-GACGAGTCACCCGTTTGATTTA 14 TAGC-AACTGCTCATGGATTT-AGCTGAGGT-GACGAGTCACCCGTTTGATTTA 15 TAGC-AACTGCTCATGGATTTAAGCTGAGGT-GAGAGTCACCCGTTTGATTTA 16 TAGC-AACTGCTCATGGATTTAAGCTGAGGTT-GAGAGTCACCCGTTTGATTTAAGCTGAGGTTAATGAGAGTCACCCGTTTGATTTAAGCTGAGGTTGACTCACCCGTTTGATTTAAGCTGAGGTTGACTGAGGTTGACTCACCCGTTTGATTTAAGCTGAGGTTGACTGAGGTTGACTCACCCGTTTGATTTAAGCTGAGGTTGACTGAC	IGACAAA GACAAA ATA TAA IGATAAA IGATAAA IGACAAA
LCY-b2(FJ516403) LCY-b2-clone3_F LCY-b2-clone1 F LCY-b2-clone2_F	78 ATGGTTCTCATG-GATTGGAGAGATTCCCATTTAGGGAATGAGCCTTACTTGCG 74 C <mark>IGTTCC</mark> TCATCCAATTGGAGAGACTCCATTAAGCTATGAGCCTTACTTGC- 51 AATGT-CTCATCATGGAAAGATCCCATAAGGCATGAC-TACT-GC- 53 CATGTTCTCATGATGGAGAGATCCAATAAG-CATGACCTACT-GC-	AGCTAG AGCTAG AGCTAG AGCTAG

LCY-b2-clone1_R LCY-b2-clone2_R LCY-b2-clone3_R	158 153 162	ATGGTTCTCATG- ATG <mark>-</mark> TT <mark>T</mark> TCATG- ATGGTTCTCATG-	GAT <mark>-</mark> GGAGAGAI GATTGGAGAGAG GAT <mark>-</mark> GGAGAGAI	IGCCCA-TTAGG(TGCCA-TTAGG(IGCCAT-TTAGG(GAATGAGC <mark>A</mark> TTAC GAATGAGC <mark>A</mark> TTAC GAATGAGC <mark>-</mark> TTAC	TTGCGAGCTAG TTGCGAGCTAG TTGCGAGCTAG
LCY-b2(FJ516403) LCY-b2-clone3_F LCY-b2-clone1_F LCY-b2-clone2 F LCY-b2-clone1 R LCY-b2-clone2 R LCY-b2-clone3_R	837 831 809 812 215 210 218	CAATTTGAAGCTC CAATT <mark>G</mark> GAAGCTC CA-TTGAAGCTC CA-TTGA CAATTGAAGCTC CAATTTGAAGCTC CAATTTGAAGCTC	CC-AACTTTTC C-AACTGTCC CC-A-CTTTCC TC-A-CGTTTC CCCAACTTTTC CC-AACTTTTC CC-AACTTTTC	TCTATGCAATGC TAT - TGCCATG TAT GGCATG TAT G-CATGC TCTATGCAATGC TCTATGCAATGC TCTATGCAATGC	CCATTTGATTCAA CATTTGTTTCAA CAATTGCATCA CCATTGCATCAA CCATCGCATCAA CCATTGATTCAA CCATTTGATTCAA	ATTTGGTATTT TG TTTCGA ATTTGGTATTT ATTTGGTATTT ATTTGGTATTT
LCY-b2(FJ516403) LCY-b2-clone3 F LCY-b2-clone1_F LCY-b2-clone2 F	895	TT-AGAAGAAACA	TCTTTGG-TTAC	GTAGGCCAGTTT	IGTCATATAAAGA	GGTTAAGAGCA
LCY-b2-clone1_R LCY-b2-clone2 R LCY-b2-clone3_R	274 268 276	TT-AGAAGAAACA TTTAGAAGAAACA TT-AGAAGAAACA	TCTTTGG <mark>G</mark> TTAC TCTTTGG <mark>G</mark> TTAC TCTTTGG <mark>-</mark> TTAC	GTAGGCCAGTTT GTAGGCCAGTTT GTAGGCCAGTTT	IGTCATATAAAGA IGTCATATAAAGA IGTCATATAAAGA	IGGTTAAGAG <mark>A</mark> A IGGTTAAGAGAA IGGTTAAGAG <mark>C</mark> A
