UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

DEBORAH SANAE NISHIMURA

Perfil transcricional dos genes envolvidos na via de biossíntese de carotenóides e quantificação dos metabólitos em laranjas de polpa vermelha

Piracicaba
2012

DEBORAH SANAE NISHIMURA

Perfil transcricional dos genes envolvidos na via de biossíntese de carotenóides e quantificação dos metabólitos em laranjas de polpa vermelha

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Dr. Rodrigo Rocha Latado

Piracicaba

2012

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

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

Nishimura, Deborah Sanae

Perfil transcricional dos genes envolvidos na via de biossíntese de carotenóides e quantificação dos metabólitos em laranjas de polpa vermelha / Deborah Sanae Nishimura; orientador Rodrigo Rocha Latado. - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2012.

136 p.: il.

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

1. Antioxidantes 2. Expressão gênica 3. Fisiologia vegetal 4. Genética vegetal 5. Laranja 6. Mutação genética 7. Pigmentos vegetais I. Título

CDU 634.31 : 547.97

A toda minha família

*À minha mãe **Rosa**, pelo carinho, minha grande incentivadora e companheira sempre,*

*Ao meu pai **Carlos**, pelo apoio pela liberdade que sempre me concedeu,*

*Aos meus irmãos **André**, **Fábio** e **César**, pela amizade e apoio, mesmo que distantes,*

*Aos meus sobrinhos **Lucas**, **Ricardo** e o **Eduardo**, os quais tenho aprendido a amar cada vez mais,*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por me proporcionar a vida e a saúde; permitindo a realização dos meus sonhos.

Ao Dr. Rodrigo Rocha Latado pela orientação, paciência e amizade contribuindo para meu desenvolvimento acadêmico-científico. Muito obrigado por acreditar.

Ao Prof. Dr. Antonio Figueira pelos ensinamentos, amizade e apoio durante os 10 anos de convivência em seu laboratório.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) e a instituição do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo e apoio financeiro concedido.

Á Profª. Dra. Maria Célia Sylos do Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho", no campus de Araraquara-SP, pelas as análises de quantificação dos carotenóides.

Ao Prof. Dr. Glauco de Souza Rolim do Departamento de Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho", no campus de Jaboticabal-SP, pelas análises climatológicas.

Ao laboratório de Qualidade da Fruta do Centro APTA Citros "Sylvio Moreira" - IAC (CCSM), Cordeirópolis-SP, pelas análises de qualidade dos frutos.

A todos os amigos do Laboratório de Melhoramento de Plantas: Amanda, Ângela, André, Bressan, Danielle, Ilse, Isabela, Ju Deganelo, Ju Leles, Layanne, Letícia, Mariana, Marielle Vitti, Melissa, Roberto e Verusca. Aos que já deixaram o laboratório: Edgar, Felipe Jóia, Gabi, Gabriel, Laís e Marielle Pazzoto, pelo companheirismo, apoio, convívio em equipe e troca de experiências.

Á estagiária Aline Harissis pela amizade e ajuda nos ensaios finais da minha tese. Ajuda essencial!

Em especial, ao amigo Joni Lima, pelo apoio, ajuda e presença constante. Levantou sugestões, críticas e opiniões que foram essências para continuação e finalização da minha tese. Sou muito grata a você!

Aos amigos do coração que conviveram comigo no Laboratório de Melhoramento de Plantas: Celso Gaspar, Cláudio Lopes, Felippe Campana, Gildemberg Leal Amorin, Henrique Souza, João Felipe Nebó, João Bortoleto, Lígia Morena, Lorena Sereno, Onildo Nunes, Raul Santin, Renato Ferreira, Tais Tomazini e Thaísa Pinheiro, pela amizade sincera, carinho e descontrações (cafezinhos, barzinhos, churrascos...).

Aos funcionários do Laboratório de Melhoramento de Plantas: Luís Eduardo Fonseca, Raquel Orsi e Wlamir Godoy, pela amizade e auxílio imprescindível nas várias fases do desenvolvimento deste trabalho.

Á bibliotecária Marília Garcia Henyei por toda a ajuda prestada e pela compreensão e carinho.

Á minha chefa Mariana Daher pela amizade, apoio e compreensão no final de minha tese.

Aos meus pais pela convivência, apoio, dedicação e amizade e meus irmãos pela confiança e incentivo mesmo que de longe. As minhas cunhadas pela força. A vocês todos à minha consideração e gratidão!

Aos meus queridos sobrinhos pela alegria, aprendizado e participação me fazendo sorrir sempre. Em especial, aos queridos sobrinhos Ricardo Kenzo (afilhado) e ao Eduardo Takeshi, que convivi junto a eles em uma fase de mudanças em minha vida. Aprendizado e crescimento mútuo!

A todos os amigos de longe e de perto, aos antigos e aos novos, aos presentes e aos fisicamente ausentes, mas não menos importantes, os agradeço pela força e pela torcida.

RESUMO

NISHIMURA, D. S. **Perfil transcricional dos genes envolvidos na via de biossíntese de carotenóides e quantificação dos metabólitos em laranjas de polpa vermelha.** 2012. 136 f. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

A combinação do aumento da população mundial e a melhoria nos padrões de vida estão levando a uma maior demanda por alimentos com alto valor nutricional. As variedades de laranjas de polpa vermelha são as únicas laranjas que acumulam licopeno na polpa e no suco. O licopeno é um carotenóide considerado como um composto antioxidante, com ação potencial na prevenção de alguns tipos de câncer. Apesar do valor nutricional agregado as laranjas de polpa vermelha, a caracterização fisiológica e molecular dos carotenóides nessas laranjas permanece pouco estudada. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o perfil de transcrição de genes envolvidos na via de biossíntese dos carotenóides e quantificar a concentração dos carotenóides na polpa dos frutos de duas laranjas de polpa vermelha e da laranja Pêra (controle). Para comparação entre variedades, os frutos das laranjas Sanguínea-de-Mombuca (‘SM’) e Bahia Cara-Cara (‘CC’), que possuem polpa vermelha, e da laranja Pêra (‘P’) foram colhidos aos 270, 300 e 330 dias após o florescimento (DAF), em Cordeirópolis (CCSM). Para identificar a influência climática no acúmulo de carotenóides, frutos da laranja de polpa vermelha ‘SM’ foram também colhidos frutos aos 270, 300 e 330 DAF em diversos locais: CCSM, Mogi-Mirim (MM) e São Bento do Sapucaí (SBS). A quantidade dos transcritos dos genes fitoeno sintase (*PSY*), fitoeno dessaturase (*PDS*), ζ-caroteno dessaturase (*ZDS*), carotenóide isomerase (*CRTISO*), licopeno ε-ciclase (*LCY*ε), licopeno β-ciclase (*LCY*β), hidroxilase β-caroteno (*HY*β) e zeaxantina epoxidase (*ZEP*), que codificam para as enzimas da via de biossíntese dos carotenóides, foram analisados por PCR em tempo real. A quantificação dos principais carotenóides presentes no suco dos frutos foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência. A análise quantitativa de transcritos obtidos a 330 DAF indicaram a existência de maiores níveis de expressão dos genes precursores dos carotenos (*PSY*, *PDS*, *CRTISO*, *ZDS*, *LCY*β) nas variedades de polpa vermelha, principalmente na ‘SM’. A quantidade dos carotenos fitoflueno, licopeno e β-caroteno foram maiores nas laranjas vermelhas, em relação ao observado nos frutos de laranja Pêra, correlacionando com os níveis de expressão gênica. Nos frutos da laranja pigmentada ‘SM’ coletadas aos 330 DAF pôde-se observar uma possível associação entre o clima do local de cultivo e o conteúdo de transcritos dos genes da via de carotenóides. O cultivo em clima mais quente (MM) resultou em frutos com maiores níveis de transcritos dos genes precursores de carotenos (*PSY*, *PDS*, *ZDS*, *CRTISO* e *LCY*β), enquanto que o cultivo em região de clima mais frio (SBS) resultou no aumento do nível de transcritos dos genes precursores das xantofilas (*HY*β e *ZEP*). Como consequência, houve um acúmulo maior dos carotenos fitoflueno, licopeno e β-caroteno, nos frutos cultivados em locais quentes, porém, em regiões mais frias, houve maior acúmulo das xantofilas zeaxantina e violaxantina, nos frutos. Com o sequenciamento das regiões de diferentes genes da via de biossíntese de carotenóides, foram

identificadas algumas mutações pontuais na sequência de nucleotídeos dos genes *PSY*, *CRTISO* e *ZDS* da variedade pigmentada 'SM', em comparação com os mesmos genes da laranja Pêra. Algumas dessas mutações resultaram na alteração de aminoácidos na sequência das proteínas e deste modo, supõe-se que estes genes sejam os principais candidatos a serem os responsáveis pela alteração do fenótipo das variedades que produzem frutos com polpa avermelhada, ricos em licopeno.

Palavras-chave: *Citrus sinensis* [L.] Osbeck. Licopeno. β-Caroteno. CLAE. PCR em tempo real. *SNP*.

ABSTRACT

NISHIMURA, D. S. **Transcriptional profile of genes involved in carotenoids biosynthesis pathway and metabolites quantification in red-fleshed sweet oranges**. 2012. 136 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

The increasing world population and improvement in living standards are leading to greater demand for food with high nutritional value. The sweet orange varieties with red-flesh are the only ones that accumulate lycopene in the pulp and juice. Lycopene is a carotenoid compound with antioxidative property which may have a potential action in preventing some cancers. Despite of the high nutritional value in the red-fleshed oranges, the physiological and molecular characterization of carotenoids remains to be elucidated. The present work aimed to characterize the transcriptional profile of genes involved in carotenoids biosynthesis pathway and quantify the carotenoids in red-fleshed oranges and Pêra orange (as a control). For a direct comparison among the varieties, fruits of Sanguínea-de-Mombuca ('SM') and Bahia Cara-Cara ('CC') red-fleshed sweet oranges, and Pêra orange were harvested at 270, 300 and 330 days after flowering (DAF) in Cordeirópolis station (CCSM). To investigate the impact of climate variation on carotenoids accumulation, red-fleshed fruits 'SM' orange were harvested on 270, 300 and 330 DAF in different climate locations: Cordeirópolis station (CCSM), Mogi-Mirim (MM) and São Bento do Sapucaí (SBS). Quantitative transcriptional analysis of the genes phytoene syntase (*PSY*), phytoene desaturase (*PDS*), ζ-carotene desaturase (*ZDS*), carotenoid isomerase (*CRTISO*), lycopene ε-ciclase (*LCY*ε), lycopene β-cyclase (*LCY*β), hydroxylase β-carotene (*HY*β) and zeaxanthin epoxidase (*ZEP*) related to the carotenoids biosynthesis pathway were performed by quantitative Real Time PCR. Further, carotenoids quantification in red-fleshed fruits was measured by high performance liquid chromatography. The transcriptional profile at 330 DAF revealed high expression levels for the carotene gene precursors (*PSY*, *PDS*, *CRTISO*, *ZDS*, *LCY*β) in red-fleshed oranges, in particular to 'SM' orange when compared to Pêra orange. Carotenoids profiling displayed higher phytofluene, lycopene and β-carotene concentrations in red-fleshed orange than Pêra orange fruits. Transcript levels of genes related to the carotenoids pathway were responsive to the climate variation in red-fleshed orange harvested at 330 DAF. In warmer climate conditions, increased expression levels were found for the genes related carotene precursors (*PSY*, *PDS*, *ZDS*, *CRTISO* and *LCY*β), whereas under colder climate conditions, the red-fleshed fruits orange showed higher expression levels for the xanthophylls precursors genes (*HY*β e *ZEP*). As a consequence, the carotenes phytofluene, lycopene and β-carotene accumulated in warmer climate developed fruits, instead of colder climate conditions, where the fruits accumulate increased concentrations of xanthophylls such as zeaxanthin and violaxanthin. Moreover, the sequencing of fragments from different genes related to the carotenoids pathway enabled the identification of point mutations for the genes *PSY*, *CRTISO* and *ZDS* in the red-fleshed variety. These mutations caused amino acid changes in the protein

which indicates that these genes might be responsible for the phenotypes red-fleshed fruits and increased lycopene levels shown in the variety ‘SM’.

Keywords: *Citrus sinensis* [L.]. Osbeck. Lycopene. β-Carotene. HPLC. Real Time PCR. *SNP*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UV	Ultravioleta
CV	Cultivar
TC	agrupamento de ESTs alinhados (*Tentative consenso*)
EST	etiqueta de seqüência expressa (*Expressed Sequence Tag*)
BLAST	alinhamento local de seqüências (*Basic Alignament Sequence Tool*)
ORF	quadro aberto de leitura (*Open Reading Frame*)
mRNA	ácido ribonucleico
DNA	ácido desoxirribonucleico
RNA	ácido ribonucleico
SDS	dodecil sulfato sódico (*Sodium Dodecyl Sulfate*)
DTT	dithiothreitol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
dNTP	N-desoxinucleótideo trifosfato
dATP	A-desoxiadenosina trifosfato
SB	tampão ácido bórico – sódio (*Sodium Boric Acid*)
RT-PCR	transcrição reversa seguida de PCR
PCR	reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
cDNA	DNA complementar ao mRNA
RT-qPCR	transcrição reversa seguida de PCR quantitativo em tempo-real
LB	Luria-Bertani

LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
Kg	kilograma
β	beta
ζ	zeta
α	alfa
ε	épsilon
pb	pares de bases
ºC	graus Celsius
μM	micromolar
nº	número
g	grama
cm	centímetro
nm	nanômetro
mm	milímetro
μm	micromicrômetro
mL	mililitro
min	minuto
atm	atmosfera
μg	micrograma
g	constante gravitacional
mM	milimolar
mg	miligrama
M	molar
v	volts
U	unidade de enzima (Weiss)
h	hora
s	segundo
rpm	rotação por minuto
ng	nanograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
2 REVISÃO DE LITERATURA 20
2.1 Carotenóides 20
2.2 Biossíntese de carotenóides 22
2.3 Regulação da biossíntese e acúmulo de carotenóides 24
2.4 Importância nutricional dos carotenóides para a saúde humana 27
3 OBJETIVOS 31
3.1 Objetivo geral 31
3.2 Objetivos específicos 31
4 MATERIAL E MÉTODOS 32
4.1 Material vegetal, local e estádio de maturação 32
4.2 Análises físico-química dos frutos e do suco dos frutos de laranja 35
4.3 Quantificação dos metabólitos da via de biossíntese de carotenóides 36
4.3.1 Extração do suco e quantificação de carotenóides totais 36
4.3.2 Quantificação dos carotenóides por cromatografia líquida de alta eficiência 36
4.3.3 Análises estatísticas 37
4.4 Caracterização molecular dos genes da via de biossíntese de carotenóides 38
4.4.1 Identificação e caracterização dos genes 38
4.4.2 Construção de iniciadores específicos dos genes 38
4.4.3 Quantificação de transcritos reversos dos genes da via de carotenóides 40
4.4.3.1 Extração de RNA total 40
4.4.3.2 Visualização e quantificação de RNA total 41
4.4.3.3 Tratamento com DNAse 41
4.4.3.4 Síntese de cDNA 42
4.4.3.5 Análise da identidade dos iniciadores por RT-PCR 42
4.4.3.6 Clonagem e transformação gênica 43
4.4.3.7 Armazenamento dos clones 43
4.4.3.8 Extração de DNA plasmidial 44
4.4.3.9 Sequenciamento e análise dos resultados 45
4.4.3.10 Amplificação dos cDNAs e genômico com os iniciadores dos genes 45
4.4.3.11 Análise da expressão gênica por RT-PCR quantitativo 46
4.4.3.12 Delineamento experimental e estabilidade gênica 48

4.4.4 Identificação de mutações pontuais em regiões das sequências de genes que codificam as proteínas da via de carotenóides 49
4.4.4.1 Amplificação dos cDNAs com os iniciadores dos genes 49
4.4.4.2 Clonagem e transformação gênica 50
4.4.4.3 Armazenamento dos clones 51
4.4.4.4 Extração de DNA plasmidial 51
4.4.4.5 Sequenciamento 52
4.4.4.6 Análise dos resultados de sequenciamento 53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 55
5.1 Análises físico-química dos frutos e do suco dos frutos de laranja 55
5.2 Quantificação dos metabólitos da via de biossíntese de carotenóides 61
5.2.1 Análise de quantificação dos carotenóides no suco dos frutos das variedades de polpa vermelha e de polpa clara 61
5.2.2 Análise de quantificação dos carotenóides no suco dos frutos da variedade de polpa vermelha em locais distintos 68
5.3 Identificação e caracterização de genes da via de biossíntese de carotenóides 72
5.4 Desenvolvimento de iniciadores gene-específico para via de carotenóides 88
5.5 Quantificação de transcritos reversos dos genes da via de carotenóides 91
5.5.1 Análise de quantificação dos transcritos dos genes de carotenóides nos tecidos/órgãos . 91
5.5.2 Análise de quantificação dos transcritos dos genes de carotenóides na polpa dos frutos 97
5.5.2.1 Perfil dos transcritos dos genes da via entre as variedades (polpa clara e polpa vermelha) 97
5.5.2.2 Perfil dos transcritos dos genes da via de carotenóides na variedade de polpa vermelha entre os diferentes locais 102
5.6 Identificação de mutações pontuais em regiões das sequências de genes que codificam as proteínas da via de carotenóides 106
6 CONCLUSÕES 120
REFERÊNCIAS 121
APÊNDICE 134

1 INTRODUÇÃO

O Brasil detém 50% da produção mundial de suco de laranja e seus subprodutos, exporta 98% do que produz e consegue 85% de participação no mercado mundial. Juntos, São Paulo e a Flórida detêm 81% da produção mundial de suco. Só o Estado de São Paulo possui 53% do total. Na safra 2009/2010, a produção brasileira foi de 397 milhões de caixas de laranja de 40,8 kg (NEVES et al., 2010). Diante disto, vemos que a cadeia citrícola pode ser considerada como um dos segmentos mais globalizados do agronegócio brasileiro. Com grande parte de sua produção voltada ao mercado externo, a cadeia traz anualmente mais de US$ 1,5 - 2,5 bilhões em divisas para o Brasil, sendo um dos principais produtos na pauta das exportações (FNP, 2012).

As laranjas doces são originárias da China, conhecida cientificamente por *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, estas podem ser classificadas em função da coloração da polpa dos frutos. As laranjas claras são caracterizadas pela cor amarela da polpa e do suco (Figura 1), devido à presença de carotenóides, que são pigmentos que variam entre o amarelo e o vermelho. As diferentes cores na polpa dos frutos observadas nas variedades deste grupo são decorrentes de flutuações na quantidade dos diferentes carotenóides presentes, principalmente das xantofilas (BITTERS, 1961). A este grupo pertencem quase que a totalidade das laranjas comerciais cultivadas no mundo todo, tais como a Pêra e a Valência; laranjas sem acidez, a Lima e outras; e incluem também as variedades de mesa, tais como as laranjas Bahia. A variedade Pêra, dentre as variedades de laranjas comerciais, é a que se destaca tanto para o consumo de frutos *in natura* como para o processamento do suco pasteurizado, devido as suas características de sabor.

O outro grupo de laranjas doces [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] são as variedades de polpa vermelha ou falsas-sanguíneas (Figura 2). Nestas, a coloração vermelha da polpa é devido à presença de maiores teores de carotenóides do grupo dos carotenos (principalmente de licopeno) [LEE; COATES, 2002; FANCIULLINO et al., 2006; XU et al., 2006a; LIU et al., 2007]. O licopeno é o principal responsável pela coloração vermelha da polpa dos frutos das variedades Bahia Cara-Cara (SAUNT, 2000) e Hong Anliu (LIU et al., 2007). As laranjas de polpa vermelha são mutantes que surgiram de forma espontânea no campo, provavelmente originadas de laranjas de polpa clara. A Bahia Cara-Cara, a Sanguínea-de-Mombuca, a Valência Puka são exemplos de variedades de polpa vermelha presentes no Brasil. A Bahia

Cara-Cara é uma laranja mutante que surgiu de forma espontânea da Washington Navel (conhecida como laranja Bahia), na Venezuela (SAUNT, 2000). A variedade pigmentada Sanguínea-de-Mombuca também é uma mutante que surgiu de forma espontânea encontrada na região de Mombuca (SP), mas não se sabe ao certo qual seria a variedade original.

A laranja é conhecida como uma importante fonte de vitamina C para a alimentação humana. Acredita-se que o cultivo e a comercialização das variedades de polpa vermelha possam aumentar ainda mais o potencial do econômico no país, porque são variedades que apresentam maior valor nutricional e nutracêutica, devido ao acúmulo do pigmento licopeno. O licopeno é considerado um dos mais potentes agentes antioxidantes naturais, sendo sugerido na prevenção de câncer, devido a sua capacidade de proteger moléculas, inclusive o DNA, da ação de radicais livres (SHAMI; MOREIRA, 2004).

Trabalhos ressaltam que nos frutos de citros, a composição e quantidade dos carotenóides variam enormemente entre espécies (FANCIULLINO et al., 2006), variedades (LEE; COATES, 2002; FANCIULLINO et al., 2006), estádios de maturação dos frutos (LEE; COATES, 2002; KATO et al., 2004), clima ou região de cultivo (MOULY; GAYDOU; CORSETTI, 1999) e efeito de processamento (GAMA; SYLOS, 2007). Diante dos resultados acima observados para as laranjas de polpa clara, confirma-se a necessidade da realização de estudos mais completos com as laranjas de polpa vermelha, em locais de climas distintos e nos diferentes estádios de maturação dos frutos, visando caracterizar; através da quantificação dos metabólitos e transcritos dos genes da via de biossíntese de carotenóides.

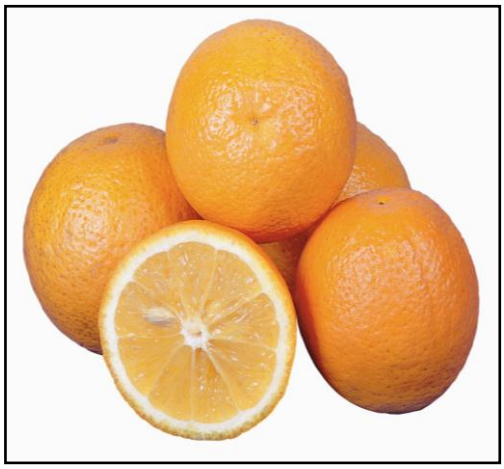

Figura 1 - Fruto da laranja Valência, do grupo das variedades de polpa clara

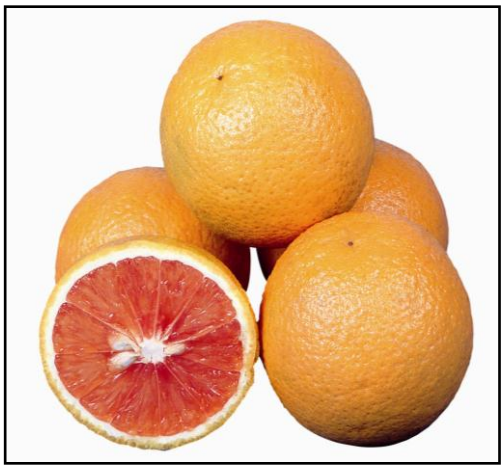

Figura 2 - Fruto da laranja Sanguínea-de-Mombuca, do grupo das variedades de polpa vermelha

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carotenóides

Os carotenóides são compostos isoprenóides (Tetraterpenos-C_{40}) com cadeias de polieno que contém 15 duplas ligações conjugadas (BRITTON; LIAAEN-JENSEN; PFANDER, 1995). A cadeia pode ser terminada por grupos terminais cíclicos (anéis) e pode ser complementada com grupos funcionais contendo oxigênio. Com base na sua estrutura química, os carotenóides em plantas são classificados em dois grupos: os carotenos, formado de hidrocarbonetos (alguns exemplos: ζ-caroteno, α-caroteno e β-caroteno) e as xantofilas cadeia de hidrocarboneto, com grupo oxigenado como hidroxilas ou cetonas (alguns exemplos: β-criptoxantina, violaxantina e zeaxantina), sendo os oxigenados derivados destes hidrocarbonetos (NAMITHA; NEGI, 2010) (Figura 3).

