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

**Isolamento e caracterização de promotores de genes constitutivos de
*Citrus sinensis***

Lígia Erpen

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

**Piracicaba
2017**

Lígia Erpen
Engenheira Agrônoma

Isolamento e caracterização de promotores de genes constitutivos de *Citrus sinensis*

Orientador:
Profa. Dra. **BEATRIZ MADALENA JANUZZI MENDES**

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

Piracicaba
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Erpen, Lígia

Isolamento e caracterização de promotores de genes constitutivos de *Citrus sinensis* / Lígia Erpen. - - Piracicaba, 2017.

97 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Citros 2. Transformação genética 3. Promotores constitutivos 4. Elementos cis-regulatórios I. Título

**Aos meus pais, Sergio e Marlene e
meus irmãos, Marcos, Natália e Vitor**

Ao meu noivo, Gerson

À minha madrinha, Maria

Por todo apoio e incentivo

Dedico

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos às instituições e pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho.

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela oportunidade de realização do curso de doutorado, ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, por oferecer a estrutura necessária para a realização do projeto e ao Citrus Research and Education Center (CREC) por oferecer toda a estrutura para a realização do estágio sanduíche.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudos.

Agradeço especialmente a minha orientadora, Prof Dra. Beatriz M. J. Mendes pela oportunidade, confiança e orientação na construção dessa tese, que contribuiu de maneira significativa para a minha formação e amadurecimento profissional.

Ao prof. Dr. Francisco de Assis A. Mourão Filho pela solicitude e essencial contribuição na orientação. Agradeço também, ao Dr. Ricardo Harakava pelo constante apoio, disponibilidade e contribuições inestimáveis para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Manjul Dutt pela orientação na condução do projeto durante o valoroso período do estágio sanduíche e da mesma forma ao Dr. Jude W. Grosser por me receber em seu laboratório.

Aos técnicos Liliane Stipp, Renata Cruz e Marcelo Favaretto Correa pelo auxílio durante o desenvolvimento das construções gênicas, nos experimentos de transformação genética e nas análises moleculares.

Aos prestativos funcionários do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ, José, David, Éder e Aparecido, por toda a ajuda na manutenção das plantas da casa-de-vegetação. As secretárias Luciane da ESALQ e Suzineide do CENA pela constante disponibilidade e auxílio. Ao João Geraldo pelo serviço de computação gráfica.

No decorrer dessa jornada fui presenteada com pessoas muito queridas. Quero agradecer aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal - Eveline, Tatiana, Bianca, Carolina, Isabela, Fabiana, Leonardo, Marcelo, Renata, Sylvia, Sandra e Maíra - do Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas - Camilo, Filipi, Meire, Perla, Fabiana, Jessika, Rafael, Gabriel e Liliane - e do CREC/UF - Kyle, Ana, Gary, Aditi, Ethan, Elach, Ahmad, Erick e Elaine. Obrigada pela amizade, companheirismo e pelos momentos compartilhados, que

transformaram a rotina diária de trabalho em períodos agradáveis e produtivos. Obrigada Melina, por ser essa amiga tão especial. Obrigada aos amigos do Programa de Fitotecnia, em especial, Aninha, Felipe e Fabricia, por toda amizade e pelos ótimos momentos que compartilhamos. Obrigada Cristiane, Marzie, Elaine, Shelley, Mayara, Flavia e Aditi pelo carinho, amizade e acolhida em Lake Alfred.

Agradeço aos meus pais e aos meus irmãos por todo amor e torcida e por sempre estar presente, mesmo distante. A minha avó Hirma, meu tio Aquiles e minha madrinha Maria pelo carinho, preocupação e por todas as orações. Agradeço especialmente ao meu noivo Gerson, que esta do meu lado desde a faculdade e com quem eu sou uma pessoa muito melhor. Obrigada por todo amor, incentivo e confiança. Agradeço a todos os meus amigos, e não poderia nomear todos aqui, que são essenciais em minha vida.

Agradeço à Deus, por todas oportunidades e conquistas e, principalmente, por ter colocado todas essas pessoas em minha vida. Muito obrigada!

“Todas as manhãs, a gazela acorda sabendo que tem que correr mais veloz que o leão ou será morta. Todas as manhãs, o leão acorda sabendo que deve correr mais rápido que a gazela ou morrerá de fome. Não importa se você é um leão ou uma gazela: quando o Sol desponta, o melhor é começar a correr”.

Provérbio africano

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. Citricultura no Brasil e no mundo	13
2.2. Transformação genética.....	15
2.3. Promotores para a expressão constitutiva de genes	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1. Identificação e isolamento dos promotores de genes constitutivos de citros	23
3.2. Clonagem dos promotores CsGAPC2, CsEF1 e CsCYC.....	24
3.3. Elaboração das construções gênicas pC2201CsGAPC2/uidA, pC2201CsEF1/uidA e pC2201CsCYC/uidA.....	25
3.4. Transformação genética de <i>C. sinensis</i>	27
3.5. Ensaio histoquímico da atividade β -Glucuronidase em plantas transgênicas de <i>C.</i> <i>sinensis</i>	30
3.6. Análise de Southern blot	31
3.7. Quantificação da expressão do gene <i>uidA</i> por análise de RT-qPCR.....	31
3.8. Caracterização dos elementos cis-regulatórios nos promotores CsGAPC2, CsCYC e CsEF1	34
3.9. Análises de deleção	34
3.9.1. Elaboração das construções gênicas de deleção	34
3.9.2. Expressão transiente em <i>Nicotiana benthamiana</i>	38
3.9.3. Transformação genética de <i>N. benthamiana</i>	39
3.9.4. Ensaio histoquímico da atividade GUS em plantas transgênicas de <i>N. benthamiana</i> ...	41
3.9.5. Ensaio fluorimétrico da atividade GUS em plantas transgênicas de <i>N. benthamiana</i>	41
4. RESULTADOS	43
4.1. Elaboração das construções gênicas.....	43
4.1.1. Construções genéticas pC2201CsGAPC2/uidA.....	43
4.1.2. Construção genética pC2201CsEF1/uidA.....	44
4.1.3. Construção genética pC2201CsCYC/uidA	46
4.2. Transformação genética de <i>C. sinensis</i>	50

4.3. Ensaio histoquímico da atividade GUS em plantas transgênicas de <i>C. sinensis</i>	53
4.4. Análise de Southern blot.....	54
4.5. Quantificação da expressão do gene <i>uidA</i> por análise de RT-qPCR.....	55
4.6. Caracterização dos elementos cis-regulatórios nos promotores CsGAPC2, CsCYC e CsEF1	57
4.7. Análises de deleção	63
4.7.1. Elaboração das construções gênicas de deleção.....	63
4.7.1.1. Construções gênicas de deleção do promotor CsGAPC2.....	63
4.7.1.2. Construções gênicas de deleção do promotor CsCYC	64
4.7.1.3. Construções gênicas de deleção do promotor CsEF1.....	66
4.7.2. Avaliação da expressão transiente e estável do gene <i>uidA</i> em <i>N. benthamiana</i> pelo o ensaio histoquímico e fluorimétrico da atividade GUS	68
5. DISCUSSÃO	75
6. CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS.....	83
ANEXO	96

RESUMO

Isolamento e caracterização de promotores de genes constitutivos de *Citrus sinensis*

A transformação genética é uma alternativa ao melhoramento convencional de citros que permite a modificação de genótipos pela introdução de um ou mais genes oriundos de organismos semelhantes ou filogeneticamente distantes do hospedeiro. Os genes transferidos para espécies de interesse devem ser controlados por promotores, os quais regulam a expressão gênica de forma temporal, espacial e na magnitude desejada. Na maioria dos casos, os genes são expressos de forma constitutiva utilizando o promotor CaMV35S isolado do Vírus do Mosaico da Couve Flor. No entanto, o desenvolvimento de novas abordagens de transformação de plantas (cisgenia e intragenia), que fazem o uso de genes e sequências regulatórias derivadas da mesma espécie ou espécies relacionadas, requer a disponibilidade de elementos genéticos, incluindo promotores constitutivos, isolados de citros. Assim, o objetivo do trabalho foi clonar e caracterizar promotores constitutivos de *Citrus sinensis*. Para isso, a região promotora dos genes Fator de elongação 1- α (CsEF1), Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase C2 (CsGAPC2) e Cyclofilina (CsCYC) foi isolada e avaliados pela fusão ao gene repórter *uidA*. A funcionalidade dos três promotores foi confirmada por ensaio histoquímico da atividade GUS em folhas, caules e raízes de plantas transgênicas de citros cv. 'Hamlin'. A análise de RT-qPCR mostra que a expressão do gene *uidA* sob controle dos promotores CsCYC, CsGAPC2 e CsEF1 correspondeu a uma atividade aproximada de 64%, 58% e 47%, respectivamente em comparação com o promotor CaMV35S. A análise *in silico* dos promotores CsGAPC2, CsCYC e CsEF1 mostra que a atividade de cada um é controlada por uma série de putativos elementos cis-regulatórios. A sequência completa e versões truncadas originadas a partir de deleções em cada promotor foram fundidas ao gene *uidA* e analisadas em plantas transgênicas de *Nicotiana benthamiana* pelo ensaio histoquímico e fluorimétrico da atividade GUS. As análises de deleções não causaram perda de função dos promotores em estudo, mas afetaram a expressão gênica nos promotores CsGAPC2 e CsEF1. Os promotores isolados representam bons candidatos a serem utilizados em trabalhos de transformação genética de citros.

Palavras-chave: Citros; Transformação genética; Promotores constitutivos; Elementos cis-regulatórios

ABSTRACT

Isolation and characterization of constitutive gene promoters from *Citrus sinensis*

Genetic transformation is an alternative to citrus conventional breeding that allows the modification of genotypes by the introduction of one or more genes derived from different organisms that can not be crossed by natural means. The transferred genes to the species of interest are controlled by promoters, which regulate a gene expression temporally, spatially and in the desired magnitude. In most cases, the introduced genes have been constitutively expressed using the CaMV35S promoter obtained from the cauliflower mosaic virus. However, the development of novel plant transformation approaches (cisgenesis and intragenesis) imply the use of genetic material from the same species or from closely related species capable of sexual hybridization, which requires the isolation of genetic elements, including citrus constitutive promoters. The objective of this study was clone and characterize *Citrus sinensis* constitutive promoters. For this, the promoter region of the genes Elongation Factor 1- α (CsEF1), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2 (CsGAPC2) and Cyclophilin (CsCYC) was isolated and evaluated by fusion to the *uidA* reporter gene. The functionality of three promoter was confirmed by histochemical GUS assay in leaves, stems and roots of transgenic citrus plants cv. 'Hamlin'. RT-qPCR analysis revealed that *uidA* gene expression under control of the CsCYC, CsGAPC2 and CsEF1 promoters was approximately 64%, 58% and 47% expression compared with the CaMV35S promoter. *In silico* analysis of the CsGAPC2, CsCYC and CsEF1 promoters displays their activity is controlled by a series of putative cis-regulatory elements. The full length promoter and truncated versions originated from deletions in promoters sequences were fused to the *uidA* gene and analyzed in *Nicotiana benthamiana* transgenic plants by histochemical and fluorimetric GUS assay. Deletion analysis did not cause loss of function on any of the promoters, but affected the gene expression on CsGAPC2 and CsEF1 truncated versions. The isolated promoters represent good candidates to be used in citrus genetic transformation.

Keywords: Citrus; Genetic transformation; Constitutive promoters; Cis-regulatory elements

1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia, utilizando técnicas de transformação genética, tornou-se uma poderosa ferramenta para o melhoramento genético de citros, visto que essa cultura possui características relacionadas à sua biologia reprodutiva que dificultam a adoção dos métodos tradicionais de melhoramento (Singh e Rajam 2009; Febres et al. 2012; Donmez et al. 2013). A transgenia permite a modificação de genótipos, pela introdução de genes no genoma das plantas, os quais podem ser oriundos de organismos semelhantes ou filogeneticamente distantes do hospedeiro, que não poderiam ser transferidos por hibridação sexual (Anami et al. 2013).

Os genes transferidos para espécies de interesse devem ser controlados por promotores, os quais regulam a expressão gênica de forma temporal, espacial e na magnitude desejada. Promotores constitutivos conferem a expressão gênica na maioria dos órgãos/tecidos e em todas as fases de desenvolvimento da planta (Potenza et al. 2004). Até o momento, um limitado número de promotores tem sido utilizado para conferir expressão gênica de forma constitutiva em plantas, sendo a maioria derivados de organismos distantes de plantas, como o promotor nopalina sintetase (NOS), clonado de *Agrobacterium tumefaciens*, e o promotor CaMV35S, clonado do vírus do mosaico da couve-flor (Potenza et al. 2004; Dutt et al. 2014).

Apesar de ser considerada uma vantagem, a inserção no genoma da planta de DNA proveniente de diferentes espécies, gêneros e até mesmo reinos é uma das principais razões da dificuldade de aceitação dos organismos geneticamente modificados. Isso estimulou o desenvolvimento de tecnologias que se assemelham com a transferência de genes por hibridação sexual, como a cisgenia e a intragenia, que fazem o uso de genes e sequências regulatórias derivadas da mesma espécie ou espécies relacionadas à espécie em estudo (Lassen et al. 2002; Holme et al. 2013). Dessa forma, a obtenção de plantas pela cisgenia/intragenia requer disponibilidade de elementos genéticos, como promotores, genes e terminadores, isolados da espécie de interesse.

Promotores isolados de plantas têm sido caracterizados e aplicados em transformação genética. O promotor Ubiquitina-1 isolado de milho (*Zea mays*) (Christensen et al. 1992; Cornejo et al. 1993), assim como o promotor Actina-1 (McElroy et al. 1991; Zhang et al. 1991) isolado de arroz (*Oryza sativa*), são exemplos de promotores constitutivos capazes de conferir elevados níveis de expressão de genes em monocotiledôneas. Outros exemplos são promotores constitutivos isolados de espécies como soja (*Glycine max*) (Chiera et al. 2007;

Hernandez-Garcia et al. 2009), batata (*Solanum tuberosum*) (Garbarino et al. 1995; Rockhold et al. 2008), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) (Wei et al. 2003) e videira (*Vitis vinífera*) (Li et al. 2012). Em citros, só há relatos da caracterização de promotores com atividade específica em tecidos do xilema e do pecíolo (Azevedo et al. 2006b), floema (Singer et al. 2011; Miyata et al. 2012), semente (Nishikawa et al. 2008), flor (Sorkina et al. 2011) e fruto (Endo et al. 2007; Kim et al. 2011; Sorkina et al. 2011) e até o momento não há promotores constitutivos disponíveis, que poderiam substituir o promotor CaMV35S em trabalhos de transformação genética.

Promotores de genes ubíquos são uma fonte importante de novos promotores constitutivos, uma vez que geralmente são genes que desempenham funções celulares básicas e são expressos em todos os tecidos e estádios de desenvolvimento das plantas. Os genes de citros Fator de elongação 1- α (EF1), Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase C2 (GAPC2) e Cyclofilina (CYC), caracterizados como genes ubíquos e de elevada expressão (Mafra et al. 2012), se apresentam, assim, como bons candidatos para o isolamento de promotores constitutivos. Diante disso, o objetivo do trabalho foi isolar e caracterizar os promotores dos genes constitutivos GAPC2, CYC e EF1 de *C. sinensis*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Citricultura no Brasil e no mundo

As principais plantas cítricas utilizadas em plantios comerciais no mundo pertencem, em geral, a três gêneros: *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus* (Davies e Albrigo 1994), com destaque para o gênero *Citrus*. Estudos filogenéticos e taxonômicos indicam que o gênero *Citrus* é composto por apenas três espécies verdadeiras: cidra (*Citrus medica*), tangerina (*Citrus reticulata*) e toranja (*Citrus grandis*), sendo os demais representantes derivados de hibridações entre estas espécies. Também são representantes do gênero os pomelos (*Citrus paradisi*), as laranjas doces (*Citrus sinensis*), os limões (*Citrus limon*), as limas ácidas, como o Tahiti (*Citrus latifolia*) e o Galego (*Citrus aurantiifolia*), e as limas doces, como a lima da Pérsia (*Citrus limettioides*) (Scora 1975; Barrett e Rhodes 1976).

Originários do sul e sudeste da Ásia, incluindo áreas da Austrália e África (Donadio et al. 2005), os citros são atualmente cultivados em regiões tropicais e subtropicais do mundo em uma área de aproximadamente 9.720.762 hectares (FAO 2016). A produção mundial em 2013 foi de, aproximadamente, 136.320.156 toneladas, incluindo laranjas, limões, limas, tangerinas e pomelos. Os três principais produtores são China (32.576.744 toneladas), Brasil (19.734.725 toneladas) e Estados Unidos (10.133.246 toneladas), sendo que a China ocupa o primeiro lugar na produção mundial de tangerinas e o Brasil se destaca como maior produtor mundial de laranjas (FAO 2016).

As plantas cítricas foram introduzidas no Brasil no início da colonização, onde encontraram condições ideais para seu desenvolvimento, expandindo-se por todo o território nacional. A partir da década de 1960, a produção comercial de citros cresceu em função da exportação de suco de laranja e, desde então, é considerada uma das atividades mais importantes do agronegócio brasileiro (Boteon e Neves 2005; AGRIANUAL 2016). Ao longo dos anos, o país se consolidou como o maior produtor mundial de laranja e maior produtor e exportador de suco concentrado de laranja. A produção de laranja, em 2013, alcançou cerca de 17.549.536 toneladas, que representa em média o dobro da produção dos Estados Unidos, segundo maior produtor com 7.574.094 toneladas (FAO 2016).

A produção brasileira de laranja está concentrada na região sudeste, com destaque para o Estado de São Paulo, que detém 425.359 mil hectares de um total de 683.089 mil hectares em todo o Brasil, sendo responsável por 71% da produção nacional. O restante da produção

está concentrada em Minas Gerais (6,1%), Paraná (6,0%), Bahia (6,0%), Sergipe (3,6 %), Rio Grande do Sul (2,2%) e outros estados (5,1%) (AGRIANUAL 2016).

As variedades copa utilizadas nos plantios comerciais brasileiros estão distribuídas em laranjas doces, tangerinas, limões e limas ácidas. As laranjas doces sobressaem-se em comparação aos demais grupos, representando cerca de 2/3 do volume total da produção. Essa produção é praticamente toda destinada à produção de suco de laranja para exportação. As laranjas de mesa, tangerinas, limões e limas ácidas representam 20 a 30% da produção e são destinadas, principalmente, ao mercado interno para atender o consumo *in natura* (Neves et al. 2010; AGRIANUAL 2016).

Apesar do destaque como maior produtor, nos últimos anos, houve uma redução significativa da área cultivada de laranja no estado de São Paulo. Em 2015, a cultura ocupou 683.089 mil hectares, o que representa uma redução de 23% em relação ao ano de 2010. Os principais motivos para essa queda são os altos custos de produção, que comprometem a rentabilidade da cultura, especialmente devido aos maiores gastos com mão de obra e manejo fitossanitário, que se tornou mais intensivo nos últimos anos (AGRIANUAL 2010, 2016).

Os citros são suscetíveis a uma série de doenças causadas por vírus, fungos ou bactérias (Timmer et al. 2000). A leprose dos citros, causada pelo vírus *Citrus leprosis virus* (CiLV), e a tristeza, causada pelo *Citrus tristeza virus* (CTV) são consideradas as principais viroses que afetam os pomares brasileiros. A pinta preta e a podridão floral são causadas pelos fungos *Guignardia citricarpa* (*Phyllosticta citricarpa*) e *Colletotrichum* spp., respectivamente, e a gomose por *Phytophthora* spp. Entre as doenças bacterianas, estão a clorose variegada dos citros (CVC), o cancro cítrico, que têm como agente causal as bactérias *Xylella fastidiosa* e *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, respectivamente, e o Huanglongbing (HLB), considerada, atualmente, a mais destrutiva das doenças (Mattos Junior et al. 2005; da Graça et al. 2016).

O HLB está presente no Brasil desde 2004, quando foi relatado pela primeira vez no Estado de São Paulo, e desde então espalhou-se para as principais áreas produtoras, atingindo também pomares no Paraná e Minas Gerais (Teixeira et al. 2005; Belasque Junior et al. 2009). No Brasil, a doença está associada às bactérias *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) e *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam), que colonizam os vasos do floema da planta. Ambas são transmitidas pelo psílídeo *Diaphorina citri* Kuwayama (Teixeira et al. 2005). O agente causal pode ainda ser transmitido por enxertia de borbulhas contaminadas (Lopes et al. 2009).

HLB é uma das mais complexas doenças dos citros, envolvendo interações entre o patógeno, o vetor, o hospedeiro e o meio ambiente. Plantas infectadas têm produtividade comprometida, frutos menores, com redução do suco e alteração do sabor, culminando com desfolha e morte com a evolução da doença (da Graça et al. 2016). O manejo consiste apenas em medidas de prevenção, como o uso de mudas sadias, controle químico do inseto vetor e a erradicação de plantas sintomáticas. Além disso, a doença afeta todas as espécies e variedades de importância comercial e não há fontes conhecidas de resistência ao HLB, o que torna o controle dessa doença um grande desafio para a citricultura (Belasque Junior et al. 2009; Gottwald 2010). A identificação e incorporação de resistência em cultivares de citros representa uma potencial estratégia para o manejo da doença.

A obtenção de variedades resistentes a doenças utilizando métodos de melhoramento genético convencional é conseguida por hibridação sexual. No entanto, apesar da diversidade genética e da inexistência de barreiras reprodutivas entre algumas espécies de *Citrus* e gêneros afins, o melhoramento genético dos citros apresenta dificuldades. A maioria das espécies possuem elevada heterozigosidade, produzindo assim, descendentes que segregam amplamente para muitos caracteres. A ocorrência de poliembrionia e embriões somáticos possibilita a produção de indivíduos geneticamente idênticos à planta mãe, dificultando a identificação dos indivíduos de origem zigótica. Além disso, a cultura apresenta longa fase juvenil que pode variar de 4 a 12 anos (Soares Filho et al. 2013). O desenvolvimento das técnicas de biotecnologia, a exemplo da transformação genética, representa uma alternativa para colaborar na superação das limitações dos métodos tradicionais de melhoramento de citros, pois permitem a seleção e transferência de genes específicos para genótipos elites sem que haja necessidade de hibridação (Gambino e Gribaudo 2012; Donmez et al. 2013; Van Nocker e Gardiner 2014).

2.2. Transformação genética

A transgenia é uma técnica que permite a modificação de genótipos pela introdução de um ou mais genes, os quais podem ser oriundos de organismos semelhantes ou filogeneticamente distantes do hospedeiro, que não poderiam ser transferidos por hibridação sexual (Visarada et al. 2009; Anami et al. 2013). O estabelecimento de um eficiente sistema de transformação genética para qualquer espécie envolve basicamente três etapas: identificação, isolamento e introdução de DNA exógeno na célula, seleção e divisão das

células transformadas, e o estabelecimento de um sistema simples e eficiente de regeneração de plantas a partir destas células (Brasileiro e Dusi 1999; Anami et al. 2013).

O DNA exógeno identificado e isolado deve ser associado a vetores de expressão para a introdução nas células vegetais. Os vetores de expressão devem conter basicamente três elementos: o promotor, responsável por regular a expressão gênica, o gene, que codifica a proteína de interesse, e o terminador, que determina o final do processo de transcrição (Anami et al. 2013). Para selecionar as células transformadas, além do gene de interesse, deve-se inserir um gene de seleção, que confere às células transformadas resistência a agentes seletivos, como antibióticos ou herbicidas. Genes repórter também podem ser inseridos, pois codificam proteínas de atividade enzimática cujo produto é facilmente detectável, e assim facilitam identificação da transgenia (Brasileiro e Carneiro 1998).

O vetor de expressão é introduzido na planta através de técnicas de transferência direta ou indireta de DNA. A primeira utiliza processos físicos, como a eletroporação de protoplastos e o bombardeamento de partículas (Brasileiro e Dusi 1999). A segunda utiliza um vetor para promover a transferência de DNA exógeno, a exemplo do co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens* (Lee e Gelvin 2007). Após a transferência do DNA exógeno, a obtenção de uma planta transgênica depende da habilidade de regeneração da célula transformada, por meio de técnicas de cultura de tecidos *in vitro*.

Plantas transgênicas de um grande número de espécies foram produzidas nos últimos anos utilizando uma vasta gama de genes e promotores (Gomez-Lim e Litz 2004; Gambino e Griboaldo 2012; Ji et al. 2013). De acordo com o tipo de regulação da expressão gênica, os promotores usualmente empregados podem ser classificados em três tipos: promotores constitutivos, que conferem expressão na maioria dos órgãos/tecidos e em todas as fases de desenvolvimento da planta; promotores espaço-temporais específicos, que conferem expressão em determinado órgão/tecido ou em determinada fase de desenvolvimento; e promotores induzíveis, regulados por sinais físicos ou químicos externos (Potenza et al. 2004; Dutt et al. 2014). Na maioria dos estudos, os genes introduzidos são controlados por promotores constitutivos, sendo usualmente empregado o promotor do gene que codifica a nopalina sintetase (NOS), isolado de *A. tumefaciens* (Bevan et al. 1983), e o promotor CaMV35S, clonado do vírus do mosaico da couve-flor (Odell et al. 1985; Benfey e Chua 1990).

Em citros, o primeiro trabalho envolvendo transformação genética foi divulgado em 1989, quando foi relatada a introdução direta de DNA em protoplastos de laranja doce ‘Trovita’ (*C. sinensis*), via polietilenoglicol (PEG) (Kobayashi e Uchimiya 1989). Desde

então, foram estabelecidos protocolos eficientes de transformação genética para várias espécies de citros utilizando-se principalmente o sistema *A. tumefaciens* para a transferência do transgene (Bond e Roose 1998; Almeida et al. 2002; Molinari et al. 2004a; Dutt e Grosser 2009). Esses avanços permitiram a obtenção de plantas transgênicas buscando características como precocidade de produção (Peña et al. 2001), resistência à salinidade (Cervera et al. 2000), tolerância ao déficit hídrico. (Molinari et al. 2004b), produção de frutos com menor número de sementes (Koltunow et al. 2000) e resistência a diferentes patógenos (Azevedo et al. 2006b; Boscariol et al. 2006; Barbosa-Mendes et al. 2009; Cardoso et al. 2010; Mendes et al. 2010; Dutt et al. 2015).