LCY-b2(FJ516403) LCY-b2-clone3_F LCY-b2-clone1_F	953	GAATGGCAGCGAG	G- <mark>TTAAGGCAT</mark>	ATGGGAATTAGAG	GTTAAAAGAGTGA	TTGAAGATGAA
LCY-b2-clone1_R LCY-b2-clone2_R LCY-b2-clone3_R	333 328 334	GAATGGCAGCGAG GAATGGCAGCGAG GAATGGCAGCGAG	G <mark>G</mark> TTAAGGCAT <i>I</i> G <mark>G</mark> TTAAGGCAT <i>I</i> G <mark>G</mark> TTAAGGCAT <i>I</i>	ATGGGAATTAGA(ATGGGAATTAGA(ATGGGAATTAGA(GTTAAAAGAGTGA GTTAAAAGAGTGA GTTAAAAGAGTGA	.TTGAAGATGAA .TTGAAGATGAA .TTGAAGATGAA
LCY-b2(FJ516403) LCY-b2-clone3_F LCY-b2-clone1_F LCY-b2-clone2_F	1012	AAATGTTTGATT	CCAATGGGAGGT		GATCCC <mark>ACAAAG</mark> I	'GTGATGGCTAT <u>T</u>
LCY-b2-clone1 R LCY-b2-clone2 R LCY-b2-clone3 R	393 388 394	AAATGTTTGATTC AAATGTTTGATTC AAATGTTTGATTC	CAATGGGAGGTC CAATGGGAGGTC CAATGGGAGGTC	CCTCTGCCTGTG CCTCTGCCTGTG CCTCTGCCTGTG CCTCTGCCTGTG	ATCCCGCAAAGTC ATCCCGCAAAGTC ATCCCACAAAGTC	TGATGGCTATT TGATGGCTATT TGATGGCTATT
LCY-b2(FJ516403) LCY-b2-clone3 F LCY-b2-clone1 F LCY-b2-clone2 F	1072	GGCCGCACGTCT	GGTTTAATCCAT	ICCT <mark>G</mark> CAACTGG(GTATATGGTGGCI	CGGACCATGGCT
LCY-b2-clone1_R LCY-b2-clone2 R LCY-b2-clone3_R	453 448 454	GGCAGCACGTCTG GGCAGCACGTCTG GGC <mark>G</mark> GCACGTCTG	GTTTAGTCCATC GTTTAGTCCATC GTTTAATCCATC	CCTTCAACTGGG CCTTCAACTGGG CCT <mark>G</mark> CAACTGGG	IATATGGTGGCTC IATATGGTGGCTC IATATGGTGGCTC	:GGACCATGGCT :GGACCATGGCT :GGACCATGGCT
LCY-b2(FJ516403) LCY-b2-clone3_F LCY-b2-clone1 F LCY-b2-clone2 F	1132	CTGGCCCCTGC 		AATAGCTGAATGO	CCTTGGCTCAACC	AGGATGATCAGA
LCY-b2-clone1 R LCY-b2-clone2 R LCY-b2-clone3_R	513 508 514	CTGGCCCCTGC <mark>G</mark> T CTGGCCCCTGC <mark>G</mark> T CTGGCCCCTGC <mark>C</mark> T	TGGCTGATGCA TGGCTGATGCA TGGCTGATGCA	ATAGCTGAGTGCO ATAGCTGAGTGCO ATAGCTGAATGCO	CTTGGCTCAACCA CTTGGCTCAACCA CTTGGCTCAACCA	IGGATGATCAGA IGGATGATCAGA IGGATGATCAGA
LCY-b2(FJ516403): LCY-b2-clone3_F LCY-b2-clone1_F LCY-b2-clone2_F	1192	GGCAGGCCACTTC	ATCAGAAAGTG1	GGAATGGGTTG	IGGCCAATTGACA	GAAGATCCAAT
LCY-b2-clone1 R LCY-b2-clone2 R LCY-b2-clone3_R	573 568 574	GGCAGGCCACTTC GGCAGGCCACTTC GGCAGGCCACTTC	ATCAGAAAGTG1 ATCAGAAAGTG1 ATCAGAAAGTG1	EGGAATGGGTTG EGGAATGGGTTG EGGAATGGGTTG	IGGCCAATTGACA IGGCCAATTGACA IGGCCAATTGACA	IGAAGATGCAAT IGAAGATACAAT IGAAGATGCAAT