Amplamente distribuídos na natureza, aproximadamente 700 carotenóides já foram identificados na natureza (BRITTON; LIAAEN-JENSEN; PFANDER, 1995). Nas plantas superiores, os carotenóides são sintetizados e acumulados nos cloroplastos, dos tecidos fotossintéticos, nos cromoplastos nos frutos e flores (NAMITHA; NEGI, 2010; SANDMANN, 2001), e servem como precursores de outros componentes importantes biologicamente (FESTER et al., 2002; GUILIANO et al., 2003; MILBOROROW, 2001).

Estes pigmentos têm um papel chave na vida das plantas tem a função antioxidante para proteger clorofilas contra a foto-oxidação durante a fotossíntese (CUNNINGHAM; GANTT, 1998; FRASER; BRAMLEY, 2004; GREEN; DURNFORD, 1996; NIYOGI, 2000) e são considerados como substratos precursores para biossíntese do regulador de crescimento ácido abscísico (NAMBARA; MARION-POLL, 2005) e outros fito-hormônios (AULDRIDGE; McCARTY; KLEE, 2006), como corante nas flores para atrair polinizadores ou em frutos para atrair para promover dispersores de sementes (CUNNINGHAM; GANTT, 1998; FRASER; BRAMLEY, 2004).

Carotenóides na dieta humana são principalmente derivados de plantas onde eles estão naturalmente presentes nas folhas, flores e frutas. Em geral, o aumento na intensidade da cor em um órgão da planta indica um nível mais elevado de carotenóide (NAMITHA; NEGI, 2010). O acúmulo de carotenóides na casca dos frutos cítricos ocorre simultaneamente com a

degradação de clorofila, durante o processo de amadurecimento do fruto, determinando assim a sua cor (KATO et al., 2004; RODRIGO; MARCOS; ZACARIAS, 2004). Em *Citrus*, os carotenóides são responsáveis pela cor dos frutos maduros e do suco das frutas (laranja, variando de amarelo a vermelho), que é um atributo importante na qualidade do fruto e no aceite pelo consumidor. O conteúdo e a composição dos carotenóides variam muito entre as cultivares e espécies de *Citrus* (FANCIULLINO et al., 2006; GROSS, 1987), estágio de maturação, práticas de produção, manuseio pós-colheita, processamento e armazenamento dos alimentos (NAMITHA; NEGI, 2010).

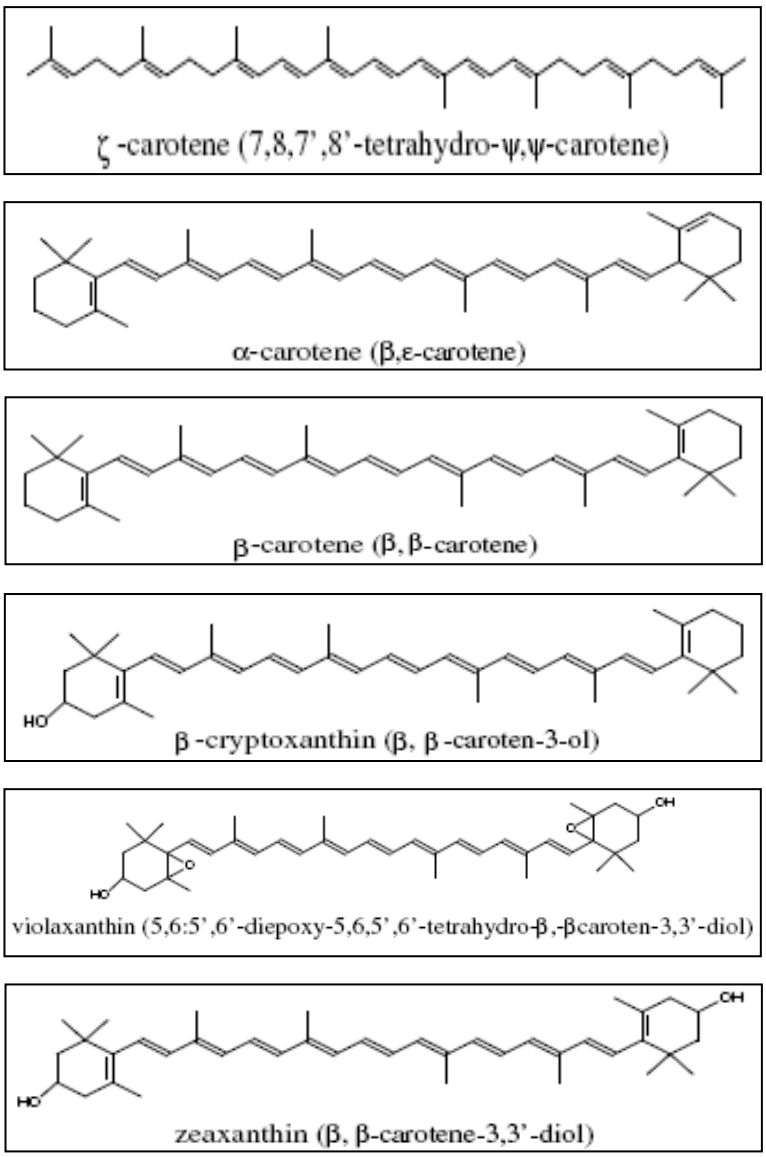

Figura 3 - Exemplos de estruturas químicas de alguns carotenos (ζ-caroteno, α-caroteno e β-caroteno) e de algumas xantofilas (β-criptoxantina, violaxantina e zeaxantina) (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2008)

Carotenóides mostram diferenças qualitativas dependendo do tecido/órgão e da espécie da planta. Por exemplo, tecidos verdes da maioria das plantas demonstram perfis semelhantes de carotenóides, acumulando ambos β,ε-carotenóide (com um β- e um ε-anel) e β, β-carotenóide (com dois β-anéis) [GOODWIN; BRITTON, 1988]. Em contraste, nos tecidos coloridos, os carotenóides mostram composições distintas que dependem da espécie de planta. Por exemplo, o tomate é o melhor modelo para determinar o acúmulo de carotenóides, o fruto acumula grandes quantidades de licopeno (FRASER et al., 1994). Em geral, as plantas não acumulam carotenóides nas raízes. O armazenamento nas raízes de cenoura (BARANSKA et al., 2006) e de batata doce (HAGENIMANA et al., 1999) são exceções. Elas acumulam altas concentrações de β-caroteno que é uma importante fonte de vitamina A para dieta humana (NIELSEN; LEWIS; MORGAN, 2003).

2.2 Biossíntese de carotenóides

Em plantas, a via de biossíntese de carotenóides está ilustrada na Figura 4, inicia nos plastídios com isopentenil pirofosfato (IPP) onde o produto é acumulado. Uma hipótese diz que as enzimas da via de carotenóides estão associadas à membrana do plastídio (CUNNINGAM; GANTT, 1998). A biossíntese dos carotenóides inicia-se com uma unidade de isopreno (IPP, C_5). Quatro unidades de IPP são condensadas para formar geranilgeranilpirofosfato (GGPP; C_{20}). Em seguida, duas moléculas GGPP são condensadas e catalisadas pela enzima fitoeno sintase (*PSY*), formando o carotenóide fitoeno incolor (C_{40}) (ARMSTRONG, 1997; SANDMANN, 1994; TANAKA; SASAKI; OHMIYA, 2008). Duplas ligações conjugadas são subsequentemente adicionadas na molécula por duas enzimas estruturalmente similares fitoeno dessaturase (*PDS*) e ζ-caroteno dessaturase (*ZDS*). Os produtos dessas reações de dessaturação são fitoflueno, ζ-caroteno, neurosporeno e licopeno, contendo 5, 7, 9 e 11 duplas ligações conjugadas, respectivamente (TANAKA; SASAKI; OHMIYA, 2008).

A coloração do carotenóide varia em função da quantidade de duplas ligações na molécula, quanto mais insaturações apresentar, menor será o comprimento de onda absorvido. Os carotenóides fitoeno e fitoflueno são incolores, o ζ-caroteno é amarelo, o neurosporeno é laranja amarelado e o licopeno, apresenta coloração vermelha. Durante as etapas de

dessaturações, várias reações intermediárias com a configuração *cis* são produzidas (TANAKA; SASAKI; OHMIYA, 2008). A conversão da molécula *cis* para *trans*-licopeno é carreada pela enzima carotenóide isomerase (*CRTISO*), que foi identificada em tomate (ISAACSON et al., 2002) e em *Arabidopsis* (PARK et al., 2002). Mais recentemente, Li, Murillo Wurtzel (2007) relataram outra enzima carotenóide isomerase (*Z-ISO*), identificada em milho.

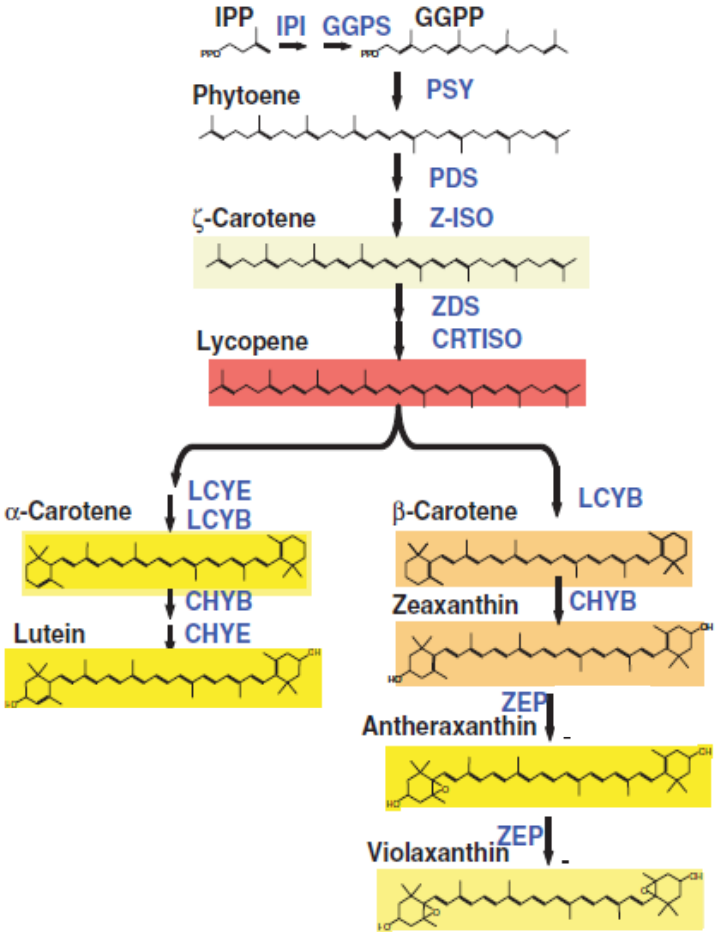

Figura 4 - Via de biossíntese de carotenóides em plantas (TANAKA; SASAKI; OHMIYA, 2008)

O ciclização do carotenóide licopeno é considerado o ponto de ramificação da via carotenogênica, catalizado pelas enzimas licopeno ε-ciclase (*LCY*ε) e licopeno β-ciclase (*LCY*β), produzindo o α- e β-caroteno; respectivamente. Os carotenóides α- e β-caroteno são diferentes entre si pela posição da dupla ligação no anel cíclico da molécula (CUNNINGAM; GANTT, 1998). Os carotenóides α- e β-criptoxantina são os produtos da enzima β-ring hidroxilase (*HY*β). O α-criptoxantina é convertido à luteína por hidroxilação (adição de um

grupo de ligação - OH), sendo esta reação de catálise realizada pela enzima ε-ring hidroxilase (*HY*ε).

Do outro lado da via, o β-criptoxantina é convertido a zeaxantina pela reação de hidroxilação da enzima *HY*β. Assim, a enzima zeaxantina epoxidase (*ZEP*) converte o produto (zeaxantina) de *HY*β no substrato violaxantina (CUNNINGAM; GANTT, 1998; TANAKA; SASAKI; OHMIYA, 2008).

2.3 Regulação da biossíntese e acúmulo de carotenóides

O metabolismo de carotenóides e a sua regulação têm sido estudada em várias espécies de plantas, como *Arabidopsis* (PARK, et al., 2002; POGSON et. al., 1996), tomate (FRASER et. al., 1994; GUILIANO; BARTLEY; SCOLNIK, 1993; ISAACSON et al., 2002; RONEN et al., 1999), pimenta (*Capsicum annuum*; BOUVIER et al., 1996; 1998), tabaco (*Nicotiana tabacum*; BUSCH; SEUTER; HAIN, 2002), algas (STEINBRENNER; LINDEN, 2001), *Citrus* (KATO et al., 2004; RODRIGO; MARCOS; ZACARÍAS, 2004; RODRIGO; ZACARIAS, 2007), damasco (MARTY et al., 2005; KITA et al., 2007) e outros. Tecidos das plantas, em particular as pétalas das flores e os frutos, apresentam uma variação na composição e na quantidade de carotenóides (SANDMANN; RÖMER; FRASER, 2006).

O metabolismo de carotenóides é um processo complexo, que é todo regulado com o ciclo de vida da planta, com mudanças dinâmicas no conteúdo e na sua composição dos pigmentos em resposta aos estímulos ambientais (CAZZONELLI; POGSON, 2010). A luminosidade tem sido reportada como importante fator ambiental que regula o metabolismo dos carotenóides em plantas (ALBA et al., 2000; DOMINGO et al., 2001; HUFF et al., 1983, 1984; LIU et al., 2009; SANDMANN; RÖMER; FRASER, 2006; SCHOFIELD; PALIYATH, 2005; WU et al., 2007).

Sob condições de luz, ocorre um elevado acúmulo de pigmentos de clorofila, o que leva consecutivamente a formação dos pigmentos de carotenóide (SANDMANN; RÖMER; FRASER, 2006; SIMKIN et al., 2003).

A evidência direta de que a luz aumenta a biossíntese dos carotenóides das folhas vem desde o início dos estudos. Além disso, foi demonstrado que sob escuridão prolongada, a biossíntese de carotenóides é completamente interrompida (SIMKIN et al., 2003).

O sistema-modelo de formação de carotenóides tem sido estabelecido em frutos de tomate. Na coloração dos frutos de tomate, com o acúmulo de licopeno, os níveis de transcritos da isoforma *PSY*I e do gene *PDS* aumentam significativamente (FRASER et al., 1994; GIULIANO et al., 1993; PECKER et al., 1992), enquanto que os mRNAs das licopeno ciclases (*LCY*β e -ε) desaparecem (PECKER et al., 1996; RONEN et al., 1999). Em cravo, as diferenças na coloração das pétalas, de amarelo para laranja-avermelhado, são causadas pelas diferenças no acúmulo do carotenóide amarelo, luteína. Também já foi demonstrado que o *PSY* é uma enzima essencial na biossíntese dos carotenóides em sementes de canola (*Brassica napus*) (SHEWMAKER et al., 1999) e em frutos de tomate (FRASER et al., 1994).

Em *Citrus*, os genes que codificam as enzimas dos principais passos do metabolismo de carotenóides têm sido investigados e as suas expressões têm sido avaliadas nas plantas (ALQUÉZAR; ZACARÍAS; RODRIGO, 2009; KATO et al., 2004; KATO et al., 2006; KITA et al., 2007). Durante o amadurecimento do fruto, a regulação da transcrição dos genes de carotenóides parece ser um mecanismo importante pelo qual a biossíntese e acumulação de carotenóides específicos são regulados (FRASER; BRAMLEY, 2004; HIRSCHBERG, 2001). Os níveis de transcritos de mRNA dos genes *PSY*, *PDS* e *ZDS* aumentam na casca e na polpa dos frutos durante o amadurecimento, consequentemente ocorre o massivo acúmulo dos carotenóides específicos, metabolizados por estas enzimas (KATO et al., 2004; FANCIULLINO et al., 2008).

Em laranjas claras, Rodrigo, Marcos e Zacarías (2004) avaliaram a expressão de oito genes da via biossintética dos carotenóides nas folhas e frutos nos diversos estádios de desenvolvimento e observaram que os genes *PSY* e *ZDS* tiveram sua expressão aumentada durante o período de desenvolvimento e amadurecimento. O gene *PDS*, apresentou transcrição moderada durante a fase do amadurecimento. Os genes *LCY*β e *ZEP* tiveram suas transcrições presentes durante todo o processo de desenvolvimento e maturação em níveis relativamente baixos em comparação com outros genes da via carotenogênica. Já o gene *LCY*ε, apresentou elevada expressão no início do desenvolvimento dos frutos, seguido de rápido decréscimo nos estádios posteriores do desenvolvimento do fruto.

Em tangerina Satsuma, após a investigação de vários genes, o *PSY* teve sua expressão aumentada na casca e no suco de fruta com o início da coloração (IKOMA et al., 2001; KIM et al, 2001), enquanto que a expressão dos genes *PDS* e *HY*β foram mantidas no fruto em desenvolvimento (KIM et al., 2001; KITA et al., 2001).

O acúmulo de licopeno é uma característica incomum na maioria das frutas cítricas, tendo sido relatado em poucas espécies. Os mutantes que acumulam licopeno foram identificados em pomelos (*Citrus paradisi* Macf.), toranjas (C*itrus grandis* Osbeck) (SAUNT, 2000) e em laranjas doces (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck), esta última espécie com três relatos na literatura: Shara (MONSELISE; HALEVY, 1961), Bahia Cara-Cara (ALQUEZAR; RODRIGO; ZACARÍAS, 2008) e mais recentemente, na variedade Hong Anliu (LIU et al., 2007).

Durante o amadurecimento do fruto, a casca e a polpa da laranja Cara-Cara acumula altas quantidades de carotenos iniciais (fitoeno, fitoflueno, licopeno e β-caroteno) da via, enquanto que as xantofilas apresentaram uma evidente diminuição, o contrário foi observado na laranja Washington Navel, variedade clara, da qual foi originada (ALQUEZAR; RODRIGO; ZACARÍAS, 2008). Os resultados obtidos por Tao et al. (2007) mostraram que o acúmulo de fitoeno em Bahia Cara-Cara é responsável pela regulação da expressão do gene *PSY*, o que sugere que o mecanismo de regulação ocorrido em Cara-Cara é bastante similar ao demonstrado em tomate, mas esta hipótese ainda precisa ser confirmada. Segundo os autores, o licopeno acumulado nas vesículas de suco de Cara-Cara poderia gerar um *feedback* positivo, ou seja, o acúmulo deste pigmento poderia induzir ao acúmulo de fitoeno. Estes estudos demonstram que o acúmulo de licopeno está altamente relacionado ao aumento na expressão dos genes *PSY*, *PDS*, *ZDS*. Isto sugere que uma possível manipulação destes genes poderia alterar o perfil de licopeno em *Citrus*, realçando a coloração e promovendo o enriquecimento do teor nutricional do fruto (TAO et al., 2007).

Esforços têm sido feitos para compreender a regulação molecular da via biossintética de carotenóides nos frutos de *Citrus*. Genes que codificam para as principais enzimas de biossíntese de carotenóides têm sido isolados e a expressão deles na casca e polpa, durante o amadurecimento natural de frutos de laranjas, limões e tangerinas, tem sido investigada (KATO et al., 2004; RODRIGO; MARCOS; ZACARÍAS, 2004). A comparação no perfil de expressão de genes com as alterações na quantidade dos carotenóides revelou os seguintes passos na regulação da via na casca e na polpa dos frutos de laranja: (1) o aumento dos transcritos dos genes *PSY* e *ZDS* aumenta consequentemente o fluxo dos pigmentos precursores da via dos carotenos lineares; (2) o conteúdo de carotenóides nos frutos em desenvolvimento e nos maduros, foi diretamente correlacionado com o perfil de expressão do gene *PDS*, (3) a transição de cloroplastos para cromoplastos parece ser determinada por uma progressiva diminuição na expressão do gene *LCY*ε e por um aumento concomitante na

expressão do gene *HY*β, que atua no direcionamento do fluxo de carotenóide para a acumulação de pigmentos coloridos durante o amadurecimento (KATO et al., 2004; RODRIGO; MARCOS; ZACARÍAS, 2004).

O isolamento dos genes de biossíntese de carotenóides permitiu uma melhor identificação dos postos-chave de regulação da via de biossíntese de carotenóides. Mas mesmo assim, o conhecimento sobre os aspectos moleculares que regulam a via são ainda limitados. A quantidade de carotenóides nos tecidos não é atribuída unicamente à capacidade de sintetizar carotenóides. O mecanismo que controla o acúmulo de carotenóides é praticamente desconhecido. Dois diferentes mecanismos de regulação foram postulados. Um está relacionado à degradação de carotenóides, e o outro está relacionado à capacidade de dreno (translocação) (KISHIMOTO; OHMINA, 2006).

Embora avanços significativos tenham sido feitos para entender o acúmulo de carotenóides e a expressão dos genes durante a maturação dos frutos de citros, o conhecimento sobre as mudanças no metabolismo de carotenóides em resposta a vários estímulos ambientais nos frutos ainda é limitado (MATSUMOTO et al., 2009; RODRIGO; ZACARIAS, 2007). A maioria dos trabalhos foi realizada com variedades de frutos claros, utilizando-se a como tecido, a casca (KATO et al., 2004; KATO et al., 2006; RODRIGO; MARCOS; ZACARÍAS, 2004; RODRIGO; ZACARIAS, 2007) e as vesículas de suco (KATO et al., 2004).

2.4 Importância nutricional dos carotenóides para a saúde humana

Os carotenóides são essenciais aos humanos que necessitam incorporá-los pela dieta, por serem incapazes de sintetizá-los. A biodisponibilidade é definida como a fração de um nutriente ingerido que se torna disponível para o corpo para utilização em funções fisiológicas ou para o armazenamento (JACKSON, 1997). A biodisponibilidade dos carotenóides é influenciada por muitos fatores dietéticos e fisiológicos que incluem; espécies dos carotenóides, ligação molecular, quantidade consumida em uma refeição, matriz na qual o carotenóide está incorporado, efetores de absorção e bioconversão, fatores genéticos, e outros (CASTENMILLER; WEST, 1998). Os carotenóides são lipossolúveis, a sua absorção no intestino é melhor a partir de uma dieta rica em gorduras, embora a quantidade de gordura exigida seja baixa (VAN HET HOF et al., 2000) e estudos provaram que a absorção de

carotenóides aumenta quando são ingeridos com lipídios da dieta (BROWN et al., 2004; UNLU et al., 2007).

A absorção de β-caroteno a partir de vegetais é baixa (14%) em comparação com β-caroteno purificado adicionada a uma matriz (VAN HET HOF et al., 2000). Isômeros *cis* de carotenóides são relatados como sendo mais biodisponíveis do que as formas *trans* (BOILEAU; MOORE; ERDMAN, 1999). A biodisponibilidade do licopeno de tomate é maior com o processamento do que com o produto *in natura*. Absorção de licopeno pelos seres humanos é muito maior (duas vezes maior) no suco de tomate processado do que no suco não processado. Isto é atribuído para a isomerização da forma *trans* para *cis* de licopeno no aquecimento (BOILEAU; BOILEAU; ERDMAN, 2002; STAHL; SIES, 2002). Unlu et al. (2007) descobriram que os isômeros *cis* de licopeno são mais bem absorvidos e mais biodisponíveis do que os isômeros *trans*.

Os carotenóides mais pesquisados por estarem relacionados à saúde humana são o β-caroteno, o α-caroteno, a β-criptoxantina, o licopeno, a luteína e a zeaxantina. Além de serem os principais carotenóides no sangue humano (EPLER et al., 1993), são também, com exceção da zeaxantina, os mais comumente encontrados nos alimentos, sendo o β-caroteno o mais largamente distribuído (RODRIGUEZ-AMAYA, 1993).