Na maioria dos trabalhos citados, os transgenes estão sob controle do promotor constitutivo CaMV35S. Poucos exemplos podem ser citados como exceção, como é o caso do uso do promotor induzido pelo patógeno *GlutathioneS-transferase-1* (Gst1), associado ao gene *hrpN* para obtenção de plantas transgênicas de laranja ‘Hamlin’ com resistência ao cancro cítrico (Barbosa-Mendes et al. 2009). Outro exemplo é o uso do promotor *Arabidopsis thaliana sucrose transporter-2* (AtSUC2), caracterizado por direcionar a expressão gênica ao floema. Esse promotor foi utilizado em associação ao gene da atacina A (Tavano et al. 2015) e ao gene NPR1 (Dutt et al. 2015) para a obtenção de plantas de laranja doce visando a tolerância ao HLB.

Apesar de ser considerada uma vantagem, a inserção artificial em plantas de DNA proveniente de bactérias, fungos, vírus ou até mesmo de outras plantas de diferentes espécies e gêneros, é uma das principais razões da dificuldade de aceitação dos organismos geneticamente modificados pelos consumidores (Lassen et al. 2002; Shelton et al. 2002; Holme et al. 2013). Para contornar esse problema, duas novas abordagens de trabalho, denominadas cisgenia e intragenia tem sido propostas como alternativa a transgenia (Devi et al. 2013; Espinoza et al. 2013; Holme et al. 2013).

A cisgenia e intragenia usam técnicas de transformação genética para introduzir novos genes (como transgenia), mas implicam no uso de material genético derivado da mesma espécie ou espécies relacionadas à espécie em estudo, capazes de hibridizar naturalmente, excluindo-se qualquer introdução de DNA não vegetal (Devi et al. 2013; Espinoza et al. 2013; Holme et al. 2013). Na cisgenia, o gene a ser inserido no genoma de interesse deve ser uma cópia idêntica do gene endógeno, incluindo os introns, o promotor e o terminador (Schouten et al. 2006; Jacobsen e Schouten 2009). No caso da intragenia, as regiões regulatórias (promotor e terminador) podem ter diferentes origens dentro da espécie ou de espécies relacionadas, permitindo uma combinação de elementos genéticos (Rommens 2004). A

adoção dessas técnicas requer a disponibilidade de promotores isolados da espécie de interesse para obtenção de plantas geneticamente modificadas.

2.3. Promotores para a expressão constitutiva de genes

Em eucariontes, a transcrição é um processo determinante no controle da expressão gênica, o que é regulada por sequências específicas de DNA denominadas promotores (Wray et al. 2003). O promotor compreende a região 5' não transcrita de um gene e contém os sítios de ligação para os complexos protéicos da RNA polimerase, enzima responsável pela transcrição gênica (Porto et al. 2014). A transcrição é o processo de formação de uma molécula de RNA usando como molde a sequência de DNA de um gene. O processo inicia com a associação prévia das proteínas, fatores gerais de transcrição, à região promotora do gene a ser transcrito seguido do reconhecimento e ligação da RNA polimerase II. A RNA polimerase II, ligada à região promotora, se desloca pela molécula de DNA adicionando os nucleotídeos complementares para formar a sequência de RNA. O processo é finalizado quando a RNA polimerase II reconhece uma sequência de terminação específica. O RNA formado carrega a informação genética necessária para a síntese protéica, que ocorre durante o processo de tradução (Phillips 2008).

O promotor possui uma região proximal denominada promotor-núcleo que está situada próxima ao sítio de início da transcrição. O promotor-núcleo é a região mínima necessária para o correto posicionamento da maquinária transcricional, composta pela RNA polimerase e suas proteínas acessórias. Em geral, o promotor-núcleo pode se localizar numa região que se estende por 35 pares de bases adjacente ao sítio de início da transcrição. Nessa região, normalmente são encontrados motivos como TATA-box, onde se liga a TATA-binding protein (TBP), que faz parte do complexo protéico que define o início da transcrição na maioria dos genes (Butler e Kadonaga 2002).

Elementos cis-regulatórios, encontrados em regiões a montante do promotor-núcleo, a centenas ou milhares de pares de base de distância do gene que controlam, mostram-se necessários para a máxima ativação da transcrição de um gene. Os elementos cis-regulatórios permitem a ligação de proteínas regulatórias ativadoras ou repressoras, denominadas fatores de transcrição, responsáveis por modular os níveis da transcrição. Os fatores de transcrição podem ser ativados por diversos estímulos tais como hormônios endógenos (auxinas, giberilinas, ácido salicílico, dentre outros) e fatores exógenos (luz, pressão, umidade e temperatura), sendo que muitos são célula-específicos (Hernandez-Garcia e Finer 2014; Bilas

et al. 2016). De maneira geral, uma transcrição baseada somente no promotor-núcleo produzirá baixas taxas de transcrição. Para se atingir taxas de transcrição significativas, são necessárias associações específicas de fatores de transcrição aos elementos cis-regulatórios presentes fora do promotor-núcleo (Lemon e Tjian 2000). A presença dos diferentes elementos cis-regulatórios combinada com a interação com os fatores de transcrição contribui para o perfil de expressão de um gene, direcionando a transcrição temporal e espacial apropriada (Hernandez-Garcia e Finer 2014; Porto et al. 2014; Bilas et al. 2016).

Outro fator que contribui para a regulação da expressão gênica em eucariontes é a região 5' não traduzida (UTR) dos genes, uma região regulatória situada na extremidade 5' de todos os genes codificadores de proteínas que é transcrita em RNA mensageiro mas não traduzida em proteína (Barrett et al. 2012). Em alguns genes, a região 5'UTR pode conter íntrons, caracterizados por ter um efeito positivo na expressão gênica (Le Hir et al. 2003). Muitos íntrons que interferem na expressão gênica aumentam os níveis de RNA por um mecanismo pouco entendido, denominado *intron-mediated enhancement* (IME), uma interação que ocorre entre a maquinária transcricional do gene e o *splicing* do íntron durante o processamento de RNA (Gallegos e Rose 2015). Além disso, o íntron pode conter elementos regulatórios que atuam como *enhancers* na região promotora (Gidekel et al. 1996; Stark et al. 2001). A importância do íntron na expressão de muitos genes foi demonstrada em diversos trabalhos pela sua remoção ou inserção em regiões promotoras (Suhandono et al. 2001; Sivamani e Qu 2006; Emami et al. 2013; De La Torre e Finer 2015).

Os promotores possuem os componentes fundamentais para o controle da transcrição e constituem, portanto, uma ferramenta chave na regulação da expressão do gene de interesse num modelo temporal, espacial e na magnitude adequada. O sucesso da tecnologia de transformação genética, desde a pesquisa básica até o desenvolvimento de novas cultivares depende da correta seleção e uso de promotores para o propósito desejado (Potenza et al. 2004; Porto et al. 2014).

Os promotores constitutivos determinam a expressão gênica em todos os órgãos e em todas as fases de desenvolvimento da planta (Potenza et al. 2004). Como anteriormente exposto, o promotor CaMV35S é o mais utilizado na produção de plantas geneticamente modificadas, e está presente em mais de 80% das construções gênicas utilizadas para esse fim (Hull et al. 2000). O vírus do mosaico da couve-flor apresenta um genoma pequeno e circular de fita dupla que se replica no citoplasma das células vegetais por transcrição reversa. A replicação é iniciada pela síntese de um RNA sob o controle do promotor viral, que interage com a RNA polimerase II da planta, sem a necessidade de fatores de transcrição virais. O

genoma do vírus geralmente contém dois promotores, um para uma transcrição subgenômica e outro para a transcrição do genoma inteiro, que é o conhecido promotor CaMV35S (Hull e Covey 1983).

O promotor CaMV35S, possui um domínio a jusante (-90 a +8), denominado domínio A, que confere expressão em tecidos de raiz e um domínio a montante (-343 a -90), denominado domínio B, que contém cerca de cinco subdomínios que conferem padrões de expressão diferentes, quando fundidos com o domínio A. A duplicação e a combinação dos domínios A e B têm fornecido uma série de versões do promotor CaMV35S com atividade mais forte, como por exemplo, o promotor CaMV35S duplicado (Benfey et al. 1989; Benfey et al. 1990; Benfey e Chua 1990).

O sequenciamento do genoma de várias espécies de plantas levou à identificação de uma série de promotores constitutivos de origem vegetal. Muitos destes promotores são derivados de genes da ubiquitina e actina. O promotor Ubiquitina-1 isolado de milho (*Zea mays*) (Christensen et al. 1992; Cornejo et al. 1993) assim como os promotores Actina-1 (McElroy et al. 1991; Zhang et al. 1991), Actina-2 (He et al. 2009), Ubiquitina-1 e Ubiquitina-2 (Wang e Oard 2003; Bhattacharyya et al. 2012) isolados de arroz (*Oryza sativa*) são bastante utilizados em transformação genética de monocotiledôneas (Shrawat e Lörz 2006). Além disso, promotores desses genes foram isolados e caracterizados em soja (*Glycine max*) (Chiera et al. 2007; Hernandez-Garcia et al. 2009), batata (*Solanum tuberosum*) (Garbarino et al. 1995; Rockhold et al. 2008), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) (Wei et al. 2003) e videira (*Vitis vinífera*) (Li et al. 2012). Outros promotores constitutivos com um grande potencial em biotecnologia de plantas foram identificados nos genes MtHP, isolado de *Medicago truncatula* (Xiao et al. 2005), 60S ribossomal ácida P1 (ARP1), Histona H2B.3 (H2BF3), Histona H3.3 (H3F3) e Proteína de choque térmico (HSP) isolados de arroz (Bang et al. 2015). Estes promotores apresentam níveis elevados de expressão constitutiva e tornam-se uma alternativa para o uso do promotor CaMV35S na transformação genética de plantas.

Em citros, não há relatos de isolamento e caracterização de promotores constitutivos. No entanto, são descritos vários promotores com atividade específica. O promotor do gene da fenilalanina amônialiase de *C. sinensis* (CsPP) controla a expressão preferencialmente em tecidos do xilema e do pecíolo (Azevedo et al. 2006a). Os promotores dos genes de *C. sinensis*, proteína do floema - 2 (CsPP2) (Miyata et al. 2012) e sacarose sintase-1 (CsSUS1) (Singer et al. 2011) direcionam a expressão preferencialmente no floema. O promotor *Citrus unshiu* FT/TFL1 (CuMFT1) direciona a expressão gênica preferencialmente na semente (Nishikawa et al. 2008). O promotor de *C. limon* isolado de um gene sem função conhecida

(Cl111) direciona a expressão gênica no fruto e na flor (Sorkina et al. 2011). Da mesma forma, os promotores isolados de *C. unshiu*, Metalotioneína-3 (CitMT45) (Endo et al. 2007) e da proteína abundante de embriogênese- 5 (CuLea) (Kim et al. 2011) direcionaram expressão gênica preferencialmente em vagens de *Arabidopsis*.

Promotores de genes ubíquos são uma fonte importante de novos promotores constitutivos, uma vez que geralmente são genes constitutivos que desempenham funções celulares básicas e, portanto, são expressos em todos os tecidos e estádios de desenvolvimento. Para citros, estão disponíveis na literatura trabalhos que identificam genes de expressão constitutiva para serem usados como genes de referência na análise de RT-qPCR. No trabalho de Mafra et al. (2012), entre os genes estudados, destacam-se pela forte expressão os genes Fator de elongação 1- α (EF1), Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase C2 (GAPC2) e Cyclofilina (CYC).

As proteínas EF1 desempenham um papel central no processo de síntese de proteínas, catalizando a ligação do aminoacyl-tRNA ao ribossomo durante o processo de tradução (Andersen et al. 2003). As proteínas EF1 constituem cerca de 3 - 10% do total de proteína solúvel, sendo considerada uma das mais abundantes proteínas solúveis no citoplasma (Merrick 1992). Os genes que codificam as proteínas EF1 geralmente são altamente expressos em todos os tecidos em desenvolvimento e seus promotores já foram isolados e caracterizados para mandioca (*Manihot esculenta*) (Suhandono et al. 2001; Suhandono et al. 2014), *Arabidopsis thaliana* (Curie et al. 1991; Curie et al. 1993), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) (Yang et al. 2003), braquipódio (*Brachypodium distachyon*) (Coussens et al. 2012) e soja (*Glycine max*) (Zhang et al. 2015).

A proteína Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) é uma enzima chave no metabolismo do carbono. As plantas possuem dois tipos de proteínas GAPDH, a citosólica e a cloroplástica. A GAPDH citosólica está envolvida na via glicolítica e é geralmente representada por duas isoformas (GAPC1 e GAPC2) (Rius et al. 2008; Muñoz-Bertomeu et al. 2009). Em *Arabidopsis*, os transcritos dos genes GAPC1 e GAPC2 foram detectados em todos os órgãos da planta, raízes, folhas, caules, flores e vagens (Muñoz-Bertomeu et al. 2009). Em milho, GAPC é composta por uma família gênica constituída pelos genes GAPC1, GAPC2, GAPC3 e GAPC4. A expressão dos genes GAPC3 e GAPC4 foram detectados em raízes em condições anaeróbicas. Em contraste, os genes GAPC1 e GAPC2 apresentaram expressão constitutiva (Manjunath e Sachs 1997).

As proteínas CYC são proteínas ubíquas, presentes em todos os compartimentos subcelulares (Galat 1999). Estas proteínas estão envolvidas em uma ampla variedade de

processos celulares como o enovelamento, maturação e tráfego de proteínas, processamento de RNA e transdução de sinais. Não há evidências de trabalhos que caracterizam a região promotora de genes CYC, embora a caracterização da expressão desses genes em *Arabidopsis* mostre expressão constitutiva para a maioria deles (Romano et al. 2004).

A busca por promotores constitutivos representa uma importante ferramenta biotecnológica, principalmente com o objetivo de gerar alternativas ao uso do promotor CaMV35S, utilizado na maioria dos trabalhos de transformação genética de citros. Diante disso, os genes descritos acima se apresentam como bons candidatos para o estudo de promotores constitutivos em citros.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), e no Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), ambos da Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba, São Paulo. A caracterização das sequências regulatórias e análises de deleção, para cada promotor, foram realizadas no Citrus Research and Education Center (CREC), da Universidade da Florida (UF), em Lake Alfred, Florida, Estados Unidos da América.

3.1 Identificação e isolamento dos promotores de genes constitutivos de citros

A sequência genômica dos genes Fator de elongação 1- α (EF1), Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase C2 (GAPC2) e Cyclofilina (CYC), de *C. sinensis*, (Cs) foram identificadas no banco de dados Phytozome (Tabela 1).

Tabela 1. Número de acesso dos genes constitutivos de *C. sinensis* selecionados no banco de dados Phytozome.

Gene	Abreviação	Acesso Phytozome
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase C2	GAPC2	orange1.1g019445m.g
Fator de elongação 1- α	EF1	orange1.1g013237m.g
Cyclofilina	CYC	orange1.1g030245m.g

A sequência a montante da região codificadora de cada gene (ATG) foi identificada e toda a região regulatória, incluindo a região 5'UTR, foi isolada. Para isso, foram desenhados primers específicos para cada uma das sequências promotoras, sendo um deles posicionado a montante e adjacente ao início da região codificadora do gene (primer reverse) e o outro posicionado cerca de 1000 - 1300 pb anteriores ao início da região codificadora (primer forward). Na extremidade 5' de cada um desses primers foi adicionado um sítio para uma enzima de restrição, a fim de permitir a inserção direcional do fragmento do promotor no vetor de expressão (Tabela 2).

Tabela 2. Sequência dos primers utilizados para a amplificação do promotor dos genes em estudo, com o respectivo tamanho do amplicon e temperatura de anelamento.

Primer	Sequência	Amplicon (pb)	Temperatura anelamento (°C)
GAPC2-F	5' AAGCTT GAACACAACCTGACAAGA 3' [*]	1090	51 °C
GAPC2-R	5' ACATGT ATATTATCGAAAATGAGAAAG 3'		
CYC-F	5' AAGCTT ACGCACTAGCAACTCCTAATACTG 3'	1036	59 °C
CYC-R	5' ACATGT TTGATTGGTTGATTGGTTGATTGG 3'		
EF1- F	5' AAGCTT CTCACATCAAGGTAGGGTCC 3'	1355	64 °C
EF1- R	5' CCATGG TAAAGTATTTGCTTAAACTGTATCC 3'		

* O sítio de restrição da enzima *Hind*III (AAGCTT, destacado em vermelho) foi adicionado aos primers Forward (F) e das enzimas *Nco*I (CCATGG, destacado em verde) e *Psc*I (ACATGT, destacado em azul) foram adicionados aos primers Reverse (R). As extremidades geradas pela digestão com as enzimas *Nco*I e *Psc*I são compatíveis.

3.2 Clonagem dos promotores CsGAPC2, CsEF1 e CsCYC

Os promotores de interesse foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR), com primers específicos para cada promotor (Tabela 2), a partir de DNA genômico de *C. sinensis* cv. 'Hamlin', extraído pelo método CTAB (Doyle e Doyle 1990). A reação de PCR foi realizada utilizando-se o Kit Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, EUA), para amplificação do promotor CsGAPC2, e o Kit Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA), para amplificação dos promotores CsCYC e CsEF1. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose (1%), em tampão TAE, contendo brometo de etídio (0,1%), e visualizados sob luz ultravioleta. Os fragmentos isolados foram extraídos do gel e purificados (QIAEX II Gel Extraction Kit- QIAGEN, Hilden, Alemanha).

O promotor CsGAPC2 foi clonado no vetor pGEM-T (Promega, Madison, EUA) e os promotores CsCYC e CsEF1 foram clonados no vetor pJET1.2 (Thermo Fisher Scientific). A ligação de cada inserto ao vetor de clonagem foi realizada utilizando-se tampão de reação (10X) e a enzima T4 DNA ligase, segundo recomendações de cada fabricante. A ligação precipitada (3 µL) foi utilizada na transformação genética de células de *E. coli* DH5α, por eletroporação. As células transformadas foram recuperadas pelo cultivo em meio de cultura SOC (Invitrogen; 37 °C, 1 h, 170 rpm). A suspensão bacteriana foi plaqueada em meio de cultura YEP, suplementado com ampicilina (100 mg L⁻¹), para seleção dos plasmídeos recombinantes.

Para a confirmação da presença do inserto no vetor, o DNA plasmidial de cinco colônias brancas de *E. coli* foi extraído, em cada experimento (Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System Kit - Promega) e submetido à reação de digestão com as enzimas de restrição *HindIII/PscI* e *NcoI* (CsGAPC2 e CsCYC) e *HindIII/NcoI* (CsEF1) (37 °C; 1 h). A confirmação da transformação genética também foi feita por PCR, com primers específicos para identificação de cada promotor (Tabela 2).

Após a clonagem, as regiões promotoras foram sequenciadas no Laboratório de Biologia Molecular e Genômica, do Centro de Biotecnologia Agrícola (CBTEC), da USP, em Piracicaba – SP, utilizando-se primers específicos dos vetores pGEM-T e pJET1.2. O contig resultante foi alinhado com a sequência depositada no banco de dados Phytozome para confirmar identidade da sequência amplificada. O alinhamento foi realizado com auxílio do programa MultiAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/>).

3.3 Elaboração das construções gênicas pC2201CsGAPC2/*uidA*, pC2201CsEF1/*uidA* e pC2201CsCYC/*uidA*

Os promotores clonados foram inseridos no vetor binário pCAMBIA2201, em substituição ao promotor CaMV35S, de maneira a controlar a expressão do gene *uidA*, que codifica a enzima β -Glucuronidase (GUS). Foi necessário realizar uma clonagem intermediária no plasmídeo pCAMBIA1201, pois a enzima *NcoI*, utilizada para a retirada do promotor CaMV35S, também possui um sítio de restrição para o gene *nptII*, que codifica a enzima neomicina fosfotransferase II e confere resistência ao antibiótico canamicina. Este gene não está presente no vetor pCAMBIA1201 (Figura 1).

Os promotores clonados foram inicialmente transferidos para o plasmídeo pCAMBIA1201, em substituição ao promotor CaMV35S. Para isso, os promotores CsCYC e CsEF1, foram isolados do vetor pJET1.2, com as enzimas *HindIII/PscI* e *HindIII/NcoI* (37 °C; 1 h), respectivamente, e o promotor CsGAPC2 isolado do vetor pGEM-T com as enzimas *HindIII/PscI* (37 °C; 1 h). Os promotores extraídos foram ligados ao vetor pCAMBIA1201, digerido com as enzimas *HindIII/NcoI* para a retirada do promotor CaMV35S (37 °C; 1 h). Os fragmentos foram separados por eletroforese, visualizados sob luz ultravioleta, isolados e purificados. A reação de ligação foi realizada utilizando-se tampão de reação (10X), aproximadamente 20 ng de vetor, 100 ng de inserto e 3U da enzima T4 DNA ligase (Promega), segundo recomendações do fabricante (16 °C; 16 h). A transformação genética de células de *E. coli* foi realizada conforme descrito no item 3.2. A suspensão bacteriana foi

plaqueada em meio de cultura YEP, suplementado com cloranfenicol (25 mg L^{-1}) para seleção dos plasmídeos recombinantes.

A confirmação dos plasmídeos recombinantes foi feita pela extração de DNA plasmidial e digestão com as enzimas de restrição *EcoRI/BstEII* (37°C ; 1 h). O plasmídeo pCAMBIA1201 foi utilizado como controle, para a comparação do padrão de digestão em relação aos plasmídeos recombinantes.

O fragmento correspondente ao promotor e o gene *uidA* nos plasmídeos recombinantes foi transferido para o plasmídeo pCAMBIA2201, em substituição ao promotor CaMV35S e o gene *uidA* (Figura 1). Para isso, os plasmídeos recombinantes foram digeridos com as enzimas *EcoRI/BstEII* (37°C ; 1 h), liberando um fragmento referente ao promotor fusionado ao gene *uidA*. Este fragmento foi ligado ao vetor binário pCAMBIA2201, digerido com as mesmas enzimas para a retirada do CaMV35S e o gene *uidA*. As etapas posteriores de purificação, ligação e transformação genética foram realizadas conforme descrito anteriormente.

A confirmação dos plasmídeos recombinantes foi realizada pela extração de DNA plasmidial e digestão com as mesmas enzimas descritas na avaliação dos plasmídeos recombinantes em pCAMBIA1201. O plasmídeo pCAMBIA2201 foi utilizado como controle para a comparação do padrão de digestão em relação aos plasmídeos recombinantes. Os plasmídeos que apresentaram o padrão de digestão esperado foram sequenciados, com primers específicos para detecção de cada promotor (Tabela 2), para verificar a identidade do fragmento clonado.

Os vetores de expressão elaborados e o vetor pCAMBIA2201, denominado pC2201CaMV35S/*uidA*, foram introduzidos em *Agrobacterium tumefaciens*, estirpe EHA105, pelo método do choque térmico (Brasileiro e Carneiro 1998). A confirmação da introdução dos vetores em *A. tumefaciens* foi realizada pela extração de DNA plasmidial e digestão com as mesmas enzimas descritas na avaliação dos plasmídeos recombinantes em pCAMBIA2201. As colônias de *A. tumefaciens* contendo os respectivos plasmídeos foram armazenadas (-80°C) em solução contendo glicerol (50%) e meio de cultura YEP líquido, suplementado com canamicina (100 mg L^{-1}) e rifampicina (25 mg L^{-1}).

Figura 1. Vetores pCAMBIA utilizados para elaboração das construções gênicas. A) pCAMBIA1201: gene *uidA* dirigido pelo promotor CaMV35S e gene *hptII* que confere resistência ao antibiótico higromicina, dirigido pelo promotor CaMV35S duplicado. B) pCAMBIA2201: gene *uidA* dirigido pelo promotor CaMV35S e gene *nptII* que confere resistência ao antibiótico canamicina, dirigido pelo promotor CaMV35S duplicado. 35S-3': terminador; NOS-3': terminador nopalina sintase. LB: borda esquerda. RB: borda direita.

3.4 Transformação genética de *C. sinensis*

Foram realizados experimentos de transformação genética de *C. sinensis* cv. 'Hamlin', utilizando-se como explante segmentos de epicótilo. Para obtenção dos explantes, sementes extraídas de frutos maduros, oriundos da Empresa Citrograf, localizada em Rio Claro/SP, foram germinadas *in vitro*. Inicialmente as sementes foram lavadas para a retirada da mucilagem e secas à temperatura ambiente. Posteriormente, foi realizada a retirada do tegumento e desinfestação em solução de hipoclorito de sódio (2,5%) e água na proporção de 1:2, durante 15 min, sob agitação constante, seguida da tríplice lavagem com água destilada estéril. As sementes foram introduzidas em tubo de ensaio (25 x 150 mm), contendo meio de cultura MS (Murashige e Skoog 1962), suplementado com sacarose (30 g L⁻¹), phytigel (2 g L⁻¹) e pH ajustado para 5,8 (Figura 2A). A incubação foi realizada em ausência de luz (27 °C; 30 – 50 d) para germinação e alongamento do epicótilo (Figura 2B). As plântulas obtidas foram transferidas para condições de fotoperíodo de 16 h de luz (27 °C; 20 d) (Figura 2C) e utilizadas para obtenção dos explantes, segmentos de epicótilo (0,8 - 1,0 cm) (Figura 2D-E).

Em cada experimento de transformação genética, colônias de *A. tumefaciens*, contendo as construções gênicas elaboradas, foram cultivadas isoladamente em meio de cultura YEP sólido, acrescido dos antibióticos canamicina (100 mg L⁻¹) e rifampicina (50 mg L⁻¹), em ausência de luz (28 °C; 3d). Após esse período, uma colônia da bactéria foi transferida para frasco erlenmeyer, contendo meio de cultura YEP líquido (50 ml), suplementado com os

mesmos antibióticos (28 °C; 16 h; 180 rpm). A absorbância da suspensão bacteriana foi determinada em espectrofotômetro ($\lambda = 600$ nm) até atingir o valor 0,5, quando a suspensão bacteriana foi centrifugada (15 °C; 15 min; 4800 rpm). O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em meio de cultura MS líquido em volume adequado para obter concentração de 5×10^8 UFC mL⁻¹.

Figura 2. Obtenção de plântulas *in vitro* de *C. sinensis* para a coleta de explantes para transformação genética. A) Sementes introduzidas no meio de cultura MS, incubadas em ausência de luz. B) Plântula estiolada, pronta para ser transferida para fotoperíodo de 16 h de luz. C - D) Plântula em estágio para a retirada dos explantes. E) Obtenção dos explantes, segmentos de epicótilo (0,8 - 1,0 cm).