LCY-b2(FJ51640 LCY-b2-clone3 F LCY-b2-clone1 F LCY-b2-clone2 F	1252	AGGGAGTTTTATT	CATTTGGTATGC	GAGACTTTGTTGA	AAGCTGGATTTGA	AGGGGACTAGG
LCY-b2-clone1_R LCY-b2-clone2_R LCY-b2-clone3_R	633 628 634	AGGGAGTTTTATT AGGGAGTTTTATT AGGGAGTTTTATT	CATTTGGTATGC CATTTGGTATGC CATTTGGTATGC	GAGACTTTGTTGA GAGACTTTGTTGA GAGACTTTGTTGA	AAGCTGGATTTGA AAGCTGGATTTGA AAGCTGGATTTGA	AGGGGACTAGG AGGGGACTAGG AGGGGACTAGG

LCY-b2(FJ516403)131	2 AGATTCTTTGATGCTTTCTTTGATTTGAATCCTTACTACTGGCATGGGTTTCTGTCCTCA
LCY-b2-clone3 F	
LCY-b2-clone1 F	
LCY-b2-clone2 F	
LCY-b2-clone1 R 69	3 AGATTCTTTGATGCTTTCTTTGATTTGAATCCTCACTACTGGCATGGGTTTCTGTCCTCA
LCY-b2-clone2 R 68	8 AGATTCTTTGATGCTTTCTTTGATTTGAATCCTCACTACTGGCATGGGTTTCTGTCCTCA
LCY-b2-clone3 R 69	4 AGATTCTTTGATGCTTTCTTTGATTTGAATCCT <mark>T</mark> ACTACTGGCATGGGTTTCTGTCCTCA
—	
LCY-b2(FJ516403)137	2 AGGTTGTCTCTTGCAGAGCTTGCTGGCCTAAGCTTGTCTCTCTTTGGACACGCCTCGAAT
LCY-b2-clone3 F	
LCY-b2-clone1 F	
LCY-b2-clone2 F	
LCY-b2-clone1 R 75	3 AGGTTGTCTCTTGCAGAGCTTGCTGGCCTAAGCTTGTCTCTCTTTGGACACGCCTCGAAT
LCY-b2-clone2 R 74	8 AGGTTGTCTCTTGCAGAGCTTGCTGGCCTAAGCTTGTCTCTCTTTGGACACGCCTCGAAT
LCY-b2-clone3 R 75	4 AGGTTGTCTCTTGCAGAGCTTGCTGGCCTAAGCTTGTCTCTCTTTGGACACGCCTCGAAT
_	
LCY-b2(FJ516403)143	2 TCTTCCAGGTT <mark>G</mark> GATATTGTTACCAAGTGCCCT <mark>G</mark> TTCCTCTGGTTAAAATGATGGGGAAT
LCY-b2-clone3 F	
LCY-b2-clone1 F	
LCY-b2-clone2 F	
LCY-b2-clone1_R 81	3 TCTTCCAGGTT <mark>T</mark> GATATTGTTACCAAGTGCCCT <mark>C</mark> TTCCTCTGGTTAAAATGATGGGGAAT
LCY-b2-clone2_R 80	8 TCTTCCAGGTT <mark>T</mark> GATATTGTTACCAAGTGCCCT <mark>C</mark> TTCCTCTGGTTAAAATGATGGGGAAT
LCY-b2-clone3_R 81	4 TCTTCCAGGTT <mark>G</mark> GATATTGTTACCAAGTGCCCT <mark>G</mark> TTCCTCTGGTTAAAATGATGGGGAAT
LCY-D2(FJ516403)149	2 CTTGCCCTTGAAACCATTTTGA
LCY-b2-clone3_F	
LCY-b2-clonel_F	
LCY-b2-clone2_F	
LCY-b2-clonel R 87	3 CHIFIGCCCHIFIGAAACCATHIGAA
LCY-b2-clone2 R 86	8 CHIFGCCCHIFGAAACCATHGAA
LCY-b2-clone3_R 87	4 CTTGCCCTTGAAACCATTGAA

3- LCY-b2 (FJ516403) - Fragmento do gene