Carotenóides têm um papel importante na nutrição e saúde humana, fornecendo Provitamina A e tem atividade protetora contra câncer (MAYNE, 1996). Alguns carotenos são chamados de provitamina A, devido ao fato de possuírem atividade como vitamina A. Além do β-caroteno, a criptoxantina, o α e o γ-caroteno, após a ingestão, sofrem metabolização e resultam na Vitamina A, sendo que o β-caroteno é potencialmente duas vezes mais ativo que os outros. O α-caroteno e a β-criptoxantina têm cerca de 50% da atividade do β-caroteno, ao passo que a luteína, zeaxantina e licopeno não possuem atividade (MACKINNEY, 1961).

Mais recentemente, outras funções importantes a saúde tem sido atribuídas como redução do risco de contrair doenças crônicas ou degenerativas, tais como câncer, doenças cardiovasculares, catarata e degeneração macular relacionada à idade (ASTORG, 1997; GAZIANO; HENNEKENS, 1993; KRINSKY, 1993; OLSON, 1999). Tais atividades fisiológicas não possuem relação com a atividade vitamínica A, mas têm sido atribuídos às suas propriedades antioxidantes, especificamente, à capacidade de sequestrar o oxigênio singleto e interagir com os radicais livres (PALOZZA; KRINSKY, 1992).

Entretanto, outros mecanismos de ação dos carotenóides contra as doenças crônicas foram relatados, tais como a modulação do metabolismo de substâncias cancerígenas, inibição

da proliferação celular, realce da diferenciação celular, estimulação da comunicação intercelular e filtragem da luz azul (ASTORG, 1997; OLSON, 1999; SIES; STAHL, 2002).

Segundo Shami e Moreira (2004), o licopeno aparece atualmente como um dos mais potentes agentes antioxidantes naturais, sendo sugerido na prevenção de carcinogênese e aterogênese, devido a sua capacidade de proteger moléculas, inclusive o DNA, da ação de radicais livres. A ação do licopeno na saúde humana tem recebido grande destaque nos últimos anos (CLINTON, 1999; GERSTER, 1997; GIOVANNUCCI, 1999; KHACHIK et al., 2002; RAO; AGARWAL, 1999; STAHL; SIES, 1996; SIES; STAHL, 2000), sendo a evidência científica mais forte em relação ao câncer do pulmão, esôfago e próstata. A ênfase tem sido a sua ação contra câncer da próstata (GIOVANNUCI et al., 2002; HADLEY et al., 2002; STACEWICZ-SAPUNTZAKIS; BOWEN, 2005), por meio de diferentes mecanismos que levam à redução da proliferação de células epiteliais normais e cancerosas da próstata, redução do dano no DNA e melhoramento da defesa contra estresse oxidativo. O licopeno pode ter um papel também na prevenção de doenças cardiovasculares (ARAB; STECK, 2000; RISSANEN et al., 2002).

Os antioxidantes, entretanto, possuem diversos modos de ação, e os métodos que determinam a atividade antioxidante medem diferentes ações e são efetuados sob diferentes condições. Assim, a extrapolação de medidas simples da capacidade antioxidante para os efeitos na saúde humana é cada vez mais questionada. A capacidade dos carotenóides de sequestrar o oxigênio singleto (função oxidante) tem sido atribuída ao extenso sistema de duplas ligações conjugadas, obtendo-se a máxima proteção daqueles que possuem nove ou mais duplas ligações. Foi constatado que o licopeno, sendo acíclico, é mais eficiente do que o dicíclico β-caroteno, embora os dois tenham 11 duplas ligações conjugadas (BECKER; NISSEN; SKIBSTED, 2004).

A manipulação genética da via de carotenóides é de interesse substancial a fim de gerar plantas que são mais resistentes a estresses ambientais (por exemplo, luz elevada e UV-B) com um incremento no conteúdo nutricional ou fábricas celulares para a produção de carotenóides de alto valor industrial (SANDMANN; RÖMER; FRASER, 2006).

O conteúdo de carotenóides totais e/ou individuais difere entre as variedades de *Citrus* e os locais de cultivo e um dos fatores influenciáveis é a temperatura e a luminosidade. Diante das informações acima descritas, é de interesse realizar estudos mais completos nas variedades de laranja de polpa vermelha em relação à polpa amarela, visando quantificar os carotenóides totais, principalmente os metabólitos de β-caroteno e licopeno (Figura 5) na polpa dos frutos das variedades nos diferentes locais de coleta e estádios de maturação dos

frutos. Assim confirmada a presença e a estabilidade destes compostos nos frutos de polpa vermelha, estes poderão ser considerados como alimentos nutracêuticos, servindo como um apelo comercial para o consumo.

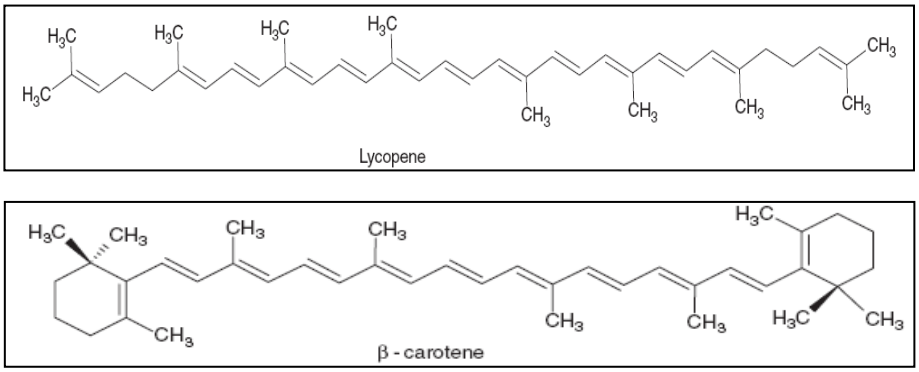

Figura 5 - Estrutura química dos carotenos (licopeno e β-caroteno) (NAMITHA; NEGI, 2010)

Os genes estruturais de biossíntese de carotenóides já foram identificados e clonados em polpa clara, mas a regulação da via de biossíntese de carotenóides ainda é pouco conhecida, principalmente nas variedades de polpa vermelha. Sendo assim, um estudo mais detalhado dos genes da via de biossíntese de carotenóides junto à quantificação dos metabólitos sintetizados, poderá ajudar na caracterização do fenótipo que leva a coloração diferenciada da polpa dos frutos entre as variedades (polpa clara e polpa vermelha) e cultivadas em locais de climas distintos (alterações climáticas).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Quantificar os transcritos dos genes e os principais metabólitos sintetizados na via de carotenóides nos frutos das laranjas de polpa vermelha e de polpa clara, em locais com condições climáticas distintas e nos diferentes estádios de maturação dos frutos.

3.2 Objetivos específicos:

a) Avaliar as características de qualidade dos frutos nas variedades de polpa vermelha e de polpa clara (mantidas no mesmo local) e nos locais com condições climáticas distintas (temperatura e pluviosidade), quente e frio (utilizando mesma variedade), em diferentes estádios de maturação;

b) Quantificar os pigmentos de carotenóides dos frutos nas variedades de polpa vermelha e de polpa clara (mantidas no mesmo local) e nos locais com condições climáticas distintas, quente e frio (utilizando mesma variedade), em diferentes estádios de maturação;

c) Quantificar o perfil de transcritos dos genes da via de carotenóides nas variedades de polpa vermelha e de polpa clara (mantidas no mesmo local) e nos locais com condições climáticas distintas, quente e frio (utilizando mesma variedade), em diferentes estádios de maturação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal, locais e estádio de maturação

Duas variedades de laranja de polpa vermelha foram utilizadas no presente estudo, a Sanguínea-de-Mombuca (‘SM’) e a Bahia Cara-Cara (‘CC’), além da laranja Pêra (‘P’), variedade que possui frutos com polpa clara e foi usada como controle. A laranja ‘SM’ foi coletada em três locais no Estado de São Paulo, Cordeirópolis (CCSM / Latitude: -22.4802, Longitude: -47.4557, 22° 28´ 49˝ Sul, 47° 27´ 21˝ Oeste), Mogi-Mirim (MM / Latitude: -22.432, Longitude: -46.9582, 22° 25´ 55˝ Sul, 46° 57´ 30˝ Oeste) e São Bento do Sapucaí (SBS / Latitude: -22.6883, Longitude: -45.7363, 22° 41´ 18˝ Sul, 45° 44´ 11˝ Oeste). As demais variedades somente em CCSM.

Os locais de coleta apresentam climas distintos, sendo que em CCSM e em MM o clima pode ser classificado como tipo Cwa (clima temperado úmido com inverno seco e verão quente, segundo classificação de Köppen-Geiger), e SBS, região com clima mais frio, sendo classificado como Cfb (clima temperado úmido com verão temperado, segundo classificação de Köppen-Geiger).

Os dados de temperatura média (ºC) e pluviosidade (mm) total durante o período de cultivo da safra 2008/09 (09/08/2008 a 03/09/2009) foram os seguintes: CCSM - temperatura média diária de 20,8 ºC e a pluviosidade total de 1127,6 mm no período; MM - temperatura média de 21,4 ºC e a pluviosidade total de 1180,7 mm no período; e SBS - temperatura média de 15,9 ºC e a pluviosidade total de 1976,3 mm no período. As figuras, 6, 7 e 8 representam o balanço hídrico nas respectivas regiões Mogi-Mirim (MM), Cordeirópolis (CCSM) e São Bento do Sapucaí (SBS), respectivamente durante o mesmo período.

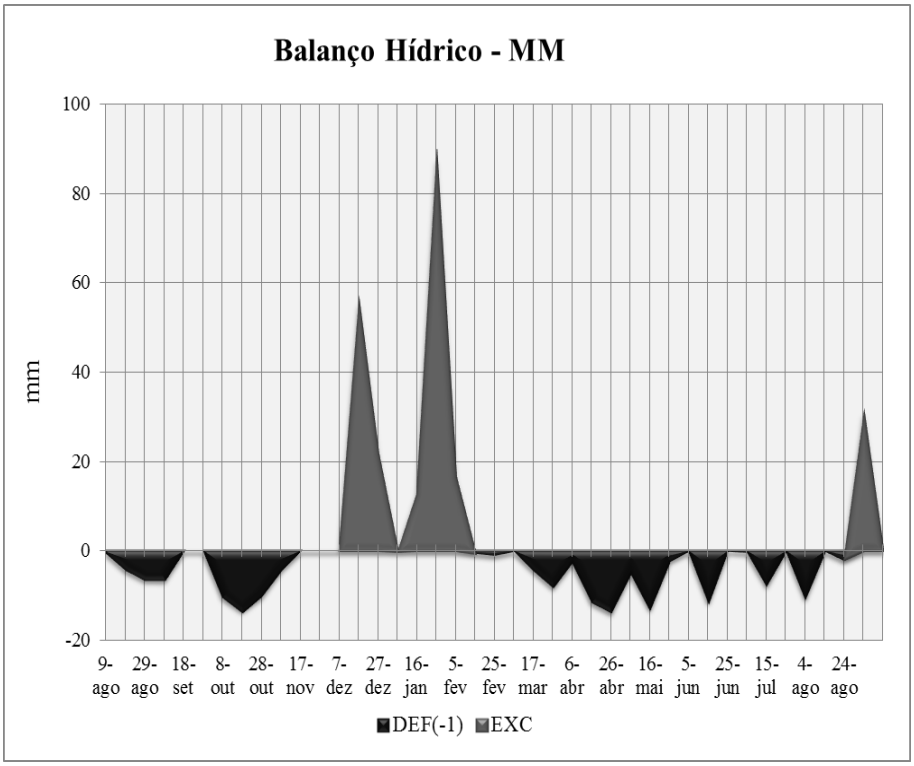

Figura 6 - Balanço hídrico monitorado na região de Mogi-Mirim (MM) durante o cultivo (safra 2008/09).

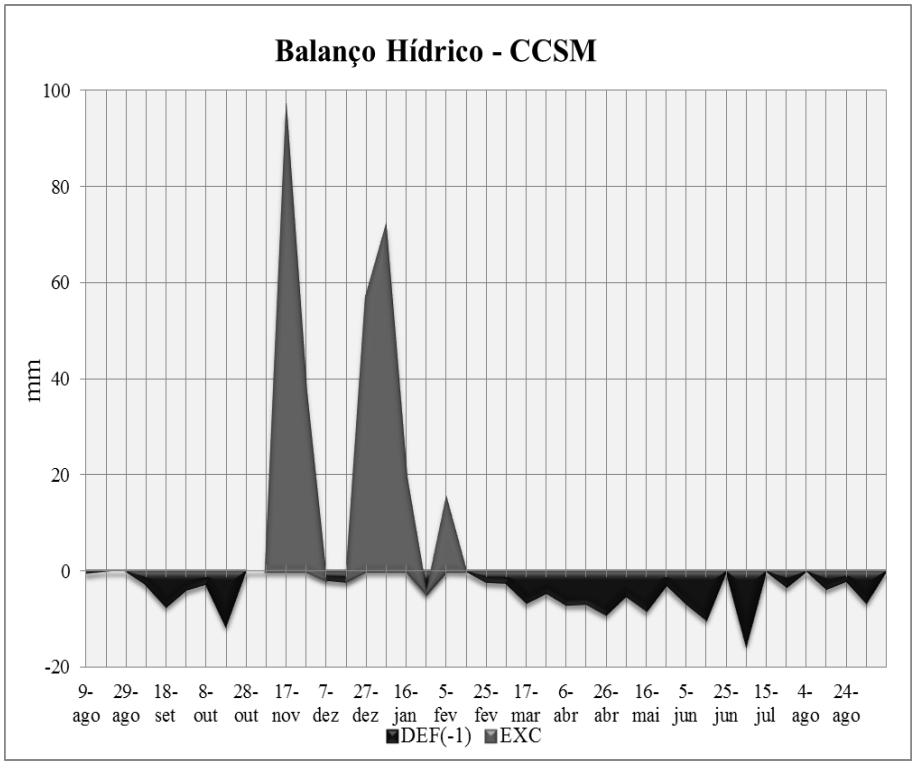

Figura 7 - Balanço hídrico monitorado na região de Cordeirópolis (CCSM) durante o cultivo (safra 2008/09).

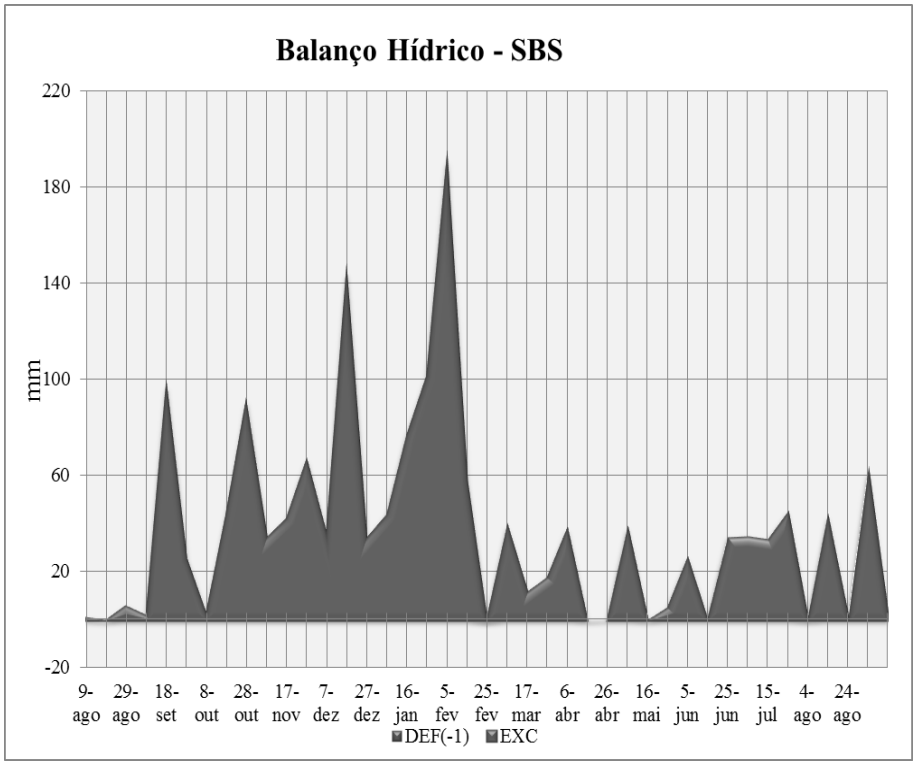

Figura 8 - Balanço hídrico monitorado na região de São Bento do Sapucaí (SBS) durante o cultivo (safra 2008/09).

Nos três locais, os pomares são formados por três plantas de cada uma das variedades, com idade adulta (acima de 10 anos), em plantio não-casualizado e sem irrigação. O porta-enxerto utilizado foi à tangerina 'Cleópatra'.

As coletas foram realizadas em três estádios de maturação (tempos) dos frutos: a 270, 300 e 330 dias após o florescimento (DAF). Cada amostra foi composta por 50 frutos, foram coletados ao acaso das três plantas do pomar, com coletas nos quatro quadrantes de cada planta, sempre altura média entre 1 e 2 metros de altura e na parte externa do dossel da planta.

Em seguida, as amostras foram subdivididas e enviadas para a realização das análises de qualidade de frutos e suco; quantificação dos carotenóides individuais e totais, assim como para experimentos de quantificação de transcritos dos genes da via de biossíntese dos carotenóides.

4.2 Análises físico-química dos frutos e do suco dos frutos de laranja

As análises de qualidade dos frutos e de suco foram conduzidas no laboratório de Qualidade da Fruta do Centro APTA Citros “Sylvio Moreira” - Cordeirópolis (CCSM), Cordeirópolis, SP. As amostras de 20 frutos de cada variedade foram divididas em sub-amostras de 10 frutos, considerando assim duas repetições biológicas, para a determinação de vários parâmetros físicos e químicos de frutos e de suco dos frutos.

As variáveis físicas avaliadas em frutos foram à massa, altura e largura dos frutos. Os frutos de cada amostra foram pesados numa balança analítica para a determinação da massa. A altura e largura dos frutos foram mensuradas com auxílio de um paquímetro. O parâmetro relação altura por largura dos frutos foi calculado posteriormente.

O suco dos frutos de cada amostra foi extraído em extratora manual e em seguida, homogeneizado. As variáveis químicas avaliadas no suco foram à massa do suco, o teor de sólidos solúveis totais (STT), a acidez total titulável (ATT) e o teor de vitamina C. Além de se calcular posteriormente o rendimento e o *ratio* do suco de cada amostra.

Os teores de SST foram determinados em refratômetro e os valores expressos em graus Brix. A ATT foi determinada utilizando-se metodologia citada por Latado et al. (2008). O *ratio* foi calculado através da razão entre o SST e a ATT. Os teores de vitamina C no suco de laranja foram quantificados de acordo com Latado et al. (2008).

A análise estatística dos parâmetros físicos e químicos dos frutos e do suco dos frutos, respectivamente foi realizada com uso do modelo em delineamento de blocos ao acaso, sendo cada tempo de coleta (270, 300 e 330 DAF) considerado como um bloco estatístico e as diferenças entre blocos indicam variação no comportamento geral das variedades em relação à data de coleta.

Os tratamentos avaliados foram às amostras de cada variedade coletadas em cada local, sendo compostas por duas repetições de cada tratamento (dois dados médios de 10 frutos). A análise estatística realizada foi a análise de variância (ANOVA) com uso do teste F, seguido pelo teste de Tukey a 5%, utilizando o programa SASM-Agri (Sistema para Análise e Separação de Médias em experimentos Agrícolas).

4.3 Quantificação dos metabólitos da via de biossíntese de carotenóides

As análises de quantificação de alguns carotenóides em suco de frutos foram conduzidas nos laboratórios do Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho" (UNESP/Araraquara).

As amostras coletadas nos diversos pomares e utilizadas nestes experimentos foram compostas por 15 frutos por tratamento (variedade e local diferentes). Estas amostras foram então subdivididas em *pools* de 5 frutos, considerando assim três repetições biológicas para as análises de quantificação de carotenóides.

4.3.1 Extração do suco e quantificação de carotenóides totais

O suco dos frutos de cada amostra foi extraído em extratora manual e em seguida, homogeneizado.

Foi realizada a metodologia de extração dos carotenóides com acetona fria a 4 ºC, os pigmentos foram transferidos para éter de petróleo, saponificado com hidróxido de potássio (KOH) metanólico por 16 horas. O uso da técnica de saponificação é importante para promover a hidrólise de carotenóides hidroxilados (xantofilas), que se encontravam parcial ou totalmente esterificado. Os carotenóides foram transferidos da acetona para o éter etílico, usando um funil de separação. O extrato foi diluído com éter de petróleo e a leitura da absorbância da solução foi realizada a 450 nm. O teor de carotenóides totais foi expresso em termos de β-caroteno, aplicando-se a Lei de Beer (RODRIGUES-AMAYA, 1999).

4.3.2 Quantificação dos carotenóides por cromatografia líquida de alta eficiência

Em seguida, foi realizada a quantificação dos pigmentos de carotenóides por cromatografia líquida de alta eficiência CLAE, usando gradiente ternário de eluição e uma coluna Symmetry C_{18} (4.6 x 150 mm I.D., 3.5 μm) da Waters. O sistema cromatográfico era

equipado com detector por arranjo de fotodiodos e a fase móvel consistia de acetonitrila: metanol: acetato de etila contendo 0,05% de trietilamina com vazão de 0,6 mL min^{-1}. Um gradiente foi aplicado a partir de 99:1:0 para 64:1:35 em 30 minutos e 99:1:0 em 60 min. O volume da injeção foi de 20 μL. Detecção realizada de 350 a 550 nm. As amostras e as soluções foram filtradas em membrana de 0.22 μm antes da injeção. Os carotenóides isolados individualmente nas amostras foram identificados pela comparação de seu tempo de retenção no CLAE e pelas características dos espectros do arranjo dos padrões e dos valores dos carotenóides na literatura.

4.3.3 Análises estatísticas

A análise estatística dos resultados foi realizada primeiramente com estatística univariada, utilizando-se a análise de variância (ANOVA) com uso do teste F, seguido pelo teste de Tukey 5% pelo programa SASM-Agri.

Em seguida, os dados de quantificação de carotenóides nas amostras de frutos foram analisados utilizando-se a Análise de Componentes Principais (ACP) e representados através de gráficos *biplots* (GOWER et al., 2011). O método ACP *biplot* possibilita determinar como os diferentes carotenóides (variáveis) estão relacionados com as variedades (amostras ou observações). Tipicamente, um gráfico PCA *biplot* é representado por linhas e pontos, sendo que as linhas representam as variáveis e os pontos, as observações. O comprimento das linhas está associado à variância da variável que ela representa, enquanto que o ângulo entre duas linhas representa a correlação entre as variáveis correspondentes. Outra informação importante que pode ser extraída do *biplot* é que valores maiores das variáveis ocorrem para as amostras ou observações para os quais as linhas apontam, ou seja, concentrações maiores de um determinado carotenóide ocorrerão para a variedade para a qual a linha que representa tal carotenoide apontar. Análises foram conduzidas no ambiente computacional R Development Core Team (2010).

4.4 Caracterização molecular dos genes da via de biossíntese de carotenóides

4.4.1 Identificação e caracterização dos genes

Foi realizada a busca das sequências dos genes da via de carotenóides de *Citrus* no banco de dados *Orange Gene Index* (http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=orange), baseando-se na busca por palavra-chave e pelos genes ortólogos de tomate (*Solanum licopersicum*). As sequencias consensos (TC - *tentative consensus*) que apresentaram alta similaridade em relação aos genes de tomate foram analisadas individualmente no *Blast* (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) para confirmar sua identidade. Os TCs de *Citrus* mais completos foram traduzidos no programa *ORF Finder* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html), a partir da identificação do melhor quadro de leitura.