Os explantes foram inoculados com a suspensão bacteriana (15 min) e secos em papel de filtro estéril para retirar o excesso de bactéria. Após a inoculação, os explantes foram transferidos para meio de co-cultivo, constituído do meio de cultura MT sólido (25 ml) (Murashige e Tucker 1969), acrescido de sacarose (30 g L⁻¹), benzilaminopurina (BAP; 1 mg L⁻¹) e pH ajustado para 5,8. Os explantes foram incubados em ausência de luz (24 °C; 2 d).

Após o período de co-cultivo (2 d), os explantes foram transferidos para meio de seleção e regeneração, constituído do meio de cultura MT sólido (25 ml) suplementado com sacarose (30 g L⁻¹), BAP (1,0 mg L⁻¹), canamicina (100 mg L⁻¹), para seleção dos explantes transformados, e cefotaxima sódica (500 mg L⁻¹), para controle do crescimento da *A.*

tumefaciens, e pH ajustado para 5,8. Os explantes foram incubados em ausência de luz por 30 - 45 dias (28 °C). A cada 15 dias, os explantes foram transferidos para meio de cultura fresco.

As gemas adventícias desenvolvidas foram transferidas para condições de fotoperíodo de 16 h (27 ± 2°C) e quando atingiram cerca de 1 cm foram transferidas para meio de cultura de enraizamento, constituído de meio de cultura MS sólido, suplementado com sacarose (30 g L⁻¹), ácido naftaleno acético (NAA; 0,5 mg L⁻¹) e ácido indol-butírico (IBA; 0,5 mg L⁻¹), e pH ajustado para 5,8. O enraizamento das gemas foi realizado para verificar a expressão do gene *uidA* nas raízes das plantas, assim como, para estimular o crescimento e aumentar o vigor das plantas, facilitando a enxertia *in vitro*.

Antes da enxertia, a identificação das plantas transgênicas foi realizada pelo ensaio histoquímico da atividade GUS. As plantas que apresentaram reação GUS positiva (coloração azul) foram enxertadas *in vitro* em plântulas de citrange ‘Carrizo’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.]. Os porta-enxertos foram germinados *in vitro* e tiveram a gema apical, os cotilédones e o excesso de raiz removidos. As plantas a serem enxertadas tiveram a extremidade cortada em bisel, para auxiliar no encaixe na região apical superior do porta-enxerto. O material enxertado foi transferido para tubos de ensaio contendo meio de cultura MS líquido, suplementado com sacarose (30 g L⁻¹), e incubado nas mesmas condições citadas anteriormente, para pegamento da enxertia e desenvolvimento das plantas.

As plantas desenvolvidas foram removidas dos tubos de ensaio e transferidas para vasos plásticos contendo substrato (Multiplant 1075 Citros, Terra do Paraíso, Holambra, Brasil) e mantidas em câmara úmida. Durante o processo de aclimatização foi realizada remoção diária da cobertura plástica por um curto período (15 min). Este processo foi repetido todos os dias, aumentando gradualmente a duração do período sem cobertura plástica, por aproximadamente 30 dias, até a aclimatização das plantas.

A transgenia foi verificada por PCR a partir de DNA genômico extraído das plantas pelo método CTAB (Doyle e Doyle 1990). Foram utilizados primers específicos para detecção de um fragmento correspondente ao promotor fusionado ao gene *uidA*. O primer forward foi posicionado dentro da região promotora e o primer reverse dentro da região codificadora do gene *uidA* (Tabela 3). Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose (1%), em tampão TAE (1X), contendo brometo de etídio (0,1%) e visualizados sob luz ultravioleta.

Tabela 3. Sequência dos primers utilizados para a amplificação de fragmentos contendo parte de cada promotor fusionado ao gene *uidA*, com o respectivo tamanho do amplicon e temperatura de anelamento.

Primer	Sequência	Amplicon (pb)	Temperatura de anelamento (°C)
GAPC2 - F	5'GGCGTTCTTCTATTCTTTGTTG 3'	1076	60
<i>uidA</i> - R	5'CTTTGCCGTAATGAGTGACC 3'		
CYC - F	5'ACCGCTCCATCCCCTATTT 3'	758	60
<i>uidA</i> - R2	5'CTGCCAGTTCAGTTCGTTGT 3'		
EF1 - F	5'TGTGTTTCGTTGTTTTGATGTAGT 3'	1434	64
<i>uidA</i> - R2	5'CTGCCAGTTCAGTTCGTTGT 3'		
35S - F	5'CTACAAATGCCATCATTGC 3'	897	61
<i>uidA</i> - R2	5'CTGCCAGTTCAGTTCGTTGT 3'		

F = forward; R = reverse

3.5 Ensaio histoquímico da atividade β -Glucuronidase em plantas transgênicas de *C. sinensis*

O ensaio histoquímico para detecção da atividade β -Glucuronidase (GUS) baseia-se na clivagem do substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucuronida (X-GLUC) por GUS, enzima codificada pelo gene *uidA*. O produto dessa reação resulta em um precipitado insolúvel de coloração azul (Brasileiro e Carneiro 1998).

O ensaio foi utilizado inicialmente para identificação da transgenia e também para verificar o padrão da expressão do gene *uidA* em diferentes partes da planta. Para isso, segmentos de tecido foliar, radicular e de caule de plantas contendo as construções gênicas elaboradas e uma planta não transgênica (controle negativo) foram imersos em solução de X-GLUC.

Para o preparo da solução, o substrato X-GLUC foi dissolvido em DMSO e diluído em solução tampão (100 mM Tris-HCL, pH 7,0; 50 mM Cloreto de sódio; 0,5 mM Ferricianeto de potássio, pH 7,0; 0,5 mM Ferrocianeto de potássio, pH 7,0; 0,01% Triton X-100). As amostras foram incubadas à temperatura de 37 °C, em ausência de luz, por 16 h. Após este período, o material foi lavado com álcool etílico (70%) para retirada da clorofila, facilitando a visualização da reação pela presença da coloração azul no tecido vegetal.

3.6 Análise de Southern blot

A análise de Southern blot foi realizada para confirmar a integração e determinar o número de inserções do transgene no genoma das plantas. Foram selecionadas 10 - 12 plantas PCR+, regeneradas dos experimentos com cada construção gênica, e uma planta não transgênica, como controle negativo. O DNA total foi extraído de folhas jovens (1,4 g) pelo método CTAB (Doyle e Doyle 1990) e quantificado por fluorimetria (Qubit™ Fluorometer Kit e QuantiT™ dsDNA BR assay Kit - Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Um total de 20 - 60 µg do DNA foi submetido à reação de digestão utilizando-se a enzima *EcoRI* (5 u/µg de DNA; 37 °C; 16h), que realiza corte único na região do T-DNA e fora do gene de interesse. Os fragmentos de DNA obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose (1%), transferidos para membrana de nylon 'Amersham Hybond™ - N+' (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) e fixados em alta temperatura (80 °C; 2 h).

Para a hibridização, a sonda foi preparada pela amplificação de um fragmento de 412 pb do gene *uidA*, a partir do plasmídeo pCAMBIA 2201 de *E. coli* (Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System Kit - Promega) utilizando-se os primers *uidA*-F 5'-GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG-3' e *uidA*-R 5'-TGGATCCCGGCATAGTTAAA-3'. O fragmento amplificado foi purificado (QIAEX® II Gel Extration Kit - QIAGEN) e quantificado por fluorimetria. A membrana foi hibridizada (16 h; 60 °C) em solução de hibridização contendo 150 ng de sonda marcada com a enzima Fosfatase Alcalina (AlkPhos Direct Labelling Reagents Kit - GE Healthcare).

A reação de detecção foi realizada pela aplicação do agente de detecção (CDP - Star™ Detection Reagent kit - GE Healthcare) na membrana (2 - 4 mL; 3 min), conforme as instruções do fabricante. Após a secagem do agente de detecção, a membrana foi envolvida em filme plástico e introduzida no cassete fotográfico (Hypercassette™ - Amersham Life Science, Little Chalfont, UK) em contato com a chapa fotográfica (60 min). Após o período de exposição, a imagem foi revelada (Solução reveladora Kodak GBX - Carestream Health, Rochester, EUA) e fixada (Solução fixadora Kodak GBX - Carestream Health).

3.7 Quantificação da expressão do gene *uidA* por análise de RT-qPCR

A análise de RT-qPCR foi realizada para quantificar a expressão do gene *uidA* sob controle dos diferentes promotores. Para isso, foram selecionadas plantas transgênicas que

apresentassem apenas uma inserção do transgene, totalizando sete plantas para cada construção gênica e uma planta de laranja 'Hamlin' não transgênica, como controle negativo.

O RNA foi extraído de três folhas recém-expandidas de cada planta, de forma a constituir triplicata biológica, utilizando-se o reagente TRIzol (1 mL - Invitrogen), com auxílio de um disruptor de tecidos (TissueLyser II – QIAGEN; 30 hz; 3 min). Os tubos com as amostras foram mantidos à temperatura ambiente (5 min), adicionando-se em seguida clorofórmio (200 µL). Os tubos foram invertidos (5x) e mantidos à temperatura ambiente (3 min) e então centrifugados (12.000 g; 15 min; 4 °C). A fase aquosa foi transferida para tubo novo e adicionou-se etanol 70% (500 µL).

Após a extração, o RNA foi purificado (RNeasy Plant Mini Kit - QIAGEN) e tratado com DNase (RNase-Free DNase Set - QIAGEN), para remover contaminação de DNA genômico. A integridade do RNA total extraído foi confirmada por eletroforese em gel de agarose pela visualização das bandas individuais de RNA ribossomal 26S e 18S. O RNA foi quantificado por espectrofotometria (NanoDrop - Thermo Scientific, Wilmington, EUA) e a pureza foi determinada pelo razão de OD260/OD280 (1,80 - 2,00). Todas as amostras foram ajustadas para a concentração de 100 ng µL⁻¹.

O RNA obtido foi utilizado para a síntese de cDNA. Inicialmente, 10 µL do RNA diluído, totalizando 1 µg de RNA, foram adicionados a uma solução 1 µL de oligo dT (10 µM) e 1 µL de mix de dNTP (10 mM). A solução foi incubada a 65 °C (5 min) e depois mantida em gelo (3 min). Em seguida, adicionou-se 4 µL de tampão First Strand (5x), 2 µL de DDT (0,1 M) e 1 µL de RNaseOUT (Invitrogen). A solução foi incubada à temperatura de 37°C (2 min). Foi adicionado à solução 1 µL da enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen) e a reação foi incubada à temperatura de 37 °C (50 min), seguida de 70 °C (15 min) para inativação. As amostras de cDNA foram armazenadas a -20 °C. Antes da reação de RT-qPCR, o cDNA obtido foi submetido a reação de PCR com os mesmos primers a serem utilizados para verificar a correta amplificação.

A análise de RT-qPCR foi realizada no equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, EUA), no Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas - Esalq/USP. Foram utilizados primers para detecção do gene *uidA*, e dos genes Enzima conjugadora da ubiquitina-21 (UBC21) e DIM1 homólogo/YLS8 (DIM1), utilizados como genes de referência (Mafra et al. 2012). A sequência dos primers utilizados para amplificação dos genes está apresentada na Tabela 4. Preliminarmente, os primers foram testados para sua eficiência com diluições seriadas (1:5, 1:25, 1:125 e 1:625) de um mix de cDNA oriundo de plantas com os diferentes promotores e a especificidade dos primers foi

confirmada pelo ponto de fusão médio dos amplicons (curva de melting), por meio da presença de um único pico.

Tabela 4. Sequência dos primers utilizados para a amplificação dos genes *uidA*, UBC21 e DIM1 na análise de RT-qPCR, com o respectivo tamanho do amplicon e temperatura de anelamento.

Primer	Sequência	Amplicon (pb)	Temperatura de anelamento (°C)
<i>uidA</i> - F	5'TCGCATTACCCTTACGCTGAA 3'	82	60
<i>uidA</i> - R	5'CGACAGCAGCAGTTTCATCAAT 3'		
UBC21 - F	5'CCTCCACAAGTGCGGTTTTTAA 3'	100	60
UBC21 - R	5'CTGGGCTCCATGCGTTCTT 3'		
DIM1 - F	5'CGAAACCTGTATGCAGATGG 3'	138	60
DIM1 - R	5'ACGGTTGAGGGATCGTAAAG 3'		

F = forward; R = reverse

A reação de RT-qPCR foi realizada em volume final de 10 uL, utilizando-se 1 µL do cDNA diluído (1:5), 0,25 µL de cada primer (10 µM), 6 µL de Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) e 2,5 µL de água, em placa de 96 poços (0,1 ml; MicroAmp - Applied Biosystems). Foram realizadas 3 réplicas biológicas (3 amostras por planta) e 3 réplicas técnicas (3 repetições por amostra) para cada gene analisado. Para a amplificação, utilizou-se o programa padrão do equipamento Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems), no modo FAST. O valor do ciclo threshold (Ct) foi determinado para o gene alvo e para os genes de referência. A análise de eficiência de cada reação foi realizada com o auxílio do software LinRegPCR (Ramakers et al. 2003) e a quantificação relativa da expressão do gene *uidA* foi analisada pelo método descrito por Pfaffl (2001), em que:

$$\text{Expressão} = \frac{\text{Eficiência da reação do gene alvo}^{\Delta\text{Ct alvo (controle-amostra)}}}{\text{Eficiência da reação do gene de referência}^{\Delta\text{Ct referência (controle-amostra)}}$$

Os genes UBC21 e DIM1 foram utilizados como genes de referência, para a normalização da expressão gênica. Como controle, utilizou-se a planta que apresentou o maior valor de Ct, ou seja, de menor expressão. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey, no nível de significância de 5%.

3.8 Caracterização dos elementos cis-regulatórios nos promotores CsGAPC2, CsCYC e CsEF1

Os elementos cis-regulatórios envolvidos no controle da expressão gênica foram identificados por análise *in silico* no banco de dados PLACE (Higo et al. 1999). A distribuição e a frequência dos elementos ao longo da sequência dos promotores foram verificadas com auxílio do software Vector NTI (Thermo Fisher Scientific).

A partir dessas informações, foram realizadas análises de deleção em cada promotor para verificar seu efeito na funcionalidade e na expressão gênica.

3.9 Análises de deleção

3.9.1 Elaboração das construções gênicas de deleção

As análises de deleção dos promotores CsGAPC2 e CsCYC compreenderam uma série de deleções na sequência dos promotores, utilizando-se um primer reverse adjacente ao início da região codificadora de cada gene em combinação com primers forwards que anelam em três posições (-1090, -911 e -497) da região promotora CsGAPC2 e três posições (-1036, -822 e -531) da região promotora CsCYC, resultando na versão completa inicialmente clonada CsGAPC2-1090 e CsCYC-1036 e duas versões truncadas CsGAPC2-911 e CsGAPC2-497, CsCYC-822 e CsCYC-531, para cada promotor.

As análises de deleção do promotor CsEF1 foram realizadas a partir de uma sequência maior que a inicialmente clonada, utilizando-se um primer reverse adjacente ao início da região codificadora do gene em combinação com primers forwards que anelam em três posições (-2476, -2092 e -1322) da região promotora, resultando na versão completa CsEF1-2476 e duas versões truncadas CsEF1-2092 e CsEF1-1322 (CsEF1-1322 corresponde à sequência inicialmente clonada). Para verificar o efeito do íntron presente na região 5'UTR, foi elaborada uma versão sem o íntron, utilizando um primer reverse adjacente ao início da região 5'UTR, em combinação com o primer forward que anela na posição -2476, resultando na versão sem o íntron CsEF1-1474.

O DNA utilizado como molde para gerar as diferentes versões dos promotores CsGAPC2 e CsCYC foram os plasmídeos pGEM-T e pJET1.2 contendo os respectivos promotores clonados, descritos no item 3.2. Para o promotor CsEF1, foi isolada uma região maior. A nova sequência (1.5 kb) amplificada por PCR, utilizando o DNA de *C. sinensis*, foi

isolada, purificada e clonada no vetor pGEM-T Easy (Promega). Utilizando-se PCR de sobreposição, o novo fragmento foi ligado ao fragmento do promotor CsEF1 previamente clonado no vetor pJET1.2, descritos no item 3.2. Este produto (2.6 kb) foi isolado, purificado e clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega). Este plasmídeo foi utilizado como molde para gerar as diferentes versões do promotor CsEF1.

As versões de cada promotor foram inseridas em um vetor de expressão de maneira a controlar a expressão do gene *uidA*, utilizando a tecnologia Gateway (Thermo Fisher Scientific). Para isso, os fragmentos foram amplificados por análise de PCR (Polimerase Taq High Fidelity-TaKaRa - Clontech, Mountain View, EUA) com primers específicos para cada um dos fragmentos dos promotores (Tabela 5).

Tabela 5. Sequência dos primers utilizados para a amplificação dos fragmentos dos promotores para elaboração de construções gênicas de deleção de cada promotor.

Primer	Sequência
CYC-R	5' GGGG <u>ACCAC</u> TTTGTACAAGAAAGCTGGGTA <u>AGATCT</u> CATTTTGGATTGGTTGATTGGTT 3'
CYC-F1	5' GGGG <u>ACAAG</u> TTTGTACAAAAAGCAGGCTTC <u>AAGCTT</u> ACGCACTAGCAACTCCTAATA 3'
CYC-F2	5' GGGG <u>ACAAG</u> TTTGTACAAAAAGCAGGCTTC <u>AAGCTT</u> CACCACTTTTCGACAAGTGCA 3'
CYC-F3	5' GGGG <u>ACAAG</u> TTTGTACAAAAAGCAGGCTTC <u>AAGCTT</u> GTTCATGGATTGAGGAGAACT 3'
GAPC2-R	5' GGGG <u>ACCAC</u> TTTGTACAAGAAAGCTGGGTA <u>GGATCC</u> CATTGATATTATCGAAAATGAGA 3'
GAPC2-F1	5' GGGG <u>ACAAG</u> TTTGTACAAAAAGCAGGCTTC <u>AAGCTT</u> TAAACTTGAACACAAGTGACA 3'
GAPC2-F2	5' GGGG <u>ACAAG</u> TTTGTACAAAAAGCAGGCTTC <u>AAGCTT</u> AATTTTCGTATGCGTTGACTA 3'
GAPC2-F3	5' GGGG <u>ACAAG</u> TTTGTACAAAAAGCAGGCTTC <u>AAGCTT</u> AACCGTCGAAAGCCAAAGTCCA 3'
EF1-R1	5' GGGG <u>ACCAC</u> TTTGTACAAGAAAGCTGGGTA <u>GGATCT</u> GTATAAAGTATTGCTTAAACT 3'
EF1-R2	5' GGGG <u>ACCAC</u> TTTGTACAAGAAAGCTGGGTA <u>GGATCT</u> GTATATCTCGTATAGGGTTTGCT 3'
EF1-F1	5' GGGG <u>ACAAG</u> TTTGTACAAAAAGCAGGCTTC <u>AAGCTT</u> GATTTGTGCGACCTGGACGTGA 3'
EF1-F2	5' GGGG <u>ACAAG</u> TTTGTACAAAAAGCAGGCTTC <u>AAGCTT</u> GAAAGCTGGAAAGTGCTCTGAA 3'
EF1-F3	5' GGGG <u>ACAAG</u> TTTGTACAAAAAGCAGGCTTC <u>AAGCTT</u> TCGTGGTGCTTGCTGTCTCTT 3'

*Os primers contém: quatro bases guanina (G) na extremidade 5', seguido pelos 25 pb do sítio *attB1* (primer forward) e *attB2* (primer reverse) sublinhado na sequência, seguido pelo sítio de restrição das enzimas *HindIII* (AAGCTT, destacado em vermelho) *BglIII* (AGATCT, destacado em azul) e *BamHI* (GGATCC, destacado em verde) seguido dos 18 - 25 pb de sequências específicas do molde. F = Forward; R = Reverse.

Na extremidade 5' dos primers foi adicionado um sítio para uma enzima de restrição e os sítios Gateway de recombinação para gerar o produto *attB*-PCR. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese, visualizados sob luz ultravioleta, isolados e purificados.

O fragmento *attB*-PCR gerado foi transferido para o vetor *attP*-doador pela reação de recombinação BP, criando um vetor de *attL*-entrada. O vetor doador utilizado foi o pDONRTM/Zeo (Thermo Fisher Scientific), um vetor adaptado ao sistema Gateway que contém dois sítios de recombinação (*attP*1 e *attP*2) para clonagem recombinatória com fragmentos *attB*-PCR. O vetor pDONRTM/Zeo contém o gene *ccdB*, para seleção negativa e o gene *CmR*, que confere resistência ao cloranfenicol, localizados entre os dois sítios *attP*, e o gene de resistência à zeocina para seleção em *E. coli*. Quando ocorre a recombinação entre o vetor *attP*-doador e o produto *attB*-PCR, o fragmento de interesse substitui o gene *ccdB* e o gene *CmR*. Células de *E. coli* que carregam vetores com o gene *ccdB* não crescem (Figura 3).

Figura 3. Vetores utilizados na reação de recombinação BP. A) Fragmento *attB*-PCR gerado por análise de PCR com primers específicos contendo os sítios de recombinação *attB*. B) Vetor *attP*-doador pDONRTM/Zeo contendo os genes *ccdB* e *CmR* entre os sítios de recombinação *attP*. C) Vetor *attL*-entrada pDONRTM/Zeo contendo o fragmento de PCR em substituição aos genes *ccdB* e *CmR* entre os sítios de recombinação *attL*. CAT: promotor; EM7: promotor; *Zeo*: gene de resistência ao antibiótico zeocina.

A reação de recombinação BP foi realizada com 5 µL de fragmento *attB*-PCR, 1 µL pDONRTM/Zeo (150 ng/µL), 2 µL tampão TE e 2 µL da enzima Gateway BP Clonase II (Thermo Fisher Scientific), segundo recomendações do fabricante (25 °C, 1 h). Após a recombinação, adicionou-se 1 µL de proteinase K (37 °C, 10 min) para interromper a reação.

O mix de recombinação foi inserido em *E. coli*, quimicamente competente, por choque térmico. As células transformadas foram recuperadas pelo cultivo em meio de cultura SOC (Invitrogen; 37 °C, 1 h, 170 rpm). A suspensão bacteriana foi plaqueada em meio de cultura LB de baixo teor de sal, suplementado com o antibiótico zeocina (100 mg L⁻¹) para seleção dos plasmídeos recombinantes. Para confirmar os clones derivados a partir de recombinação, o DNA plasmidial de três colônias de *E. coli* foi extraído (QIAprep spin Miniprep Kit - QIAGEN) e submetido à reação de clivagem com as enzimas de restrição *Hind*III/*Bam*HI (37 °C, 1h). Os clones que apresentaram o padrão de digestão esperado foram sequenciados no Interdisciplinary Center for Biotechnology Research (ICBR), University of Florida, Gainesville, FL, EUA, para verificar se não ocorreram erros.

O fragmento do promotor no vetor de *attL*-entrada foi transferido para um vetor de *attR*-destino pela reação de recombinação LR, criando um clone de *attB*-expressão (Figura 4).

Figura 4. Vetores utilizados na reação de recombinação LR. A) Vetor *attL*-entrada pDONR™/Zeo contendo o fragmento de PCR em substituição aos genes *ccdB* e *CmR* entre os sítios de recombinação *attL*. B) Vetor pCAMBIA2300 contendo os genes *ccdB* e *CmR* entre os sítios de recombinação *attR*. C) Vetor pCAMBIA2300 contendo o fragmento de PCR em substituição aos genes *ccdB* e *CmR* entre os sítios de recombinação *attB*. *npII*: gene de resistência ao antibiótico canamicina; NOS: promotor nopalina sintase; NOS-3': terminador nopalina sintase. LB: borda esquerda. RB: borda direita.

O vetor de destino é um vetor binário pCAMBIA2300 adaptado ao sistema Gateway que contém, entre os dois sítios de recombinação *attR1* e *attR2*, o gene *ccdB* e o gene *CmR*,

localizados a montante do gene *uidA*. Quando ocorre a recombinação entre o vetor pCAMBIA2300 e o vetor de *attL*-entrada, o fragmento de interesse substitui os genes *ccdB* e o gene *CmR*, de modo que os promotores passem a dirigir o gene *uidA*. Além disso, o vetor de destino contém o gene de resistência ao antibiótico canamicina para seleção em bactéria e planta (Figura 4).

A reação de recombinação LR foi realizada utilizando-se 4 µL do vetor de *attL*-entrada, 1 µL vetor *attR*-destino, 3 µL tampão TE e 2 µL da enzima Gateway LR Clonase II (Thermo Fisher Scientific), segundo recomendações do fabricante (25 °C; 16 h). Após a recombinação, adicionou-se 1 µL de proteinase K (37 °C; 10 min) para interromper a reação.

O mix da reação foi inserido em *E. coli*, quimicamente competente, por choque térmico. As células transformadas foram recuperadas pelo cultivo em meio de cultura SOC (Invitrogen; 37 °C; 1 h; 170 rpm). A suspensão bacteriana foi plaqueada em meio de cultura LB suplementado com canamicina (100 mg L⁻¹) para selecionar os plasmídeos recombinantes. Para confirmar os clones derivados a partir de recombinação, o DNA plasmidial de três colônias de *E. coli* foi extraído (QIAprep spin Miniprep Kit - QIAGEN) e submetido à reação de clivagem com as enzimas de restrição *HindIII/BamHI* e *HindIII/EcoRI* (37°C, 1h).

Os vetores de expressão elaborados foram introduzidos em *A. tumefaciens* estirpe EHA105, por choque térmico (Brasileiro e Carneiro 1998).

3.9.2 Expressão transiente em *Nicotiana benthamiana*

A funcionalidade das diferentes versões de cada promotor foi inicialmente avaliada por expressão transiente em folhas de tabaco (*N. benthamiana*) por meio de agroinfiltração. Colônias de *A. tumefaciens*, contendo os vetores de interesse, foram cultivadas em meio de cultura YEP líquido (28 °C; 16 h; 180 rpm) suplementado com os antibióticos canamicina (100 mg L⁻¹) e rifampicina (50 mg L⁻¹). A suspensão bacteriana foi centrifugada (15 °C; 15 min; 4800 rpm) e o precipitado ressuscitado em 35 ml de tampão de ressuspensão (10 mM MES-pH 5,85; 10 mM MgCl₂). As células foram novamente centrifugadas e o precipitado ressuscitado em 35 ml de tampão de indução (10 mM MES-pH 5,85; 10 mM MgCl₂; 150 µM de acetoseringona). As células foram incubadas à temperatura ambiente sem agitação durante 3 - 5 horas. A absorbância da suspensão bacteriana foi determinada e ajustada para 0,5 - 0,8 antes da infiltração. A epiderme inferior de folhas jovens de tabaco foi infiltrada com a solução de *A. tumefaciens* utilizando seringa estéril (1 mL, sem agulha). Como controle positivo foi utilizado um vetor de expressão contendo o promotor constitutivo CaMV35S

fusionado ao gene *uidA* e como controle negativo foi utilizado *A. tumefaciens* desarmada. A infiltração foi feita em três folhas de uma planta para cada construção. Após infiltração, as plantas foram mantidas a temperatura ambiente por 2-3 dias e submetidas ao ensaio histoquímico da atividade GUS.