LCY-b2(FJ516403) LCY-b2-clone1 R LCY-b2-clone1 F LCY-b2-clone2 R LCY-b2-clone2_F	1 1 1 1	AAGTGTGGAATGGGTTGTGGCCAATTGACAGAAGATGCAATAGGGAGTTTTATTCATTTG AAGTGTGGAATGGGTTGTGGCCAATTGACAGAAGATGCAATAGGGAGTTTTATTCATTTG AAGTGTGGAATGGGTTGTGGCCAATTGACMGAMKATGCAATAGGGAGTTTTATTCATTTG AAGTGTGGAATGGGTTGTGGCCAATTGACAGAAGATGCAATAGGGAGTTTTATTCATTTG AAGTGTGGAATGGGTTGTGGCCAATTGACAGAAGATGCAATAGGGAGTTTTATTCATTTG
LCY-b2(FJ516403) LCY-b2-clonel R LCY-b2-clonel F LCY-b2-clone2_R LCY-b2-clone2_F	61 61 61 35	GTATGGAGACTTTGTTGAAGCTGGATTTGAAGGGGACTAGGAGATTCTTTGATGCTTTCT GTATGGAGACTTTGTTGAAGCTGGATTTGAAGGGGACTAGGAGATT <mark>Y</mark> TTTGATGCTTTCT GTATGGA <mark>R</mark> ACTTTGTTGAAG <mark>Y</mark> TGGATTTGAAGGGGGACTAGGAGATTCTTTGATGCTTTCT GTATGGAGACTTTGTTGAAGCTGGATTTGAAGGGGACTAGGAGATTCTTTGATGCTTTCT GTATGGA <mark>R</mark> ACTTTGTTGAA <mark>S</mark> CTGGATTTGAAGGGGACTAGGARATTCTTTGATGCTTTCT
LCY-b2(FJ516403) LCY-b2-clone1_R LCY-b2-clone1_F LCY-b2-clone2_R LCY-b2-clone2_F	121 121 121 121 95	$eq:ttgattgaatccttactgccatgggttctgtctctcaaggttgtctcttgcagagc\\ Ttgatttgaatccttactgccatgggtttctgtcctcaaggttgtctcttgcagagc\\ Ttgatttgaatccttactgccatgggtttctgtcctcaaggttgtctcttgcagagc\\ Ttgatttgaatccttactgccatgggtttctgtcctcaaggttgtctcttgcagagc\\ Ttgatttgaatccttactgccatgggtttctgtcctcaaggttgtctcttgcagagc\\ Ttgatttgaatccttactgccatgggtttctgtcctcaaggttgtctcttgcagagc\\ Ttgatttgaatccttactgccatgggtttctgtcctcaaggttgtctcttgcagagc\\ Ttgatttgaatccttactgccatgggtttctgtcctcaaggttgtctcttgcagagc\\ Ttgatttgaatccttactgcatggcatgggtttctgtcctcaaggttgtctcttgcagagc\\ Ttgatttgaatccttactgcatggcatgggtttctgtcctcaaggttgtctcttgcagagc\\ Ttgatttgaatccttactgcatggcatgggtttctgtcctcaaggttgtctcttgcagagc\\ Ttgatttgaatccttactactgcatggcatgggtttctgtctctgtcctcaaggttgtctcttgcagagc\\ Ttgatttgaatccttactactgcatggcatgggtttctgtctctgtcctcaaggttgtctctttgcagagc\\ Ttgatttgaatccttactactgcatggcatgggtttctgtctctgtcctcaaggttgtctctttgcagagc\\ Ttgatttgaatccttactactgcatggcatgggtttctgtctctgtcctcaaggttgtctctttgcaggttgtctctttgcaggtgtgtctctttgcaggttgtcttttgtcttgtctttgtcttttgtcttgtctttgtcttgtctttgtctttgtctttgtctttgtctttgtcttgtcttttgtcttgtctttgtctttgtctttgtctttgtcttttgtctttgtctttgtctttgtctttttt$