Seguida a identificação e tradução dos melhores TCs de *Citrus*, as sequências completas da proteína foram utilizadas para a análise filogenética. Alinhamentos múltiplos das sequências de aminoácidos dos genes de carotenóides em *Citrus* e tomate foram realizados com o programa ClustalW (http://align.genome.jp/). A árvore filogenética foi obtida utilizando o programa PAUP 4.0b10 (SWOFFORD, 1998), com valores de *bootstrap* indicando a porcentagem em que cada ramo da árvore obteve a formação apresentada (FELSENSTEIN, 1985). A visualização dos fenogramas foram realizadas com o programa TreeView (PAGE, 1996).

4.4.2 Construção de iniciadores específicos dos genes

Depois da classificação, foram desenhados iniciadores (*primers*) dentro da sequência que codificam as proteínas dos genes da via de carotenóides (alvos) de *Citrus* com auxílio do programa *on-line* Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), ajustado com os parâmetros padrão, exceto: tamanho do amplicon variando de 80 a 170 pb; tamanho do primer entre 18 e 22 pb (ótimo a 20 pb); temperatura de anelamento entre 59 e 61 ºC (ótimo a 60 ºC); conteúdo GC% entre 40 e 60% (ótimo a 50%); fator de auto-

complementariedade máxima inicial de 3,0; fator de auto-complementariedade máxima na região 3´ de 0. Dentre os pares de iniciadores obtidos para os gene de interesse, foram selecionados aqueles com melhores características usando o programa *on-line* NetPrimer (http://www.premierbiosoft.com/netprimer) em relação à estabilidade e eventual ocorrência de pareamento indesejável, como a formação de alças (*hairpins*), dímeros do mesmo iniciador (*primer-dimer*) e entre o par de iniciadores (*cross dimer*). Os iniciadores específicos (alvos) sintetizados foram *PSY*, *PDS*, *ZDS*, *CRTISO*, *LCY*ε, *LCY*β, *HY*β e *ZEP* (Tabela 1), estes foram então ressuspendidos na concentração estoque de 100 μM em água ultrapura (Milli-Q) estéril e armazenado a -20 ºC.

Tabela 1 - Descrição dos iniciadores específicos (alvos) de *Citrus* desenhados para análise transcricional dos genes; estão listados com suas respectivas siglas do gene, sequência dos iniciadores, número de acesso (TC nº) e tamanho do amplicon (pb)

Gene	Sequência (5´- 3´)	TC nº	Amplicon (pb)
PSY	F: GGTATGGGCTTCATTGCTGT R: GGGCGTAAGAGGGATTTTG	42	147
PDS	F: TTCCAGTCATCAACATCCACA R: CGGGGCAAAAACTAACTCC	3	167
ZDS	F: GGGCAAGGTTCATTACTCCA R: AAACCTGCTTTGCCACTCTC	2199	97
CRTISO	F: TTGTGCTTGAGGATGACTGG R: CCTCTGGAGCCAAAGATGAA	19375	96
***LCY*ε**	F: TTGATTGGTCGTGCTTATGG R: CCGTAATGCTTTCCACTTTTG	37214	110
***LCY*β**	F: GCTGCGGCTCCTATTGTTG R: CCCTTTGCCTTCTCCTTTCT	5	127
***HY*β**	F: TTTCACGGAGGAGGAGGAG R: GACGGCAGCAACGAGATAAG	8364	115
ZEP	F: CATTTCACAAGGAACCAGCA R: CATTATCACACCAACCCTCAAA	19033	90

4.4.3 Quantificação de transcritos dos genes da via de carotenóides

As análises de quantificação de transcritos dos genes da via de carotenóides foram conduzidas no Laboratório de Melhoramento de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), Piracicaba, SP. As amostras de 15 frutos de cada variedade foram divididas em sub-amostras de 5 frutos, considerando assim três repetições biológicas, para a quantificação dos transcritos dos genes da via de carotenóides no suco dos frutos.

4.4.3.1 Extração de RNA total

Foi realizada a extração do RNA total dos tecidos/órgãos de 'SM' e da polpa dos frutos das laranjas de polpa vermelha ('SM' e 'CC') e clara ('P'), com cerca de 6-8 g das amostras de polpa e 4-5 g para os demais tecidos, de acordo com o método descrito por TAO et al. (2004), com modificações. Para o procedimento de extração do RNA, bem como para as etapas seguintes, foram tomados os devidos cuidados à manutenção da integridade do mesmo. Para tanto, todos os utensílios utilizados foram previamente tratados com água ultrapura (Milli-Q) estéril adicionada de 0,01% dietilpirocarbonato (DEPC) e submetidos à esterilização em autoclave por 40 min a 120 ºC e 1 atm de pressão.

Cada amostra foi macerada em nitrogênio líquido, transferida para um tubo contendo 50 mL de água ultrapura estéril tratada com 0,01 % DEPC e 30 mL de etanol absoluto, bem homogeneizada e centrifugada a 4.000 *g* por 5 min a 4 °C. Em seguida o sobrenadante foi descartado, e ao *pellet* foi adicionado a uma mistura de 5 mL de tampão de extração (1 % SDS, 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM LiCl; 20 mM EDTA pH 8,0) e 5 mL de fenol, vortexado por 2 min e centrifugado a 4.000 *g* por 20 min a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo que continha 10 mL de [24:1 (v/v)] clorofórmio:álcool isoamílico, invertido gentilmente por 5 min e centrifugado a 4.000 *g* por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo que continha 1/3 de 8 M LiCl, misturado por inversão e incubado a (-) 20 ºC *overnight*. No dia seguinte, seguiu-se uma centrifugação de 4.000 *g* por 20 min a 4 °C, sendo o sobrenadante descartado cuidadosamente, adicionando-se ao precipitado (*pellet*) 1 mL de 70% etanol gelado preparado com água ultrapura estéril tratada

com 0,01% DEPC e centrifugado a 4.000 *g* por 5 min a 4°C. Este etapa anterior foi seguida mais uma vez, depois o sobrenadante foi descartado e as amostras foram mantidas em temperatura ambiente até a secagem total, e então foram ressuspendidas em 50 µL de água ultrapura estéril tratada com 0,01 % DEPC e mantidas em freezer a -80 ºC até o procedimento das etapas seguintes.

4.4.3.2 Visualização e quantificação de RNA total

Uma alíquota de 2 µL de amostra foi adicionada a 8 µL de tampão desnaturante [20 mM ácido 3-morfolinopropanosulfônico (MOPS) pH 7,0; 50 mM acetato de sódio; 1 mM EDTA; 17,5% formaldeído; 50% formamida; 0,4 mg L^{-1} brometo de etídeo]. A amostra foi previamente aquecida em banho-maria a 55ºC por 10 min e transferida para gelo até ser carregada em gel 1,2% agarose em SB (5 mM borato deca-hidratado de sódio pH 8,0) **[**BRODY; KERN, 2004] preparado com água com 0,01% DEPC a 3 V cm^{-1}. A imagem do gel foi adquirida com câmera digital e processada com o programa Kodak Digital Science 1D (Kodak). Para a determinação da concentração e pureza do RNA total extraído, uma alíquota de 2 µL foi retirada para leitura da densidade óptica no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, EUA) em 260 nm e razão de 260/280 nm, respectivamente.

4.4.3.3 Tratamento com DNAse

Depois da quantificação, cerca de 2 µg do RNA extraído de cada amostra foi submetido a tratamento com a enzima DNAse I. Para tanto, seguiu-se as especificações do fabricante utilizando-se 1 µL de 1 U DNAse I (Fermentas Life Sciences), acrescida de 1 µL de 10 X *Reaction Buffer* with $MgCl_2$ (100 mM Tris-HCl pH7,5; 25 mM $MgCl_2$; 1 mM $CaCl_2$), 0,5 µL de 40 U RNaseOUT (Invitrogen) e água ultrapura estéril tratada com 0,01% DEPC para um volume final da reação de 10 µL. O tubo foi incubado no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) a 37ºC por 30 min. Em seguida foi adicionado 1 µL de 25 mM EDTA, incubado 65 ºC por 10 min e seguido a 4 ºC para a inativação da enzima.

4.4.3.4 Síntese de cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando-se 2 μg do RNA tratado com DNAse, seguindo as especificações do kit SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Foi adicionado ao cDNA, 1 μL de 50 μM oligonucleotídeo poli-dT (18 pb) e água ultrapura estéril tratada com 0,01% DEPC para um volume final de 13 μL. O RNA foi desnaturado a 65 ºC por 5 min e resfriado a 4ºC por 1 min. Em seguida, foi adicionado 4 μL de 5 X First-Strand Buffer (250 mM Tris-HCl pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM $MgCl_2$); 1 μL de 0,1 M DTT; 0,5 μL de 40 U RNaseOUT (Invitrogen); 1 μL de 200 U SuperScript III Reverse Transcriptase; e água ultrapura estéril tratada com 0,01% DEPC para um volume final da reação de 20 μL. A reação de transcrição reversa foi realizada no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) nas seguintes condições de termociclagem: 25 ºC por 5 min, 50 ºC por 60 min e 70 ºC por 15 min; depois armazenada a -20 ºC.

4.4.3.5 Análise da identidade dos iniciadores por RT-PCR

Com o objetivo de certificar a identidade de amplificação dos iniciadores dos genes da via de carotenóides (Tabela 1) a serem utilizados nas análises de RT-qPCR, foi conduzida a reação de amplificação no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) visando a purificação, clonagem e sequenciamento do produto obtido dos amplicons. O volume total da PCR foi de 25 μL; adicionando-se 1 μL do RNA tratado com DNAse na diluição 1:10 (v:v) [amostra ‘SM’ CCSM]; 0,5 μL de 10 mM dNTPs; 0,5 μL de 5μM de cada iniciador; 1,5 μL de 25 mM $MgCl_2$; 0,1 μL de 1 U da enzima Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) em tampão apropriado; e água ultrapura estéril. A termociclagem foi conduzida a uma desnaturação inicial de 94 ºC por 4 min; 40 ciclos de 94 ºC por 30 s, 60 ºC por 30 s e 72 ºC por 30 s; e extensão final de 72 ºC a 7 min.

4.4.3.6 Clonagem e transformação gênica

Cerca de 25 μL de cada amostra amplificada foi separado eletroforeticamente em gel de agarose 1,0 % agarose em SB a 3 V cm^{-1}. Após a separação no gel, a banda obtida foi isolada com o auxílio de um bisturi esterilizado para purificação empregando o kit *GFX PCR DNA and gel band purification* (Amersham Biosciences). Verificou-se a integridade do produto purificado, submetendo o mesmo novamente à eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão SB preparado com água com 0,01% DEPC a 3 V cm^{-1}. Após a quantificação, foi realizada a ligação do amplicom purificado em no vetor de clonagem pGEM-T Easy PCR Product Cloning kit (Promega) seguindo as especificações do fabricante. A ligação foi mantida a 8 ºC por 17 h. Após esse período, 2 μL da ligação foram transferidos para um tubo contendo 40 μL células competentes de *E. coli* DH10B. Posteriormente, utilizou-se a técnica de eletroporação das bactérias, utilizando-se um eletroporador modelo micropulser – BioRad e em cubetas de 0,2 μm foi aplicado um pulso de corrente elétrica de 1,8 kV durante 3,4 s. Logo em seguida, foram transferidas para um tubo contendo 1 mL de meio líquido LB e mantidas durante 1 h em agitação constante a 37 ºC. Procedeu-se a uma centrifugação por 5 min a 2.000 *g* para a sedimentação das bactérias e o sobrenadante foi descartado. Um volume de 100 μL de célula foi plaqueado em meio sólido LB contendo 100 μg mL^{-1} de ampicilina; adicionado de 40 μL de 100 mM IPTG (isopropil β-D-thiogalactopiranosidae); e 25 μL de 120 mM X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galacto-piranosideo). As placas foram mantidas a temperatura de 37 ºC por 17 h para promover o crescimento e isolamento de colônias contendo o inserto do fragmento de interesse.

4.4.3.7 Armazenamento dos clones

As colônias brancas isoladas foram transferidas para 5 mL de meio líquido LB com 100 μg mL^{-1} de ampicilina, e mantidas em agitação constante (120 rpm) a 37 ºC por aproximadamente 17 h. Um volume de 500 μL da cultura foi reservado e adicionado, em condições assépticas, o mesmo volume de 50% glicerol estéril. Após homogeneização, o tubo foi imerso em nitrogênio líquido e armazenado a -80 ºC.

4.4.3.8 Extração de DNA plasmidial

Do volume remanescente da cultura líquida estocada foram transferidos 2,0 mL para um novo tubo e centrifugado a 12.000 *g* por 1 min para a realização do protoloco de lise alcalina (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Descartado o sobrenadante, o procedimento foi repetido mais uma vez, usando-se o mesmo tubo para aumentar o rendimento da minipreparação. Em seguida, o precipitado de células de cada tubo foi totalmente resuspenso em 200 μL de solução I (50 mM glicose; 25 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA) com forte agitação e incubando à temperatura ambiente por 10 min. Em seguida, foi adicionado 200 μL de solução II [0,2 M NaOH; 1,0 % SDS], misturado por inversão e incubado à temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, foram acrescentados 200 μL de solução III (3 M acetato de potássio pH 5,5), misturado por inversão e incubado no gelo por 5 min. Depois de centrifugado por 10 min o sobrenadante foi transferido para tubo novo, ao qual foram adicionados 500 μL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) gelado e novamente misturado por inversão. Com nova centrifugação por 5 min, a fase superior foi transferida para outro tubo e acrescida a ela 500 μL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), com mistura e centrifugação por 1 min. A nova fase superior foi coletada em novo tubo e adicionada a ela 1 mL de etanol absoluto gelado e o material foi mantido a -20 ºC por 30 min, seguindo de centrifugação por 5 min. O líquido sobrenadante foi descartado e nova lavagem do precipitado foi feita com 500 μL de 70 % etanol com mais uma centrifugação como a descrita anteriormente. O tubo foi mantido à temperatura ambiente até que as amostras secassem. Posteriormente, as amostras foram resuspendidas em 50 μL de TE com 50 mg mL^{-1} ribonuclease A (RNase A) e incubadas a 37 ºC por 15 min.

Para a verificação do DNA plasmidial foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 0,8 % em tampão SB a 3 V cm^{-1}. Após a confirmação da integridade do DNA plasmidial por eletroforese, a identidade das sequências dos genes da via de carotenóides (amplicom) clonadas no vetor foram confirmadas por sequenciamento.

4.4.3.9 Sequenciamento e análise dos resultados

Amostras de DNA plasmidial (sequências dos genes da via de carotenóides) foram amplificadas no termociclador GeneAmp PCR System 9700 em reações de 10 μL contendo 100-150 ng de DNA plasmidial; 3 μL de 2,5X tampão *Save Money* (200 mM Tris-HCl, pH 9.0; 5 mM $MgCl_2.6H_2O$); 1 μL do kit *DYEnamic*^{TM} *ET Terminator Cycle Sequencing* (Amersham Biosciences); 0,25 μM do iniciador universal (T7 ou SP6); e água ultrapura estéril. A reação de sequenciamento foi estabelecida com o seguinte perfil: 30 ciclos de 20 s a 95 ºC; 15 s a 50 ºC; 1 min a 60 ºC, finalizando com 10 min a 4 ºC. Os produtos amplificados foram precipitados com 60 μL de 100 % etanol e 2 μL de 3 M acetato de sódio, centrifugados por 45 min a 8.000 *g* a 4 ºC, seguido por lavagem com 150 μL de 70 % etanol, centrifugado novamente por 15 min e a secagem do *pellet* foi realizada a 37ºC por 1 h. O precipitado foi então ressuspenso em 10 μL tampão de sequenciamento (80 % v/v formamida deionizada; 20 % *loading buffer*), para carregamento em sequenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA. USA).

Os cromatogramas gerados foram examinados, para qualidade e presença de vetor com o programa Phred/Phrap/Crossmatch (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998), agrupadas com o Cap3 (HUANG; MADAN, 1999) e as sequências resultantes foram submetidas à busca por similaridade no GenBank (nr) e no *Orange Gene Index* através de *BlastN* e *BlastX* (McGINNIS; MADDEN, 2004) para identificação de eventuais anotações presumíveis.

4.4.3.10 Amplificação dos cDNAs e DNA genômico com os iniciadores dos genes

Como o objetivo de observar a presença de íntron nas sequências genômicas de *Citrus*, foi realizado reação de amplificação com 1 μL do cDNA 1:10 (v:v) [amostras de ‘P’, ‘SM’ e ‘CC’]; 100 ng DNA genômico (‘P’) e água ultrapura estéril (utilizada como controle negativo). O volume total da PCR foi de 25 μL adicionando-se 0,5 μL de 10 mM de dNTP; 1,5 μL de 25 mM $MgCl_2$; 0,5 μL de 5 μM de cada iniciador (Tabela 1); 1 U de Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) em tampão apropriado; e água ultrapura estéril. A

termociclagem foi conduzida com uma desnaturação inicial de 94 ºC por 4 min; seguido de 45 ciclos de 94 ºC por 30 s, 60 ºC por 30 s e 72 ºC por 30 s; e finalizando com uma extensão final de 72 ºC por 3 min. Foi utilizado 25 μL do produto da PCR fracionados por eletroforese em gel de agarose 1,4 % em tampão SB a 3 V cm^{-1}.

4.4.3.11 Análise da expressão gênica por RT-PCR quantitativo

As reações de PCR quantitativo em Tempo Real foram conduzidas empregando SYBR Green® (Molecular Beacons) no sistema RotorGene-3000 (Corbett Research). A reação de amplificação foi realizada num volume final de 10 μL, contendo 1 μL do cDNA diluído (v/v); 0,5 μL de 5 μM de cada iniciador; 5 μl de *2X Platinum SYBR-green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen); e água ultrapura (Milli-Q) estéril. O perfil da reação foi estabelecido com duas etapas constantes de: 50 °C por 2 min e 95 °C for 2 min; seguido de 40 ciclos de 95 °C por 20 s, 60 °C for 30 s. Um protocolo de dissociação foi adicionado ao final da termociclagem, ajustado de 72 ºC a 95 °C (curva de *melting*), determinando a curva de dissociação dos produtos da PCR.

Todos os ensaios de RT-qPCR incluíram amostras em triplicatas (10^{-1}); controle negativo (água ultrapura estéril) em duplicata o estabelecimento de curva padrão composta de triplicatas das diluições seriais (10^{-1}, 10^{-2} e 10^{-3}). Foram realizados dois ensaios para quantificar o nível de transcritos dos genes da via de biossíntese de carotenóides de *Citrus* em relação aos genes de referências (*housekeeping gene*). No primeiro ensaio foi utilizado cDNA de tecidos/órgãos da variedade 'SM' (polpa, semente, caule, casca, raiz, folha e flor). Para a determinação da curva padrão foi utilizado diluições seriais do tecido/órgão polpa. No segundo ensaio foi utilizado cDNA o tecido/órgão polpa das variedades 'P', 'SM' e 'CC' nos diferentes locais (CCSM, MM e SBS), nos tempos de coleta de 270, 300 e 330 DAF. Para a determinação da curva padrão foi utilizado diluições seriais do cDNA da variedade 'P' do local CCSM.

Como genes de referência foram utilizados os genes Actin (*ACT*), Elongation Factor 1-Alpha (*EF*), Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (*GAPDH*), Translation Initiation Factor (*IF3*), Translation Initiation Factor 5A (*IF5A*), Malate Dehydrogenase (*MDH*),

Phosphatase (*PHS*), PSI Reaction Center Subunit III (*PSI*), Ribossomal Protein L35 (*rpl35*), β-Tubulin (*TUB*) e Ubiquitin extension Protein (*UbiQ*), mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Descrição dos iniciadores de referência desenhados para análise transcricional dos genes de *Citrus*; estão listados com suas respectivas siglas do gene, sequência dos iniciadores, número de acesso (TC nº) e tamanho do amplicon (pb)

Gene	Sequência (5´- 3´)	TC nº	Amplicon (pb)
ACT	F: CCGAGCGTGGTTATTCTTTC R: CTGAGCTGGTCTTTGCTGTCT	219	123
EF	F: CCACATTGCTGTCAAGTTTTCT R: CCATTCGGCATTTCCATTT	877	106
GAPDH	F: TGACCACTGTCCATTCCATC R: GCAGGCAAAACCTTACCAAC	6953	145
IF3	F: CAAGACGCTGATTGTCCTCTC R: CTGAATTGCTTGCTCAAAACC	2703	121
IF5A	F: ACTGAAACCGGAAACACCAA R: TTTCCTTCAGCAAACCCATC	17010	89
MDH	F: TCTCCATCCACCAACTCTCC R: GCTCCCAATACAGCCACCT	623	108
PHS	F: CCTCTTTGGAGTTTTTGATGGT R: TCCGAGTCTGTGTGGCTGT	1013	147
PSI	F: GCATTGGATGAGATCGAAGAA R: CACATTCCTGGCACACAAAG	9462	96
Rpl35	F: GAAGGCGGCTTTGAGAGAA R: ATGCCTGATGCTTGGTGAG	12848	107
TUB	F: TTTGTGACATCCCTCCGACT R: TCACCCTCCTGAACATTTCC	3994	111
UBQ	F: GACCCTCGCCGACTACAAT R: TCTGAACTTTCCACCTCCAAA	5210	129

A aquisição dos dados em tempo real foi efetuada com o programa RotorGene Real-Time Analysis 6.0 (Corbett Research, Austrália), o qual forneceu os valores de ciclo-limite de leitura (C_T, ou *cycle threshold*), eficiência da PCR (E) e R^2 associada.

4.4.3.12 Delineamento experimental e estabilidade gênica

No primeiro ensaio, o nível de transcritos foi avaliado em triplicatas de cada amostra dos sete tecidos/órgãos para cada um dos 19 pares de iniciadores dos genes (8 alvos e 11 referências) e designada com os seguintes símbolos: polpa (*Po*), semente (*Se*), caule, (*Cl*), casca (*Ca*), raiz (*Ra*), folha (*Fo*) e flor (*Fl*). No segundo ensaio, o nível de transcritos foi avaliado em triplicatas de cada amostra das três variedades (controle + 2 pigmentadas) nos diferentes locais e estádios de maturação para um dos 19 pares de iniciadores (alvos e referências).

A análise da curva padrão da diluição serial de amostras de cDNA serviu como referencial para calcular as concentrações de transcritos com base em um modelo de regressão linear, valores logarítmicos das concentrações e com o *threshold*, ou seja, o limite de detecção de estabelecido em 10 % da fluorescência. Esses valores de concentrações serviram para calcular as variações e a estabilidade de expressão gênica, e assim avaliar os candidatos a genes de referência. O coeficiente R^2 resultante foi considerado como ideal com valores de R^2 acima de 0,98; o valor de M (inclinação da reta) entre -3 e -4 foi considerado aceitável, sendo seu ótimo em torno de 3,6. A eficiência ideal deve ter valor igual a 1, o que corresponde a uma eficiência de amplificação = 2 (dobrando a cada ciclo), ou seja, 100 %, no entanto, foi considerado satisfatório valores entre 90 e 110 %.

Com o auxílio dos programas *GeNorm* e *NormFinder* disponível em http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/ e http://www.multid.se/genex/hs410.htm, respectivamente; os genes de referências ideais para os ensaios foram estabelecidos (PFAFFL, 2001; PFAFFL et al., 2004). Para a normalização de cada uma das amostras analisadas, calculou-se a variação quantitativa de expressão dos genes da via de carotenóides (alvo) de forma relativa aos genes de referências com o auxílio do programa *Relative Expression* Software Tool (REST-2009), disponível em http://www.gene-quantification.com/rest.html (PFAFFL, 2001; PFAFFL; HORGAN; DEMPFLE, 2002; VANDESOMPELE et al., 2002) disponível em http://www.gene-quantification.com/rest.html. A utilização deste programa permitiu quantificar relativamente o nível de transcritos dos genes alvos em relação aos genes de referências.