3.9.3 Transformação genética de *N. benthamiana*

Para cada experimento de transformação genética, colônias de *A. tumefaciens* contendo as construções gênicas elaboradas foram cultivadas isoladamente em meio de cultura YEP sólido, acrescido dos antibióticos canamicina (100 mg L^{-1}) e rifampicina (50 mg L^{-1}), em ausência de luz (28°C ; 3d). Após esse período, uma colônia da bactéria foi cultivada em frasco erlenmeyer (28°C ; 16 h; 180 rpm), contendo meio de cultura YEP líquido (50 ml), suplementado com os mesmos antibióticos. A absorbância da suspensão bacteriana foi determinada em espectrofotômetro ($\lambda = 600 \text{ nm}$) até atingir o valor 0,5, quando a suspensão bacteriana foi centrifugada (15°C ; 15 min; 4800 rpm). O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em meio de cultura MS líquido em volume adequado para obter concentração de $5 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$.

Folhas de *N. benthamiana* cultivadas em casa-de-vegetação foram utilizadas como fonte de explantes nos experimentos de transformação genética (Figura 5A). A desinfestação das folhas foi realizada com solução de hipoclorito de sódio (10%) durante 8 minutos, seguido da tríplice lavagem com água destilada estéril. As folhas foram cortadas em segmentos e incubadas com uma suspensão de *A. tumefaciens* (5 min) contendo os vetores de expressão (Figura 5B). Após a inoculação, os explantes foram secos com papel absorvente (Figura 5C) e transferidos para meio de co-cultivo constituído de sais de MS (Murashige e Skoog 1962), suplementado com sacarose (30 g L^{-1}), ácido 2-N-morfolino etanesulfônico (MES) (497 mg L^{-1}), BAP (1 mg L^{-1}), NAA (1 mg L^{-1}), ágar (8 g L^{-1}) e pH ajustado para 5,8, por um período de 2 dias (24°C , no escuro), para a infecção da bactéria (Figura 5D).

Figura 5. Etapas do processo de transformação genética de *N. benthamiana*. A) Folha utilizada como fonte de explante. B) Segmentos foliares incubados com suspensão de *A. tumefaciens*. C) Remoção do excesso de bactéria dos explantes. D) Explantes cultivados em meio de cultura MS.

Após esse período, os explantes foram transferidos para meio de cultura de seleção e regeneração, para o desenvolvimento de calos e posterior regeneração de gemas adventícias. O meio de cultura constituiu-se de sais de MS, suplementado com sacarose (30 g L^{-1}), MES (497 mg L^{-1}), BAP (1 mg L^{-1}), NAA (1 mg L^{-1}), ágar (8 g L^{-1}), os antibióticos canamicina (70 mg L^{-1}), para seleção dos explantes transformados, e cefotaxima sódica (497 mg L^{-1}) e timentin (200 mg L^{-1}), para prevenir o crescimento de *A. tumefaciens*, e pH ajustado para 5,8. Os explantes que apresentaram o desenvolvimento de calos foram transferidos para meio de cultura fresco. Os calos foram mantidos em crescimento até o desenvolvimento de gemas adventícias. Os brotos formados foram isolados e transferidos para frascos contendo meio de cultura de enraizamento constituído de sais de MS, suplementado com sacarose (30 g L^{-1}), MES (500 mg L^{-1}), ágar (8 g L^{-1}) e antibiótico canamicina (70 mg L^{-1}).

As plântulas que apresentaram desenvolvimento do sistema radicular foram avaliadas pelo ensaio histoquímico da atividade GUS para identificação da transgenia. As plântulas GUS positivas e devidamente enraizadas foram transferidas para vasos de plástico contendo substrato comercial para aclimatização. A transgenia foi confirmada por análise de PCR, utilizando-se os primers *nptII*-F 5'-GGATGATCTGGACGAAGAGC-3' e NOS-R'-AACACATGAGCGAAACCCTA -3' que amplifica um fragmento de 460 pb, correspondente a uma parte do gene *nptII* e do terminador NOS. Seis plantas transgênicas de eventos independentes de cada construção gênica foram selecionadas para a realização dos ensaios histoquímicos e fluorimétrico da atividade GUS.

3.9.4 Ensaio histoquímico da atividade GUS em plantas transgênicas de *N. benthamiana*

O ensaio histoquímico para detecção da atividade GUS foi realizado nas plantas transgênicas obtidas para cada construção gênica. Diferentes regiões da planta (folha, caule e raiz) foram coletadas das plantas no momento da transferência para a aclimatização e imersos em solução de X-GLUC, seguindo o protocolo descrito no item 3.5. As amostras foram submetidas a vácuo e incubadas à temperatura de 37 °C, em ausência de luz, por 16 h. Após este período, o material foi lavado com álcool etílico (70%) para retirada da clorofila, facilitando a visualização da reação pela presença da coloração azul no tecido vegetal.

3.9.5 Ensaio fluorimétrico da atividade GUS em plantas transgênicas de *N. benthamiana*

O ensaio fluorimétrico para a quantificação da atividade GUS baseia-se na hidrólise do substrato 4-metil-umbeliferil- β -D-glucuronido (4-MUG) pela enzima GUS, resultando em um composto fluorescente, 4-ethylumbelliferone (4-MU). Após a reação, a fluorescência total é medida e a concentração do produto é calculada com base numa curva de calibração 4-MU anterior.

Amostras de folhas e raízes (20 - 50 mg) foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas com 500 μ L de tampão de extração de proteína (50 mM tampão fosfato de sódio, pH 7,0; 10 mM EDTA, pH 8,0; 0,1% de Triton X-100; 10 mM β -mercaptoetanol). As amostras foram centrifugadas (10 min; 4 °C; 13000 g), o sobrenadante foi transferido para tubo novo e centrifugado novamente (10 min, 4 °C, 13000 g). O extrato protéico resultante foi utilizado para análise da atividade GUS.

Foram preparadas três repetições de cada amostra (3 folhas e 3 raízes para cada planta) contendo 150 μ L do extrato protéico e 150 μ L do tampão de ensaio GUS (tampão de extração de proteínas contendo 2 mM de 4-MUG; Thermo Fisher Scientific). A mistura foi incubada a 37 °C no escuro e uma alíquota de 100 μ L foi retirada aos 10, 20 e 30 min após o início da reação e transferida para 900 μ L de tampão de parada (0,2 M Na_2CO_3), para interromper a reação. A fluorescência foi medida com o Fluorímetro VersaFluor (Bio-Rad Laboratories, CA, EUA) com excitação a 365 nm e emissão a 455 nm. O fluorímetro foi calibrado utilizando a solução de 4-MU (Thermo Fisher Scientific) diluída para traçar uma curva padrão (0 - 40 μ M 4-MU). A concentração de proteína de cada amostra foi determinada utilizando-se Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit com BSA (Bovine Serum Albumin) como o padrão

(Thermo Fisher Scientific). A atividade GUS foi calculada como nmol de 4-MU/min/mg de proteína.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey, no nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

4.1 Elaboração das construções gênicas

4.1.1 Construção gênica pC2201CsGAPC2/*uidA*

O fragmento do promotor CsGAPC2 (1090 pb) foi clonado no vetor pGEM-T como pode ser verificado no resultado da reação de digestão realizada com as enzimas *Nco*I, com liberação do fragmento de 525 pb, referente a parte do promotor CsGAPC2 (Figura 6A - coluna 1) e *Hind*III/*Psc*I, com liberação do fragmento de 1090 pb, referente ao promotor CsGAPC2 completo (Figura 6A - coluna 2). A transferência do promotor CsGAPC2 do plasmídeo pGEM-T para o plasmídeo pCAMBIA1201, em substituição do promotor CaMV35S, foi confirmada pela reação de digestão com as enzimas *Eco*RI/*Bst*EII, que apresentou um fragmento de 3203 pb, correspondente ao promotor CsGAPC2 fusionado ao gene *uidA* (Figura 6B - coluna 1), resultando no plasmídeo denominado pC1201CsGAPC2/*uidA*. A digestão do plasmídeo pCAMBIA1201 apresentou um fragmento de 2874 pb, correspondente ao promotor CaMV35S fusionado ao gene *uidA* (Figura 6B - coluna 2). O fragmento CsGAPC2/*uidA* do plasmídeo pC1201CsGAPC2/*uidA* foi transferido para o plasmídeo pCAMBIA2201, em substituição ao fragmento CaMV35S/*uidA*, gerando o plasmídeo pC2201CsGAPC2/*uidA* (Figura 12A). A transferência foi confirmada pela reação de digestão com as enzimas *Eco*RI/*Bst*EII, liberando um fragmento de 3203 pb, correspondente ao promotor CsGAPC2 fusionado ao gene *uidA* (Figura 6C - coluna 1). A digestão do plasmídeo pCAMBIA2201 resultou em um fragmento de 2874 pb, correspondente ao promotor CaMV35S fusionado ao gene *uidA* (Figura 6C - coluna 2). A introdução do vetor de expressão pC2201CsGAPC2/*uidA* em *A. tumefaciens* foi confirmada pela reação de digestão com as enzimas *Eco*RI/*Bst*EII, apresentado os mesmos resultados descritos na etapa anterior (Figura 6D). O alinhamento das sequências, mostra que o contig CsGAPC2 apresenta identidade elevada com a sequência correspondente depositada no banco de dados Phytozome (orange1.1g019445m.g), comprovando a correta clonagem do fragmento (Figura 7).

Figura 6. Elaboração da construção gênica pC2201CsGAPC2/*uidA*. A) Digestão do vetor pGEM-T, contendo o promotor CsGAPC2, com a enzima *NcoI* (coluna 1) e com as enzimas *HindIII/PscI* (coluna 2). B) Digestão dos plasmídeos pC1201CsGAPC2/*uidA* (coluna 1) e pCAMBIA1201 (coluna 2) com as enzimas *EcoRI/BstEII*. C) Digestão dos plasmídeos pC2201CsGAPC2/*uidA* (coluna 1) e pCAMBIA2201 (coluna 2) com as enzimas *EcoRI/BstEII*. D) Digestão dos plasmídeos pC2201CsGAPC2/*uidA* (coluna 1) e pCAMBIA2201 (coluna 2), extraídos de *A. tumefaciens*, com as enzimas *EcoRI/BstEII*. M: Marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen).

4.1.2 Construção gênica pC2201CsEF1/*uidA*

O fragmento do promotor CsEF1 (1355 pb) foi clonado no vetor pJET1.2, confirmado pelo resultado da reação de digestão realizada com as enzimas *HindIII/NcoI*, com liberação do fragmento de 1355 pb (Figura 8A - coluna 1). A transferência do promotor CsEF1 do plasmídeo pJET1.2 para o plasmídeo pCAMBIA1201, em substituição do promotor CaMV35S, foi confirmada pela reação de digestão com as enzimas *EcoRI/BstEII*, com a liberação de um fragmento de 3471 pb, correspondente ao promotor CsEF1 fusionado ao gene *uidA* (Figura 8B - coluna 1), resultando no plasmídeo denominado pC1201CsEF1/*uidA*. A digestão do plasmídeo pCAMBIA1201 apresentou um fragmento de 2874 pb, correspondente ao promotor CaMV35S fusionado ao gene *uidA* (Figura 8B - coluna 2). O fragmento CsEF1/*uidA* do plasmídeo pC1201CsEF1/*uidA* foi transferido para o plasmídeo pCAMBIA2201, em substituição ao fragmento CaMV35S/*uidA*, gerando o plasmídeo pC2201CsEF1/*uidA* (Figura 12B). A transferência foi confirmada pela reação de digestão com as enzimas *EcoRI/BstEII*, liberando um fragmento de 3471 pb, correspondente ao promotor CsEF1 fusionado ao gene *uidA* (Figura 8C - coluna 1). A digestão do plasmídeo

CsGAPC2 orange1.1g019445m.g	CTTGAACACAACCTGACAAGACAAGGTGAGATGAGATCACTGTCTCCTA-TGCCGACA-TA CTTGAACACAACCTGACAAGACAAGGTGAGATGAGATCACTGTCTCCTAATGCCGACAATA *****
CsGAPC2 orange1.1g019445m.g	ATGTCAATATCGAGATTAGATCACACAATTCACATTAGATATAAGGTAAGGGATGACCTC ATGTCAATATCGAGATTAGATCACACAATTCACATTAGATATAAGGTAAGGGATGACCTC *****
CsGAPC2 orange1.1g019445m.g	AAGCTCCATCCACAAATTTTCAGATTCTCTTTGCCAGCTACTAGAAACCTGAATGCAATT AAGCTCCATCCACAAATTTTCAGATTCTCTTTGCCAGCTACTAGAAACCTGAATGCAATT *****
CsGAPC2 orange1.1g019445m.g	TTCGTATGCGTTGACTATTATCTAAGCCACCGTCCGTGACCACTGACTTCATGTGCA TTCGTATGCGTTGACTATTATCTAAGCCACCGTCCGTGACCACTGACTTCATGTGCA *****
CsGAPC2 orange1.1g019445m.g	TGCAAGATGGCGTATCATATGATTTCTACTAATTTCTCGGGGAAAAAAAATTCATTTG TGCAAGATGGCGTATCATATGATTTCTACTAATTTCTCGGGGAAAAAAAATTCATTTG *****
CsGAPC2 orange1.1g019445m.g	GATGATTCTTCAATAAAACATCCTTTTAATTAACAAAGACACGTATTCAAAAAAAAAT GATGATTCTTCAATAAAACATCCTTTTAATTAACAAAGACACGTATTCAAAAAAAAAT *****
CsGAPC2 orange1.1g019445m.g	AAAAAATTAACAAAGACATTGTGCGGGAACAAGGATAATTTAACTTGTTCACAAAGC AAAAAATTAACAAAGACATTGTGCGGGAACAAGGATAATTTAACTTGTTCACAAAGC *****
CsGAPC2 orange1.1g019445m.g	CAACGTAGAATAATTCTAGAGGCGTAGAATAAAGTTCTAGAAAAATGGCATGGAACGTT CAACGTAGAATAATTCTAGAGGCGTAGAATAAAGTTCTAGAAAAATGGCATGGAACGTT *****
CsGAPC2 orange1.1g019445m.g	TCAAGTTTGTATTGTTGCTGCACAACTCAACGGCAGGCGTTCTTCTATTCTTTGTGT TCAAGTTTGTATTGTTGCTGCACAACTCAACGGCAGGCGTTCTTCTATTCTTTGTGT *****
CsGAPC2 orange1.1g019445m.g	CAAGCTCCGATTGGCCTGTCGCCAATACTTTCAACCTTTGACTTTTACCATGGAACCGTC CAAGCTCCGATTGGCCTGTCGCCAATACTTTCAACCTTTGACTTTTACCATGGAACCGTC *****
CsGAPC2 orange1.1g019445m.g	GAAAGCCAAAGTCCAGTACGACCAGACAGGCTTGGCCTTTTGGTGGGTCCGCGGAAA GAAAGCCAAAGTCCAGTACGACCAGACAGGCTTGGCCTTTTGGTGGGTCCGCGGAAA *****
CsGAPC2 orange1.1g019445m.g	ATTTTAAAGCCCATTTGGGAGGATCATGCGCTCTACAAACTCGAATATTCGCCCAAAAGG ATTTTAAAGCCCATTTGGGAGGATCATGCGCTCTACAAACTCGAATATTCGCCCAAAAGG *****
CsGAPC2 orange1.1g019445m.g	AAATCCTGATTCCCACGCTCCTTTTCTGCGGTACGAACACCTTCTCCAAAATCTGTCT AAATCCTGATTCCCACGCTCCTTTTCTGCGGTACGAACACCTTCTCCAAAATCTGTCT *****
CsGAPC2 orange1.1g019445m.g	GACAAATCAGAACTAACTGGCGCTTACGTTTCATACGCTATACGATCGCGTGGAACGGT GACAAATCAGAACTAACTGGCGCTTACGTTTCATACGCTATACGATCGCGTGGAACGGT *****
CsGAPC2 orange1.1g019445m.g	TAACATTAAAACTAAATCAGCGGCTGCGGACAGGGATTAATATAACAGCGGCTTCGAT TAACATTAAAACTAAATCAGCGGCTGCGGACAGGGATTAATATAACAGCGGCTTCGAT *****
CsGAPC2 orange1.1g019445m.g	ATAAAAGTTACTGACTTTCTTTTCGTCGAAGAAAAATAAAATTAACAAAAACAGTCACG ATAAAAGTTACTGACTTTCTTTTCGTCGAAGAAAAATAAAATTAACAAAAACAGTCACG *****
CsGAPC2 orange1.1g019445m.g	TGACCCCAACCACTCCCTCTCCCTTTAAATAACCTCTAATTAATCCTCCCATCGTCAC TGACCCCAACCACTCCCTCTCCCTTTAAATAACCTCTAATTAATCCTCCCATCGTCAC *****
CsGAPC2 orange1.1g019445m.g	AAACAACGCACCCAGCGAAAAATCGCAGCGTTAAACAACCTTCACTACTTTCTCATTTTC AAACAACGCACCCAGCGAAAAATCGCAGCGTTAAACAACCTTCACTACTTTCTCATTTTC *****
CsGAPC2 orange1.1g019445m.g	GATAATATACATG GATAATATCAATG *****

Figura 7. Análise de sequenciamento da construção gênica pC2201CsGAPC2/*uidA*. Alinhamento entre o contig gerado no sequenciamento do promotor CsGAPC2 e a sequência orange1.1g019445m.g do banco de dados Phytozome.

pCAMBIA2201 apresentou um fragmento de 2874 pb, correspondente ao promotor CaMV35S fusionado ao gene *uidA* (Figura 8C - coluna 2). A introdução do vetor de expressão pC2201CsEF1/*uidA* em *A. tumefaciens* foi confirmada pela reação de digestão com as enzimas *EcoRI/BstEII*, apresentando os mesmos resultados descritos na etapa anterior (Figura 8D). O alinhamento do contig CsEF1 com a sequência depositada no banco de dados Phytozome (orange1.1g013237m.g), mostra algumas diferenças, como substituição, remoção ou inserção de bases. Foram avaliadas quatro colônias de *E. coli* proveniente de dois experimentos diferentes de clonagem, e as mesmas diferenças foram observadas em todos os casos (Figura 9). A sequência clonada apresentou tamanho maior que o esperado (cerca de 20 pb), pois uma parte da sequência depositada no banco de dados era desconhecida.

Figura 8. Elaboração da construção gênica pC2201CsEF1/*uidA*. A) Digestão do vetor pJET1.2, contendo o promotor CsEF1, com as enzimas *HindIII/NcoI* (coluna 1). B) Digestão dos plasmídeos pC1201CsEF1/*uidA* (coluna 1) e pCAMBIA1201 (coluna 2) com as enzimas *EcoRI/BstEII*. C) Digestão dos plasmídeos pC2201CsEF1/*uidA* (coluna 1) e pCAMBIA2201 (coluna 2) com as enzimas *EcoRI/BstEII*. D) Digestão dos plasmídeos pC2201CsEF1/*uidA* (coluna 1) e pCAMBIA2201 (coluna 2), extraídos de *A. tumefaciens*, com as enzimas *EcoRI/BstEII*. M: Marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen).

4.1.3 Construção gênica pC2201CsCYC/*uidA*

O fragmento do promotor CsCYC (1036 pb) foi clonado no vetor pJET1.2 como pode ser verificado no resultado da reação de digestão realizada com as enzimas *NcoI*, com liberação de fragmentos de 287 pb, referente a parte do promotor CsCYC (Figura 10A - coluna 1), e *HindIII/PscI*, com liberação do fragmento de 1036 pb, referente ao promotor CsCYC completo (Figura 10A - coluna 2). A transferência do promotor CsCYC do plasmídeo pJET1.2 para o plasmídeo pCAMBIA1201, em substituição ao promotor CaMV35S,

```

CsEF1      CTCACATCAAGGTAGGGTCCACACGAGTAATCGAAGACGCTTCTCTGAC-AAGACTTCGTG
orange1.1g013237m.g  CTCACATCAAGGTAGGGTCCACACGAGTAATCGAAGACGCTTCTCTGACCAAGACTTCGTG
*****

CsEF1      GTGCTTGCTGTCTCTTAAATTTATATCCGAAACATACACACCCCTCTCAGACGCGCGTG
orange1.1g013237m.g  GTGCTTGCTGTCTCTTAAATTTATATCCGAAACATACACACCCCTCTCAGACGCGCGTG
*****

CsEF1      TTCCTGATTCCTTGGACATTACAACGATAATTCACGAAACGGACATCGAAGCGAGTGGG
orange1.1g013237m.g  TTCCTGATTCCTTGGACATTACAACGATAATTCACGAAACGGACATCGAAGCGAGTGGG
*****

CsEF1      ATAAGAGGGACAAAAAGAAAAAAGAAAAAGAACGAATCCCAATCTCCCACGGCCATTA
orange1.1g013237m.g  ATAAGAGGGACAAAAAGAAAAAAGAAAAAGAACGAATCCCAATCTCCCACGGCCATTA
*****

CsEF1      TAAATTTTATAATATTAGGCTTTAGTAAAAAGGAGGACACGTAGGTAATCCAATAGCAC
orange1.1g013237m.g  TAAATTTTATAATATTAGGCTTTAGTAAAAAGGAGGACACGTAGGTAATCCAATAGCAC
*****

CsEF1      GTAAGGGTATATTCGAAACAGGAGATATAAATTCCTGTATAAACTAGCCAGCAAAAC
orange1.1g013237m.g  GTAAGGGTATATTCGAAACAGGAGATATAAATTCCTGTATAAACTAGCCAGCAAAAC
*****

CsEF1      CTATACGAGATATCAGCTCTCTCTGCCCTGACCACTCTCTTCTATCGCTTGGCGCTAGG
orange1.1g013237m.g  CTATACGAGATATCAGCTCTCTCTGCCCTGACCACTCTCTTCTATCGCTTGGCGCTAGG
*****

CsEF1      GTTTTAGCAGAGCTCTTTCAGTCCAATTTTCTCTTTTGTAGTGAACAATTAATA
orange1.1g013237m.g  GTTTTAGCAGAGCTCTTTCAGTCCAATTTTCTCTTTTGTAGTGAACAATTAATA
*****

CsEF1      TTTTAAATTGCATTCTGTATTTTCTATAAGTTAATTTATGACGAGAAGTTCATTT
orange1.1g013237m.g  TTTTAAATTGCATTCTGTATTTTCTATAAGTTAATTTATGACGAGAAGTTCATTT
*****

CsEF1      GATTCTTGGCATTGGAATTGTTGTTGTTTGTATGTAGTACGAATGCTTCTCTTGTG
orange1.1g013237m.g  GATTCTTGGCATTGGAATTGTTGTTGTTTGTATGTAGTACGAATGCTTCTCTTGTG
*****

CsEF1      ATTCAATGATTTTGTCAATATGTTGATCTTGAATCGTTTATTTGAACATATGTTGACTT
orange1.1g013237m.g  ATTCAATGATTTTGTCAATATGTTGATCTTGAATCGTTTATTTGAACATATGTTGACTT
*****

CsEF1      TGAATCGTTTAAT--CTGATTTTATTTCATTATAGATGATTTTGGCATCTTTTAAATA
orange1.1g013237m.g  TGAATCGTTTAATCTGATTTTATTTCATTATAGATGATTTTGGCATCTTTTAAATA
*****

CsEF1      ACATATGCGCATTTTATTTTCTTTTCGGTTATTTGCTCTAGTTAGATTAACCTTTTAAAT
orange1.1g013237m.g  ACATATGCGCATTTTATTTTCTTTTCGGTTATTTGCTCTAGTTAGATTAACCTTTTAAAT
*****

CsEF1      TTTTATATACGTTTCGGTGATATTGTACCTTAGCTGATTTAAAAA-TAATAATAATCTATG
orange1.1g013237m.g  TTTTATATACGTTTCGGTGATATTGTACCTTAGCTGATTTAAAAATAATAATAATCTATG
*****

CsEF1      ATGTGTTTTTTTATTATTGATCAGATCTGATTTTGTGTTGATTTCAATTTTATT
orange1.1g013237m.g  ATGTGTTTTTTTATTATTGATCAGATCTGATTTTGTGTTGATTTCAATTTTATT
*****

CsEF1      AGTCTGTGTTTTCAGTTTTTTGTAATTATTTTCTGCTCTTTTGGATTAAAAATGTTGATG
orange1.1g013237m.g  AGTCTGTGTTTTCAGTTTTTTGTAATTATTTTCTGCTCTTTTGGATTAAAAATGTTGATG
*****

CsEF1      ATCTGATTCATACTGTCTGATATATTTTATTTTGTAAATTTTGGTTTGAATTATAACA
orange1.1g013237m.g  ATCTGATTCATACTGTCTGATATATTTTATTTTGTAAATTTTGGTTTGAATTATAACA
*****

CsEF1      TGATTACCTGCTGAGTATGTTGGATGTGTGCCCTTCTTCTATATATCTGTGTGATACAA
orange1.1g013237m.g  TGATTACCTGCTGAGTATGTTGGATGTGTGCCCTTCTTCTATATATCTGTGTGATACAA
*****

CsEF1      ACAGAGTTTACGTGCAATGTGTGATGCTGAGTTTCTTTTCTGATTGTATGTGTG
orange1.1g013237m.g  ACAGAGTTTACGTGCAATGTGTGATGCTGAGTTTCTTTTCTGATTGTATGTGTG
*****

CsEF1      TGTGTGTGTGTGTGTCTCTTATTAGCTTTAATTTTGTGTATAAGTTGGCACTACTGT
orange1.1g013237m.g  TGTGTGTGTGTGTGTCTCTTATTAGCTTTAATTTTGTGTATAAGTTGGCACTACTGT
*****

CsEF1      TAAACAAATTGTTGGGTCCCTGAAGGCTCGTTTGATATGATACAGTTAAATGAAGATGA
orange1.1g013237m.g  TAAACAAATTGTTGGGTCCCTGAAGGCTCGTTTGATATGATACAGTTAAATGAAGATGA
*****

CsEF1      AATTGTCCTTCAAATTTTGGGCTAAATGTTTGAGATATTGTTGAAGTTTGTGTTCTGCC
orange1.1g013237m.g  AATTGTCCTTCAAATTTTGGGCTAAATGTTTGAGATATTGTTGAAGTTTGTGTTCTGCC
*****

CsEF1      CAAGCAAATTTTCTAAGTGAACCTTTTCTTGGATACAGTTTAAAGCAAATCTTTAC
orange1.1g013237m.g  CAAGCAAATTTTCTAAGTGAACCTTTTCTTGGATACAGTTTAAAGCAAATCTTTAC
*****

CsEF1      ATG
orange1.1g013237m.g  ATG

```

Figura 9. Análise de sequenciamento da construção gênica pC2201CsEF1/*uidA*. Alinhamento entre o contig gerado no sequenciamento do promotor CsEF1 e a sequência orange1.1g013237m.g do banco de dados Phytozome.

foi confirmada pela reação de digestão com as enzimas *EcoRI/BstEII*, que liberou um fragmento de 3152 pb, correspondente ao promotor CsCYC fusionado ao gene *uidA* (Figura 10B - coluna 1), resultando no plasmídeo denominado pC1201CsCYC/*uidA*. A digestão do plasmídeo pCAMBIA1201 apresentou um fragmento de 2874 pb, correspondente ao promotor CaMV35S fusionado ao gene *uidA* (Figura 10B - coluna 2). O fragmento CsCYC/*uidA* do plasmídeo pC1201CsCYC/*uidA* foi transferido para o plasmídeo pCAMBIA2201, em substituição ao fragmento CaMV35S/*uidA*, gerando o plasmídeo pC2201CsCYC/*uidA* (Figura 12C). A transferência foi confirmada pela reação de digestão com as enzimas *EcoRI/BstEII*, liberando um fragmento de 3152 pb, correspondente ao promotor CsCYC fusionado ao gene *uidA* (Figura 10C - coluna 1). A digestão do plasmídeo pCAMBIA2201 liberou um fragmento de 2874 pb, correspondente ao promotor CaMV35S fusionado ao gene *uidA* (Figura 10C - coluna 2). A introdução do vetor de expressão pC2201CsCYC/*uidA* em *A. tumefaciens* foi confirmada pela reação de digestão com as enzimas *EcoRI/BstEII*, apresentando os mesmos resultados descritos na etapa anterior (Figura 10D). O alinhamento do contig CsCYC com a sequência correspondente depositada no banco de dados Phytozome (orange1.1g030245m.g) mostra identidade elevada entre as sequências, comprovando a correta clonagem do fragmento (Figura 11).