LCY-b2(FJ516403) LCY-b2-clone1_R LCY-b2-clone1_F LCY-b2-clone2_R LCY-b2-clone2_F	181 181 181 181 155	TTGCTGGCCTAAGCTTGTCTCTCTTTGGACACGCCTCGAATTCTTCCAGGTTGGATATTG TTGCTGGCCTAAGCTTGTCTCTCTTTGGACACGCCTCGAATTCTTCCAGGTTGGATATTG TTGCTGGCCTAAGCTTGTCTCTCTTTGGACACGCCTCGAATTCTTCCAGGTTGGATATTG TTGCTGGCCTAAGCTTGTCTCTCTTTGGACACGCCTCGAATTCTTCCAGGTTGGATATTG TTGCTGGCCTAAGCTTGTCTCTCTTTGGACACG
LCY-b2(FJ516403) LCY-b2-clone1_R LCY-b2-clone1 F LCY-b2-clone2 R LCY-b2-clone2_F	241 241 241 241 241 215	$\label{eq:target} TTACCAAGTGCCCTGTTCCTCTGGTTAAAATGATGGGGAATCTTGCCCTTGAAACCATTT\\ TTACCAAGTGCCCTGTTCCTCTGGTTAAAATGATGGGGGAATCTTGCCCTTGAAACCATTT\\ TTACCAAGTGCCCTGTTCCTCTGGTTAAAATGATGGGGGAATCTTGCCCTTGAAACCATTT\\ TTACCAAGTGCCCTGT\\ CCTCKG\\TAATRCAGTCAATAAWWRRKKKT\\TTACCAAGTGCCCTGTTCCTCTGGTTAAAATGATGGGCRAATCTTGCCCTTGAAACCATTT\\ TTACCAAGTGCCCTGTTCCTCTGGTTAAAATGATGGGCRAATCTTGCCCTTGAAACCATTT\\ TTACCAAGTGCCCTGTTCCTCTGGTTAAAATGATGGGCRAATCTTGCCCTTGAAACCATTT\\ TTACCAAGTGCCCTGTTCCTCTGGTTAAAATGATGGCCRAATCTTGCCCTTGAAACCATTT\\ TTACCAAGTGCCCTGTTCCTCTGGTTAAAATGATGATGGCCCTTGAAACCATTT\\ TTACCAAGTGCCCTGTTCCTCTGGTTAAAATGATGATGGCCTTGCCCTTGAAACCATTT\\ TTACCAAGTGCCCTGTTCCTCTGGTTAAAATGATGATGGCCCTTGCCCTTGAAACCATTT\\ TTACCAAGTGCCCTGTTCCTCTGGTTAAAATGATGATGGCCCCTTGAAACCATTT\\ TTACCAAGTGCCCTTGTCCTCTGGTTAAAATGATGATGGCCCTTGCCCTTGAAACCATTT\\ TTACCAAGTGCCCTTGTCCTCTGGTTAAAATGATGATGGCCCTTGCCCTTGAAACCATTT$
LCY-b2(FJ516403) LCY-b2-clone1_R	301 301	GA GA

LCY-b2-clone1_F 301 GA LCY-b2-clone2_R ---LCY-b2-clone2_F 275 GA

4- HYb (DQ228870.1) - Gene Completo

HYB(DQ228870) HYB-clone1 R HYB-clone2 F HYB-clone1 F HYB-clone2 R	1 1 1 1	ATGGCGCTCGGACTATTGCCCCCCATAGT-CCCGAAGCC CKTCCAGCACAWWWAGGTGCCTGAAGGTCC CRTRCAWWWAGGTGCCTGAAGGTCC CRTRRRWMSKTTTTCAATTTKGRWTGRGC CGCTCGGACTATTGCCCCCCATAGT-CCCGAAGCC TGATACCAAATAAGCAGGYTCCGATCGTCGTCGTCGCGTTCGACTATGGCGCATAGTCCGA
HYB(DQ228870)	39	CTTCTGTCTCCTCACAACAAAACTTCAACCCTCTTCGCTCCTCACAAC-AAAACCCGC
HYB-clone1 R	31	GTTCGTTCTACATCAAT-CTTCAACCTCTTCGCTCCTCACAACMAAAACCCGC
HYB-clone2 F	30	CTTCTGTCTC-TCACAACAAAACTTCAACCCTCTTCGCTCCTCACAACAAAAACCCGC
HYB-clone1 F	39	CTTCTGTCTCCTCACAACAAAACTTCAACCCTCTTCGCTCCTCACAACAAAACCCGC
HYB-clone2_R	61	AGCGTCYGTCTC-TCACACAAAACTTCAACCCTCT