4.4.4 Identificação de mutações pontuais em regiões das sequências dos genes que codificam as proteínas da via de carotenóides

Com objetivo de identificar mutações pontuais (*Single-Nucleotide Polymorphism - SNP*) em regiões das sequências que representam os genes da via de carotenóides entre a variedade controle 'P' e a pigmentada 'SM', essas regiões foram amplificadas, clonadas e sequenciadas. Para a amplificação das sequências (busca baseada no banco de dados de ESTs em laranja doce) foi utilizado como molde, cDNAs do tecido das variedades 'P' e a 'SM', cultivada no mesmo local (CCSM). Abaixo foram descritas as etapas seguintes a extração de RNA total e síntese de cDNA.

4.4.4.1 Amplificação dos cDNAs com os iniciadores dos genes

Foi conduzida a reação de amplificação no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) visando a purificação, clonagem e sequenciamento do produto obtido dos amplicons. O volume total da PCR foi de 25 μL; adicionando-se 1 μL do cDNA na diluição 1:10 (v:v) das variedades ('P' e 'SM); 2,0 μL de 10 mM de dNTPs; 1 μL de 5 μM de cada par de iniciador específico externo (Tabela 3); 1 μL de 1 U da enzima High Fidelity PCR Enzyme Mix (Fermentas) em tampão 2,5 μL de 10 X High Fidelity PCR *buffer* with 15 mM de $MgCl_2$; e água ultrapura estéril. A termociclagem foi conduzida de acordo com as especificações de amplificação de cada par de genes da via de carotenóides (Apêndice A). Antes de iniciar a extensão final de cada termociclagem, a reação foi interrompida, adicionada em cada amostra 1μL de 10 mM de dATP e 1 μL de 1U da enzima *Taq* DNA polimerase recombinante (Fermentas) e assim a reação foi finalizada.

Tabela 3 - Descrição dos iniciadores específicos externos desenhados para amplificar as sequências dos genes de *Citrus* que codificam as proteínas; estão listados com suas respectivas siglas do gene, sequência dos iniciadores, número de acesso (TC nº) e tamanho do amplicon (pb)

Gene	Sequência (5´- 3´)	TC nº	Amplicon (pb)
PSY	F: ATGTCTGTTACATTGCTGTG R: TTAAGCCTTACTGGTATA	42	1311
PDS	F: ATGAGCCTTTGCTTCAGCG R: TTATGGACACATGCTTGCCTC	3	1662
ZDS	F: ATGGGTTCTTCAGTTCTGTTTC R: TCACACAAGACTTAGTTCATCG	2199	1713
CRTISO	F: ATGGGTGTTAAAGCTGAGGTTCTG R: TCATGCCATACTCCTTAACCAAGC	19375	603
LCYε	F: ATGGACATGTTTATACTACC R: CTATAAAGTCAGGTATGTTC	37214	110
LCYβ	F: ATGCTCCCATTTCTCTC R: TTAATCTGTATCTTGTACCA	5	1575
HYβ	F: ATGGCGGTCGGACTATTG R: TTATTTTGGAACCCTGTTGTAT	8364	936
ZEP	F: ATGGTTTCATCTATGTTCTAC R: TTACACTGCCTGAAGAAT	19099	1995

4.4.4.2 Clonagem e transformação gênica

Cerca de 25 μL de cada amostra amplificada foi separada por eletroforese em gel de agarose 1,0 % agarose em SB a 3 V cm^{-1}. Após a separação no gel, a banda obtida foi isolada com o auxílio de um bisturi esterilizado para purificação empregando o kit *GFX PCR DNA and gel band purification* (Amersham Biosciences). Verificou-se a integridade do produto purificado, submetendo o mesmo novamente à eletroforese em gel de agarose 1,2 % em tampão SB preparado com água com 0,01% DEPC a 3 V cm^{-1}. Após a quantificação, foi realizada a ligação do amplicom purificado em no vetor de clonagem pGEM-T Easy PCR Product Cloning kit (Promega) seguindo as especificações do fabricante. A ligação foi mantida a 4 ºC por 17 h. Após esse período, 2 μL da ligação foram transferidos para um tubo contendo 40 μL células competentes de *E. coli* DH10B. Posteriormente, utilizou-se a técnica de eletroporação das bactérias, utilizando-se um eletroporador modelo micropulser – BioRad e em cubetas de 0,2 μm foi aplicado um pulso de corrente elétrica de 1,8 kV durante 3,4 s.

Logo em seguida, foram transferidas para um tubo contendo 1 mL de meio líquido LB e mantidas durante 1 h em agitação constante a 37 ºC. Procedeu-se a uma centrifugação por 5 min a 2.000 *g* para a sedimentação das bactérias e o sobrenadante foi descartado. Um volume de 100 μL de célula foi plaqueado em meio sólido LB contendo 100 μg mL^{-1} de ampicilina; adicionado de 40 μL de 100 mM IPTG; e 25 μL de 120 mM X-gal. As placas foram mantidas a temperatura de 37 ºC por 17 h para promover o crescimento e isolamento de colônias contendo o inserto do fragmento de interesse. Foram isoladas oito colônias de cada variedade ('P' e 'SM') por gene da via de carotenóide. As colônias brancas isoladas de cada placa foram transferidas para 5 mL de meio líquido LB com 100 μg mL^{-1} de ampicilina, e mantidas em agitação constante a 37 ºC durante aproximadamente 17 h.

4.4.4.3 Armazenamento dos clones

As colônias brancas isoladas foram transferidas para 5 mL de meio líquido LB com 100 μg mL^{-1} de ampicilina, e mantidas em agitação constante (120 rpm) a 37 ºC por aproximadamente 17 h. Um volume de 500 μL da cultura foi reservado e adicionado, em condições assépticas, o mesmo volume de 50 % glicerol autoclavado. Após homogeneização, o tubo foi imerso em nitrogênio líquido e armazenado a -80 ºC.

4.4.4.4 Extração de DNA plasmidial

Do volume remanescente da cultura líquida estocada foram transferidos 2,0 mL para um novo tubo e centrifugado a 12.000 *g* por 1 min. Descartado o sobrenadante, o procedimento foi repetido mais uma vez, usando-se o mesmo tubo para aumentar o rendimento da minipreparação. Em seguida, o precipitado de células de cada tubo foi totalmente resuspendido em 200 μL de solução I (50 mM glicose; 25 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA) com forte agitação e incubado à temperatura ambiente por 10 min. Em seguida, adicionado 200 μL de solução II (0,2 M NaOH; 1,0 % SDS), com mistura por inversão e incubado à temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, foram acrescentados

200 μL de solução III (3 M acetato de potássio pH 5,5), misturado por inversão e incubando no gelo por 5 min. Foi centrifugado por 10 min o sobrenadante e transferido para tubo novo, ao qual foram adicionados 500 μL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) gelado e misturado por inversão. Com nova centrifugação por 5 min, a fase superior foi transferida para outro tubo e acrescida a ela 500 μL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), com mistura e centrifugada por 1 min. A nova fase superior foi coletada em novo tubo e adicionado a ela 1 mL de etanol absoluto gelado e o material foi mantido a -20 ºC por 30 min, em seguida centrifugado por 5 min. O líquido sobrenadante foi descartado e nova lavagem do precipitado foi feita com 500 μL de 70 % etanol com mais uma centrifugação como a anterior. O tubo foi mantido à temperatura ambiente até que as amostras secassem. Posteriormente, as amostras foram resuspendidas em 30 μL de TE com 50 mg mL^{-1} ribonuclease A (RNase A) e incubadas a 37 ºC por 15 min.

Para a verificação do DNA plasmidial foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 0,8 % em tampão SB a 3 V cm^{-1}. Após a confirmação da integridade do DNA plasmidial por eletroforese, a identidade das sequencias da via de carotenóides (amplicom) clonadas no vetor foram confirmadas por sequenciamento.

4.4.4.5 Sequenciamento

Cada amostra de DNA plasmidial foi amplificada no termociclador GeneAmp PCR System 9700 em reações de 10 μl contendo 100-150 ng DNA plasmidial (variedade/gene); 3 μL de 2,5 X tampão *Save Money* (200 mM Tris-HCl, pH 9.0; 5 mM $MgCl_2.6H_2O$); 1 μL do kit *DYEnamic*^{TM} *ET Terminator Cycle Sequencing* (Amersham Biosciences); 0,5 μL de 5 μM do iniciador universal (T7 ou SP6) ou 0,5 μL de 5 μM do iniciador específico interno (Tabela 4); e água ultrapura estéril. A reação de sequenciamento foi estabelecida com o seguinte perfil: 30 ciclos de 20 s a 95 ºC; 15 s a 50 ºC; 1 min a 60 ºC, finalizando com 10 min a 4 ºC. Os produtos amplificados foram precipitados com 60 μL de 100 % etanol e 2 μL de 3 M acetato de sódio, centrifugados por 45 min a 8.000 *g* a 4 ºC, seguido por lavagem com 150 μL de 70 % etanol, centrifugado novamente por 15 min e a secagem do *pellet* foi realizada a 37 ºC por 1 h. O precipitado foi então ressuspenso em 10 μL

tampão de sequenciamento (80 % v/v formamida deionizada; 20 % *loading buffer*), para carregamento em sequenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA. USA).

Tabela 4 - Descrição dos iniciadores específicos internos desenhados para amplificar as sequências completas dos genes de *Citrus* que codificam as proteínas; estão listados com suas respectivas siglas do gene, sequência dos iniciadores, número de acesso (TC nº) e tamanho do amplicon (pb)

Gene	Sequência (5´- 3´)	TC nº	Amplicon (pb)
PSY*	F: ACCAAGTGGGGTTACTCGTG R: GGCATCCTCTCCAACATCTC	42	595
PDS*	F: CATATTTTCTTCGGGGCTTACC R: CATGGATTGATTGGGGTTGT	3	873
ZDS*	F: GCACGTTTTCTTTGGATGCT R: TGAACCTTGCCCTTCTCTGT	2199	955
CRTISO*	-	19375	-
LCYε*	F: TTGATTGGTCGTGCTTATGG R: CCACTTGGGTAATCGGAAGA	37214	888
LCYβ*	F: TTATGGTGTTTGGGTGGATG R: TTTGAGGAAGCACTGGAAGG	5	680
HYβ*	-	8364	-
ZEP*	F: TGGTTTGGTTGATGGGATTT R: CTTGCAACACGGTGACCTAC	19099	1042

4.4.4.6 Análise dos resultados de sequenciamento

Os cromatogramas gerados foram examinados, para qualidade e presença de vetor com o programa Phred/Phrap/Crossmatch (EWING; GREEN, 1998; EWING ET AL., 1998), agrupadas com o Cap3 (HUANG; MADAN, 1999) e as sequências resultantes foram submetidas à busca por similaridade no GenBank (nr) e no *Orange Gene Index* através de *BlastN* e *BlastX* (McGINNIS; MADDEN, 2004) para identificação de eventuais anotações presumíveis.

A sequência consenso de nucleotídeo obtida pelo Cap3 para cada variedade (‘P’ ou ‘SM’) por gene foi alinhada entre si através do *bl2seq*, disponível em http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi. Em seguida, esta sequência foi traduzida no programa *ORF Finder* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html) e novamente alinhada para identificar possíveis mutações pontuais (substituição, adição ou deleção) de base entre a sequência da variedade ‘P’ e a pigmentada ‘SM’, para cada gene da via de biossíntese de carotenóides.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises físico-química dos frutos e do suco dos frutos de laranja

As análises estatísticas realizadas com alguns parâmetros físicos e químicos de frutos de laranjeiras de polpa vermelha Bahia Cara-Cara (‘CC’), Sanguínea-de-Mombuca (‘SM’) e de polpa clara Pêra (‘P’ - controle) demonstraram que somente houve efeito significativo no fator tempo, para o parâmetro rendimento de suco (Tabela 5).

Tabela 5 - Médias dos parâmetros físicos de frutos e de suco de frutos de laranjas de polpa vermelha e da laranja Pêra (polpa clara), em três tempos de coleta

Variedade Local	**Massa (g)**	**Altura (cm)**	**Largura (cm)**	**Relação A/L**	**Rend. suco (%)**	**Vitamina C (mg mL^{-1})**
‘P’ CCSM	114,3 bc	6,7 a	6,2 b	1,0	56,3	58,4 c
‘CC’ CCSM	156,1 a	6,8 a	6,8 a	1,0	47,7	64,8 bc
‘SM’ CCSM	124,0 ab	6,5 ab	6,4 ab	1,0	58,9	65,1 bc
‘SM’ MM	86,2 c	5,9 b	5,7 c	1,0	58,8	75,3 ab
‘SM’ SBS	109,3 bc	6,5 ab	6,2 b	1,0	58,4	82,6 a
Valor F Tempo	4,10 ns	1,2 ns	2,6 ns	1,7 ns	15,6 **	0,5 ns
Valor F Variedade	14,9 **	6,1 *	21,4 **	2,7 ns	3,5 ns	9,1 **
CV (%)	9,7	3,9	2,3	2,2	7,7	7,9

* e ** Significativos ao nível de probabilidade de 5% e 1% respectivamente, pelo teste F.
Médias seguidas de letras distintas na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Esta observação de não haver diferenças entre as amostras de frutos e sucos de frutos de diversas variedades, coletados nos três tempos, para os parâmetros: massa, altura e largura dos frutos pode ser creditada ao fato de que todos os frutos coletados no presente estudo possivelmente se encontravam na fase 3 de desenvolvimento (Tabela 5).

A razão para tal fato pode ser observada na revisão de Tadeo et al. (2008) que cita que os frutos cítricos apresentam três fases distintas de desenvolvimento, desde o seu início (final do florescimento) até o amadurecimento. Segundo os autores, um grande incremento no

tamanho e na massa dos frutos cítricos ocorre durante a fase 2 do desenvolvimento (entre 120 e 180 DAF), devido principalmente ao crescimento celular e ao acúmulo de água, sendo que na fase 3 do desenvolvimento, o crescimento dos frutos cítricos é praticamente paralisado e os frutos seguem para o amadurecimento do tipo não climatério. Segundo os mesmos autores, é na fase 3 do desenvolvimento (depois de 180 DAF) que ocorrem mudanças anatômicas e fisiológicas tais como: conversão e acúmulo de carboidratos solúveis na polpa e no suco, redução da acidez do suco, degradação de clorofila no flavedo, acúmulo de carotenóides nos cromoplastos e amolecimento da polpa.

Sendo assim, conclui-se que os frutos coletados no presente estudo se encontravam todos na fase 3 do desenvolvimento, em que não se observa mais crescimento em tamanho e nem incremento de massa. No entanto, o amolecimento dos frutos possivelmente foi o responsável pelo o aumento no rendimento de suco, em função do avanço das três coletas realizadas (Tabela 5).

Para o fator variedade, pôde-se observar que, a excessão dos parâmetros rendimento de suco e relação altura/largura (A/L), em todos os demais se observou a existência de diferenças entre as médias dos tratamentos (F significativo para fator variedade). Comparando-se os frutos das variedades Pêra (‘P’), Sanguínea-de-Mombuca (‘SM’) e Bahia Cara-Cara (‘CC’) coletados no mesmo local, Cordeirópolis (CCSM), pôde-se observar que os frutos da laranja ‘CC’ apresentaram maiores massa e largura, quando comparados com as demais variedades (Figura 9, Tabela 5). Resultados já esperados, pois há relatos de que as laranjas de umbigo, caso da laranja Bahia Cara-Cara, geralmente produzem frutos maiores e mais pesados, com valores de massa próximos ou acima de 200 gramas (SYVERTSEN; GOÑI; OTERO, 2003) e de altura e largura de frutos, próximos de 7 cm (HARE et al., 1992). Já a massa e tamanho de frutos das laranjas ‘SM’ e ‘P’ foram menores e mais próximos.

A comparação entre os frutos de mesma variedade (‘SM’) quando coletados em diferentes locais (CCSM, SBS e MM) demonstrou que, as amostras coletadas em Mogi-Mirim (MM) sempre apresentaram frutos contendo menores massa, altura e largura (Figura 10, Tabela 5). Uma possível explicação para este fato foi que este pomar é conduzido de forma comercial e visando produzir frutos para o processamento industrial e, portanto, tenta maximizar a produção total por talhão. Sendo assim, durante as coletas verificou-se que as plantas apresentavam cargas muito maiores de frutos do que nos pomares experimentais de Cordeirópolis (CCSM) e de São Bento de Sapucaí (SBS), o que pode ter resultado na

produção de frutos com menor tamanho. Já é reconhecido que em plantas cítricas há uma relação inversamente proporcional entre a carga elevada (produção) de frutos por planta e o tamanho de cada fruto.

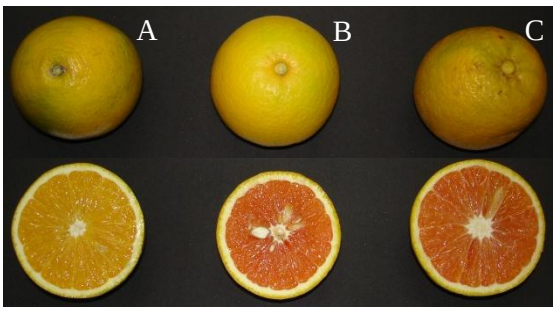

Figura 9 - Frutos das variedades ‘P’ (A), ‘SM’ (B) e ‘CC’ (C) coletados no mesmo local CCSM a 330 DAF

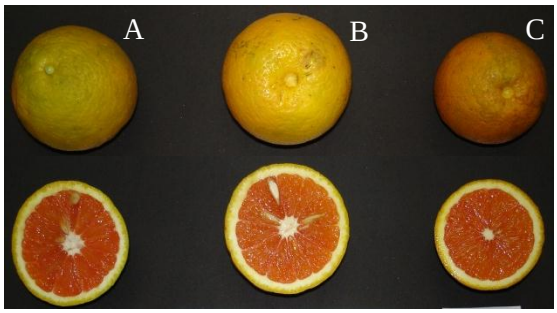

Figura 10 - Frutos da variedade ‘SM’ coletados nos locais SBS (A), CCSM (B) e MM (C) a 330 DAF

Já o parâmetro relação altura/largura dos frutos dos diversos tratamentos, diferentes variedades e coletadas em mais de um local, não era esperada a observação de diferenças para os fatores: variedade e tempo. Isto porque esta característica é inerente à variedade e geralmente sofre baixa influência ambiental. Desta forma, todas as variedades apresentaram frutos com formato esféricos, com valor médio igual a 1,0 (Tabela 5).

A variedade ‘SM’, nos três locais CCSM, MM e SBS, apresentou frutos com rendimento de suco bem semelhante (entre 58,4 a 58,9%) e próximo do rendimento dos frutos da variedade controle (56,3%). Com isto considerou-se que os frutos da variedade Sanguínea-de-Mombuca (‘SM’) também são adequados para o processamento industrial, tal como os frutos da laranja controle ‘P’ (Tabela 5).

O teor de vitamina C presente no suco de frutos da variedade ‘SM’ variou entre locais, com médias entre 65,1 a 82,6 mg mL, sendo maior nos frutos coletados na região de clima mais frio (SBS), seguido dos frutos de Mogi-Mirim (MM) e de Cordeirópolis (CCSM).

Os resultados obtidos com as análises dos parâmetros químicos dos sucos dos frutos de diversas variedades (‘P’, ‘SM’ e ‘CC’), quando coletados no mesmo local (CCSM), demonstraram que a laranja de polpa vermelha ‘CC’ possivelmente possui frutos com o período de maturação mais precoce que as demais. Isto porque já na primeira coleta (a 270 DAF) ela já apresentava suco com alto teor de SST, de 12,1 ºBrix, e acidez média, próxima de 0,9 % (Figuras 11 e 12). Além disto, durante as outras duas coletas posteriores (300 e 330 DAF) o suco quase não apresentou elevação nos teores de SST e nem redução na acidez, como seriam esperados para frutos em fase de maturação.

Os frutos da variedade de polpa vermelha ‘SM’ apresentaram um acúmulo moderado SST no suco durante as três coletas e a redução da acidez, o que resultou na elevação do *ratio* do suco para o valor de 18,7 (Figuras 11, 12 e 13) na última coleta. Na última coleta (330 DAF), os frutos da laranja controle de polpa clara ‘P’ podiam ser considerados como maduros por apresentarem suco com teores de SST acima de 12,0 ºBrix, acidez próxima de 1,3 e *ratio* próximo de 9,7; valores próximos aos citados por Blumer, Pompeu Junior e Garcia (2003); Domingues et al. (2004) para experimentos realizados com esta variedade em Cordeirópolis (CCSM).

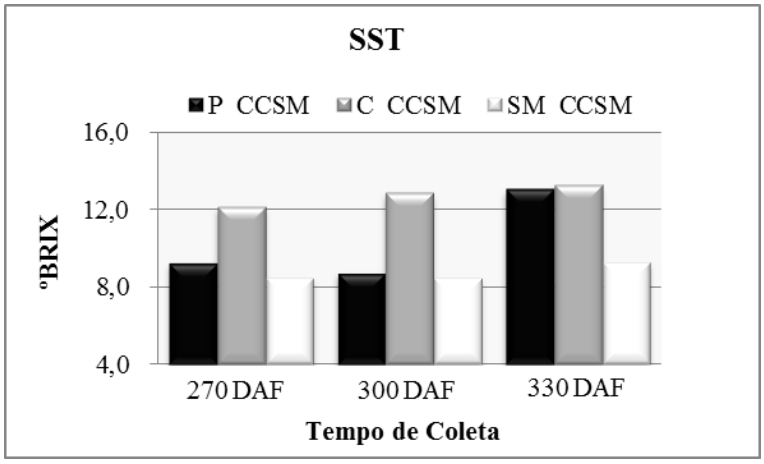

Figura 11 - Teores médios de SST (ºBRIX) do suco dos frutos das duas variedades de polpa vermelha (‘CC’ e ‘SM’) e da variedade de polpa clara Pêra (‘P’), coletados em Cordeirópolis (CCSM) e em três tempos de coleta (270, 300 e 330 DAF).

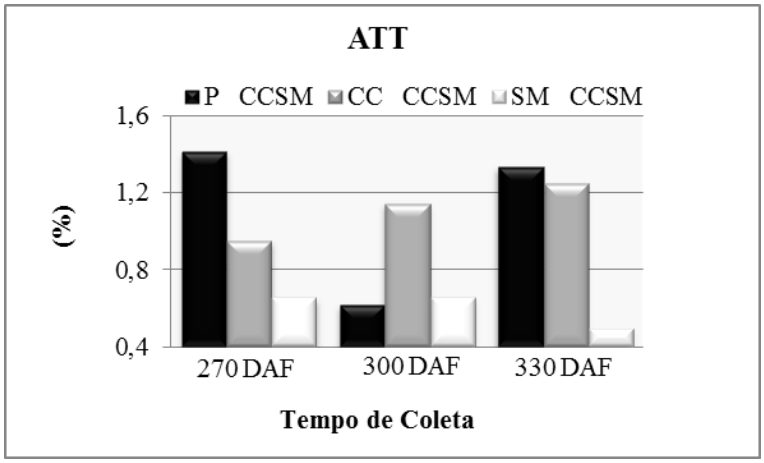

Figura 12 - Teores médios de ATT (%) do suco dos frutos das duas variedades de polpa vermelha (‘CC’ e ‘SM’) e da variedade de polpa clara Pêra (‘P’), coletados em Cordeirópolis (CCSM) e em três tempos de coleta (270, 300 e 330 DAF).

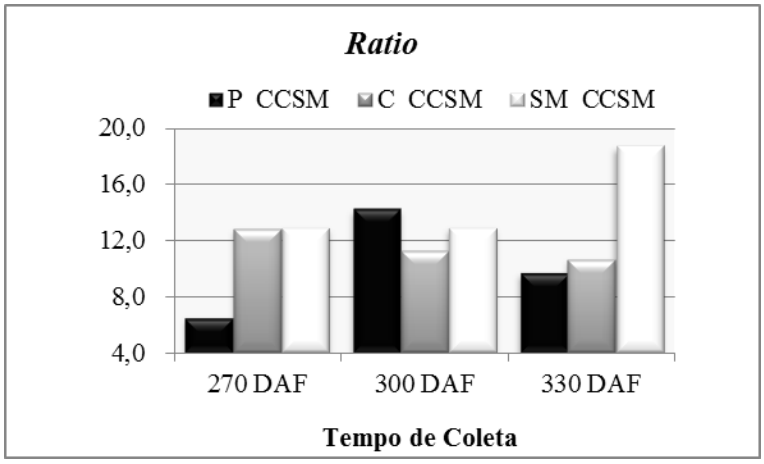

Figura 13 - Teor de *ratio* do suco dos frutos das duas variedades de polpa vermelha (‘CC’ e ‘SM’) e da variedade de polpa clara Pêra (‘P’), coletados em Cordeirópolis (CCSM) e em três tempos de coleta (270, 300 e 330 DAF).