Figura 10. Elaboração da construção gênica pC2201CsCYC/*uidA*. A) Digestão do vetor pJET1.2 contendo o promotor CsCYC com as enzimas *NcoI* (coluna 1) e *HindIII/PscI* (coluna 2). B) Digestão dos plasmídeos pC1201CsCYC/*uidA* (coluna 1) e pCAMBIA1201 (coluna 2) com as enzimas *EcoRI/BstEII*. C) Digestão dos plasmídeos pC2201CsCYC/*uidA* (coluna 1) e pCAMBIA2201 (coluna 2) com as enzimas *EcoRI/BstEII*. D) Digestão dos plasmídeos pC2201CsCYC/*uidA* (coluna 1) e pCAMBIA2201 (2), extraídos de *A. tumefaciens*, com as enzimas *EcoRI/BstEII*. M: marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen).

CsCYC orange1.1g030245m.g	ACGCACTAGCAACTCCTAATACTGGTTCGATACACTATCGACACCAATTTAAAGGACGTC ACGCACTAGCAACTCCTAATACTGGTTCGATACACTATCGACACCAATTTAAAGGACGTC *****
CsCYC orange1.1g030245m.g	GATCGCGTGATTCTAGCGAGAGCAAGCCATCTTCGTCCTGAGTCCATCGAGCCACTTCC GATCGCGTGATTCTAGCGAGAGCAAGCCATCTTCGTCCTGAGTCCATCGAGCCACTTCC *****
CsCYC orange1.1g030245m.g	CAATCACTGGTTCCAGCCAAACAATTGCACTATCACAACATTCAAGATCGCCACCCGTAC CAATCACTGGTTCCAGCCAAACAATTGCACTATCACAACATTCAAGATCGCCACCCGTAC *****
CsCYC orange1.1g030245m.g	TTCTCCTGGTTCCTCATTTGACGGCTCTGTAATCACCACCTTTTCGACAAGTGCAATAGC TTCTCCTGGTTCCTCATTTGACGGCTCTGTAATCACCACCTTTTCGACAAGTGCAATAGC *****
CsCYC orange1.1g030245m.g	CATGGTGAAGGATCAAACTGTGTTGGTTTCAAAAATTTGCGCATTTCAATTAATTGTGG CATGGTGAAGGATCAAACTGTGTTGGTTTCAAAAATTTGCGCATTTCAATTAATTGTGG *****
CsCYC orange1.1g030245m.g	CTTTATTTGAACAATTAATTTTCGGTGTATATCAATGTATTATTGTAACCTTTATTTGAAC CTTTATTTGAACAATTAATTTTCGGTGTATATCAATGTATTATTGTAACCTTTATTTGAAC *****
CsCYC orange1.1g030245m.g	AATTAATCTTAGTGTATTATATTTTGAAACTTTAAACGTATTATTTTAGTTTTATTTAAA AATTAATCTTAGTGTATTATATTTTGAAACTTTAAACGTATTATTTTAGTTTTATTTAAA *****
CsCYC orange1.1g030245m.g	CAATTAATTTGTTTAAATTTTATTCATTTTAAATTTAATTGGTAGTAAATATTTTAT CAATTAATTTGTTTAAATTTTATTCATTTTAAATTTAATTGGTAGTAAATATTTTAT *****
CsCYC orange1.1g030245m.g	ATTATATATTTTTTAAATTTTCATTAGTTCATGGATTGAGGAGAACTAAAAATTTTAAATT ATTATATATTTTTTAAATTTTCATTAGTTCATGGATTGAGGAGAACTAAAAATTTTAAATT *****
CsCYC orange1.1g030245m.g	CGAAAACTAATGTGCTAAAGGTAGATTAGATATCAATTAAATTAATCCGCATCCGATCC CGAAAACTAATGTGCTAAAGGTAGATTAGATATCAATTAAATTAATCCGCATCCGATCC *****
CsCYC orange1.1g030245m.g	GCAAACGTATAGATTGGATATGGATTGAGTCAAATCTGTATCCGATTGCGAAATGTATGG GCAAACGTATAGATTGGATATGGATTGAGTCAAATCTGTATCCGATTGCGAAATGTATGG *****
CsCYC orange1.1g030245m.g	ATTGGATTGGATTGAGTTTAAATCAATCCGTGAATTTGATTGAATTGAAAAATATAATC ATTGGATTGGATTGAGTTTAAATCAATCCGTGAATTTGATTGAATTGAAAAATATAATC *****
CsCYC orange1.1g030245m.g	CGTAATATTATTGATCAGATATAAATTGATGTCTAATCCGTAAAAATCCGATCCGCGAACA CGTAATATTATTGATCAGATATAAATTGATGTCTAATCCGTAAAAATCCGATCCGCGAACA *****
CsCYC orange1.1g030245m.g	CTCCTACCTCAGCCTGGGATCCCTCACATAACTCTAGTCAACCTTAACTCAACCTCAGTT CTCCTACCTCAGCCTGGGATCCCTCACATAACTCTAGTCAACCTTAACTCAACCTCAGTT *****
CsCYC orange1.1g030245m.g	ACTTCACCCCGCCCCACGATATCCCTCCACGTGTTCCCCCTCAACGGTCCAGATTCACT ACTTCACCCCGCCCCACGATATCCCTCCACGTGTTCCCCCTCAACGGTCCAGATTCACT *****
CsCYC orange1.1g030245m.g	TTTTGTTACTCCCCACCGCTCCATCCCCTATTTAACTGCCCCAAAACCTAAAAAATTC TTTTGTTACTCCCCACCGCTCCATCCCCTATTTAACTGCCCCAAAACCTAAAAAATTC *****
CsCYC orange1.1g030245m.g	GCCCCAAAATCACCAATCAGAAATCCGTGTTAGTTTGTTTAACTCTCTCCAATCAACC GCCCCAAAATCACCAATCAGAAATCCGTGTTAGTTTGTTTAACTCTCTCCAATCAACC *****
CsCYC orange1.1g030245m.g	AATCAACCAATCAAAATG AATCAACCAATCAAAATG *****

Figura 11. Análise de sequenciamento da construção gênica pC2201CsCYC/*uidA*. Alinhamento entre o contig gerado no sequenciamento do promotor CsCYC e a sequência orange1.1g030245m.g do banco de dados Phytozome.

Figura 12. Esquema da região de transferência (T-DNA) das construções gênicas elaboradas a partir do vetor binário pCAMBIA2201. A) Plasmídeo pC2201CsGAPC2: gene *uidA* dirigido pelo promotor *CsGAPC2*. B) Plasmídeo pC2201CsEF1: gene *uidA* dirigido pelo promotor *CsEF1*. C) Plasmídeo pC2201CsCYC: gene *uidA* dirigido pelo promotor *CsCYC*. *nptII*: gene de resistência ao antibiótico canamicina; 2xCaMV35S: promotor CaMV35S duplicado; 35S-3': terminador; NOS-3': terminador nopalina sintase; LB: borda esquerda; RB: borda direita.

4.2 Transformação genética de *C. sinensis*

As etapas do processo de obtenção de plantas transgênicas de *C. sinensis* estão ilustradas na Figura 13. A regeneração das gemas adventícias a partir de segmentos de epicótilo (Figura 13A) ocorreu após 30 dias de cultivo dos explantes em meio de cultura MT (Figura 13B). As gemas adventícias desenvolvidas (Figura 13C) foram enraizadas (Figura 13D) e assim que apresentavam tamanho adequado e bom vigor (Figura 13E), foram enxertadas *in vitro* (Figura 13F). As enxertias bem sucedidas permitiram o desenvolvimento das plantas, que foram transferidas para vasos plásticos contendo substrato e mantidas em câmara úmida (Figura 13G) até aclimatização (Figura 13H).

Figura 13. Etapas do processo de obtenção de plantas transgênicas de *C. sinensis*. A) Explantes cultivados em meio de cultura MT após inoculação com suspensão bacteriana de *A. tumefaciens*. B) Desenvolvimento de gemas adventícias em meio de cultura de seleção e regeneração de plantas incubadas em ausência de luz. C) Desenvolvimento de gemas adventícias em meio de cultura de seleção e regeneração de plantas após transferência para fotoperíodo de 16 h de luz. D) Gema adventícia em meio de cultura de enraizamento. E) Gema adventícia enraizada. F) Desenvolvimento de gema adventícia de laranja 'Hamlin' enxertada *in vitro* em citrange Carrizo. G) Planta em fase de aclimatização. H) Planta transgênica 'Hamlin' desenvolvida após enxertia em citrange Carrizo.

Foram realizados oito experimentos de transformação genética, totalizando três experimentos com a construção gênica pC2201CsGAPC2/*uidA*, um experimento com a construção gênica pC2201CsEF1/*uidA*, dois experimentos com a construção gênica pC2201CsCYC/*uidA* e dois experimentos com a construção pC2201CaMV35S/*uidA*. Nesses experimentos, foram inoculados com *A. tumefaciens* 1140, 960, 1170 e 881 explantes, obtendo-se 75, 81, 93 e 63 explantes responsivos, para as construções gênicas pC2201CsGAPC2/*uidA*, pC2201CsEF1/*uidA*, pC2201CsCYC/*uidA* e pC2201CaMV35S/*uidA*, respectivamente. Para a identificação da transgenia, o teste histoquímico da atividade GUS foi realizado em 60, 77, 83 e 41 gemas adventícias, tendo sido identificadas 34, 48, 48, 26 gemas adventícias GUS positivas, resultando em uma eficiência média de transformação genética de 3%, 5%, 4% e 2% para as construções gênicas pC2201CsGAPC2/*uidA*, pC2201CsEF1/*uidA*, pC2201CsCYC/*uidA* e pC2201CaMV35S/*uidA*, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6. Experimentos de transformação genética realizados com laranja doce ‘Hamlin’, via *A. tumefaciens*, com as construções gênicas pC2201CsGAPC2/*uidA*, pC2201CsEF1/*uidA*, pC2201CsCYC/*uidA* e pC2201CaMV35S/*uidA*.

Construção gênica	Explantos responsivos* / Total explantes	Gemas adventícias GUS+** / Gemas adventícias	Eficiência de transformação genética*** (%)	Plantas aclimatizadas PCR +
pC2201CsGAPC2/ <i>uidA</i>	33/380	15/22	3.9	7
pC2201CsGAPC2/ <i>uidA</i>	20/320	9/20	2.8	6
pC2201CsGAPC2/ <i>uidA</i>	22/440	10/18	2.3	7
Total	75/1140	34/60	3.0	20
pC2201CsEF1/ <i>uidA</i>	81/960	48/77	5.0	22
Total	81/960	48/77	5.0	22
pC2201CsCYC/ <i>uidA</i>	25/570	6/22	1.1	3
pC2201CsCYC/ <i>uidA</i>	68/600	42/61	7.0	19
Total/	93/1170	48/83	4.05	22
pC2201CaMV35S/ <i>uidA</i>	20/273	8/13	1.1	3
pC2201CaMV35S/ <i>uidA</i>	43/608	18/28	2.9	7
Total	63/881	26/41	2.0	10

* Explantes que apresentaram o desenvolvimento de gemas adventícias.

**Gemas adventícias que apresentaram coloração azul no teste histoquímico da atividade GUS.

*** Número de plantas GUS+(x100)/ número total de explantes.

Além do ensaio histoquímico da atividade GUS, a identificação de plantas transgênicas também foi realizada por análise de PCR. Fragmentos de 1076, 1434, 758 e 897 pb, correspondentes a cada promotor em estudo associado ao gene *uidA*, foram identificados nas plantas contendo as construções gênicas pC2201CsGAPC2/*uidA* (Figura 14A), pC2201CsEF1/*uidA* (Figura 14B), pC2201CsCYC/*uidA* (Figura 14C) e pC2201CaMV35S/*uidA* (Figura 14D), respectivamente. A análise de PCR permitiu a amplificação do fragmento de interesse em todas as plantas GUS+. As plantas PCR+ estão sendo cultivadas em de casa-de-vegetação.

Figura 14. Análise de PCR de plantas de laranja ‘Hamlin’ regeneradas dos experimentos de transformação genética com as construções gênicas pC2201CsGAPC2/*uidA* (A), pC2201CsEF1/*uidA* (B), pC2201CsCYC/*uidA* (C) e pC2201CaMV35S/*uidA* (D). T: Testemunha (DNA de planta não transgênica); C-: Controle negativo (água); C+: Controle positivo (DNA plasmidial da respectiva construção); M: Marcador de peso molecular de 1000 pb (Sinapse).

4.3 Ensaio histoquímico da atividade GUS em plantas transgênicas de *C. sinensis*

O ensaio histoquímico para a detecção da atividade GUS foi realizado em diferentes tecidos das plantas regeneradas nos experimentos de transformação genética com cada construção gênica. Foi possível observar a presença de coloração azulada, relativa à reação da enzima GUS com o substrato X-GLUC, em raízes, folhas e segmentos de caule de todas as plantas transgênicas, independente do promotor utilizado. Não foi detectada atividade GUS nos tecidos da planta não transgênica (Figura 15).

O padrão da atividade GUS observado nas plantas transgênicas com os promotores CsGAPC2, CsEF1 e CsCYC é similar ao observado em plantas transgênicas contendo o

promotor CaMV35S. Esses resultados demonstram que os promotores em estudo são funcionais e direcionam expressão gênica em toda a planta, assim como o promotor CaMV35S.

Figura 15. Ensaio histoquímico da atividade GUS sob controle dos promotores CaMV35S, CsGAPC2, CsEF1 e CsCYC em raízes, folhas e segmentos de caule de plantas transgênicas de laranja ‘Hamlin’ e em uma planta não transgênica, utilizada como testemunha.

4.4 Análise de Southern blot

A análise de Southern blot confirmou a integração do transgene de interesse para 10 plantas regeneradas nos experimentos de transformação genética para cada uma as construções gênicas pC2201CsGAPC2/*uidA* (Figura 16A), pC2201CsEF1/*uidA* (Figura 16B), pC2201CsCYC/*uidA* (Figura 16C) e pC2201CaMV35S/*uidA* (Figura 16D). O número de eventos de inserção do transgene no genoma das plantas variou de um a quatro, sendo que a maioria das plantas apresentou apenas uma única inserção. As inserções estão posicionadas em diferentes pontos do genoma, o que confirma a origem a partir de eventos independentes de transformação genética. Não foi observada hibridização nas amostras não transgênicas.

Figura 16. Análise de Southern blot, utilizando sonda para detecção do gene *uidA*, em plantas transgênicas de laranja ‘Hamlin’ contendo as construções gênicas pC2201CsGAPC2/*uidA* (A), pC2201CsEF1/*uidA* (B), pC2201CsCYC/*uidA* (C) e pC2201CaMV35S/*uidA* (D). C+: Controle positivo (amostra da sonda, formada pelo amplicon do gene *uidA* - 412 pb). C-: Controle negativo (DNA de planta não transgênica). Colunas numeradas correspondem ao DNA das plantas transgênicas de laranja ‘Hamlin’ regeneradas dos experimentos com cada construção gênica.

4.5 Quantificação da expressão do gene *uidA* por análise de RT-qPCR

A análise de RT-qPCR foi realizada em sete plantas, para cada construção gênica, previamente analisada por Southern blot, contendo apenas um evento de inserção. Uma das

plantas contendo o promotor CaMV35S apresentou o valor de Ct do gene alvo mais elevado, entre todas as plantas analisadas, e foi usada como controle para o cálculo da quantificação da expressão relativa do gene *uidA* de todas as plantas. A expressão do gene *uidA* sob o controle do promotor CaMV35S variou de 5 a 54, em relação a planta de menor expressão. As plantas avaliadas para os promotores de citros apresentaram expressão do gene *uidA* que variou de 2 a 47 (CsCYC), 7 a 34 (CsGAPC2) e 11 a 24 (CsEF1) em relação a planta de menor expressão (Figura 17).

Considerando a média da expressão relativa das sete plantas analisadas para cada construção, os promotores de citros apresentaram expressão aproximada de 64% (CsCYC), 58% (CsGAPC2) e 47% (CsEF1), em relação a expressão direcionada pelo promotor CaMV35S. No entanto, estatisticamente, não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes promotores (Figura 18).

Figura 17. Expressão relativa do gene *uidA* sob controle dos promotores CaMV35S (A), CsCYC (B), CsGAPC2 (C) e CsEF1 (D) em plantas transgênicas de laranja ‘Hamlin’. A planta 1*contendo o promotor CaMV35S foi utilizada como controle para o cálculo da expressão gênica. Cada coluna representa a média de três análises independentes, com o respectivo erro padrão indicado pela barra vertical.

Figura 18. Expressão relativa do gene *uidA* sob controle dos promotores CaMV35S, CsCYC, CsGAPC2 e CsEF1 em plantas transgênicas de laranja ‘Hamlin’. Cada coluna representa a média de sete plantas, com o respectivo erro padrão indicado pela barra vertical.

4.6 Caracterização dos elementos cis-regulatórios nos promotores CsGAPC2, CsCYC e CsEF1

A análise da sequência de cada promotor utilizando-se o banco de dados PLACE (Higo et al. 1999) revelou a presença de um grande número de elementos cis-regulatórios. O posicionamento relativo dos elementos cis-regulatórios nos promotores foi determinado a partir do códon ATG, denominado +1. Nas Figuras 19 - 21 estão representados os diferentes elementos cis-regulatórios, assim como a região 5’UTR, o sítio de início de transcrição (SIT), o códon ATG e os primers forward e reverse utilizados para elaborar as diferentes versões truncadas de cada promotor.

O promotor CsGAPC2 contém 1090 pb, com uma região promotora de 1029 pb a montante do SIT e uma região de 61 pb correspondente a região 5’UTR. De acordo com as análises *in silico*, foram encontrados 78 putativos elementos cis-regulatórios distribuídos ao longo do promotor (Figura 19; Tabela 7 – anexo). O elemento TATAbox, considerado essencial para a iniciação da transcrição foi encontrado na posição -226. O elemento CAATbox, relatado por contribuir para o aumento dos níveis de transcrição gênica, foi encontrado em várias posições (-2, -527, -780, -915, -1005, -1026 e -1035). Dentre os

elementos cis-regulatórios encontrados, seis são sítios de ligação para fatores de transcrição regulados por luz, com destaque para o G-box e GATAbbox, presentes em 5 (-133, -294, -615, -668 e -749) e 4 posições (-10 -193, -695 e -993), respectivamente. Também estão presentes os elementos IBOXcore (-10 e -695), GT1CORE (-253), PALBOXAPC (-879) e -10PEHVPSBD (-563). A análise também evidenciou a presença de elementos relacionados com expressão gênica em raiz, como o elemento AS-1, encontrado na posição -286, e o elemento ROOTMOTIFTAPOX1, encontrado na posição -308. Além desses, são relatadas regiões regulatórias associadas à expressão gênica em semente, como o RYREPEATBNNAPA (-852), TGACGTVMAMY (-286), CANBNNAPA (-336) e AACACOREOSGLUB1 (-38), à expressão gênica específica em grãos de pólen, POLLEN1LELAT52 (-927, -631 e -154) e GTGANTG10 (-1066, -873), e em resposta a hormônios como auxina, ARFAT (-1051) e CATATGGMSAUR (-835), e giberelina, PYRIMIDINEBOX (-351, -454, -769).

Dentre os diferentes elementos de regulação encontrados, uma grande parte são elementos relacionados à resposta a estresses bióticos e abióticos. Os elementos WRKY, WBOX, WBOXATNPR1 são sítios de ligação de vários fatores de transcrição da família WRKY, encontrados em muitos promotores de genes induzidos pela presença de patógenos. Estes elementos estão presentes em 10 (-130, -179, -286, -307, -512, -865, -872, -899, -977, -1080), 4 (-179, -512, -865, -899) e 3 (-177, -513, -900) diferentes posições no promotor CsGAPC2. De forma semelhante, BIHD1OS e GT1GMSCAM4, que aparece em 2 (-553, -1019) e 3 diferentes posições (-160, -630, -808), respectivamente, também interagem com fatores de transcrição relacionados à presença de patógenos. Os cis-elementos MYB2AT (-297), MYBST1(-696) e MYB1AT (-208) são sítios reconhecidos pelo fator de transcrição MYB, envolvidos na sinalização de estresse hídrico. Outros exemplos que aparecem com frequência são os sítios ACGTATERD1 (-133, -294, -615, -668 e -749), sítio de ligação para fatores de transcrição bZIP, relacionados a desidratação, assim como CBFHV (-1040) e ARR1AT (-216, -364, -563, -602, -788, -831, -950, -1008) relacionados a desidratação e ao estresse salino, respectivamente. COLDMOTIF (-1061) é um elemento de resposta à baixa temperatura.

Figura 19. Sequência do promotor CsGAPC2 apresentando os elementos cis-regulatórios preditos pelo banco de dados PLACE. O sítio de início da transcrição (SIT) está indicado pela seta. A região 5'UTR está representada em azul. O códon ATG de início de tradução (+1) está representado em vermelho. Os primers forward e reverse, utilizados para elaboração das versões truncadas do promotor, estão destacados na sequência em negrito e sublinhados.

O promotor CsCYC contém 1036 pb, com uma região promotora de 994 pb a montante do SIT e uma região de 42 pb correspondente a região 5'UTR. De acordo com as análises *in silico*, foram encontrados 70 putativos elementos cis-regulatórios distribuídos ao longo do promotor (Figura 20; Tabela 7 –anexo). O elemento TATAbox foi encontrado em duas diferentes posições (-107 e -297), assim como o elemento CAATbox, encontrado em várias posições (-9, -17, -25, -353, -463, -592, -616, -677, -704, -725, -749, -803, -895, -916, -997). Estão presentes cinco elementos relacionados com fatores de transcrição regulados por luz e expressos em tecidos fotossintetizantes, com destaque para o Gbox e GATABox, presentes em 4 (-167, -432, -551, -981) e 5 posições (-174, -295, -420, -468, -1008), respectivamente, assim como os elementos CIACADIANLELH (-182, -274, -458), REALPHALGLHCB21 (-12, -20) e SORLIP1AT (-867, -925). Além desses, são observadas regiões regulatórias determinantes para expressão gênica tecido-específica, representada pelos elementos AS-1 (-837) e ROOTMOTIFTAPOX1 (-314, -551, -558, -659), que determinam expressão gênica na raiz, GCN4OSGLUB1 (-411) e CANBNNAPA (-262), em semente,

POLLEN1LELAT52 (-57) e GTGANTG10 (-970, -792, -347), em grãos de pólen e TAAAGSTKST1 (-479, -987), em células guardas.

Elementos relacionados à resposta a estresses bióticos e abióticos também são descritos, como os sítios de ligação de fatores de transcrição da família WRKY, WRKY (-837) e WBOXATNPR1 (-838), e de fatores de transcrição da família MYB, MYB2AT (-103), MYBST1(-421) e MYBPZM (-254), relacionados à indução da expressão gênica pela presença de patógenos e à sinalização de estresse hídrico, respectivamente. Outros elementos encontrados são ACGTATERD1 (-167, -432, -551, -981) e ABRELATERD1 (-167), relacionados à desidratação, assim como ARR1AT (-145, -338, -366, -373, -378, -394, -414, -426, -474, -525, -969) e CBFHV (-1000) relacionados a estresse salino e desidratação, respectivamente. O elemento HSE (-747) é responsável pela indução da expressão gênica por choque térmico e também contribui parcialmente para a indução da expressão gênica por estresse oxidativo. O elemento GT1GMSCAM4 (-330) é sítio de ligação de fatores de transcrição que atuam em resposta à presença de patógenos.