HYB(DQ228870)	96	TCCCCTTTTTGCCCCTCTCGGTACCCACCGCGGCTTCTTTAATGGCAAAAACCGAAGAAA
HYB-clone1 R	83	TCCCCTTTT <mark>-</mark> GCCCCTCTCGGTACCCACCGCGGCTTCTTTAATGGCAAAAACCGAAGAAA
HYB-clone2 F	86	TCCCCTTTTTGCCCCTCTCGGTACCCACCGCGGCTTCTTTAATGGCAAAAACCGAAGAAA
HYB-clone1_F	96	TCCCCTTTTTGCCCCTCTCGGTACCCACCGCGGCTTCTTTAATGGCAAAAAACCGAAGAAA
HYB-clone2_R	115	TCCCCTTTTTGCCCCTCTCGGTACCCACCGCGGCTTCTTTAATGGCAAAAAACCGAAGAAA
HYB(DQ228870) HYB-clone1 R HYB-clone2_F HYB-clone1_F HYB-clone2_R	156 142 146 156 175	ACTCAACTCTTTCACCGTATGTTTTGTTTTAGAGGAGAAAAAACAAAGCAACCCAGATCGA ACTCAACTCTTTCACCGTATGTTTTGTTT
HYB(DQ228870)	216	GACTTTCACGGACGAGGAGGAGGAGGAGGAGTCCGGGTACCCAGATCTCGACTGCTGCCCGCGT
HYB-clone1_R	202	GACTTTCACGGACGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGCCGGGTACCCAGATCTCGACTGCTGCCCGCGT
HYB-clone2_F	206	GACTTTCACGGACGAGGAGGAGGAGGAGGAGGCCGGGTACCCAGATCTCGACTGCTGCCCGCGT
HYB-clone1_F	216	GACTTTCACGGACGAGGAGGAGGAGGAGTCGGGTACCCAGATCTCGACTGCTGCCCGCGT
HYB-clone2_R	235	GACTTTCACGGACGAGGAGGAGGAGGAGTCGGGTACCCAGATCTCGACTGCTGCCCGCGT
HYB(DQ228870)	276	GGCCGAGAAATTGGCGAGAAAGAGATCCGAGAGGTTCACTTATCTCGTTGCTGCCGTCAT
HYB-clone1_R	262	GGCCGAGAAAT <mark>Y</mark> GGCGAGAAAGAGATCCGAGAGGTTCACTTATCTCGTTGCTGCCGTCAT
HYB-clone2 F	266	GGCCGAGAAATTGGCCAGAAAGAGATCCGAGAGGTTCACTTATCTCGTTGCTGCCGTCAT
HYB-clone1 F	276	GGCC <mark>RAR</mark> AAATTGGCGAGAAAGAGATCCGAGAGGTTCACTTATCTCGTTGCTGCCGTCAT
HYB-clone2_R	295	GGCCGAGAAATTGGCGAGAAAGAGATCCGAGAGGTTCACTTATCTCGTTGCTGCCGTCAT
HYB(DQ228870)	336	GTCTAGTTTTGGTATCACTTCCATGGCTGTCATGGCTGTTTATTACAGGTTCTGGTGGCA
HYB-clone1 R	322	GTCTAGTTTTGGTATCACTTCCATGGCTGTCATGGCTGTTTATTACAGGTTCTGGTGGCA
HYB-clone2 F	326	GTCTAGTTTTGGTATCACTTCCATGGCTGTCATGGCTGTTTATTACAGGTTCTGGTGGCA
HYB-clone1_F	336	GTCTAGTTTTGGTATCACTTCCATGGCTGTCATGGCTGTTTATTACAGGTTCTGGTGGCA
HYB-clone2_R	355	GTCTAGTTTTGGTATCACTTCCATGGCTGTCATGGCTGTTTATTACAGGTTCTGGTGGCA
HYB(DQ228870) HYB-clone1_R HYB-clone2_F HYB-clone1_F HYB-clone2_R	396 382 386 396 415	AATGGAGGGTGGAGAGGTGCCTTTAGCTGAAATGTTTGGCACATTTGCTCTCTCT