As análises de parâmetros químicos realizadas com os frutos da laranja de polpa vermelha ‘SM’ coletados em três locais, Cordeirópolis (CCSM), São Bento do Sapucaí (SBS) e Mogi-Mirim (MM) demonstraram haver pouca variação entre as amostras (Figuras 14, 15 e 16), como seria esperado, por se tratar da avaliação de uma mesma variedade, com a utilização do mesmo porta-enxerto e em três locais cujos climas não muito contrastantes, com a exceção de São Bento de Sapucaí (SBS), que é mais frio (clima Cwb).

Sendo assim, pode se observar nas amostras coletadas nos três locais o incremento gradual dos teores de SST e a redução da acidez titulável, também gradual, nos sucos dos frutos ao longo das três coletas, o que resultou no aumento mais intenso no *ratio*, com valores

finais próximos de 19,0 (Figura 16). Os únicos dados inesperados foram obtidos com as amostras coletadas em SBS que por apresentar clima mais frio, deveria apresentar frutos com suco contendo menores teores de SST e maior acidez, em comparação com os coletados nos outros dois locais, no entanto, isto não foi observado (Figuras 14 e 15).

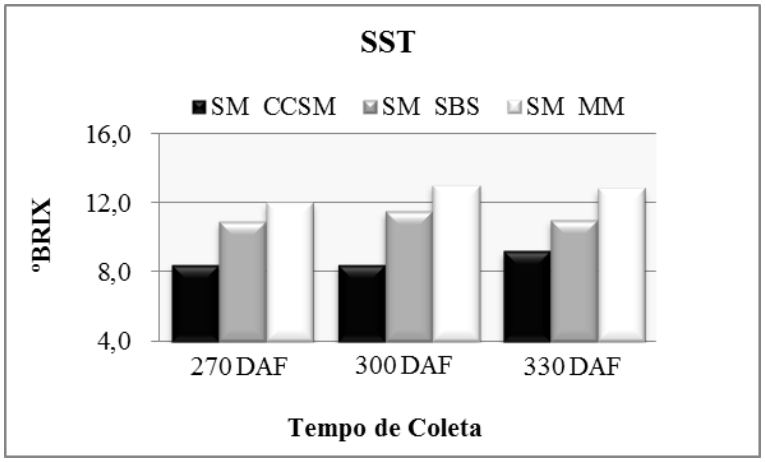

Figura 14 - Teor médio de SST (ºBRIX) do suco dos frutos da variedade de polpa vermelha 'SM' coletado nos locais (CCSM, MM e SBS) nos três tempos de coleta (270, 300 e 330 DAF).

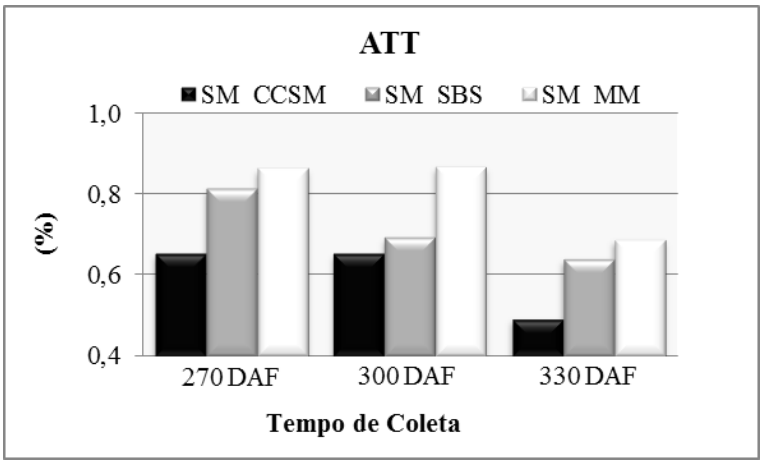

Figura 15 - Teor médio de ATT (%) do suco dos frutos da variedade de polpa vermelha 'SM' coletado nos locais (CCSM, MM e SBS) nos três tempos de coleta (270, 300 e 330 DAF).

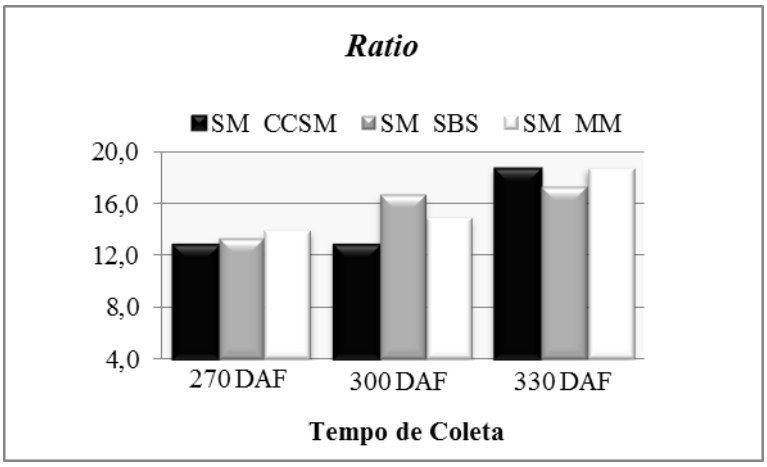

Figura 16 - Teor de *ratio* do suco dos frutos da variedade de polpa vermelha 'SM' coletado nos locais (CCSM, MM e SBS) nos três tempos de coleta (270, 300 e 330 DAF).

5.2 Quantificação dos metabólitos da via de biossíntese de carotenóides

As amostras de frutos obtidas de diversas variedades de laranja de polpa vermelha ('CC' e 'SM') e de polpa clara Pêra ('P'), em vários locais e três coletas (270, 300 e 330 DAF) foram encaminhadas ao laboratório do Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP/Araraquara), para a quantificação individual dos principais carotenóides presentes no suco de laranja (fitoflueno, licopeno, β-caroteno, luteína, zeaxantina e violaxantina) utilizando o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a quantificação dos teores de carotenóides totais (expresso em teor de β-caroteno), utilizando o método de espectrofotometria.

5.2.1 Análise de quantificação dos carotenóides no suco dos frutos das variedades de polpa vermelha e de polpa clara

A análise dos resultados obtidos com amostras de frutos de três variedades de laranja ('P', 'SM' e 'CC'), quando coletadas no mesmo local (CCSM), demonstrou que a polpa da laranja pigmentada 'SM' acumulou mais carotenóides totais em todos os tempos de coleta em relação às duas outras variedades de laranja, seguido da variedade 'CC' também laranja de

polpa vermelha, e da laranja Pêra (de polpa clara). Na última coleta (330 DAF), o conteúdo dos principais carotenóides no suco da laranja pigmentada 'SM' foi quase de 10 mg L^{-1} a mais que o apresentado na variedade controle 'P' (Figura 17).

Um estudo realizado na Espanha por Álquezar, Rodrigo e Zacarías (2008) compara o conteúdo de carotenóides das laranjas Bahia Cara-Cara e da Washington Navel, sua possível variedade original. Os resultados demonstraram que na laranja Bahia Cara-Cara, o acúmulo de carotenóides totais na polpa ficou evidente desde as fases iniciais de desenvolvimento dos frutos (meados de Julho no hemisfério norte) e aumentou continuamente durante todo o processo de maturação, enquanto que na laranja Washington Navel, o maior incremento ocorreu somente a partir de novembro. A polpa de frutos imaturos de Cara-Cara chegou a conter até 6 vezes mais carotenóides que o tecido correspondente de laranja Washington Navel, reduzindo para 2 a 3 vezes mais, na fase final de maturação.

Os carotenóides totais quantificados na polpa dos frutos de laranja Bahia Cara-Cara e do pomelo Guanxi, mutantes com frutos pigmentados, foram muitas vezes maior nestes do que em frutos de variedades de polpa clara da mesma espécie (XU et al., 2006b).

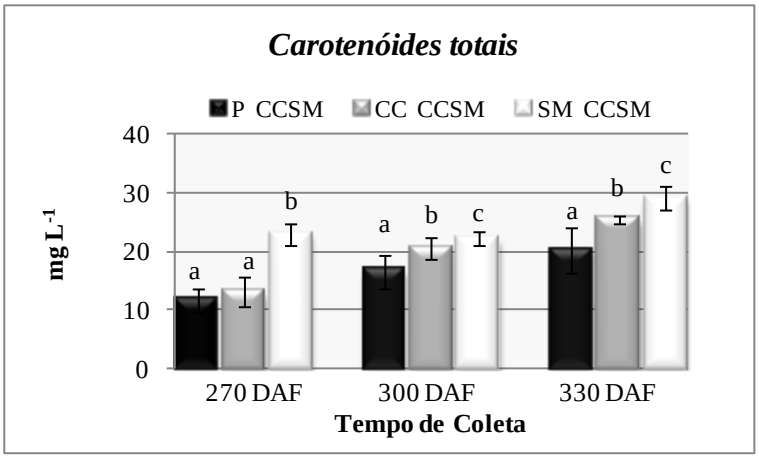

Figura 17 - Quantificação dos carotenóides totais nas variedades pigmentadas 'CC' e 'SM' de *Citrus* em relação a controle de polpa clara 'P', com valores médios e o desvio padrão (barra). Médias seguidas de letras distintas no mesmo tempo de coleta diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Eixo X: tempo de coleta (270, 300 e 330 DAF). Eixo Y: quantidade dos carotenóides totais (mg L^{-1}).

Durante a maturação dos frutos de *Citrus* ocorrem alterações na síntese de metabólitos da via de carotenóides que são dependentes da variedade e da espécie de *Citrus*, e estas alterações são sensíveis às condições ambientais, especialmente temperatura e luz (BARRY;

VAN WYK, 2006; FANCIULLINO et al., 2008; KATO et al., 2004; MATSUMOTO et al., 2007).

Dhuique-Mayer et al. (2009) avaliaram o conteúdo dos principais carotenóides em laranjas doces e tangerinas, com amostras de frutos coletados de diversas regiões climáticas (tropicais, subtropicais e mediterrânea) e em mais de uma época do ano. Os autores observaram que os frutos coletados da região mediterrânea (Córsega) apresentaram menores variações anuais no conteúdo de carotenóides da polpa em comparação com as variações observadas entre espécies e entre variedades (mesma espécie). Também foi possível verificar claramente o efeito de local (ambiente) no conteúdo total e no conteúdo dos principais carotenóides (carotenos e xantofilas) presentes na polpa dos frutos.

No presente estudo, as análises de quantificação individual dos principais carotenóides presentes no suco de frutos, de amostras obtidas de três variedades de laranja, coletadas no mesmo local (CCSM), demonstraram que havia diferenças entre variedades, mas também entre os diferentes tempos de coleta (Figura 18). As variedades de polpa vermelha (‘CC’ e ‘SM’) foram as únicas que apresentaram licopeno no suco, mas também tiveram grande acúmulo de β-caroteno, em comparação com a variedade de polpa clara controle ‘P’ (Figura 18).

Analisando-se individualmente as variedades, observa-se que a laranja ‘SM’ apresentou suco com maior conteúdo dos carotenóides fitoflueno, licopeno e β-caroteno, em todos os tempos, em relação às demais laranjas e que o conteúdo destes carotenóides foi quase sempre crescente ao longo das três coletas. O conteúdo total de luteína na variedade ‘SM’ foi maior a 270 DAF e com ligeiro decréscimo até 330 DAF. Em relação as xantofilas (zeaxantina e violaxantina), os conteúdos acumulados nesta variedade apresentaram baixo crescimento e sempre foram menores que os da laranja controle Pêra (Figura 18).

A variedade ‘CC’ também apresentou suco com maiores teores de licopeno e β-caroteno em comparação com a laranja Pêra (polpa clara), mas sem a observação de grande acréscimo no conteúdo durante o amadurecimento dos frutos, caso do β-caroteno, e até decréscimo ao longo das três coletas, para o pigmento licopeno. Em relação aos carotenóides luteína, zeaxantina e violaxantina (xantofilas), a Bahia Cara-Cara (‘CC’) apresentou níveis sempre crescentes, mas menores quando comparados às outras duas variedades (Figura 18).

A laranja controle Pêra apresentou tendência ao maior acúmulo das xantofilas no suco (zeaxantina e violaxantina), em relação às laranjas de polpa vermelha, (‘CC’ e ‘SM’) e quase não apresentou acúmulo dos carotenóides licopeno e β-caroteno (Figura 18).

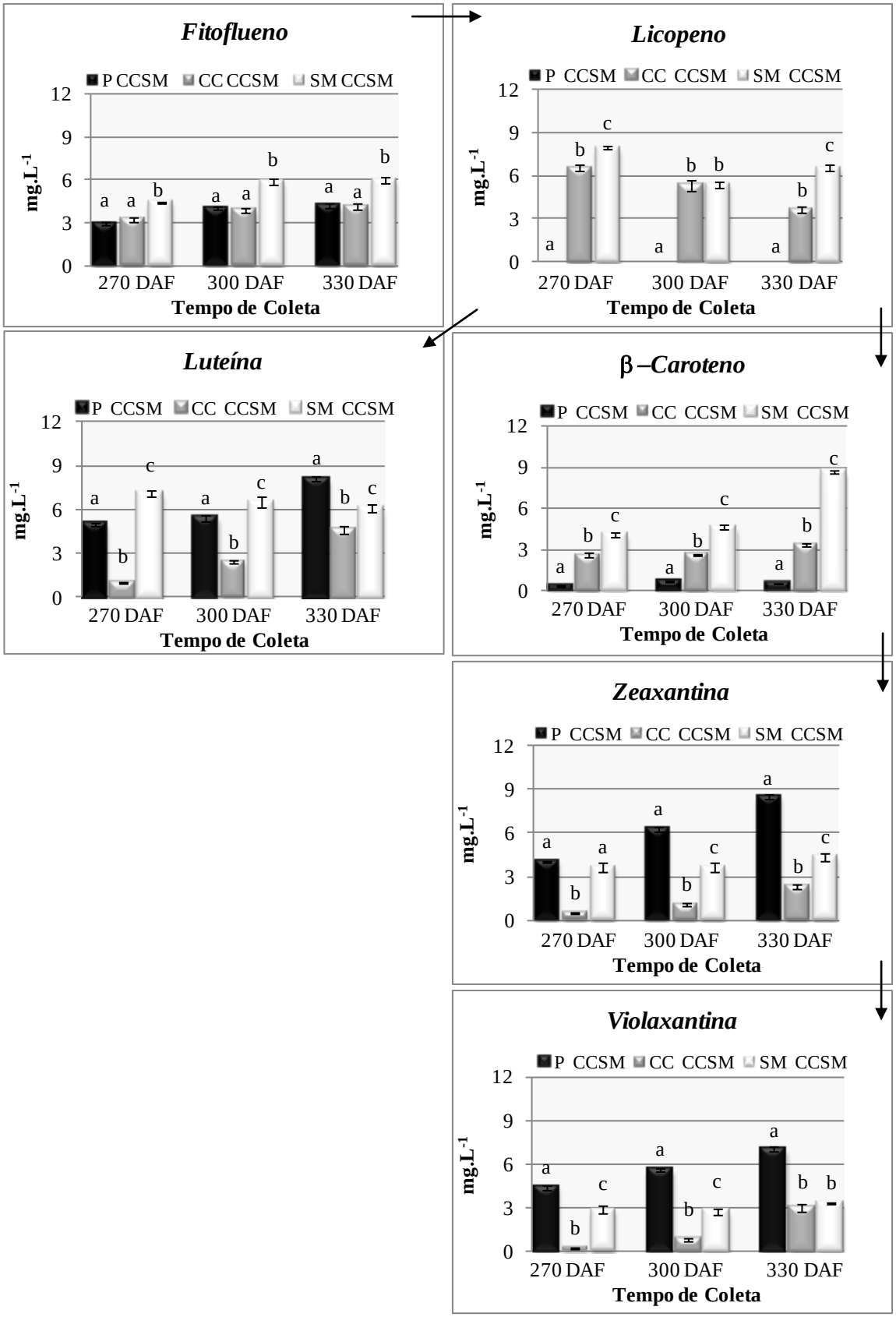

Figura 18 - Quantificação dos carotenóides dos frutos das variedades 'CC' e 'SM' de *Citrus* em relação a controle 'P', com valores médios e o desvio padrão (barra). Médias seguidas de letras distintas no mesmo tempo de coleta diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Eixo X: tempo de coleta (270, 300 e 330 DAF). Eixo Y: quantidade dos carotenóides (mg L^{-1}). As setas indicam a sequências de síntese dos carotenóides pelos genes na via

Álquezar, Rodrigo e Zacarías (2008) observaram resultados semelhantes com a avaliação de frutos das laranjas Bahia Cara-Cara e Washignton Navel. Durante a maturação da laranja Washignton Navel (polpa clara), a polpa acumulava quase que exclusivamente xantofilas, sendo a violaxantina o principal carotenóide acumulado, com mais de 90 % do total nos frutos maduros. Em contraste, os carotenos lineares foram os principais carotenóides presentes na polpa da laranja Bahia Cara-Cara, mutante de polpa vermelha, representando mais de 94 % do total, em todas as fases analisadas. Nesta variedade, o fitoeno, fitoflueno, licopeno e β-caroteno foram acumulados na polpa com quantidades relativamente grandes, mas não foram detectados na laranja Navel durante todos os estádios de maturação. Já a acumulação de xantofilas ocorreu somente nos estádios finais, sendo que ambas as variedades atingiram concentrações semelhantes destes componentes.

O licopeno é um pigmento que não é acumulado na polpa dos frutos de variedades de polpa clara de *Citrus*, sendo somente encontrado em algumas variedades mutantes, sendo conhecido com um pigmento exclusivo das variedades pigmentadas. A acumulação de licopeno em frutos já foi identificada nos pomelos Ruby Red e Star Ruby (XU et al., 2006a; 2006b); nos pomelos Fengdu, Guanxi e Chuzhou Early Red (LEE, 2001); e em algumas laranjas doces como Shara (MONSELISE; HALEVY, 1961), Cara-Cara (SAUNT, 2000; XU et al., 2006b) e Hong Anliu (LIU et al., 2009).

Outra laranja mutante de polpa vermelha, a laranja Hong Anliu, demonstrou possuir características semelhantes, concentrações muito maiores de carotenóides totais, além de maiores concentrações de fitoeno, licopeno, α-caroteno e β-caroteno na polpa, em comparação com a variedade controle, que possuía polpa clara (LIU et al., 2009).

O controle genético e a capacidade de acumular carotenóides na casca (flavedo) e na polpa são aparentemente distintos nos diversos tecidos de frutos cítricos. Como um exemplo cita-se a laranja Bahia Cara-Cara, em que o flavedo, porção externa dos frutos, tem a capacidade de acumular quantidades elevadas do carotenóide incolor fitoeno, mas não dos carotenóides pigmentados licopeno e β-caroteno (XU et al., 2006b). Assim, sugere-se que este tecido possa ter sido afetado por alguma mutação distinta da ocorrida na polpa, alterando o controle genético deste caráter (XU et al., 2006b).

Foi demonstrado que as tangerinas, as laranjas, e seus híbridos são diferentes em função dos conteúdos de carotenóides presentes na polpa, mas principalmente de β-criptoxantina. A composição dos carotenóides de variedades e espécies de *Citrus* tem um perfil específico, mas a origem dessa diversidade ainda não foi bem compreendida (FANCIULLINO et al., 2006).

Em tomateiro, durante o amadurecimento do fruto, ocorre o acúmulo dos metabólitos fitoeno, fitoflueno, ζ-caroteno e principalmente o pigmento licopeno (FRASER et al., 1994), resultado similar para o carotenóide fitoflueno foi encontrado para as laranjas de polpa vermelha 'SM' no presente trabalho (Figura 18).

O licopeno pode ser catalisado pela enzima *LCY*ε e convertido no pigmento α-caroteno, o qual é metabolizado em luteína (CUNNINGAM; GANTT, 1998). A ramificação da via de carotenóides resulta na competição pelo substrato licopeno para síntese α-caroteno (*LCY*ε) e β-caroteno (*LCY*β). Apesar do maior acúmulo de licopeno na variedade de polpa vermelha 'SM', os níveis de luteína se mantiveram praticamente constantes nesta variedade em função dos tempos de coletas, enquanto que, a laranja de polpa clara 'P', os níveis de luteína nos frutos aumentaram em função do tempo (Figura 15). Já na variedade pigmentada 'CC' foi observado um aumento deste metabólito, porém a quantidade se manteve menor do que a laranja de polpa clara 'P' (Figura 18). O acúmulo diferenciado de luteína (xantofila) na variedade de polpa clara 'P' corrobora com os altos níveis de xantofilas que são descritos em laranja doce, *Citrus sinensis* [L.] Osbeck, que resulta na coloração do fruto amarelo (DHUIQUE-MAYER et al., 2009).

A coloração amarelada da laranja 'P' também foi evidenciada por outras xantofilas presentes, como a zeaxantina e a violaxantina. Estes pigmentos foram acumulados em altos níveis quando comparados às variedades pigmentadas (Figura 18). Os resultados mostram que o menor acúmulo das xantofilas resulta no maior acúmulo dos carotenos nas variedades pigmentadas estudadas. Dentre outros, os pigmentos de zeaxantina e de violaxantina são considerados os principais carotenóides acumulados nas variedades de laranja Valência (GAMA; SYLOS, 2005; DHUIQUE-MAYER et al., 2009; MELENDEZ-MARTINEZ MARTINEZ et al., 2008). Os menores níveis das xantofilas zeaxantina e violaxantina nas laranjas de polpa vermelha foram semelhantes às quantidades encontradas nos frutos de tomate durante o amadurecimento (FRASER et al., 1994).

Para complementar os resultados obtidos da quantificação dos carotenóides foi realizada uma análise de componentes principais (ACP) com os dados de conteúdo dos principais carotenóides presentes nas polpas dos frutos das três variedades de laranja e nos diversos tempos de coleta. Esta análise teve como finalidade separar distintamente o carotenóide ou o grupo de carotenóides específicos, presentes em cada variedade e em cada tempo de coleta.

Os resultados obtidos com esta análise demonstraram que dois componentes principais explicaram 80,6 % da variabilidade total dos dados (Figura 19). Além disto, claramente houve a separação das variedades em grupos distintos, observando-se a tendência da variedade 'SM' em acumular maior conteúdo dos carotenos na polpa (fitoflueno, licopeno e β-caroteno) e, a laranja controle 'P', a tendência em acumular maior conteúdo das xantofilas (luteína, violaxantina e zeaxantina) na polpa dos frutos (Figura 19).