Figura 20. Sequência do promotor CsCYC apresentando os elementos cis-regulatórios preditos pelo banco de dados PLACE. O sítio de início da transcrição (SIT) está indicado pela seta. A região 5'UTR está representada em azul. O códon ATG de início de tradução (+1) está representado em vermelho. Os primers forward e reverse, utilizados para elaboração das versões truncadas do promotor, estão destacados na sequência em negrito e sublinhados.

O promotor CsEF1 contém 2476 pb, com uma região promotora de 1474 pb a montante do SIT e uma região de 85 pb correspondente a região 5'UTR. A região 5'UTR contém um íntron de 917 pb. De acordo com as análises *in silico*, foram encontrados 124 putativos elementos cis-regulatórios distribuídos ao longo do promotor (Figura 21; Tabela 7 – anexo). O elemento TATABox foi encontrado em três diferentes posições (-1038, -1051, -1139), logo após o íntron, o que representa início da região promotora (-13, -26 e -114). O elemento CAATbox também aparece em várias posições (-175, -490, -761, -774, -933, -1086, -1156, -1667, -2430). Os elementos GATABox, G-box e IBOXcore, relacionados com fatores de transcrição regulados por luz, estão localizados em 15 (-27, -86, -141, -146, -307, -401, -582, -1009, -1049, -1198, -1231, -1555, -2098, -2294, -2309), 7 (-591, -1079, -1099, -1607, -1839, -1946, -2460) e 3 diferentes posições (-1231, -2098, -2294) ao longo da sequência. Também foram preditos, embora em menor frequência, outros três elementos com a mesma função, denominados CIACADIANLELHC (-1577, -2348), GT1CORE/GT-1 (-1546) e -10PEHVPSBD (-1414). Os elementos AS-1 e ROOTMOTIFTAPOX1, envolvidos na expressão gênica em raiz, aparecem em 1 (-854) e 10 (-85, -400, -581, -1069, -1126, -1659, -1622, -1693, -2138, -2447) posições, respectivamente. Além desses, são observadas regiões regulatórias específicas para expressão gênica em grãos de pólen, POLLEN1LELAT52 (-1647, -1441, -1181, -1173) e GTGANTG10 (-2458, -1795, 1762, -1480, 992, -584, -309, -277), associadas à resposta a presença dos hormônios auxinas, como ARFAT (-226, -1308) e CATATGGMSAUR (-658, -730), e giberelinas, como PYRIMIDINEBOX (-639, -2063).

Elementos envolvidos na resposta a estresses bióticos e abióticos também são descritos no promotor CsEF1, a exemplo dos sítios de ligação de fatores de transcrição da família WRKY, WRKY (-723, -854, -992, -1333, -1880, -1994, -2188, -2352), WBOX (-723, -1994) e WBOXATNPR1 (-723, -1880, -1994, -2188), assim como o elemento BIHD1OS (-764), todos relacionados à indução da expressão gênica pela presença de patógenos. Os elementos MYB2AT (-2235, -2299), MYBST1 (-1199, -28) e MYB1AT (-2373) são sítios reconhecidos por fatores de transcrição MYB e os elementos MYCATERD1 (-284) e MYCATRD22 (-1876) são sítios reconhecidos por fatores de transcrição MYC. Ambos estão envolvidos na sinalização de estresse hídrico. Os elementos ACGTATERD1 (-591, -1079, -1099, -1607, -1839, -1946, -2460) e ABRELATERD1 (-2460, -1839) são relacionados à desidratação e o elemento ARR1AT (22 posições) está ligado ao estresse salino. O elemento LTRE1HVBLT49 (-1290) é responsável pela indução da expressão gênica por baixa temperatura.

ABRELATERD1

-2476 **GATTGTGTCGGACCTGGACGTGAT**GTCTCTCATATTTAAATAGGAAACAAATGAACAGCCAAAGGCCGCTGTTCTTTTATA
FORWARD 1 Gbox/ACGTATERD1 ROOTMOTIF WRKYCAATbox

-2396 TCTCTCAGCTTCATTCTGAAGGAAACCATCCATGGCCAAATGCTGACAAATACCATCTTGGTTTAACAATGTTGCTCG
MYB1AT CIACADIANLELHC

-2316 TGTGTGTTGATACTTCTTTAACTGATACTCATACCTTAAATAACAACCTTTATGAGACAAAGCCCTCTAACTTCCTATCT
GATABox MYB2ATGATABox/IBOXCORE WBOXATNP1/WRKY

-2236 **GTAAC**TGTTTGTCTGCTGCTTTTGTATGAAGTGTGCTTCTTGACACATTGAATGAGTTGATTTTCTAGGAA
MYB2AT

-2156 AGATGCCAGCTCTTTTAAATATTTGCTGCTGCTTGGTACTCCGTTCAAATAGTAGGAGATAAA**GAGCTTGGAAAGTGC**
ROOTMOTIF GATABox/IBOXCORE **FORWARD 2**

-2076 **TCTGAAA**ATTTCTCCITTTAACTAGATTTTTCATTTTGGGTACTTGTTAATGGTCGCACTAAATTTGTGGGCTAGGGC
WBOXATNP1/WRKY/WBOXPYRIMIDINEBOX

-1996 CTTGACTTGTGTTTATAGGCTTAGGAGTTTTCCTAGTTAATTAGTTTACGTTACAAAAATGCTCTGGTCGCTGTT
WBOXATNP1/WRKY Gbox/ACGTATERD1 ABRELATERD1

-1916 GTATTTCTTAGTAGACAGTAGTAATGCTATATGATTGACACATGTTGTACAGGTACAAAGATTGCATCTGAGCTT**ACG**
MYCATRD22 Gbox/ACGTATERD1

-1836 **TGG**TATATGATGTGGCTTCATTACTAATGTTATGTATTAA**GTGAT**TGTTTATTTATCTTCCACCGTCAGGA**GTGAT**T
GTGANTG10 GTGANTG10

-1756 TTTCTGAAGTAACATGTTTTCGCCGATTAGTTATTTGTTAGTACACTACGACTAATTTCTTAATATTACATTCACGAGT
ROOTMOTIF

-1676 CACGACACCCAAATTCGAATATTTCTAAATAGAAATGAGTAAGATTACTCTCAAATATTTATGAGGAAAACGTTTGCACC
CAATbox ROOTMOTIF POLLENILELAT52 ROOTMOTIF Gbox/ACGTATERD1

-1596 TATAGGAAGGAGGAGGTACCAAGTAATCACTGATCACATTGATACATTTGGTTAAAAACAACGCAAAAGCCCATTTGGAT
CIACADIANLELHC GATABox GT1CORE

-1516 TGTGGTTTTAAATCCCATTAACACTGGGATTTTAGTTACTGATTGTGTGTTGGGGAAGAGCTGGGATTGAGTTAGAAA
-10PEHVPsBD POLLENILELAT52

-1436 ATCAGCGGGGTGATTATTAGTTCTATTCTGCTCTCAAGTGAGGCCACATTCCATTACAACACATCAAGGTAGGGTCCA
WRKY GTGANTG10

-1356 CACGAGTAATCGAAGACGCTTCCTGACCAAGACT**TCGTGGTGCTTGCCTGTCTCTT**AAATTTATATCCGAAACATACACA
FORWARD 3 ARFAT LTRE1HVBTL49

-1276 CCCTCTCAGACGCGCTGTTCACTGATTCCCTTGGACATTACAACGATAATTCAGAAACGGACATCGAAGCGAGTGGGA
GATABox/IBOXCORE MYBST1

-1196 TAAGAGGGACAAAAAGAAAAATAAGAAAAAGAACAATCCCAATCTCCACGGCCATTATAAAATTTATAATATTAGGCT
GATABox POLLENILELAT52 CAATbox ROOTMOTIF TATABox ROOTMOTIF

-1116 TTAGTAAAAAGGAGGACACGTAGGTAATCCAATAGCAGTAAGGGTATATTCGGAACAGGAGATATAAAATTCCTCGTA
Gbox/ACGTATERD1CAATboxACGTATERD1/GboxWRKY GATABoxTATABox TATABox

-1036 **TAA**ACTAGCC**AGCAAACCTATACGAGATATCA**CTCTCTCTGCCCTGACCAGTCTCTTCTATCGCTTGGCGCTAGGG
REVERSE 2 GATABox **SIT**

-956 **TTTTAGCAGAGCTCTTT**CAGtccaatcttctctcttttgatgagtgacaaattaaatttttaattgcatttctgtt
WRKYCAATbox GTGANTG10

-876 tatttttctataagttaatttatgacgagaagttcatttgattcttgcgatttgaattgtgttcgttggtttgatgtagt
AS-1 WBOXATNP1/WRKY/WBOX

-796 acgaatgcttccttcttgatttcaatgattttgtcaatatgttgatcttgaatcgtttatttgaacatatgttgacttt
CAATbox BIHDIOSCAATbox CATATGMSAUR

-716 gaatcgtttaactgatttttatttcattatagatgattttggcatcttttaataacatatgcgcattttattttcct
GTGANTG10CATATGMSAUR PYRIMIDINEBOX

-636 **tttcggttattttgctctagtttagattaacttttttaatttttatatcggttcggtgatattgtaccttagctgatttataaa**
Gbox/ACGTATERD1 GATABoxROOTMOTIF

-556 ataataataatctatgatgtgttttttttatttatttgatcagattctgattttgtttgatatttcaattttatttagtc
CAATbox

-476 tgttgtttcagttttttgtaattattttctgctctttttggattaaaaatgttgattgatctgattcactgtgttgat
GATABox

-396 attttatttttgtaatttttggtttgaattataacatgattacctgctgagtgattggtgattgtgtcccttcttctata
ROOTMOTIFGTGANTG10

-316 tatctgtgtgatacaaacagagtttactgtgccatgtgtgtgattgctgagtttcttttcttgattgtatgtgtgtgtg
GATABox MYCATRD1GTGANTG10

-236 tgtgtgtgtgtctcttattagcttttaattttgtgtataagttggcactactgttaaaacaattgtttgggtccctga
ARFAT CAATbox GATABox

-156 aggtcggtttgatgatgatacagttaaatgaagatgaaattgtccttcaaatttgggctaaattgtttgagattgttg
GATABox GATABox MYBST1 ROOTMOTIF

-76 aagtttgtgttctgccaagcaatttttctaacttgaacttttcttggatag**agTTTAAAGCAAATACCTTTATCATG**
GATABox **REVERSE 1** +1

Figura 21. Sequência do promotor CsEF1 apresentando os elementos cis-regulatórios preditos pelo banco de dados PLACE. O sítio de início da transcrição (SIT) está indicado pela seta. A região 5'UTR está representada em azul. O íntron esta representado em letras minúsculas. O códon ATG de início de tradução (+1) está representado em vermelho. Os primers forward e reverse, utilizados para elaboração das versões truncadas do promotor, estão destacados na sequência em negrito e sublinhados.

4.7 Análises de deleção

4.7.1 Elaboração das construções gênicas de deleção

4.7.1.1 Construções gênicas de deleção do promotor CsGAPC2

A clonagem no vetor pDONRTM/Zeo dos fragmentos CsGAPC2-1090, CsGAPC2-911 e CsGAPC2-497 foi confirmada pela reação de digestão com as enzimas *Hind*III/*Bam*HI (Figura 22A). A transferência destes fragmentos para o vetor pCAMBIA2300 foi confirmada pela reação de digestão com as enzimas *Hind*III/*Bam*HI liberando os fragmentos de 1090 (Figura 22B – coluna 1), 911 (Figura 22B - coluna 2) e 497 pb (Figura 22B - coluna 3) e *Hind*III/*Eco*RI, liberando os fragmentos de 3203 (Figura 22B – coluna 4), 3023 (Figura 22B – coluna 5) e 2606 pb (Figura 22B – coluna 6), correspondente aos fragmentos CsGAPC2-1090, CsGAPC2-911 e CsGAPC2-497 fusionado ao gene *uidA*. Os plasmídeos obtidos foram denominados pC2300CsGAPC2-1090/*uidA*, pC2300CsGAPC2-911/*uidA* e pC2300CsGAPC2-497/*uidA* (Figura 23).

Figura 22. Elaboração das construções gênicas pC2300CsGAPC2-1090/*uidA*, pC2300CsGAPC2-911/*uidA* e pC2300CsGAPC2-497/*uidA*. A) Digestão do vetor pDONRTM/Zeo com as enzimas *Hind*III/*Bam*HI isolando os fragmentos CsGAPC2-1090 (coluna 1), CsGAPC2-911 (coluna 2) e CsGAPC2-497 (coluna 3). B) Digestão dos plasmídeos pC2300CsGAPC2-1090/*uidA* (coluna 1), pC2300CsGAPC2-911/*uidA* (coluna 2) e pC2300CsGAPC2-497/*uidA* (coluna 3) com as enzimas *Hind*III/*Bam*HI, e digestão dos plasmídeos pC2300CsGAPC2-1090/*uidA* (coluna 4), pC2300CsGAPC2-911/*uidA* (coluna 5) e pC2300CsGAPC2-497/*uidA* (coluna 6) com as enzimas *Hind*III/*Eco*RI. M: Marcador de peso molecular de 1 Kb (Biolabs).

Figura 23. Esquema da região de transferência (T-DNA) das construções gênicas de deleção do promotor CsGAPC2. A) pC2300CsGAPC2-1090/*uidA*: gene *uidA* dirigido pela versão completa do promotor CsGAPC2-1090. B) pC2300CsGAPC2-911/*uidA*: gene *uidA* dirigido pela versão truncada CsGAPC2-911. C) pC2300CsGAPC2-497/*uidA*: gene *uidA* dirigido versão truncada CsGAPC2-497. *nptII*: gene de resistência ao antibiótico canamicina; NOS: promotor nopalina sintase; NOS-3': terminador nopalina sintase. LB: borda esquerda. RB: borda direita.

4.7.1.2 Construções gênicas de deleção do promotor CsCYC

A clonagem no vetor pDONR™/Zeo dos fragmentos CsCYC-1036, CsCYC-822 e CsCYC-531 foi confirmada pela reação de digestão com as enzimas *HindIII/BamHI*, liberando os fragmentos de 796 (Figura 24A – coluna 1), 582 (Figura 24A – coluna 2) e 291 pb (Figura 24A – coluna 3). Os fragmentos são menores que o tamanho original, pois há um sítio de restrição *BamHI* na posição 240 da sequência do promotor. A transferência destes fragmentos para o vetor pCAMBIA2300 foi confirmada pela reação de digestão com as enzimas *HindIII/BamHI*, liberando os fragmentos de 796 (Figura 24B – coluna 1), 582 (Figura 24B – coluna 2) e 291 pb (Figura 24B – coluna 3) e *HindIII/EcoRI*, liberando os fragmentos de 3152 (Figura 24B – coluna 4), 2938 (Figura 24B – coluna 5) e 2647 pb (Figura 24B – coluna 6), correspondente aos fragmentos CsCYC-1036, CsCYC-822 e CsCYC-531

fusionados ao gene *uidA*. Os plasmídeos obtidos foram denominados pC2300CsCYC-1036/*uidA*, pC2300CsCYC-822/*uidA* e pC2300CsCYC-531/*uidA* (Figura 25).

Figura 24. Elaboração das construções gênicas pC2300CsCYC-1036/*uidA*, pC2300CsCYC-822/*uidA* e pC2300CsCYC-531/*uidA*. A) Digestão do vetor pDONR™/Zeo com as enzimas *Hind*III/*Bam*HI isolando os fragmentos CsCYC-1036 (coluna 1), CsCYC-822 (coluna 2) e CsCYC-531 (coluna 3). B) Digestão dos plasmídeos pC2300CsCYC-1036/*uidA* (coluna 1), pC2300CsCYC-822/*uidA* (coluna 2) e pC2300CsCYC-531/*uidA* (coluna 3) com as enzimas *Hind*III/*Bam*HI e digestão dos plasmídeos pC2300CsCYC-1036/*uidA* (coluna 4), pC2300CsCYC-822/*uidA* (coluna 5) e pC2300CsCYC-531/*uidA* (coluna 6) com as enzimas *Hind*III/*Eco*RI. M: Marcador de peso molecular de 1 Kb (Biolabs).

Figura 25. Esquema da região de transferência (T-DNA) das construções gênicas de deleção do promotor CsCYC. A) pC2300CsCYC-1036/*uidA*: gene *uidA* dirigido pela versão completa do promotor CsCYC-1036. B) pC2300CsCYC-822/*uidA*: gene *uidA* dirigido pela versão truncada CsGAPC2-822. C) pC2300CsCYC-497/*uidA*: gene *uidA* dirigido pela versão truncada CsCYC-497. *nptII*: gene de resistência ao antibiótico canamicina; NOS: promotor nopalina sintase; NOS-3': terminador nopalina sintase. LB: borda esquerda. RB: borda direita.

4.7.1.3 Construções gênicas de deleção do promotor CsEF1

A clonagem no vetor pDONR™/Zeo dos fragmentos CsEF1-2476, CsEF1-1474, CsEF1-2092 e CsEF1-1322 foi confirmada pela reação de digestão com as enzimas *HindIII*/*BamHI* com a liberação de fragmentos de 400 + 2076 pb (Figura 26A - coluna1), 400 + 1074 pb (Figura 26A - coluna 2), 2092 pb (Figura 26A - coluna 3) e 1322 pb (Figura 26A - coluna 4), respectivamente. As versões CsEF1-2476 e CsEF1-1474 apresentam um fragmento de 400 pb pois há um sítio de restrição *HindIII* na sequência do promotor CsEF1. Nas versões CsEF1-2476 e CsEF1-2092, não é possível distinguir o fragmento correspondente ao vetor e o promotor pois o tamanho é o mesmo. A transferência destes fragmentos para o vetor pCAMBIA2300 foi confirmada pela reação de digestão com as enzimas *HindIII*/*BamHI* liberando os mesmos fragmento descritos anteriormente (Figura 26B) e *HindIII*/*EcoRI*, liberando os fragmentos de 400 + 4214 pb (Figura 26C - coluna 1), 400 + 3209 pb (Figura 26C - coluna 2), 4230 pb (Figura 26C - coluna 3) e 3460 pb (Figura 26C -

coluna 4), correspondente aos fragmentos CsEF1-2476, CsEF1-1474, CsEF1-2092 e CsEF1-1322 fusionados ao gene *uidA*, respectivamente. Os plasmídeos obtidos foram denominados pC2300CsEF1-2476/*uidA*, pC2300CsEF1-1474/*uidA*, pC2300CsEF1-2092/*uidA* e pC2300CsEF1-1322/*uidA* (Figura 27).

Figura 26. Elaboração das construções gênicas pC2300CsEF1-2476/*uidA*, pC2300CsEF1-1474/*uidA*, pC2300CsEF1-2092/*uidA* e pC2300CsEF1-1322/*uidA*. A) Digestão do vetor pDONR™/Zeo com as enzimas *Hind*III/*Bam*HI isolando os fragmentos CsEF1-2476 (coluna 1), CsEF1-1474 (coluna 2), CsEF1-2092 (coluna 3) e CsEF1-1322 (coluna 4). B) Digestão dos plasmídeos pC2300CsEF1-2476/*uidA* (coluna 1), pC2300CsEF1-1474/*uidA* (coluna 2), pC2300CsEF1-2092/*uidA* (coluna 3) e pC2300CsEF1-1322/*uidA* (coluna 4), com as enzimas *Hind*III/*Bam*HI. C) Digestão dos plasmídeos pC2300CsEF1-2476/*uidA* (coluna 1), pC2300CsEF1-1474/*uidA* (coluna 2), pC2300CsEF1-2092/*uidA* (coluna 3) e pC2300CsEF1-1322/*uidA* (coluna 4) com as enzimas *Hind*III/*Eco*RI. M: Marcador de peso molecular de 1 Kb (Biolabs).

Figura 27. Esquema da região de transferência (T-DNA) das construções gênicas de deleção do promotor CsEF1. A) pC2300CsEF1-2476/*uidA*: gene *uidA* dirigido pela versão completa do promotor CsEF1-2476. B) pC2300CsEF1-1474/*uidA*: gene *uidA* dirigido pela versão sem o íntron CsEF1-1474. C) pC2300CsEF1-2092/*uidA*: gene *uidA* dirigido pela versão truncada CsEF1-2092. D) pC2300CsEF1-1322/*uidA*: gene *uidA* dirigido pela versão truncada CsEF1-1322. *nptII*: gene de resistência ao antibiótico canamicina; NOS: promotor nopalina sintase; NOS-3': terminador nopalina sintase. LB: borda esquerda. RB: borda direita.

4.7.2 Avaliação da expressão transiente e estável do gene *uidA* em *N. benthamiana* pelo o ensaio histoquímico e fluorimétrico da atividade GUS

A funcionalidade das diferentes versões de cada promotor foi inicialmente avaliada pela expressão transiente em folhas de *N. benthamiana*, por meio de agroinfiltração.

O ensaio histoquímico da atividade GUS nas folhas infiltradas mostrou que todas as versões dos promotores foram capazes de promover a expressão do gene *uidA* (Figura 28). No entanto, foi verificada uma acentuada redução da coloração azul com a utilização da versão truncada CsGAPC2-497, em comparação com a versão truncada CsGAPC2-911 e a versão completa CsGAPC2-1090 (Figura 28A). As versões do promotor CsCYC (Figura 28B), assim como do promotor CsEF1 (Figura 28C) apresentaram o padrão da atividade GUS similar. A

atividade GUS foi detectada em folhas infiltradas com o vetor de expressão contendo o promotor constitutivo CaMV35S, utilizado como controle positivo e não foi detectada em folhas infiltradas com a *A. tumefaciens* desarmada, utilizada como controle negativo (Figura 28D).

Figura 28. Ensaio histoquímico da atividade GUS em folhas de *N. benthamiana* infiltradas com *A. tumefaciens* com as construções gênicas de deleção elaboradas. A) Construções pC2300CsGAPC2-1090/*uidA* (1), pC2300CsGAPC2-911/*uidA* (2) e pC2300CsGAPC2-497/*uidA* (3). B) Construções pC2300CsCYC-1036/*uidA* (1), pC2300CsCYC-822/*uidA* (2) e pC2300CsCYC-531/*uidA* (3). C) Construções pC2300CsEF1-2476/*uidA* (1), pC2300CsEF1-1474/*uidA* (2), pC2300CsEF1-2092/*uidA* (3) e pC2300CsEF1-1322/*uidA* (4). D) Controle positivo – promotor CaMV35S (1) e controle negativo - *A. tumefaciens* desarmada (2).

Uma vez confirmada a funcionalidade das diferentes versões de cada promotor nos ensaios de expressão transiente, os mesmos foram testados em plantas transgênicas de *N. benthamiana* pelo ensaio histoquímico e fluorimétrico para verificar os efeitos na expressão gênica.

As etapas do processo de obtenção de plantas transgênicas de *N. benthamiana* estão ilustradas na Figura 29. A indução de calos a partir dos segmentos foliares (Figura 29A) ocorreu após cultivo dos explantes em meio de cultura de seleção e regeneração (Figura 29B) por aproximadamente 15 dias, sendo obtidos para cada transformação cerca de 50 calos. Os calos desenvolvidos foram transferidos para meio de cultura de seleção e regeneração até o desenvolvimento de gemas adventícias (15 dias) (Figura 29C). Destes, aproximadamente 25 calos de cada construção formaram gemas adventícias, cujos brotos foram individualizados e transferidos para meio de enraizamento (Figura 29D). As plântulas positivas para o teste de GUS, que apresentaram bom desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea, foram transferidas para vasos cobertos contendo substrato para aclimatização (Figuras 29E - F).

Após a aclimatização, as plantas foram mantidas em casa de vegetação (Figura 29G). Ao final, foram obtidos de 8-10 plantas para cada construção gênica.

Figura 29. Etapas do processo de obtenção de plantas transgênicas de *N. benthamiana*. A) Segmentos foliares de *N. benthamiana* em meio de cultura de co-cultivo. B) Explantes em meio de cultura de seleção e regeneração para a indução de calos. C) Gemas adventícias desenvolvidas a partir dos calos. D) Plântulas em meio de cultura de enraizamento. E - F) Plantas em fase de aclimatização. G) Planta aclimatizada.

As plantas foram analisadas por PCR para a identificação da transgenia. Um fragmento de 460 pb, correspondente a uma parte do gene *nptII* e o terminador NOS foi amplificado nas plantas transgênicas, como pode ser visualizado na Figura 30. A análise de PCR permitiu a amplificação do fragmento de interesse em todas as plantas GUS+.

As plantas transgênicas obtidas foram submetidas ao ensaio histoquímico para a detecção da atividade GUS (Figura 31). Para as versões do promotor CsGAPC2, a atividade GUS foi detectada em folhas, caules e raízes. No entanto, nas plantas contendo a versão truncada CsGAPC2-497 foi possível observar uma acentuada redução da coloração azul em folhas em comparação com as plantas contendo a versão truncada CsGAPC2-911 e a versão completa CsGAPC2-1090. Nas raízes, pode-se observar forte coloração azul para as três versões do promotor.

Figura 30. Análise de PCR de plantas de *N. benthamiana* regeneradas dos experimentos de transformação genética com as construções gênicas pC2300CsGAPC2-1090/*uidA* (coluna 1), pC2300CsGAPC2-911/*uidA* (coluna 2), pC2300CsGAPC2-497/*uidA* (coluna 3), pC2300CsCYC-1036/*uidA* (coluna 4), pC2300CsCYC-822/*uidA* (coluna 5), pC2300CsCYC-531/*uidA* (coluna 6), pC2300CsEF1-2476/*uidA* (coluna 7), pC2300CsEF1-1474/*uidA* (coluna 8), pC2300CsEF1-2092/*uidA* (coluna 9) e pC2300CsEF1-1322/*uidA* (coluna 10). T: Testemunha (DNA de planta não transgênica), C-: Controle negativo (água); C+: Controle positivo (DNA plasmidial); M: Marcador de peso molecular de 1kb (Biolabs).

Para as diferentes versões do promotor CsEF1, assim como do promotor CsCYC, a atividade GUS foi detectada em folhas, raízes e caules de forma similar. Os resultados apresentados confirmam que as diferentes versões de cada promotor não causaram perda de função dos promotores em estudo, como já anteriormente observado na avaliação da atividade GUS por expressão transiente.

As plantas transgênicas obtidas também foram submetidas ao ensaio fluorimétrico para a quantificação da atividade GUS. As sucessivas deleções do promotor CsGAPC2 causaram uma redução significativa da atividade GUS em folhas de plantas contendo as versões truncadas CsGAPC2-911 (92 nmol) e CsGAPC2-497 (42 nmol) em comparação com a versão completa CsGAPC2-1090 (162 nmol). A atividade GUS em raízes não foi afetada, apresentando-se similar para as três versões do promotor (151, 116 e 119 nmol para CsGAPC2-1090, CsGAPC2-911 e CsGAPC2-497, respectivamente) (Figura 32A).