HYB(DQ228870) HYB-clone1_R HYB-clone2 F HYB-clone1 F HYB-clone2_R	456 442 446 456 475	$\label{eq:templation} TGCTGCTGTGGGCATGGAGTTTTGGGCACGATGGGCTCATAAAGCTCTGTGGCATGCTTC\\ TGCTGCTGTGGGCATGGAGTTTTGGGCACGATGGGCTCATAAAGCTCTGTGGCATGCTTC\\ TGCTGCTGTGGGCATGGAGTTTTGGGCACGATGGGCTCATAAAGCTCTGTGGCATGCTTC\\ TGCTGCTGTGGGCATGGAGTTTTGGGCACGATGGGCTCATAAAGCTCTGTGGCATGCTTC\\ TGCTGCTGTGGGGCATGGAGTTTTGGGCACGATGGGCTCATAAAGCTCTGTGGCATGCTTC\\ \end{tabular}$
HYB(DQ228870)	516	TTTATGGCATATGCACGAGTCTCACCATCGACCAAGAGAGGGTCCTTTTGAGCTAAACGA
HYB-clonel R	502	TTTATGGCATATGCACGAGTCTCACCATCGACCAAGAGAGGGGTCCTTTTGAGCTAAACGA
HYB-clone2 F	506	TTTATGGCATATGCACGAGTCTCACCATCGACCAAGAGAGGGGTCCTTTTGAGCTAAACGA
HYB-clone1 F	516	TTTATGGCATATGCACGAGTCTCACCATCGACMAAGAGAGGGGTCCTTTTGAGCTAAACGA
HYB-clone2_R	535	TTTATGGCATATGCACGAGTCTCACCATCGACCAAGAGAGGGGTCCTTTTGAGCTAAACGA

HYB(DQ228870)	576	TGTGTTTGCCATAATCAACGCAGTTCCAGCCATAGCCCTTCTCTCTTTTGGCTTCTTCCA
HYB-clone1 R	562	TGTGTTTGCCATAATCAACGCAGTTCCAGCCATAGCCCTTCTCT <mark>Y</mark> TTTTGGCTT
HYB-clone2 F	566	TGTGTTTGCCATAATCAACGCAGTTCCAGCCATAGCCCTTCTCTCTTTTGGCTTCTTCCA
HYB-clone1 F	576	TGTGTTTGCCATAATCAACGCAGTTCCAGCCATAGCCCTTCTCTCTTTTGGCTTCTTCCA
HYB-clone2_R	595	TGTGTTTGCCATAATCAACGCAGTTCCAGCCATAGCCCTTCTCTCTTTTGGCTTCTTCCA
HYB(DQ228870)	636	CAAAGGCCTTGTACCTGGTCTCTGTTTTGGTGCTGGACTTGGCATTACGGTGTTTGGGAT
HYB-clonel R	622	CAAAGGCCTTGTACCTGGTCTCTGTTTTGGTGCTGGACTTGGCATTACGGTGTTTGGGAT
HYB-clone2 F	626	CAAAGGCCTTGTACCTGGTCTCTGTTTTGGTGCTGGACTTGGCATTACGGTGTTTGGGAT
HYB-clone1_F	636	CAAAGGCCTTGTACCTGGTCTCTGTTTTGGTGCTGGACTTGGCATTACGGTGTTTGGGAT
HYB-clone2_R	655	CAAAGGCCTTGTACCTGGTCTCTGTTTTGGTGCTGGACTTGGCATTACGGTGTTTGGGAT
HYB(DQ228870)	696	GGCCTACATGTTCGTCCACGATGGTCTCGTTCACAAAAGGTTCCCTGTGGGTCCCATTGC
HYB-clone1_R	682	GGCCTACATGTT <mark>Y</mark> GTCC <mark>M</mark> CGATGGT <mark>YTY</mark> GTTCACAAAAGGTTCCCTGTGGGTCCCATTGC
HYB-clone2_F	686	GGCCTACATGTTCGTCCACGATGGTCTCGTTCACAAAAGGTTCCCTGTGGGTCCCATTGC
HYB-clone1_F	696	GGCCTACATGTTCGTCCACGATGGTCTCGTTCACAAAAGGTTCCCTGTGGGTCCCATTGC
HYB-clone2_R	715	GGCCTACATGTTCGTCCACGATGGTCTCGTTCACAAAAGGTTCCCTGTGGGTCCCATTGC
HYB(DQ228870)	756	CGACGTGCCTTATTTCCGGAGAGTCGCTGCGGCTCACCAGCTTCACCACTCGGATAAATT
HYB-clone1_R	742	CGACGTGCCTTATTTCCGGAGAGTCGCTGCGGGCTCACCAGCTTCACCACTCGGATAAATT