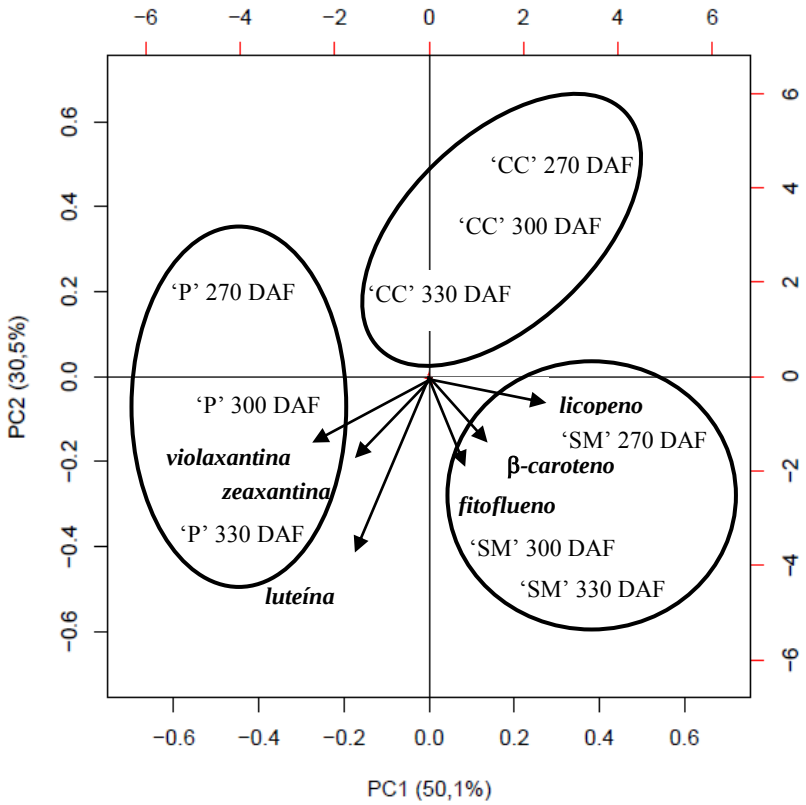

Figura 19 - Análise de Componentes Principais (ACP) dos principais carotenóides do suco de variedades pigmentadas 'SM' e 'CC' e controle 'P', com coletas aos 270, 300 e 330 DAF e no mesmo local (CCSM).

Em resumo, o acúmulo diferenciado dos pigmentos reflete nos fenótipos da polpa dos frutos das diferentes variedades estudas. A quantificação dos metabólitos demonstrou que o acúmulo dos carotenóides (fitoflueno, licopeno e β-caroteno) foi bem maior nas variedades pigmentadas 'CC' e 'SM' que na variedade de polpa clara 'P'. Já os carotenóides (luteína, zeaxantina e violaxantina) foram menos acumulados nas variedades de polpa vermelha. Além disso, as diferenças no acúmulo dos pigmentos de carotenóides entre as laranjas pigmentadas foram identificados, a variedade 'SM' acumula mais carotenóides totais (principalmente licopeno e β-caroteno) do que a pigmentada 'CC'.

5.2.2 Análise de quantificação dos carotenóides no suco dos frutos da variedade de polpa vermelha em locais distintos

A análise dos resultados obtidos com amostras de frutos da variedade de laranja pigmentada 'SM', quando coletadas em diferentes locais (CCSM, SBS e MM), demonstrou que o conteúdo de carotenóides totais foi sempre maior na polpa dos frutos cultivados na região de Mogi-Mirim (MM), chegando a um valor próximo de 39 mg de carotenóides por L de suco, seguido dos frutos coletados em São Bento do Sapucaí (SBS) com aproximadamente 33 mg L^{-1}, e por último dos frutos de Cordeirópolis (CCSM), com 29 mg L^{-1}. Além disto, o conteúdo de carotenóides totais foi sempre crescente, em todos os locais e ao longo das três coletas (Figura 20).

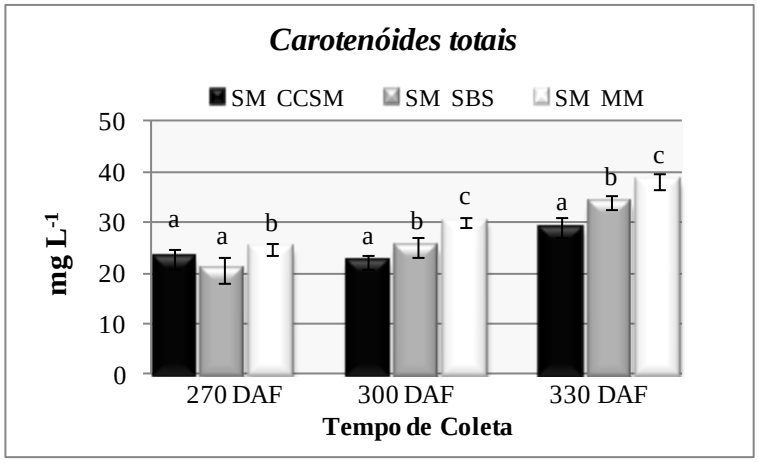

Figura 20 - Quantificação dos carotenóides totais nos locais SBS e MM em relação ao controle CCSM, com valores médios e o desvio padrão (barra). Médias seguidas de letras distintas no mesmo tempo de coleta diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Eixo X: tempo de coleta (270, 300 e 330 DAF). Eixo Y: quantidade dos carotenóides (mg L^{-1})

Os dados obtidos no presente estudo, sobre o acúmulo de carotenóides totais em frutos de laranja 'SM' colhidos de locais com diferentes climas são concordantes com os já relatados na literatura, a exceção das amostras colhidas em Cordeirópolis (CCSM), que apresentou menor conteúdo de carotenóides totais em comparação com as amostras de SBS, apesar de apresentar um clima mais quente (Figura 20).

A literatura afirma que frutos de laranjas de polpa clara e de tangerinas, quando colhidos de plantas cultivadas em região de clima mais frio, geralmente apresentam maiores

conteúdos de carotenóides totais no suco (MOULY; GAYDOU; CORSETTI, 1999; DHUIQUE-MAYER et al., 2009). Os estudos realizados em pomelos com frutos pigmentados (DHUIQUE-MAYER et al., 2009) e em tomate (GAUTIER et al., 2008), em que os frutos têm a capacidade de acumular licopeno na polpa, o efeito observado pode ser o contrário, com o acúmulo de maiores teores de carotenos (principalmente licopeno), quando o cultivo é realizado sob temperaturas mais elevadas.

Dhuique-Mayer et al. (2009) afirmaram ter verificado que tangerinas são mais sensíveis a variações ambientais anuais sobre o conteúdo de carotenóides do que as laranjas doces. Entretanto, comparando-se somente amostras de laranja doce (variedades de polpa clara) com frutos coletadas em regiões de clima subtropical (Nova Caledónia, Norte da Nova Zelândia) e tropical (Brasil, Costa Rica, Cuba e Tahiti), verificou-se que estes também apresentavam algumas diferenças marcantes no conteúdo de carotenóides entre si, porém sempre menores que as diferenças em relação a amostras colhidas na região mediterrânea, chegando-se a observar uma redução de 10 vezes no conteúdo de carotenóides totais presentes nos frutos de laranja Valência colhidos em Cuba, em comparação com as amostras colhidas na Córsega (clima mediterrâneo). Mouly, Gaydou e Corsetti (1999) já tinha verificado anteriormente este mesmo fato.

Analisando-se os resultados obtidos com a quantificação dos principais carotenóides presentes no suco de frutos de amostras obtidas de laranja ‘SM’, quando coletadas em três locais (CCSM, MM e SBS), pode-se observar que havia diferenças entre elas, mas também entre amostras de diferentes tempos de coleta (Figura 21).

De modo geral, pode-se observar que na última coleta, as amostras de frutos colhidas em MM tiveram uma tendência a acumular maiores teores dos carotenos (licopeno e β-caroteno) e da xantofila (luteína) [Figura 21], enquanto que os frutos originados de SBS apresentaram uma maior tendência em acumular as xantofilas: zeaxantina e violaxantina. Já a amostra oriunda do pomar de Cordeirópolis (CCSM) apresentou sempre menores teores de carotenóides em relação às demais, devido possivelmente a algum outro efeito experimental (ambiental, idade de planta ou outro) que atuou fortemente, afetando negativamente a produção de quase todos os carotenóides (Figura 21).

As amostras de frutos de laranja pigmentada ‘SM’ colhidas em Mogi-Mirim (MM) apresentaram valores crescentes de conteúdo de licopeno e β-caroteno no suco, ao longo das três coletas, finalizando com aproximadamente 9,0 mg de cada um deles por L de suco e aproximadamente 10,3 mg L^{-1} de luteína na última coleta (330 DAF), sendo portanto considerados como os principais carotenóides no suco (Figura 21).

As amostras de frutos da mesma variedade, quando foram colhidos em São Bento do Sapucaí (SBS), apresentaram valores crescentes de conteúdo de zeaxantina, violaxantina e luteína, ao longo das três coletas, finalizando com aproximadamente 7,5 mg de zeaxantina e de violaxantina, por L de suco e aproximadamente 8,3 mg L^{-1} de luteína, na última coleta (330 DAF), sendo portanto considerados como os principais carotenóides no suco.

Já as amostras colhidas em CCSM apresentaram alguns carotenóides com valores crescentes durante o avanço das coletas (fitoflueno, β-caroteno e zeaxantina), enquanto outros permaneceram estáveis (luteína e violaxantina) e outros ainda, apresentaram decréscimo, exemplo do licopeno (Figura 21).

Segundo Dhuique-Mayer et al. (2009), o cultivo de laranjas doces em regiões de clima semelhante ao do mediterrâneo, em que há a ocorrência de dias mais secos e com maior amplitude térmica diária, favorece o acúmulo das xantofilas, β-criptoxantina e *cis*-violaxantina na polpa, enquanto que em regiões tropicais, observou-se que os níveis destes compostos eram bem menores. O mesmo foi observado neste experimento, analisando-se os dados das amostras oriundas de SBS, que apresenta clima mais frio (Figura 21).

Por outro lado, o cultivo de variedades cítricas que possuem polpa vermelha em regiões de clima mais quente, resultou em polpa e suco de frutos com maiores teores de carotenóides totais e maior conteúdo de licopeno, em comparação com amostras obtidas da região de clima Mediterrâneo (DHUIQUE-MAYER et al., 2009). Como exemplo, os autores citam que os frutos do pomelo Star Ruby, quando colhidos em Nova Caledônia, região tropical, possuíam teores mais elevados de licopeno (17 mg L^{-1}), em comparação com as amostras colhidas na Córsega (10 mg L^{-1}). Gautier et al. (2008) relataram que em tomate, o aumento da temperatura de cultivo, de 21 ºC para 26 ºC, resultou na redução dos teores de carotenos totais, mas não no teor de licopeno, que se manteve constante.

Utilizando outra abordagem, Xu et al. (2006a) e colaboradores observaram que a armazenagem de frutos de pomelo Ganxi, mutante que acumula licopeno e β-caroteno em maiores níveis na polpa dos frutos, durante dois meses e a temperatura ambiente, resultou no aumento de 3 e 2 vezes mais na concentração de licopeno e β-caroteno, respectivamente. O incremento pós-colheita de carotenos nos frutos da variedade de laranja Bahia Cara-Cara foi também descrito por Xu et al. (2006a).

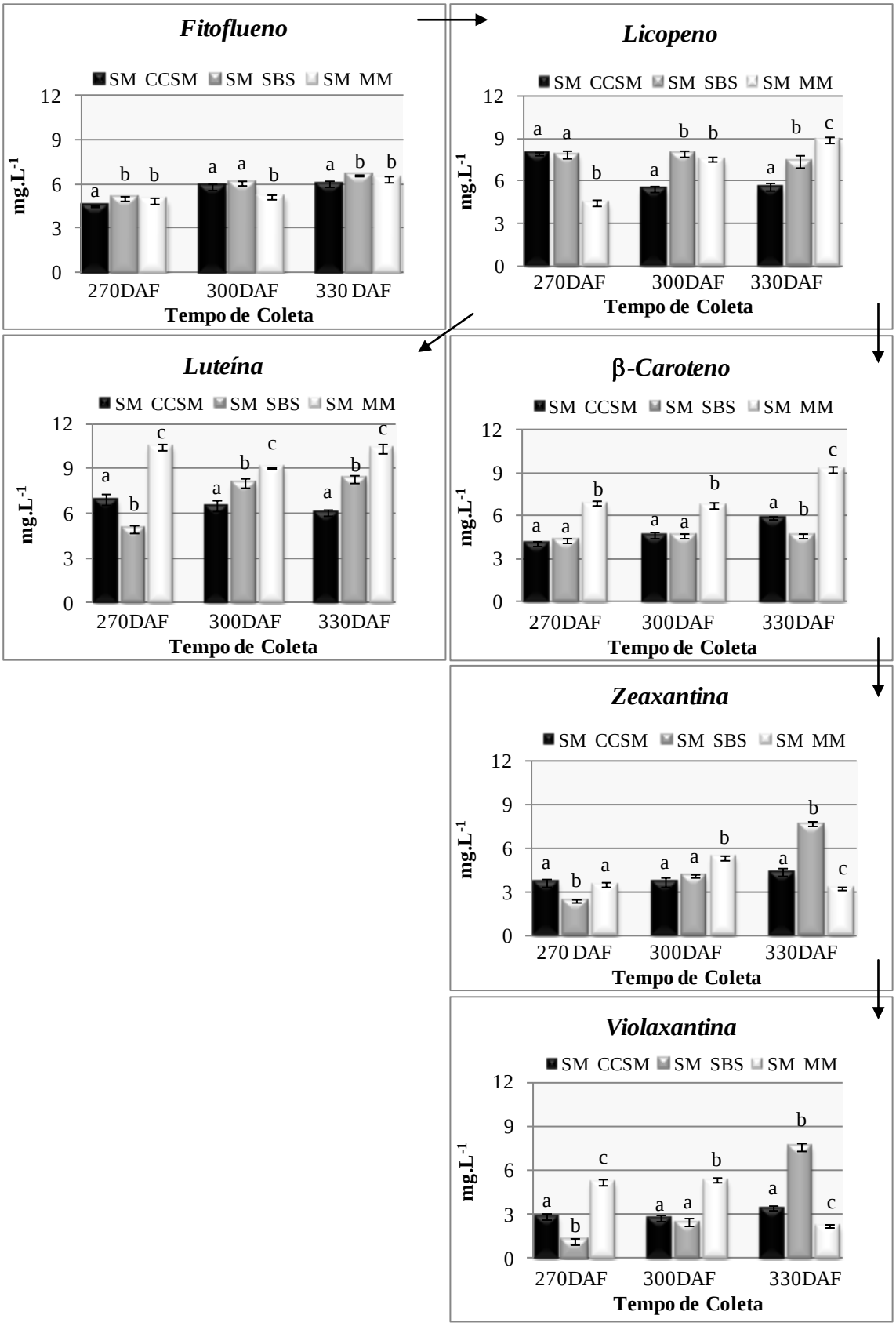

Figura 21 - Quantificação dos carotenóides dos frutos da variedade 'SM' dos locais SBS e MM em relação ao local controle CCSM, com valores médios e o desvio padrão (barra). Médias seguidas de letras distintas no mesmo tempo de coleta diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Eixo X: tempo de coleta (270, 300 e 330 DAF). Eixo Y: quantidade dos carotenóides (mg L^{-1}). As setas indicam a sequências de síntese dos carotenóides pelos genes na via

5.3 Identificação e caracterização dos genes da via de biossíntese de carotenóides

No banco de dados de Orange Gene Index (http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=orange) foram identificados um total de 23 agrupamentos (clusters ou TC - tentative consensus) e 81 ESTs individuais não agrupados (singletons) dos genes da via de biossíntese de carotenóides em *Citrus*; baseando-se na busca por palavra-chave e também usando os genes ortólogos da via de carotenóides relatados em tomate (*Solanum lycopersicum* L.), sendo os genes *PSY*I e *PSY*II (GIORIO; STIGLIANI; D'AMBROSIO, 2008), o gene *PDS* (MANN; PECKER; HIRSCHBERG, 2004), o *ZDS* (BARTLEY; ISHIDA, 1999), o *CRTISO* (ISAACSON et al., 2002), o *LCY*ε (GIORIO; STIGLIANI; D'AMBROSIO, 2008), o *LCY*β (PECKER et al., 1996), o *HY*β (D'AMBROSIO; STIGLIANI; GIORIO, 2011) e o *ZEP* (BURBIDGE et al., 1997).

As sequências de *Citrus* identificadas totalizaram 209 transcritos (0,09 %) das 202.400 ESTs disponíveis, distribuídas entre 26.081 agrupamentos e 72.791 *singletons*, originadas de diversos genótipos, tecidos e condições (dados depositados até 25 de junho de 2008).

Para classificar os genes da via de *Citrus* foi realizada uma análise filogenética empregando as sequências traduzidas dos 23 agrupamentos, dos 81 *singletons* de *Citrus* e dos genes em tomate. Os TCs e *singletons* de laranja doce se agruparam aos genes da via de carotenóides de tomate baseados em valores de re-amostragem com reposição aleatória dos dados (*bootstrap*), que revelaram a consistência interna da topologia da árvore consensual (dados não mostrados). Dos 23 agrupamentos de *Citrus*, dois (derivado de 15 ESTs) foram classificados como pertencentes ao gene *PSY*; um agrupamento (derivado de seis ESTs) foi classificado como *PDS*, nove agrupamentos (derivados de 29 ESTs) foram classificados como *ZDS*, um grupo (derivado de três ESTs) classificado como pertencente ao *CRTISO*, um (derivado de sete ESTs) pertencente ao *LCY*β, um agrupamento (derivado de quatro ESTs) do *LCY*ε, quatro (derivados de 55 ESTs) pertencentes ao *HY*β e quatro agrupamentos (derivados de nove ESTs) pertencentes ao *ZEP*. Já dos 81 *singletons*, seis foram classificados como pertencentes ao gene *PSY*; um *singleton* pertencente aos genes *PDS* e *LCY*β, 42 grupos pertencem ao gene *ZDS*, dois ao gene *CRTISO*, cinco pertencentes ao gene *LCY*ε, 10 agrupamentos pertencentes ao gene *HY*β e 14 classificados como pertencentes ao gene *ZEP*, equivalentes aos genes de tomate.

Em estudos de identificação de novos membros da família gênica da via de biossíntese de carotenóides em laranja doce (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) foram identificados quatro ESTs pertencentes a um contig que foram equivalentes ao gene *PSY*, dois ESTs para um contig equivalente ao gene *PDS*, 12 ESTs distribuídos em três contigs pertencente ao gene *ZDS*, para o gene *LCY*β foram identificados 11 ESTs pertencentes a três contigs, três ESTs pertencentes a dois contigs equivalente ao *LCY*ε e oito ESTs em um contig equivalentes ao gene *HY*β (CHEN et al., 2010). Dos ESTs identificados no presente trabalho como equivalentes aos genes (*PSY*, *PDS*, *ZDS*, *CRTISO*, *LCY*ε, *LCY*β, *HY*β e *ZEP*) da via de carotenóides, os genes *ZDS*, *HY*β e *PSY* (nesta ordem) foram os que apresentaram maior quantidade de sequências expressas em *Citrus*. Os resultados obtidos acima corroboraram com os dados obtidos por Chen et al. (2010), onde no gene *ZDS* foram identificados 12 ESTs, no *HY*β identificados oito ESTs e no gene *PSY* foram encontrados quatro ESTs.

Com o objetivo de selecionar as sequências mais completas das proteínas da via de carotenóides, uma segunda árvore filogenética foi gerada utilizando os 23 agrupamentos de *Citrus* e os oito genes de tomate (Figura 22). Os *singletons* não foram incluídos nesta análise, porque quando alinhados na ferramenta *Blast 2 Sequences* do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi) aos seus respectivos agrupamentos, mostraram-se fazer parte do mesmo grupo, apresentando pequenas diferenças entre as sequências. Os *singletons* identificados traduziam sequências pequenas de aminoácidos, e que não se agruparam automaticamente aos TCs possivelmente devido aos critérios estatísticos estabelecidos para o agrupamento. Na árvore consensual foram observados à formação de pares referentes aos genes da via de biossíntese de carotenóides de *Citrus* com o respectivo em tomate; com valor de *bootstrap* (100 %) indicando a consistência interna na análise (Figura 22).

Como observado na árvore filogenética (Figura 22), os TCs foram agrupados com os respectivos genes de tomate. Os grupos foram divididos em função da similaridade das sequências de *Citrus* e de tomate. Em seguida foram realizados alinhamentos múltiplos entre as sequências de proteína de *Citrus* e de tomate, utilizando o programa http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/. A análise objetivou restringir ainda mais a escolha de um único TC que melhor representasse cada gene da via de carotenóides em *Citrus* a partir do melhor pareamento entre elas. Assim a escolha do melhor TC foi determinada, permitindo que os 24 grupos identificados fossem reduzidos a oito agrupamentos (Tabela 6). Foi observado que o gene *ZDS* de *Citrus* foi o mais numeroso quanto a número de ESTs

individuais, seguidos dos genes *HY*β, *ZEP*, *PSY*, *LCY*ε, *LCY*β, *PDS* e *CRTISO* (Tabela 6). Após a seleção dos TCs, uma árvore consensual final foi gerada entre as oito sequências de *Citrus* e as oito de tomate (Figura 23).