As sucessivas deleções no promotor CsCYC não afetaram a atividade GUS nas plantas avaliadas. As versões truncadas CsCYC-531 e CsCYC-822 foram suficientes para conferir atividade GUS de forma similar a versão completa CsCYC-1036 em folhas (157, 115 e 132 nmol, respectivamente) e raízes (97, 60 e 59 nmol, respectivamente) de *N. benthamiana* (Figura 32B).

Figura 31. Ensaio histoquímico da atividade GUS em folhas, raízes e segmentos de caule de plantas transgênicas de *N. benthamiana* com as diferentes versões do promotor CsGAPC2 (CsGAPC2-1090, CsGAPC2-911, CsGAPC2-911), CsEF1 (CsEF1-2476, CsEF1-1474, CsEF1-2092, CsEF1-1322) e CsCYC (CsCYC-1036, CsCYC-822, CsCYC-531).

Para o promotor CsEF1, quando compara-se a versão CsEF1-2476 e CsEF1-1474, que representam as versões com e sem o íntron, respectivamente, a atividade GUS foi semelhante em folhas (123 nmol e 116 nmol) e raízes (105 nmol e 59 nmol), indicando que o íntron não teve efeito sobre a expressão gênica. Comparando-se a versão completa CsEF1-2476 com as versões truncadas CsEF1-2092 e CsEF1-1322, CsEF1-2092 (222 nmol) apresentou atividade GUS superior a CsEF1-2476 (122 nmol), mas não diferiu estatisticamente da CsEF1-1322 (167 nmol), quando avaliadas em folhas. Em raízes, a atividade GUS foi similar para as três versões do promotor (105, 119, 105 nmol), indicando que o aumento da região promotora inicialmente clonada (CsEF1-1322) não trouxe incrementos na expressão gênica (Figura 32C).

Figura 32. Ensaio fluorimétrico da atividade GUS em folhas e raízes de plantas transgênicas de *N. benthamiana* com as diferentes versões de cada promotor. A) promotor CsGAPC2. B) Promotor CsCYC. C) Promotor CsEF1. Cada coluna representa a média de seis plantas, com o respectivo erro padrão indicado pela barra vertical. Médias seguidas pela mesma letra (em folhas) não diferem entre si pelo teste de Tukey no nível de significância de 5%. Médias seguidas pela mesma letra (em raízes) não diferem entre si pelo teste de Tukey no nível de significância de 5%.

5. DISCUSSÃO

O melhoramento genético de plantas permitiu a expansão de fronteiras agrícolas e aumento significativo da produtividade de inúmeras espécies cultivadas, pela obtenção de cultivares com bom desempenho agrônômico e adaptados a diversas condições (Borém e Miranda 2009). No entanto, quando se deseja transferir genes entre espécies não relacionadas, pertencentes a gêneros, famílias e até reinos distintos, os métodos clássicos de melhoramento esbarram em limitações impostas por barreiras intransponíveis de incompatibilidade sexual (Visarada et al. 2009). Nesse contexto, a engenharia genética surgiu com o diferencial de romper essas barreiras, possibilitando o isolamento de um gene de um dado organismo e sua transferência para outro organismo. O resultado é um indivíduo geneticamente igual ao utilizado para receber o gene de interesse, porém acrescido de uma nova característica genética. As plantas obtidas por esse tipo de manipulação são chamadas organismos geneticamente modificados (OGMs) ou plantas transgênicas (Visarada et al. 2009; Anami et al. 2013).

A partir da década de 80, muitas espécies de interesse comercial passaram a ser modificadas com a tecnologia da engenharia genética, fazendo uso de elementos genéticos oriundos de gêneros, famílias e até mesmo reinos distintos. Um exemplo de sucesso, aplicado inicialmente para a cultura da soja, é o gene isolado de *A. tumefaciens* que codifica a proteína *5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate* (EPSPS) e confere resistência ao herbicida glifosato (Marcelino et al. 2007). Outro exemplo que merece ser citado é o gene que codifica a proteína cristal (*Cry*), responsável pela atividade tóxica a insetos, isolado da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt). Genes Bt codificadores de proteínas *Cry* foram introduzidos em várias espécies para obtenção de resistência a insetos, a exemplo do milho e algodão (Bobrowski et al. 2003). Segundo o relatório divulgado pelo Serviço Internacional para a Aquisição de Aplicações em Agrobiotecnologia (ISAAA), o cultivo destas variedades é realizado em escala comercial em grandes áreas de países como EUA, Argentina e Brasil (James 2015).

No caso específico de citros, embora não existam até o momento variedades transgênicas comerciais, diferentes exemplos são descritos na literatura adotando a mesma abordagem para incorporar características úteis em cultivares copa e porta-enxerto, pelo uso de genes isolados de insetos (Boscariol et al. 2006; Cardoso et al. 2010; He et al. 2011), bactérias (Azevedo et al. 2006b; Barbosa-Mendes et al. 2009; Yang et al. 2011) e vírus (Domínguez et al. 2000; Ananthakrishnan et al. 2007; Muniz et al. 2012) sendo, na maioria

dos casos, controlados pelo promotor CaMV35S (Domínguez et al. 2000; Azevedo et al. 2006a; Boscariol et al. 2006; Cardoso et al. 2010; Yang et al. 2011; Muniz et al. 2012).

Apesar do crescente cultivo e comercialização de organismos geneticamente modificados, ainda há restrições em relação a sua adoção. A maioria dos países da União Européia, por exemplo, é contrária ao cultivo e comercialização de transgênicos (James 2015). A relutância para a aceitação de culturas transgênicas ocorre, principalmente, devido à inserção artificial de genes em espécies que não podem hibridizar por meios naturais (Lassen et al. 2002). Assim, o desenvolvimento de tecnologias que se assemelham com a transferência de genes por hibridação sexual, como a cisgenia e a intragenia, podem diminuir as restrições à aplicação da engenharia genética na agricultura (Schaart et al. 2016).

A obtenção de plantas pela cisgenia/intragenia requer esforços adicionais relacionados à disponibilidade de elementos genéticos isolados da espécie de interesse. A adoção dessas técnicas descarta, por exemplo, a possibilidade de uso dos sistemas de seleção atualmente adotados, que inclui o gene *nptII* que confere resistência ao antibiótico canamicina e o gene *hptII* que confere resistência ao antibiótico higromicina, ambos isolados da bactéria *Escherichia coli* (Fraley et al. 1983; Waldron et al. 1985). O promotor CaMV35S também deverá ser substituído por outros isolados das espécies de interesse, o que abre uma demanda por elementos genéticos isolados de citros, incluindo promotores constitutivos.

No presente trabalho, foram identificados e isolados três promotores de genes constitutivos de citros, CsGAPC2, CsCYC e CsEF1 e avaliados pela fusão ao gene repórter *uidA* em plantas de citros. A funcionalidade dos três promotores foi confirmada por ensaio histoquímico da atividade GUS, mostrando que os três promotores direcionaram expressão em folhas, caules e raízes de plantas transgênicas de citros de forma similar ao CaMV35S.

O nível de expressão do gene *uidA* sob controle dos diferentes promotores pela análise de RT-qPCR mostra que a expressão dos promotores CsCYC, CsGAPC2 e CsEF1 correspondeu a uma atividade aproximada de 64%, 58% e 47%, respectivamente em comparação com o promotor CaMV35S. Resultados semelhantes foram obtidos por Han et al. (2015), em que a atividade do promotor AtTCTP em *Arabidopsis* foi aproximadamente 55% inferior ao promotor CaMV35S, mas foi suficiente para controlar a expressão do gene BAR, que confere resistência a um herbicida, na seleção de calos e plantas transgênicas. Da mesma forma, Gittins et al. (2000) observaram que o promotor do gene que codifica a subunidade pequena da Rubisco RBCS3CP isolado de tomate (*Lycopersion esculentum*) e SRS1P isolado de soja (*Glycine max*) direcionaram a expressão do gene *uidA* em níveis adequados em tecidos vegetativos de plantas de maçã (*Malus pumila*), o que representou aproximadamente

50% da atividade do promotor CaMV35S. Uma das críticas ao promotor CaMV35S é que, em alguns casos, sua atividade excessiva pode levar a fenótipos indesejáveis (Kasuga et al. 1999; Fujita et al. 2004; Dubouzet et al. 2003). Dessa forma, promotores constitutivos que apresentam atividade moderada em relação ao CaMV35S, mas em níveis adequados, podem ser desejáveis para uso em transformação genética de plantas.

Pode-se observar grande variação na expressão gênica de plantas contendo a mesma construção gênica, o que muitas vezes dificulta a análise de dados. Porém, isso é um fenômeno conhecido em plantas transgênicas (Butaye et al. 2005) e relatado em outros trabalhos que avaliam promotores (Park et al. 2010; Benyon et al. 2013; Agarwal et al. 2014). Segundo Butaye et al. (2005), uma das fontes dessa variação é o número de inserções do transgene no genoma. Teoricamente, um aumento do número de inserções resultaria em um aumento do nível de expressão do transgene. No entanto, a integração de múltiplas cópias pode ocasionar a redução da expressão ou silenciamento gênico, resultado das interações entre sequências homólogas, fenômeno denominado silenciamento de genes por homologia (Meyer e Saedler 1996). Além disso, a posição em que o transgene foi integrado dentro do genoma também afeta a sua expressão (Matzke e Matzke 1998). Como a integração ocorre de forma aleatória, as sequências que flanqueiam o transgene são diferentes em eventos independentes de transformação (Gelvin e Kim 2007). Para facilitar a interpretação, no presente estudo foram escolhidas plantas com apenas uma inserção, embora inserida em diferentes posições, o que pode ser a causa da variação.

A caracterização dos elementos cis-regulatórios nos promotores CsGAPC2, CsCYC e CsEF1 mostra que a atividade de cada um é controlada por uma série de elementos cis-regulatórios. A caracterização de promotores constitutivos de várias espécies (Park et al. 2010; Koia et al. 2013; Philip et al. 2013; Li et al. 2014; Bang et al. 2015), incluindo o promotor CaMV35S e outros promotores de origem viral (Lam et al. 1989; Lam e Chua 1989; Khan et al. 2015; Dutt et al. 2016), também apresentam múltiplos elementos cis-regulatórios que interagem com fatores de transcrição induzidos por vários estímulos e com atividade específica em diferentes células e tecidos. A atuação conjunta dos diferentes elementos cis-regulatórios é reponsável por conferir a expressão constitutiva dirigida por esses promotores.

Para uma melhor caracterização dos promotores em estudo, foram realizadas análises de deleção em cada promotor. No promotor CsGAPC2, a atividade do promotor reduziu significativamente em folhas quando as sequências entre a posição -1090 e -497 foram removidos, enquanto nas raízes a atividade se manteve inalterada. Uma possível explicação

para tais resultados é a ausência das sequências regulatórias GATAbbox (-615, -668 e -749), IBOXcore (-695), G-box (-695 e -993), PALBOXAPC (-879) e -10PEHVPSBD (-563), que podem contribuir para a expressão gênica em tecidos fotossintetizantes.

De acordo com a literatura, os elementos GATAbbox, IBOXcore e G-box são sítios de ligação para fatores de transcrição regulados por luz e direcionam expressão gênica em tecidos fotossintetizantes (Block et al. 1990; Donald E Cashmore 1990; Teakle et al. 2002; Reyes et al. 2004). São elementos conservados em muitos promotores de genes regulados por luz ou tecido específico (Block et al. 1990; Donald e Cashmore 1990; Manzara et al. 1991; Argüello-Astorga e Herrera-Estrella 1998; Jeong e Shih 2003; López-Ochoa et al. 2007; Mukherjee et al. 2015). Também são descritos em promotores constitutivos (Park et al. 2010; Bang et al. 2015), incluindo promotores derivados de genes Ubiquina de diversas espécies (Viana et al. 2011; Philip et al. 2013; Hernandez-Garcia e Finer 2014). De forma similar ao ocorrido no presente trabalho, a deleção de sequências GATAbbox no promotor *Cassava vein mosaic virus* (CsVMV) reduziu fortemente expressão gênica em tecidos fotossintetizantes (Verdaguer et al. 1998). No promotor isolado de arroz OSCON1, a deleção da região entre a posição -2.100 e -979 pb, contendo cinco repetições do elemento GATAbbox, resultou em uma redução de 66,9% na expressão do gene *uidA* em folhas, sem afetar a expressão em raízes (Li et al. 2014). Da mesma maneira, mutações nos elementos IBOXcore e G-box do promotor RBCS-1A de *Arabidopsis* reduziu a expressão gênica em folhas de tabaco (Donald e Cashmore 1990).

A atividade GUS nas raízes foi similar para as três versões do promotor CsGAPC2, o que pode ter acontecido devido a presença constante dos elementos AS-1 (-286) e ROOTMOTIFTAPOX1 (-308). O elemento AS-1 já foi anteriormente relatado no promotor CaMV35S por desempenhar um papel crucial para a expressão gênica em raízes (Lam et al. 1989; Benfey e Chua 1990). O mesmo é relatado em outros promotores constitutivos de origem viral como *Dahlia Mosaic Virus* (DaMV) (Banerjee et al. 2015) e *Figwort mosaic virus* (FMV) (Kumar et al. 2012) e em promotores isolados de plantas, com atividade constitutiva (Park et al. 2010; Bang et al. 2015) e com atividade preferencial em raiz (Vijaybhaskar et al. 2008). O elemento ROOTMOTIFTAPOX também está relacionado com a expressão específica em raízes, e é descrito no promotor *rolD*, isolado de *Agrobacterium rhizogenes*, caracterizado por dirigir elevados níveis de expressão no sistema radicular de plantas (Leach e Aoyagi 1991; Elmayan e Tepfer 1995).

A atividade do promotor CsCYC não foi afetada pelas diferentes análises de deleção realizadas e mesmo a versão de menor tamanho, CsCYC-531, foi suficiente para conferir

expressão do gene *uidA* em folhas, caules e raízes de forma similar a versão CsCYC-1036. Isso pode ter ocorrido, pois os elementos relacionados à expressão gênica em tecidos fotossintetizantes estão bem distribuídos ao longo do promotor. Ainda que na versão CsCYC-531, o elemento AS-1 (-837) tenha sido eliminado e apenas um dos quatro ROOTMOTIFTAPOX (-314) esteja presente, a atividade nas raízes foi mantida. Resultados semelhantes são expostos por Chen et al. (2015) para o promotor GmTIP, isolado de soja. As análises de deleção para esse promotor (GmTIPp-2054, GmTIPp-1546, GmTIPp-1201 e GmTIPp-253) não afetaram a expressão gênica nas raízes. O promotor tem seis elementos ROOTMOTIFTAPOX e mesmo o menor fragmento do promotor, que passou a conter apenas um, manteve a expressão de forma similar aos demais.

A atividade do promotor CsEF1 foi afetada pelas diferentes versões de cada promotor. A versão truncada CsEF1-2092 conferiu maior atividade GUS nas folhas em comparação com CsEF1-2476, mas foi estatisticamente similar a CsEF1-1322, que representa a versão inicialmente clonada. Nesse caso, poderia-se esperar que o aumento da região promotora trouxesse incrementos na expressão gênica, como relatado por Suhandono et al. (2001), que comparou três promotores MeEF1, isolados de mandioca, e a maior expressão do gene *uidA* foi obtida com o promotor de 2700 pb em comparação com o promotor de 1300 pb. Algumas vezes, no entanto, o aumento da região promotora não traz incrementos na expressão gênica, podendo até mesmo reduzir ou modificar o padrão da atividade do promotor. De forma similar aos resultados obtidos no presente trabalho, Zhang et al. (2015) mostram que o aumento da região promotora de 724 pb para 1805 pb no estudo do promotor GmEF1, isolado de soja, causou um ligeira redução na expressão gênica. Hou et al. (2016) também relataram que, nas análises de deleções do promotor de milho induzido por estresse osmótico ZmGAPP, a atividade dos fragmentos promotores de 1468 pb, 1276 pb e 1091 pb foi cerca de 4,5 vezes inferior ao fragmento de 902 pb, sendo que o fragmento de 219 pb foi suficiente para conferir expressão gênica em níveis similares a sequência de 902 pb. Segundo os autores, uma sequência de 189 pb mediou a repressão da transcrição e contribui para uma atividade relativamente fraca dos três fragmentos promotores de maior tamanho. Nas análises de deleção do promotor AtTCTP, apenas o fragmento de 300 pb apresentou expressão constitutiva, enquanto os fragmentos de 700, 1300 e 2000 pb apresentaram expressão tecido-específica (Han et al. 2015). Devido aos métodos utilizados para o isolamento e análise do promotor, a sequência maior isolada nesse estudo pode ter incluído elementos que suprimem a expressão do gene.

Quando compara-se a versão CsEF1-2476 e CsEF1-1474, que representam as versões com e sem o íntron, respectivamente, a atividade GUS foi semelhante em folhas e raízes. A presença do íntron na região 5'UTR é comum em genes EF1 (Shewmaker et al. 1990; Curie et al. 1991; Yang et al. 2003; Zhang et al. 2015), assim como em genes Ubiquitina (Lu et al. 2008; Hernandez-Garcia et al. 2009; Li et al. 2012). Alguns trabalhos relatam que a inclusão do íntron na região 5'UTR pode levar a incrementos na expressão gênica de até 10 vezes (Sivamani e Qu 2006), da mesma forma que a remoção do íntron reduz drasticamente a expressão gênica (De La Torre e Finer 2015). Em outros, tem pouca influência, como no promotor ubiquitina de arroz Gmubi, que na sua versão intacta, apresentou expressão cinco vezes superior ao promotor CaMV35S. A versão sem o íntron manteve expressão três vezes superior à do promotor CaMV35S (Chiera et al. 2007). No trabalho de Li et al. (2012), as variações na atividade do promotor de diferentes genes ubiquitina isolados de videira não foram atribuídas a presença do íntron na região 5'UTR, mas sim aos elementos cis-regulatórios (positivos ou negativos) encontrados a jusante do íntron. Da mesma forma, no presente trabalho, quando o íntron foi eliminado (versão CsEF1-1474), a expressão gênica não foi reduzida, em relação a versão CsEF1-2476. No entanto, especula-se a possível presença de silenciadores em ambas as regiões promotoras, o que pode explicar a baixa atividade dessas versões.

De acordo com as análises realizadas, pode-se afirmar que os promotores isolados CsGAPC2, CsCYC e CsEF1 representam bons candidatos a serem utilizados em trabalhos de transformação genética de citros, sendo adequados para controlar a expressão de genes de forma constitutiva em tecidos vegetativos. Considerando os resultados das análises de deleção, recomenda-se a adoção da versão completa do promotor CsGAPC2, assim como das versões truncadas CsEF1-2092 ou CsEF1-1322 do promotor CsEF1. Para o promotor CsCYC, as três versões avaliadas podem ser adotadas para direcionar a expressão de genes.

6. CONCLUSÃO

Os promotores dos genes constitutivos GAPC2, CYC e EF1 de *C. sinensis* foram isolados e caracterizados. Os resultados deste estudo demonstram que os três promotores representam bons candidatos a serem utilizados em trabalhos de transformação genética de citros para direcionar a expressão de genes de forma constitutiva.

REFERÊNCIAS

- Agarwal P, Garg V, Gautam T et al (2014) A study on the influence of different promoter and 5'UTR (URM) cassettes from *Arabidopsis thaliana* on the expression level of the reporter gene β glucuronidase in tobacco and cotton. *Transgenic Res* 23:351–363.
- AGRIANUAL (2016) Anuário da agricultura brasileira. Informa Economics FNP, São Paulo
- AGRIANUAL (2010) Anuário da agricultura brasileira. Informa Economics FNP, São Paulo
- Almeida BDA, Mourão Filho FAA, Mendes BMJ et al (2002) In Vitro Organogenesis Optimization and Plantlet Regeneration in *Citrus sinensis* and *C. limonia*. *Sci Agric* 59:35–40.
- Anami S, Njuguna E, Coussens G, et al (2013) Higher plant transformation: Principles and molecular tools. *Int J Dev Biol* 57:483–494.
- Ananthakrishnan G, Orbović V, Pasquali G et al (2007) Transfer of citrus tristeza virus (CTV)-derived resistance candidate sequences to four grapefruit cultivars through *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* 43:593–601.
- Andersen GR, Nissen P, Nyborg J (2003) Elongation factors in protein biosynthesis. *Trends Biochem Sci* 28:434–441.
- Argüello-Astorga G, Herrera-Estrella L (1998) Evolution of Light-Regulated Plant Promoters. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:525–55.
- Azevedo FA, Mourão Filho FAA, Mendes BMJ et al (2006a) Genetic transformation of rangpur lime (*Citrus limonia* Osbeck) with the bO (bacterio-opsin) gene and its initial evaluation for *Phytophthora nicotianae* resistance. *Plant Mol Biol Report* 24:185–196.
- Azevedo FA, Mourão Filho FAA, Schinor EH et al (2006b) GUS gene expression driven by a citrus promoter in transgenic tobacco and 'Valencia' sweet orange. *Pesqui Agropecuária Bras* 41:1623–1628.
- Banerjee J, Sahoo DK, Raha S et al (2015) A Region Containing an as-1 Element of *Dahlia Mosaic Virus* (DaMV) Subgenomic Transcript Promoter Plays a Key Role in Green Tissue and Root-Specific Expression in Plants. *Plant Mol Biol Report* 33:532–556.
- Bang SW, Park SH, Kim YS et al (2015) The activities of four constitutively expressed promoters in single-copy transgenic rice plants for two homozygous generations. *Planta* 241:1529–1541.

- Barbosa-Mendes JM, Mourão Filho FAA, Bergamin Filho A et al (2009) Genetic transformation of *Citrus sinensis* cv. Hamlin with *hrpN* gene from *Erwinia amylovora* and evaluation of the transgenic lines for resistance to citrus canker. *Sci Hortic* 122:109–115.
- Barrett HC, Rhodes AM (1976) A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives. *Syst Bot* 1:105–136.
- Barrett LW, Fletcher S, Wilton SD (2012) Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cell Mol Life Sci* 69:3613–3634.
- Belasque Junior J, Bergamin Filho A, Beozzo Bassanezi R et al (2009) Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. *Trop Plant Pathol* 34:137–145.
- Benfey PN, Chua NH (1990) The Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter: Combinatorial Regulation of Transcription in Plants. *Science* 250:959–966.
- Benfey PN, Ren L, Chua N (1990) Combinatorial and synergistic properties of CaMV 35S enhancer subdomains. *EMBO J* 9:1685–1696.
- Benfey PN, Ren L, Chua NH (1989) The CaMV 35S enhancer contains at least two domains which can confer different developmental and tissue-specific expression patterns. *EMBO J* 8:2195–2202.
- Benyon LS, Stover E, Bowman KD et al (2013) GUS expression driven by constitutive and phloem-specific promoters in citrus hybrid US-802. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* 49:255–265.
- Bevan M, Barnes WM, Chilton M dell (1983) Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucleic Acids Res* 11:369–385.
- Bhattacharyya J, Chowdhury AH, Ray S et al (2012) Native polyubiquitin promoter of rice provides increased constitutive expression in stable transgenic rice plants. *Plant Cell Rep* 31:271–279.
- Bilas R, Szafran K, Hnatuszko-konka K (2016) Cis -regulatory elements used to control gene expression in plants. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 127:269–287.
- Block A, Dangel JL, Hahlbrock K et al (1990) Functional borders, genetic fine structure, and distance requirements of cis elements mediating light responsiveness of the parsley chalcone synthase promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:5387–91.
- Bobrowski VL, Fiuza LM, Pasquali G et al (2003) Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. *Ciência Rural* 33:843–850.

- Bond JE, Roose ML (1998) *Agrobacterium* mediated transformation of the commercially important citrus cultivar Washington navel orange. *Plant Cell Rep* 18:229–234.
- Borém A, Miranda GV (2009) Melhoramento de plantas. UFV, Viçosa.
- Boscariol RL, Monteiro M, Takahashi EK et al (2006) *Attacin* A Gene from *Tricloplusia ni* Reduces Susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in Transgenic *Citrus sinensis* 'Hamlin'. *J Am Soc Hortic Sci* 131:530–536.
- Boteon M, Neves EM (2005) Citricultura brasileira: aspectos econômicos. In: Junior DDM, De Negri JD, Pio RM, Junior JP (eds) *Citros: liderança paulista*. Instituto Agronômico, Fundag, Campinas, pp 20–36.
- Brasileiro ACM, Dusi DMA (1999) Transformação genética de plantas. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JA (eds) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Embrapa, Brasília, pp 679–735.
- Brasileiro MCA, Carneiro CTV (1998) Manual de transformação genética de plantas. Embrapa, Brasília.
- Butaye KMJ, Cammue BPA, Delauré SL, De Bolle MFC (2005) Approaches to minimize variation of transgene expression in plants. *Mol Breed* 16:79–91.
- Butler JEF, Kadonaga JT (2002) The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev* 16:2583–2592.
- Cardoso SC, Barbosa-Mendes JM, Boscariol-Camargo RL et al (2010) Transgenic sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) expressing the attacin a gene for resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Plant Mol Biol Report* 28:185–192.
- Cervera M, Ortega C, Navarro A et al (2000) Generation of transgenic citrus plants with the tolerance-to-salinity gene HAL2 from yeast. *J Hortic Sci Biotechnol* 75:26–30.
- Chen L, Jiang B, Wu C et al (2015) The characterization of GmTIP, a root-specific gene from soybean, and the expression analysis of its promoter. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 121:259–274.
- Chiera JM, Bouchard RA, Dorsey SL et al (2007) Isolation of two highly active soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) promoters and their characterization using a new automated image collection and analysis system. *Plant Cell Rep* 26:1501–1509.
- Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH (1992) Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol Biol* 18:675–689.
- Cornejo M-J, Luth D, Blankenship KM et al (1993) Activity of a maize ubiquitin promoter in transgenic rice. *Plant Mol Biol* 23:567–581.