HYB-clone2_F	746	CGACGTGCCTTATTTCCGGAGAGTCGCTGCGGCTCACCAGCTTCACCACTCGGATAAATT
HYB-clone1 F	756	CGACGTGCCTTATTTCCGGAGAGTCGCTGCGGCTCACCAGCTTCACCACTCGGATAAATT
HYB-clone2_R	775	CGACGTGCCTTATTTCCGGAGAGTCGCTGCGGCTCACCAGCTTCACCACTCGGATAAATT
HYB(DQ228870)	816	CCACGGTGTTCCATATGGGCTCTTTCTCGGACCTAAGGAGCTTGAAGAAGTGGGGGGGACT
HYB-clone1_R	802	CCACGGTGTTCCATATGGGCTCTTTCTCGGACCTAAGGAGCTTGAAGAAGTGGGGGGGRCT
HYB-clone2 F	806	CCACGGTGTTCCATATGGGCTCTTTCTCGGACCTAAG <mark>A</mark> AGCTTGACAAC <mark>TC</mark> GGGGGGCT
HYB-clone1 F	814	CCACGGTGTTCCATATGGCTCTTTCTCGGACCTAAGGAGCTTGAAGAAGTGGGGGGGACT
HYB-clone2_R	835	CCACGGTGTTCCATATGGGCTCTTTCTCGGACCTAAGGAGCTTGAAGAAGTGGGGGGGACT
HYB(DQ228870)	876	AGAAGAATTGGAGAAGGAGATCAGTAAGAGAATCAAATCATACAA-CAGGGTTC <mark>C</mark> AAAAT
HYB-clone1 R	862	AGAAGAATTGGAGAAGGAGATCAGTAAGAGAATCAAATCATACAA-CAGGGTTCCAAAAT
HYB-clone2_F	865	AGACATTGGAGACS <mark>-</mark> AGATCAGTAAGAGA-TCAAATCATACAA-CAGGCTTCAAAWAA
HYB-clone1_F	864	AGACACGAGA-GGAGATCA <mark>RTA-GARA-TCAAATCAWMCAAMCAGGG</mark> GAT
HYB-clone2_R	895	AGAACAATGGAGAAGAG <mark>ATAKAGRTYCC</mark> AACCAATGGAGAGAG
HYB(DQ228870) HYB-clone1_R HYB-clone2_F HYB-clone1 F HYB-clone2 R	935 921 920	AAAA

5- HYb (DQ228870.1) – Fragmento do gene



HYb-clone1_R	177	ATCTCGTTGCTGCCGTCATGTCTAGTTTTGGTATCACTTCCATGGCTGTCATGGCTGTTT
HYb-clone1_F	177	ATCTCGTTGCTGCCGTCATGTCTAGTTTTGGTATCACTTCCATGGCTGTCATGGCTGTTT
HYb-clone2 R	177	ATCTCGTTGCTGCCGTCATGTCTAGTTTTGGTATCACTTCCATGGCTGTCATGGCTGTTT
HYb-clone2_F	158	ATCTCGTTGCTGCCGTCATGTCTAGTTTTGGTATCACTTCCATGGCTGTCATGGCTGTTT
HYb(DQ228870)	237	ATTACAGGTTCTGGTGGCAAATGGAGGGTGGAGAGGTGCCTTTAGCTGAAATGTTTGGCA
HYb-clone1_R	237	ATTACAGGTTCTGGTGGCAAATGGAGGGTGGAGAGGTGCCTTTAGCTGAAATGTTTGGCA
HYb-clonel F	237	ATTACAGGTTCTGGTGGCAAATGGAGGGTGGAGAGGTGCCTTTAGCTGAAATGTTTGGCA
HYb-clone2 R	237	ATTACAGGTTCTGGTGGCAAATGGAGGGTGGAGAG <mark>-K</mark> GCCT <mark></mark> AGC <mark>K</mark> AAAC <mark>C</mark> GGGT <mark>T</mark> GGA
HYb-clone2_F	218	ATTACAGGTTCTGGTGGCAAATGGAGGGGGGGGGGGGGG
HYb(DQ228870)	297	CATTIGCT
HYb-clonel R	297	CATTTGCT
HYb-clone1 F	297	CATTTGCT
HYb-clone2 R	294	AAWRR <mark>G</mark>
HYb-clone2_F	278	CATTIGCT