- Coussens G, Aesaert S, Verelst W et al (2012) *Brachypodium distachyon* promoters as efficient building blocks for transgenic research in maize. *J Exp Bot* 63:4263–4273.
- Curie C, Axelos M, Bardet C et al (1993) Modular organization and developmental activity of an *Arabidopsis thaliana* EF-1 α gene promoter.
- Curie C, Liboz T, Bardet C et al (1991) Cis and trans-acting elements involved in the activation of *Arabidopsis thaliana* A1 gene encoding the translation elongation factor EF-1 alpha. *Nucleic Acids Res* 19:1305–1310.
- da Graça JV, Douhan GW, Halbert SE et al (2016) Huanglongbing: An overview of a complex pathosystem ravaging the world's citrus. *J Integr Plant Biol* 58:373–387.
- Davies F, Albrigo L (1994) *Citrus*. CAB International, Wallingford.
- De La Torre CM, Finer JJ (2015) The intron and 5' distal region of the soybean Gmubi promoter contribute to very high levels of gene expression in transiently and stably transformed tissues. *Plant Cell Rep* 34:111–120.
- Devi EL, Chongtham SK, Holeyachi P et al (2013) Cisgenesis and Intragenesis : Twin Sisters for Crop Improvement. *Res J Agric For Sci* 1:22–26.
- Domínguez A, Guerri J, Cambra M et al (2000) Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Plant Cell Rep* 19:427–433.
- Donadio LC, Mourão Filho FAA, Moreira CS (2005) Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: Mattos Junior D, Negri JD, Pio RM, Pompeu Junior J (eds) *Citros*. Instituto Agronômico, Fundag, Campinas, pp 3–18
- Donald RG, Cashmore AR (1990) Mutation of either G box or I box sequences profoundly affects expression from the *Arabidopsis* rbcS-1A promoter. *EMBO J* 9:1717–26.
- Donmez D, Simsek O, Izgu T et al (2013) Genetic transformation in citrus. *Sci World J*. 2013: 491207.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15.
- Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet EG, Miura S, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant J* 33:751–763.
- Dutt M, Barthe G, Irely M et al (2015) Transgenic citrus expressing an arabidopsis NPR1 gene exhibit enhanced resistance against Huanglongbing (HLB; Citrus greening). *PLoS One* 10:1–17.

- Dutt M, Dhekney SA, Soriano L et al (2014) Temporal and spatial control of gene expression in horticultural crops. *Hortic Res* 1:14047.
- Dutt M, Erpen L, Ananthakrishnan G et al (2016) Comparative expression analysis of five caulimovirus promoters in citrus. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 126:229-238.
- Dutt M, Grosser JW (2009) Evaluation of parameters affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 98:331–340.
- Elmayan T, Tepfer M (1995) Evaluation in tobacco of the organ specificity and strength of the *rolD* promoter, domain A of the 35S promoter and the 35S2 promoter. *Transgenic Res* 4:388–396.
- Emami S, Arumainayagam D, Korf I, Rose AB (2013) The effects of a stimulating intron on the expression of heterologous genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnol J* 11:555–563.
- Endo T, Shimada T, Fujii H et al (2007) Promoter analysis of a type 3 metallothionein-like gene abundant in Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) fruit. *Sci Hortic (Amsterdam)* 112:207–214.
- Espinoza C, Schlechter R, Herrera D et al (2013) Cisgenesis and intragenesis: New tools for improving crops. *Biol Res* 46:323–331.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO (2016). <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em 10 de novembro de 2016.
- Febres V, Fisher L, Khalaf A, Moore GAG (2012) Citrus transformation: challenges and prospects. In: Alvarez M (ed) *Genetic Transformation*. InTech, Rijeka, pp 101–122.
- Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB et al (1983) Expression of bacterial genes in plant cells (plant protoplasts/transformation/foreign DNA/antibiotic resistance/selectable markers). *Genetics* 80:4803–4807.
- Fujita M, Fujita Y, Maruyama K et al (2004) A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *Plant J* 39:863–876.
- Galat A (1999) Variations of sequences and amino acid compositions of proteins that sustain their biological functions: An analysis of the cyclophilin family of proteins. *Arch Biochem Biophys* 371:149–62.
- Gallegos JE, Rose AB (2015) The enduring mystery of intron-mediated enhancement. *Plant Sci* 237:8–15.
- Gambino G, Gribaudo I (2012) Genetic transformation of fruit trees: Current status and remaining challenges. *Transgenic Res* 21:1163–1181.
- Garbarino JE, Oosumi T, Belknap WR (1995) Isolation of a polyubiquitin promoter and its

- expression in transgenic potato plants. *Plant Physiol* 109:1371–8.
- Gelvin SB, Kim SI (2007) Effect of chromatin upon *Agrobacterium* T-DNA integration and transgene expression. *Biochim Biophys Acta* 1769:410–421.
- Gidekel M, Jimenez B, Herrera-Estrella L (1996) The first intron of the *Arabidopsis thaliana* gene coding for elongation factor 1B contains an enhancer-like element. *Gene* 170:201–206.
- Gittins JR, Pellny TK, Hiles ER et al (2000) Transgene expression driven by heterologous ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small-subunit gene promoters in the vegetative tissues of apple (*Malus pumila* mill.). *Planta* 210:232–240.
- Gomez-Lim MA, Litz RE (2004) Genetic transformation of perennial tropical fruits. *In Vitro Cell Dev Biol* 40:442–449.
- Gottwald TR (2010) Current Epidemiological Understanding on Citrus Huanglongbing. *Annu Rev Phytopathol* 48:119–139.
- Han YJ, Kim YM, Hwang OJ, Kim J-II (2015) Characterization of a small constitutive promoter from *Arabidopsis* translationally controlled tumor protein (*AtTCTP*) gene for plant transformation. *Plant Cell Rep* 34:265–275.
- He C, Lin Z, McElroy D, Wu R (2009) Identification of a rice *Actin2* gene regulatory region for high-level expression of transgenes in monocots. *Plant Biotechnol J* 7:227–239.
- He YR, Chen SC, Peng AH et al (2011) 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. *Sci Hortic* 128:99–107.
- Hernandez-Garcia CM, Finer JJ (2014) Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. *Plant Sci* 217–218:109–119.
- Hernandez-Garcia CM, Martinelli AP, Bouchard RA et al (2009) A soybean (*Glycine max*) polyubiquitin promoter gives strong constitutive expression in transgenic soybean. *Plant Cell Rep* 28:837–849.
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Res* 27:297–300.
- Holme IB, Wendt T, Holm PB (2013) Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development. *Plant Biotechnol J* 11:395–407.
- Hou J, Jiang P, Qi S et al (2016) Isolation and functional validation of salinity and osmotic stress inducible promoter from the maize type-II H⁺-pyrophosphatase gene by deletion

- analysis in transgenic tobacco plants. PLoS One 11:1–23.
- Hull R, Covey SN (1983) Does cauliflower mosaic virus replicate by reverse transcription? Trends Biochem Sci 8:119–121.
- Hull R, Covey SN, Dale P (2000) Genetically modified plants and the 35S promoter: assessing the risks and enhancing the debate. Microb Ecol Health Dis 12:1–5.
- Jacobsen E, Schouten HJ (2009) Cisgenesis: An important sub-invention for traditional plant breeding companies. Euphytica 170:235–247.
- James C (2015) Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2015. ISAAA, Ithaca
- Jeong MJ, Shih MC (2003) Interaction of a GATA factor with cis-acting elements involved in light regulation of nuclear genes encoding chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Arabidopsis*. Biochem Biophys Res Commun 300:555–562.
- Ji Q, Xu X, Wang K (2013) Genetic transformation of major cereal crops. Int J Dev Biol 57:495–508.
- Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-shinozaki, K shinozaki K (1999) Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. Nat Biotechnol 17:287–291.
- Khan ZA, Abdin MZ, Khan JA (2015) Functional characterization of a strong bidirectional constitutive plant promoter isolated from *cotton leaf curl Burewala virus*. PLoS One 10:1–17.
- Kim I, Lee J, Han J et al (2011) Citrus Lea promoter confers fruit-preferential and stress-inducible gene expression in *Arabidopsis*. Can J Plant Sci 91:459–466.
- Kobayashi S, Uchimiya H (1989) Expression and integration of a foreign gene in orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck.) protoplasts by direct DNA transfer. Japanese J Genet 64:91–97.
- Koia J, Moyle R, Hendry C et al (2013) Pineapple translation factor SUI1 and ribosomal protein L36 promoters drive constitutive transgene expression patterns in *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol Biol 81:327–336.
- Koltunow AM, Brenann P, Protosaltis S, Nito N (2000) Regeneration of west Indian limes (*Citrus aurantifolia*) containing genes for decreased seed set. Acta Hort 535:81–91.
- Kumar D, Patro S, Ghosh J et al (2012) Development of a salicylic acid inducible minimal sub-genomic transcript promoter from *Figwort mosaic virus* with enhanced root- and leaf-activity using TGACG motif rearrangement. Gene 503:36–47.
- Lam E, Benfey PN, Chua NH (1989) Characterization of AS1: a factor binding site on the

- 35S promoter of *Cauliflower Mosaic Virus*. In: Plant gene transfer: UCLA symposia on molecular and cellular biology. pp 71–79
- Lam E, Chua NH (1989) ASF-2: a factor that binds to the cauliflower mosaic virus 35S promoter and a conserved GATA motif in Cab promoters. *Plant Cell* 1:1147–1156.
- Lassen J, Madsen KH, Sandøe P (2002) Ethics and genetic engineering - Lessons to be learned from GM foods. *Bioprocess Biosyst Eng* 24:263–271.
- Leach F, Aoyagi K (1991) Promoter analysis of the highly expressed *rolC* and *rolD* root-inducing genes of *Agrobacterium rhizogenes*: enhancer and tissue-specific DNA determinants are dissociated. *Plant Sci* 79:69–76.
- Le Hir H, Nott A, Moore MJ (2003) How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. *Trends Biochem Sci* 28:215–220.
- Lee L-Y, Gelvin SB (2007) T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiol* 146:325–332.
- Lemon B, Tjian R (2000) Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev* 14:2551–2569.
- Li J, Xu RF, Qin RY et al (2014) Isolation and functional characterization of a novel rice constitutive promoter. *Plant Cell Rep* 33:1651–1660.
- Li ZT, Kim KH, Jasinski JR et al (2012) Large-scale characterization of promoters from grapevine (*Vitis* spp.) using quantitative anthocyanin and GUS assay systems. *Plant Sci* 196:132–142.
- Lopes SA, Bertolini E, Frare GF et al (2009) Graft transmission efficiencies and multiplication of “*Candidatus Liberibacter americanus*” and “*Ca. Liberibacter asiaticus*” in citrus plants. *Phytopathology* 99:301–306.
- López-Ochoa L, Acevedo-Hernández G, Martínez-Hernández A et al (2007) Structural relationships between diverse cis-acting elements are critical for the functional properties of a *rbcS* minimal light regulatory unit. *J Exp Bot* 58:4397–4406.
- Lu J, Sivamani E, Azhakanandam K et al (2008) Gene expression enhancement mediated by the 5'UTR intron of the rice *rubi3* gene varied remarkably among tissues in transgenic rice plants. *Mol Genet Genomics* 279:563–572.
- Mafra V, Kubo KS, Alves-Ferreira M et al (2012) Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. *PLoS One* 7:e31263.
- Manjunath S, Sachs MM (1997) Molecular characterization and promoter analysis of the maize cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene family and its expression during anoxia. *Plant Mol Biol* 33:97–112.

- Manzara T, Carrasco P, Gruissem W (1991) Developmental and organ-specific changes in promoter DNA-protein interactions in the tomato *rbcS* gene family. *Plant Cell* 3:1305–16.
- Marcelino FC, Binneck E, Abdelnor RV, Nepomuceno AL (2007) Ferramentas biotecnológicas aplicadas à cultura da Soja. Embrapa, Londrina.
- Mattos Junior D, Negri JD, Pio RM, Pompeu Junior J (2005) Citros. Instituto Agronômico, Fundag, Campinas.
- Matzke AJ, Matzke MA (1998) Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Curr Opin Plant Biol* 1:142–148.
- McElroy D, Blowers AD, Jenes B, Wu R (1991) Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (*Act1*) 5' region for use in monocot transformation. *Mol Gen Genet* 231:150–160.
- Mendes BMJ, Cardoso SC, Boscariol-Camargo RL et al (2010) Reduction in susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* expressing the rice Xa21 gene. *Plant Pathol* 59:68–75.
- Merrick WC (1992) Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiol Rev* 56:291–315.
- Meyer P, Saedler H (1996) Homology-Dependent Gene Silencing in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:23–48.
- Miyata LY, Harakava R, Stipp LCL et al (2012) GUS expression in sweet oranges (*Citrus sinensis* L. Osbeck) driven by three different phloem-specific promoters. *Plant Cell Rep* 31:2005–2013.
- Molinari HBC, Bessalho JC, Kobayashi AK et al (2004a) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of Swingle citrumelo (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) using thin epicotyl sections. *Sci Hortic* 99:379–385.
- Molinari HBC, Marur CJ, Filho JCB et al (2004b) Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. *Plant Sci* 167:1375–1381.
- Mukherjee S, Stasolla C, Brûlé-Babel A, Ayele BT (2015) Isolation and characterization of rubisco small subunit gene promoter from common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Signal Behav* 10:e989033.
- Muniz FR, De Souza AJ, Stipp LCL et al (2012) Genetic transformation of *Citrus sinensis* with Citrus tristeza virus (CTV) derived sequences and reaction of transgenic lines to

- CTV infection. *Biol Plant* 56:162–166.
- Muñoz-Bertomeu J, Cascales-Miñana B, Mulet JM et al (2009) Plastidial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase deficiency leads to altered root development and affects the sugar and amino acid balance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 151:541–558.
- Murashige T, Skoog F (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* 15:473–497.
- Murashige T, Tucker DPH (1969) Growth factor requirement of citrus tissue culture. In: International Citrus Symposium. University of California, Riverside, pp 1155–1169.
- Neves MF, Trombin VG, Milan P et al (2010) O retrato da citricultura brasileira. Markestrat, Ribeirão Preto
- Nishikawa F, Endo T, Shimada T et al (2008) Isolation and characterization of a citrus FT/TFL1 homologue (CuMFT1), which shows quantitatively preferential expression in Citrus seeds. *Japanese Soc Hortic Science* 77:38–46.
- Odell JT, Nagy F, Chua NH (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313:47–48.
- Park SH, Yi N, Kim YS et al (2010) Analysis of five novel putative constitutive gene promoters in transgenic rice plants. *J Exp Bot* 61:2459–2467.
- Peña L, Martin-Trillo M, Juarez J et al (2001) Constitutive expression of *Arabidopsis* LEAFY or APETALA1, genes in citrus reduces their generation time. *Nat Biotechnol* 19:263–267.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.
- Philip A, Syamaladevi DP, Chakravarthi M et al (2013) 5' Regulatory region of ubiquitin 2 gene from *Porteresia coarctata* makes efficient promoters for transgene expression in monocots and dicots. *Plant Cell Rep* 32:1199–1210.
- Phillips T (2008) Regulation of transcription and gene expression in eukaryotes. *Nat Educ* 1:199.
- Porto MS, Pinheiro MPN, Batista VGL et al (2014) Plant promoters: An approach of structure and function. *Mol Biotechnol* 56:38–49.
- Potenza C, Aleman L, Sengupta-Gopalan C (2004) Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: Promoters used in plant transformation. *Vitr Cell Dev Biol* 40:1–22.
- Ramakers C, Ruijter JM, Lekanne Deprez RH, Moorman AFM (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett*

339:62–66.

- Reyes JC, Muro-Pastor MI, Florencio FJ (2004) The GATA family of transcription factors in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol* 134:1718–1732.
- Rius SP, Casati P, Iglesias AA, Gomez-Casati DF (2008) Characterization of *Arabidopsis* lines deficient in GAPC-1, a cytosolic NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Plant Physiol* 148:1655–1667.
- Rockhold DR, Chang S, Taylor N et al (2008) Structure of two *Solanum bulbocastanum* polyubiquitin genes and expression of their promoters in transgenic potatoes. *Am J Potato Res* 85:219–226.
- Romano PGN, Horton P, Gray JE (2004) The *Arabidopsis* cyclophilin gene family. *Plant Physiol* 134:1268–1282.
- Rommens CM (2004) All-native DNA transformation: A new approach to plant genetic engineering. *Trends Plant Sci* 9:457–464.
- Schaart JG, van de Wiel CCM, Lotz LAP, Smulders MJM (2016) Opportunities for Products of New Plant Breeding Techniques. *Trends Plant Sci* 21:438–449.
- Schouten HJ, Krens FA, Jacobsen E (2006) Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants. *EMBO Rep* 7:750–753.
- Scora R. (1975) On the history and origin of Citrus. *Bull Torrey Bot Club* 102:369–375.
- Shelton AM, Zhao J-Z, Roush RT (2002) Economic, Ecological, Food Safety, and Social Consequences of the Deployment of Bt Transgenic Plants. *Annu Rev Entomol* 47:845–881.
- Shewmaker CK, Ridge NP, Pokalsky AR et al (1990) Nucleotide sequence of an EF-1 genomic clone from tomato. *Nucleic Acids Res* 18:4276.
- Shrawat AK, Lörz H (2006) *Agrobacterium*-mediated transformation of cereals: A promising approach crossing barriers. *Plant Biotechnol J* 4:575–603.
- Singer SD, Hily JM, Cox KD (2011) The sucrose synthase-1 promoter from *Citrus sinensis* directs expression of the β -glucuronidase reporter gene in phloem tissue and in response to wounding in transgenic plants. *Planta* 234:623–637.
- Singh S, Rajam M V. (2009) Citrus biotechnology: Achievements, limitations and future directions. *Physiol Mol Biol Plants* 15:3–22.
- Sivamani E, Qu R (2006) Expression enhancement of a rice polyubiquitin gene promoter. *Plant Mol Biol* 60:225–239.
- Soares Filho WS, Sobrinho APC, Passos OS, Souza AS (2013) Melhoramento genético. In: Sobrinho APC, Magalhães AFJ, Souza AS et al. (eds) *Cultura dos citros*. Embrapa,

Brasília, pp 61–102.

- Sorkina A, Bardosh G, Liu YZ, et al (2011) Isolation of a citrus promoter specific for reproductive organs and its functional analysis in isolated juice sacs and tomato. *Plant Cell Rep* 30:1627–1640.
- Stark K, Kirk DL, Schmitt R (2001) Two enhancers and one silencer located in the introns of *regA* control somatic cell differentiation in *Volvox carteri*. *Genes Dev* 15:1449–1460.
- Suhandono S, Apriyanto A, Ihsani N (2014) Isolation and characterization of three cassava elongation factor 1 alpha (MeEF1A) promoters. *PLoS One* 9:32–34.
- Suhandono S, Hughes J, Brown K, Hughes MA (2001) Expression and structure of an elongation factor-1a gene (MeEF1) from cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Euphytica* 120:49–58.
- Tavano ECR, Vieira MLC, Mourão Filho FAA et al (2015) Genetic Transformation of *Citrus Sinensis* “Hamlin” With Attacin a Driven By a Phloem Tissue-Specific Promoter for Resistance To Candidatus *Liberibacter* Spp. *Acta Horti* 1065:695–702.
- Teakle GR, Manfield IW, Graham JF, Gilmartin PM (2002) *Arabidopsis thaliana* GATA factors: Organization, expression and DNA-binding characteristics. *Plant Mol Biol* 50:43–57.
- Teixeira D, Ayres J, De Barros A et al (2005) First report of a huanglongbing-like disease of citrus in Sao Paulo State, Brazil and association of a new liberibacter species, “Candidatus *Liberibacter americanus*”, with the disease. *Plant Dis* 89:107.
- Timmer L, Garnsey S, Graham J (2000) *Compendium of Citrus Diseases*. APS Press, St Paul
- Van Nocker S, Gardiner SE (2014) Breeding better cultivars, faster: applications of new technologies for the rapid deployment of superior horticultural tree crops. *Hortic Res* 1:14022.
- Verdaguer B, De Kochko A, Fux CI et al (1998) Functional organization of the *cassava vein mosaic virus* (CsVMV) promoter. *Plant Mol Biol* 37:1055–1067.
- Viana AA, Fragoso RR, Guimarães LM et al (2011) Isolation and functional characterization of a cotton ubiquitination-related promoter and 5’UTR that drives high levels of expression in root and flower tissues. *BMC Biotechnol* 11:115.
- Vijaybhaskar V, Subbiah V, Kaur J et al (2008) Identification of a root-specific glycosyltransferase from *Arabidopsis* and characterization of its promoter. *J Biosci* 33:185–193.
- Visarada KBRS, Meena K, Aruna C et al (2009) Transgenic breeding: Perspectives and prospects. *Crop Sci* 49:1555–1563.

- Waldron C, Murphy E, Roberts J et al (1985) Resistance to hygromycin B: a new marker for plant transformation studies. *Plant Mol Biol* 5:103–108.
- Wang J, Oard JH (2003) Rice ubiquitin promoters: Deletion analysis and potential usefulness in plant transformation systems. *Plant Cell Rep* 22:129–134.
- Wei H, Wang M, Moore PH, Albert HH (2003) Comparative expression analysis of two sugarcane polyubiquitin promoters and flanking sequences in transgenic plants. *J Plant Physiol* 160:1241–1251.
- Wray GA, Hahn MW, Abouheif E et al (2003) The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes. *Mol Biol Evol* 20:1377–1419.
- Xiao K, Zhang C, Harrison M, Wang ZY (2005) Isolation and characterization of a novel plant promoter that directs strong constitutive expression of transgenes in plants. *Mol Breed* 15:221–231.
- Yang L, Hu C, Li N, et al (2011) Transformation of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] with *pthA-nls* for acquiring resistance to citrus canker disease. *Plant Mol Biol* 75:11–23.
- Yang M, Bower R, Burow MD et al (2003) A Rapid and Direct Approach to Identify Promoters That Confer High Levels of Gene Expression in Monocots. *Crop Sci* 43:1805–1813.
- Zhang N, McHale LK, Finer JJ (2015) Isolation and characterization of “GmScream” promoters that regulate highly expressing soybean (*Glycine max* Merr.) genes. *Plant Sci* 241:189–198.
- Zhang W, McElroy D, Wu R (1991) Analysis of rice Act 5’region activity in transgenic rice plants. *Plant Cell* 3:1155–1165.

ANEXO

Tabela 7. Elementos regulatórios identificados nos promotores CsGAPC2, CsEF1 e CsCYC pela análise *in silico* no banco de dados PLACE.

Elemento	Sequência	Função	Número de elementos		
			CsGAPC2	CsEF1	CsCYC
Elementos comuns em regiões promotoras					
TATA BOX	TATAAA	Início da transcrição	1	3	1
TATA BOXOSPAL	TATTTAA	Início da transcrição	0	0	1
CAATBOX1	CAAT	Transcrição	7	9	15
Elementos tecido específico/induzidos					
GATABox	GATA	Regulação por luz/expressão em tecidos fotossintetizantes	4	15	5
G-box	ACGT	Regulação por luz/expressão em tecidos fotossintetizantes	5	7	4
IBOXCORE	GATAA	Regulação por luz/expressão em tecidos fotossintetizantes	2	3	0
PALBOXAPC	CCGTCC	Regulação por luz/expressão em tecidos fotossintetizantes	1	0	0
-10PEHVPSBD	TATTCT	Regulação por luz/expressão em tecidos fotossintetizantes	1	1	0
SORLIP1AT	GCCAC	Regulação por luz/expressão em tecidos fotossintetizantes	0	0	2
CIACADIANLELHC	NNANNNNATC N=G/A/C/T	Regulação por luz/ fitocromo/expressão em tecidos fotossintetizantes	0	2	3
REALPHALGLHCB21	AACCAA	Regulação por luz/ fitocromo/expressão em tecidos fotossintetizantes	0	0	2
GT1CORE/GT-1	GGTTAA	Regulação por luz/expressão em tecidos fotossintetizantes	1	1	0
AS-1	TGACG	Expressão na raiz.	1	1	1
ROOTMOTIFTAPOX1	ATATT	Expressão na raiz.	1	10	4
RYREPEATBNNAPA/ cotyledon-motif	CATGCA	Expressão na semente/indução por ABA.	1	0	0
TGACGTVMAMY/ "TGACGT motif"	TGACGT	Expressão na semente	1	0	0
GCN4OSGLUB1	TGAGTCA	Expressão no endosperma	0	0	1
CANBNNAPA	CNAACAC N=G	Expressão no endosperma.	1	0	1
AACACOREOSGLUB1	AACAAAC	Expressão no endosperma	1	0	0
POLLEN1LELAT52	AGAAA	Expressão em anteras/ pólen	3	4	1
GTGANTG10	GTGA	Expressão no pólen	2	8	3
TAAAGSTKST1	TAAAG	Expressão em células- guarda	0	0	2
ARFAT	TGTCTC	Indução por auxina	1	2	0
CATATGGMSAUR	CATATG	Indução por auxina	1	2	0
PYRIMIDINEBOX OSRAMY1A	CCTTTT	Indução por giberelina	3	2	0
Elementos relacionados a estresses biótico e abiótico					
WRKY	TGAC	Responsivo a patógeno	10	8	1
WBOX	TGACT	Responsivo a ferimento/ patógeno	4	2	0
WBOXATNPR1	TTGAC	Responsivo a patógeno /ácido salicílico	3	4	1
MYB2AT	TAACGTG	Responsivo ao estresse hídrico/ABA	1	2	1
MYBST1	GGATA	Responsivo ao estresse hídrico/ABA	1	2	1
MYB1AT	WAACCA W=A/T	Sítio de ligação MYB / responsivo ao ABA	1	1	0

Elementos relacionados a estresses biótico e abiótico					
MYBPZM	CCWACC W=A/T	Sítio de ligação MYB	0	0	1
MYCATERD1	CATGTG	Responsivo ao estresse hídrico/ABA	0	1	0
MYCATRD22	CACATG	Sítio de ligação MYC/ responsivo ao ABA	0	1	0
GT1GMSCAM4	GAAAAA	Responsivo a patógeno	3	0	1
ACGTATERD1	ACGT	Responsivo a desidratação	5	7	4
ARR1AT	NGATT N=G/A/C/T	Responsivo a estresse salino	8	22	11
CBFHV/ DRECRTCOREAT	RYCGAC R=A/G Y=C/T	Responsivo a desidratação	1	0	1
HSE	AAAAATTTC	Responsivo a alta temperatura	0	0	1
LTRE1HVBLT49	CCGAAA	Responsivo a baixa temperatura	0	1	0
COLDMOTIF	CCGACA	Responsivo a baixa temperatura	1	0	0
BIHD1OS	TGTCA	Responsivo a patógeno	2	1	0
ABRELATERD1	ACGTG	Responsivo a desidratação	0	2	1