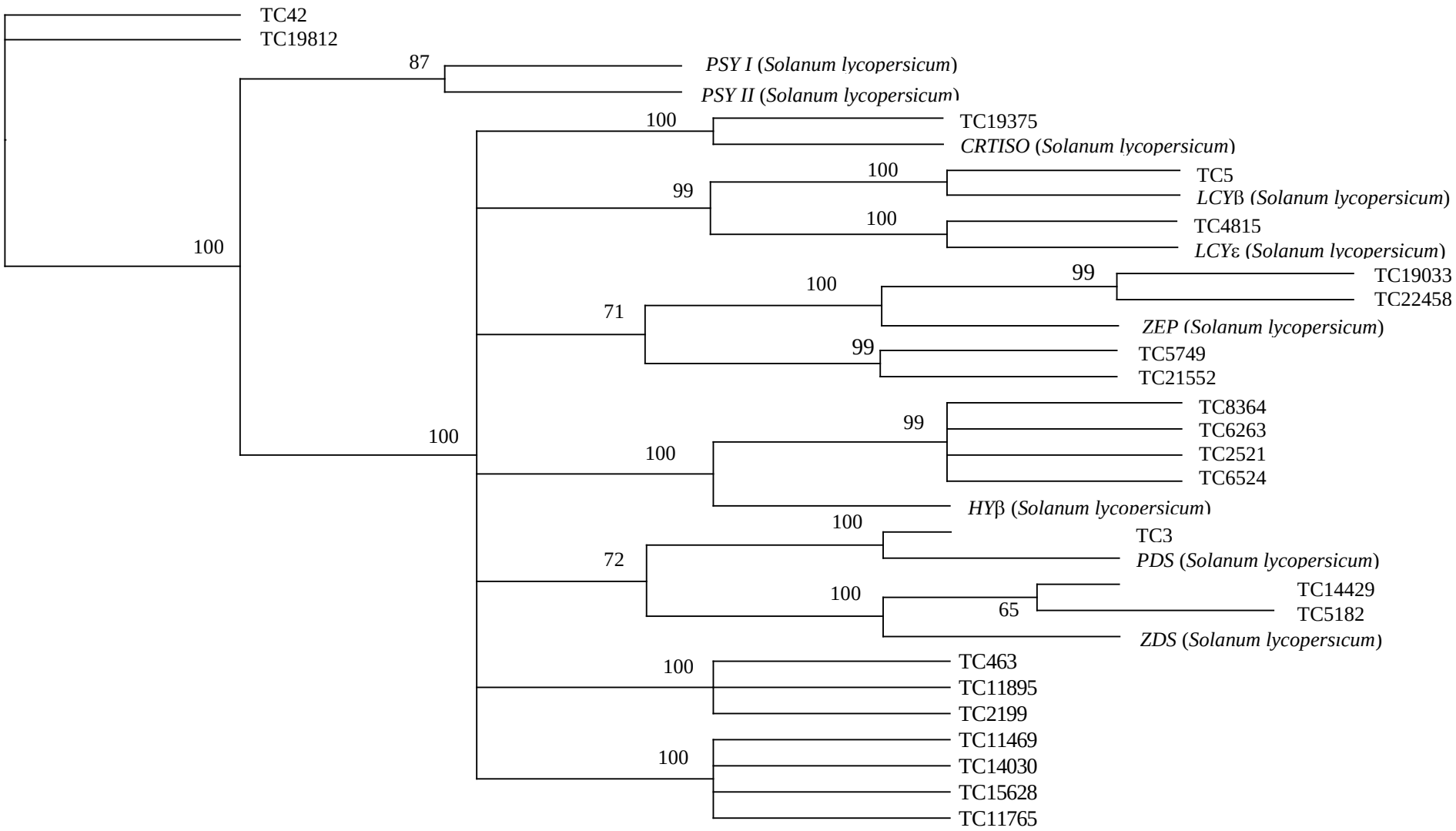

Figura 22 - Árvore filogenética dos oito genes de tomate para classificação dos 23 agrupamentos (TCs) dos genes da via de carotenóides de *Citrus*. Os alinhamentos das sequências de aminoácidos foram realizados com o auxílio do programa ClustalW e a árvore foi construída utilizando as funções de máxima parcimônia no PAUP 4.0b10. Os valores de *bootstrap* baseado em 1000 repetições aparecem nos nós da árvore

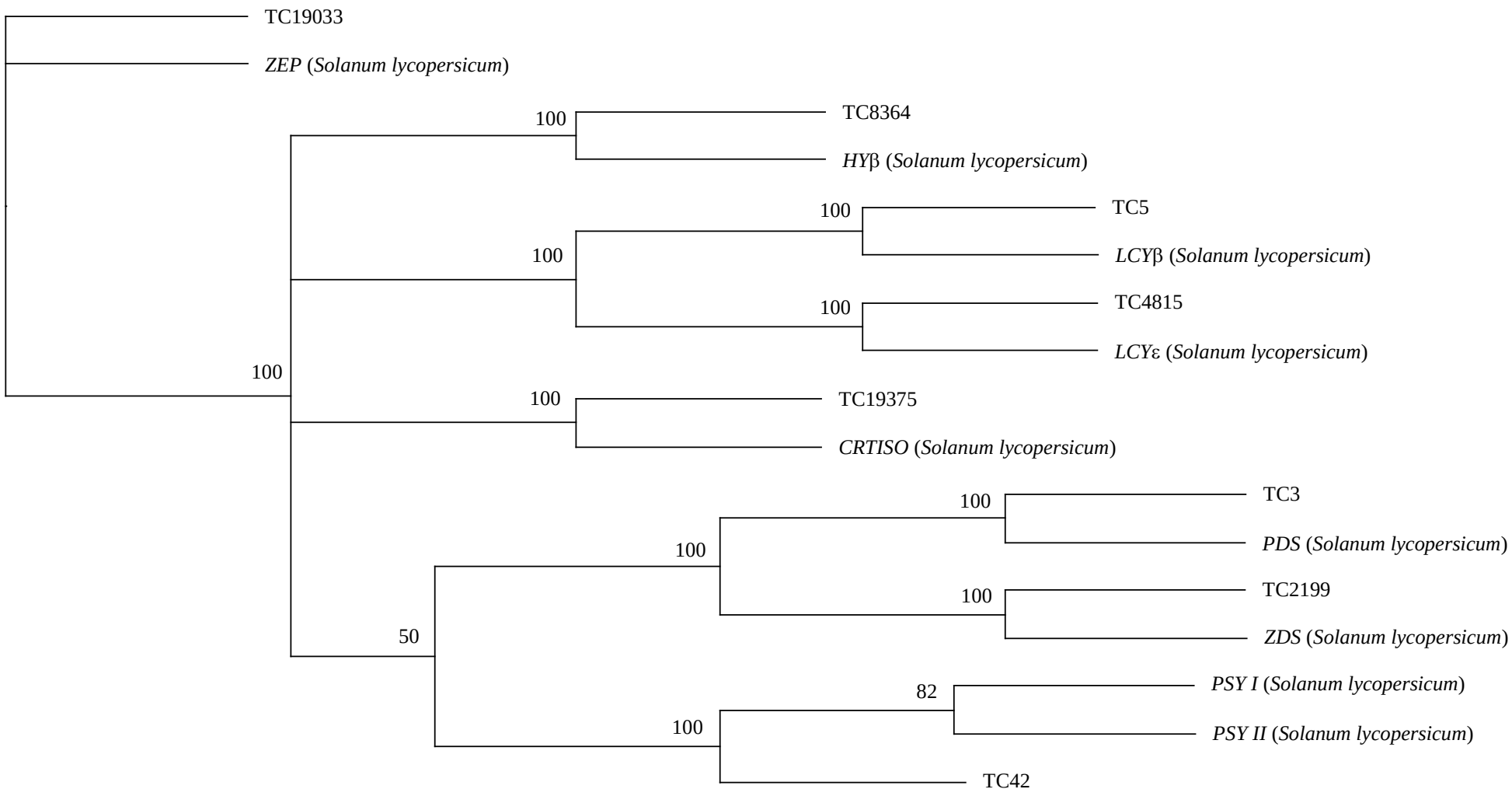

Figura 23 - Árvore filogenética dos oito genes de tomate e dos oito agrupamentos (TCs) dos genes da via de carotenóides de *Citrus*. Os alinhamentos das sequências de aminoácidos foram realizados com o auxílio do programa ClustalW e a árvore foi construída utilizando as funções de máxima parcimônia no PAUP 4.0b10. Os valores de *bootstrap* baseado em 1000 repetições aparecem nos nós da árvore

Tabela 6 - Agrupamentos de ESTs de *Citrus* identificados em relação às sequências dos genes ortólogos de tomate, com suas respectivas siglas, identificação do número de acesso (TC), nomenclatura proposta a partir dos genes de tomate, número de ESTs individuais que compõe cada TC e o *e-value* relativo à similaridade com sequências ortólogas de tomate

Gene Tomate	**TC nº Tomate**	**TC nº *Citrus***	**Nomenclatura *Citrus***	**Nº de ESTs individuais**	***e-value***
PSYI	217254	42	*PSY*	21	e^{-135}
PSYII	217255				e^{-145}
PDS	217176	3	*PDS*	7	e^{-218}
ZDS	217229	2199	*ZDS*	71	e^{-227}
CRTISO	222124	19375	*CRTISO*	5	e^{-69}
LCYε	228761	4815	*LCYε*	9	e^{-163}
LCYβ	238494	5	*LCYβ*	8	e^{-201}
HYβ	217349	8364	*HYβ*	65	e^{-89}
ZEP	217193	19033	*ZEP*	23	e^{-153}
			TOTAL	**209**	

Dos ESTs identificados por Chen et al. (2010), somente um representante de cada gene foi selecionado, provavelmente a sequência mais completa que traduz a proteína. Para o gene *PSY* foi selecionado a sequência com número de acesso DQ235260 (ID G*enBank*) depositada no banco de dados de *Citrus*, esta apresenta 1311 pb e 436 aminoácidos (INOUE et al., 2006), o gene *PDS* foi o número de acesso AJ319761, com 1919 pb e 553 aminoácidos, para o *ZDS* foi o EST referente ao número de acesso AJ319762, com a sequência de nucleotídeos de 1907 pb e de 570 aminoácidos (RODRIGO; MARCOS; ZACARIAS, 2004), para o *LCY*β foi o AY094582, com a sequência de 1575 pb e 524 aminoácidos (XU; CHEN; ZHANG, 2001), para o *LCY*ε foi a sequência de número de acesso AJ319762 com 1317 pb e 570 aminoácidos (TAO et al., 2004) e para o gene *HY*β foi o acesso número DQ228870, referente a sequência de 936 pb e de 311 resíduos de aminoácidos (RODRIGO; MARCOS; ZACARIAS, 2004).

Os oito agrupamentos selecionados, equivalentes aos genes da via de carotenóides (Tabela 6) são compostos por ESTs, mas para o desenho dos iniciadores foi selecionado somente um ESTs que representasse cada gene (sequência completa que traduz a proteína). O número de acesso dos ESTs foram DQ235260 (para o gene *PSY*), AJ319761 (gene *PDS*), AJ319762 (para o *ZDS*), AB114659 (gene *CRTISO*), AY533827 (para o gene *LCY*ε), DQ235259 (para o gene *LCY*β), DQ228870 (gene *HY*β) e AB114662 (para o gene *ZEP*). Os ESTs equivalentes aos genes *PSY*, *PDS*, *ZDS* e *HY*β foram os mesmos selecionados por Chen

et al. (2010). Já os ESTs referentes aos genes *LCY*ε e *LCY*β foram diferentes dos escolhidos por Chen et al. (2010).

As sequências traduzidas dos oito agrupamentos de ESTs de *Citrus* e dos respectivos genes de tomate foram alinhadas *Blast 2 Sequences* do NCBI para confirmar a similaridade e identidade entre elas (Figura 24a-h). A similaridade entre os genes de tomate e *Citrus* variou entre 80 e 93 % (média de 86,5 %) e a identidade entre 70 e 85 % (média 77,5 %) (dados não mostrados).

Para o gene *PSY* em *Citrus*, a similaridade foi de 73 % e a identidade foi de 81% em relação ao gene *PSY*I de tomate. Já em relação à *PSY*II de tomate, a similaridade foi de 74 % e a identidade foi de 82 % (Figura 24a). Em tomate, foram identificadas duas isoformas do gene *PSY*, ambas são altamente conservadas, com sequências de êxons quase que idênticas e íntrons mais variáveis. As sequências dos genes da *PSY*I e da *PSY*II tem 4527 e 3542 pb, sequências codificadoras tem 1239 e 1317 bp e as sequências das proteínas tem 412 e 438 aminoácidos, respectivamente. As sequências das proteínas são idênticas na região central, mas a diferença entre elas estão nas regiões terminais N- e C-terminal. Através de análise de RT-qPCR foi demonstrado que o transcrito de *PSY*II foi expresso em todos os tecidos das plantas, já o transcrito *PSY*I foi detectado na polpa do fruto (tecido-específico) (GIORIO; STIGLIANI; D'AMBROSIO, 2008). O EST de *Citrus* não apresentou grandes diferenças na similaridade e na identidade no alinhamento com as isoformas *PSY*I e *PSY*II, porque o EST de laranja alinhou na região central das isoformas de tomate, onde as mesmas são muito conservadas.

Para o gene *PDS* em *Citrus*, a similaridade foi de 93% e a identidade foi de 84 % em relação a tomate (Figura 24b). A sequência completa do gene *PDS* em tomate tem 8258 pb, sequência codificadora tem 1749 pb e a sequência da proteína de 583 aminoácidos. Em geral, a sequência do gene *PDS* em tomate comparada as demais sequências de plantas superiores são quase iguais, com algumas exceções que são diferenças pequenas características de tomate (MANN; PECKER; HIRSCHBERG, 2004).

A similaridade e a identidade de *ZDS* com relação a tomate foram de 93 % e 85 %, respectivamente (Figura 24c). Em tomate, a sequência codificadora do gene *ZDS* é de 1931 pb e a sequência de proteína é de 588 aminoácidos (BARTLEY; ISHIDA, 1999).

Para o gene *CRTISO* a similaridade foi de 92 % e a identidade foi de 84 % entre as sequências de laranja e tomate (Figura 24d). A sequência completa do gene CRTISO em tomate tem 7998 pb, sequência codificadora tem 1845 pb e a sequência da proteína de 615 aminoácidos (ISAACSON et al., 2002).

A similaridade e identidade foram de 88 % e 78 % entre as sequências do gene *LCY*ε de Citrus e tomate (Figura 24e). A sequência codificadora em tomate tem 1683 pb e a sequência de proteína tem 527 aminoácidos (GIORIO; STIGLIANI; D'AMBROSIO, 2008).

Para o gene *LCY*β foi de 90 % e 84 % a similaridade e identidade em relação à sequência de tomate, respectivamente (Figura 24f). A sequência codificadora em tomate tem 978 pb e a sequência de proteína tem 314 aminoácidos (PECKER et al., 1996).

Para o gene *HY*β foi de 80 % e 70 % a similaridade e identidade em relação à sequência de tomate, respectivamente (Figura 24g). A sequência codificadora em tomate tem 1650 pb e a sequência de proteína tem 500 aminoácidos (D'AMBROSIO; STIGLIANI; GIORIO, 2011).

Para ZEP foi de 92 % a similaridade e 83 % a identidade com relação a tomate (Figura 24h). A sequência completa do gene ZEP em tomate tem 2225 pb, sequência codificadora tem 2007 pb e a sequência da proteína de 669 aminoácidos (BURBIDGE et al., 1997).

```
PSY_I_[Solanum_lycopersicum]      1 .......... ..LVSNERIN RGGGKQTNNG RKFSVRSAIL ATPSGERTMT
PSY_II_[Solanum_lycopersicum]     1 KKGGRQGWNF GFLNADLRYS CLGRSRTENG RSFSVQSSLV ASPAGEMAVS
TC42                              1 RPKQFNNSNK QRRNS.YPLD TDLRHPCSSG IDLPEISCMV ASTAGEVAMS
consensus                         1 k    q  n    lns  ri    grk t nG r fsv S iv AspaGEmams

PSY_I_[Solanum_lycopersicum]     39 SEQMVYDVVL RQAALVKR.Q LRSTNELEVK PDIPIPGNLG LLSEAYDRCG
PSY_II_[Solanum_lycopersicum]    51 SEKKVYEVVL KQAALVKR.H LISTDDIQVK PDIVLPGNLG LLSEAYDRCG
TC42                             50 SEEMVYNVVL KQAALVNKQP SGVTRDLDVN PDIALPGTLS LLSEAYDRCG
consensus                        56 SE mVYdVVL kQAALVkr   l sT dleVk PDI lPGnLg LLSEAYDRCG

PSY_I_[Solanum_lycopersicum]     88 EVCAEYAKTF NLGTMLMTPE RRRAIWAIYV WCRRTDELVD GPNASYITPA
PSY_II_[Solanum_lycopersicum]   100 EVCAEYAKTF YLGTMLMTPD RRRAIWAIYV WCRRTDELVD GPNASHITPQ
TC42                            100 EVCAEYAKTF YLGTLLMTSE RRRAIWAIYV WCRRTDELVD GPNASHITPT
consensus                       111 EVCAEYAKTF yLGTmLMTpe RRRAIWAIYV WCRRTDELVD GPNAShITP

PSY_I_[Solanum_lycopersicum]    138 ALDRWENRLE DVFNGRPFDM LDGALSDTVS NFPVDIQPFR DMIEGMRMDL
PSY_II_[Solanum_lycopersicum]   150 ALDRWEARLE DIFNGRPFDM LDAALSDTVS RFPVDIQPFR DMVEGMRMDL
TC42                            150 ALDRWESRLE DLFRGRPFDM LDAALSDTVT KFPVDIQPFR DMIEGMRMDL
consensus                       166 ALDRWE RLE DvFnGRPFDM LDaALSDTVs rFPVDIQPFR DMiEGMRMDL

PSY_I_[Solanum_lycopersicum]    188 RKSRYKNFDE LYLYCYYVAG TVGLMSVPIM GIAPESKATT ESVYNAALAL
PSY_II_[Solanum_lycopersicum]   200 WKSRYNNFDE LYLYCYYVAG TVGLMSVPIM GIAPESKATT ESVYNAALAL
TC42                            200 RKSRYKNFDE LYLYCYYVAG TVGLMSVPVM GIAPDSQATT ESVYNAALAL
consensus                       221 rKSRYkNFDE LYLYCYYVAG TVGLMSVPiM GIAPeSkATT ESVYNAALAL

PSY_I_[Solanum_lycopersicum]    238 GIANQLTNIL RDVGEDARRG RVYLPQDELA QAGLSDEDIF AGRVTDKWRI
PSY_II_[Solanum_lycopersicum]   250 GIANQLTNIL RDVGEDARRG RVYLPQDELA QAGLSDEDIF AGKVTDKWRI
TC42                            250 GIANQLTNIL RDVGEDARRG RVYLPQDELA QAGLSDDDIF AGEVTIKWRN
consensus                       276 GIANQLTNIL RDVGEDARRG RVYLPQDELA QAGLSDeDIF AGrVTdKWRi

PSY_I_[Solanum_lycopersicum]    288 FMKKQIHRAR KFFDEAEKGV TELSSASRFP VWASLVLYRK ILDEIEANDY
PSY_II_[Solanum_lycopersicum]   300 FMKKQIQRAR KFFDEAEKGV TELSSASRWP VLASLLLYRK ILDEIEANDY
TC42                            300 FMKNQIKRAR MFFDMAENGV TELSEASRWP VWASLLLYRQ ILDEIEANDY
consensus                       331 FMKkQIhRAR kFFDeAEkGV TELSsASRwP VwASLlLYRk ILDEIEANDY

PSY_I_[Solanum_lycopersicum]    338 NNFTKRAYVS KSKKLIALPI AYAKSLVPPT KTASLQR..
PSY_II_[Solanum_lycopersicum]   350 NNFTRRAYVS KPKKLLTLPI AYARSLVPPK STSSPLAKT
TC42                            350 NNFTKRAYVS KAKKIAALPI AYAKSLIRPS RIYTSKA..
consensus                       386 NNFTkRAYVS K KKliaLPI AYAkSLvpPt kt s  a
```

Figura 24a - Alinhamentos gerados no programa ClustalW, das sequências traduzidas relativa ao gene *PSY* da via de biossíntese de carotenóides de tomate e o agrupamento de ESTs de *Citrus*. A identidade dos aminoácidos das sequências alinhadas representada em preto, similaridade em cinza e a diferença em branco (Programa Boxshade, http://www.isrec.isb-sib.ch/software/)

```
PDS_[Solanum_lycopersicum]    1 MGHKLKIRTP HATTRRLVKD LGPLKVVCID YPRPELDNTV NYLEAAFLSS
T3                            1 MGQSLKIRVK TGTR....KG FCPSKVVCVD YPRPDIDNTS NFLEAAYLSS
consensus                     1 MG  LKIR    aT rrlvK    P KVVCiD YPRPelDNT  NyLEAAfLSS

PDS_[Solanum_lycopersicum]   51 TFRASPRPTK PLEIVIAGAG LGGLSTAKYL ADAGHKPILL EARDVLGGKV
T3                           47 SFRTSPRPSK PLKVVIAGAG LAGLSTAKYL ADAGHKPLLL EARDVLGGKV
consensus                    56 tFR SPRPtK PL iVIAGAG LgGLSTAKYL ADAGHKPiLL EARDVLGGKV

PDS [Solanum lycopersicum]  101 AAWKDDDGDW YETGLHIFFG AYPNIQNLFG ELGINDRLQW KEHSMIFAMP
T3                           97 AAWKDGDGNW YETGLHIFFG AYPNIQNLFG ELGINDRLQW KEHSMIFAMP
consensus                   111 AAWKD DG W YETGLHIFFG AYPNIQNLFG ELGINDRLQW KEHSMIFAMP

PDS_[Solanum_lycopersicum]  151 SKPGEFSRFD FSEALPAPLN GILAILKNNE MLTWPEKVKF AIGLLPAMLG
T3                          147 NKPGEFSRFD FPEVLPAPLN GILAILRNNE MLTWPEKVKF AIGLLPAIIG
consensus                   166  KPGEFSRFD F E LPAPLN GILAILkNNE MLTWPEKVKF AIGLLPAmlG

PDS_[Solanum_lycopersicum]  201 GQSYVEAQDG ISVKDWMRKQ GVPDRVTDEV FIAMSKALNF INPDELSMQC
T3                          197 GQAYVEAQDG LTVQEWMRKQ GVPDRVTTEV FIAMSKALNF INPDELSMQC
consensus                   221 GQ YVEAQDG isV dWMRKQ GVPDRVT EV FIAMSKALNF INPDELSMQC

PDS_[Solanum_lycopersicum]  251 ILIALNRFLQ EKHGSKMAFL DGNPPERLCM PIVEHIESKG GQVRLNSRIK
T3                          247 ILIALNRFLQ EKHGSKMAFL DGNPPERLCL PIVEHIQSLG GEVRLNSRVQ
consensus                   276 ILIALNRFLQ EKHGSKMAFL DGNPPERLCm PIVEHI S G G VRLNSRi

PDS_[Solanum_lycopersicum]  301 KIELNEDGSV KSFILSDGSA IEGDAFVFAA PVDIFKLLLP EDWKEIPYFQ
T3                          297 KIELNDDGTV KNFLLTNGNV IDGDAYVFAT PVDILKLQLP ENWKEMAYFK
consensus                   331 KIELNeDGsV K FiLs G   IeGDAfVFA  PVDI KL LP E WKEi YF

PDS_[Solanum_lycopersicum]  351 KLEKLVGVPV INVHIWFDRK LKNTYDHLLF SRSSLLSVYA DMSVTCKEYY
T3                          347 RLEKLVGVPV INIHIWFDRK LKNTYDHLLF SRSSLLSVYA DMSLTCKEYY
consensus                   386 kLEKLVGVPV INvHIWFDRK LKNTYDHLLF SRSSLLSVYA DMSvTCKEYY

PDS_[Solanum_lycopersicum]  401 NPNQSMLELV FAPAEEWISR SDSEIIDATM KELATLFPDE ISADQSKAKI
T3                          397 NPNQSMLELV FAPAEEWISC SDSEIIDATM KELAKLFPDE ISADQSKAKI
consensus                   441 NPNQSMLELV FAPAEEWIS  SDSEIIDATM KELA LFPDE ISADQSKAKI

PDS_[Solanum_lycopersicum]  451 LKYHVVKTPR SVYKTVPGCE PCRPLQRSPI EGFYLAGDYT KQKYLASMEG
T3                          447 VKYHVVKTPR SVYKTIPNCE PCRPLQRSPV EGFYLAGDYT KQKYLASMEG

consensus                   496 lKYHVVKTPR SVYKTvP CE PCRPLQRSPi EGFYLAGDYT KQKYLASMEG

PDS_[Solanum_lycopersicum]  501 AVLSGKLCAQ AIVQDYELLV GRSQKKLSEA SVV.
T3                          497 AVLSGKLCAQ AIVQDYVLLA ARGKGRLAEA SMCP
consensus                   551 AVLSGKLCAQ AIVQDY LL  gR   kL EA Sv p
```

Figura 24b - Alinhamentos gerados no programa ClustalW, das sequências traduzidas relativa ao gene *PDS* da via de biossíntese de carotenóides de tomate e o agrupamento de ESTs de *Citrus*. A identidade dos aminoácidos das sequências alinhadas representada em preto, similaridade em cinza e a diferença em branco (Programa Boxshade, http://www.isrec.isb-sib.ch/software/)

```
ZDS_[Solanum_lycopersicum]    1 DLDSMVSDMS TNAPKGLFPP EPEHYRGPKL KVAIIGAGLA GMSTAVELLD
TC2199                        1 SLDANVSDMS VNAPKGLFPP EPEHYRGPKL KVAIIGAGLA GMSTAVELLD
consensus                     1  LD  VSDMS  NAPKGLFPP EPEHYRGPKL KVAIIGAGLA GMSTAVELLD

ZDS_[Solanum_lycopersicum]   51 QGHEVDIYES RTFIGGKVGS FVDRRGNHIE MGLHVFFGCY NNLFRLLKKV
TC2199                       51 QGHEVDIYES RSFIGGKVGS FVDKRGNHIE MGLHVFFGCY NNLFRLMKKV
consensus                    56 QGHEVDIYES RtFIGGKVGS FVDrRGNHIE MGLHVFFGCY NNLFRLlKKV

ZDS [Solanum lycopersicum]  101 GAEKNLLVKE HTHTFVNKGG EIGELDFRFP VGAPLHGINA FLSTNQLKIY
TC2199                      101 GADKNLLVKD HTHTFVNQGG EIGELDFRFP IGAPLHGIRA FLSTNQLKTY
consensus                   111 GAeKNLLVKe HTHTFVN GG EIGELDFRFP vGAPLHGI A FLSTNQLK Y

ZDS_[Solanum_lycopersicum]  151 DKARNAVALA LSPVVRALVD PDGALQQIRD LDNVSFSEWF LSKGGTRASI
TC2199                      151 DKARNALALA LSPVVKALVD PDGALKDIRD LDSISFSDWF LSKGGTQTSI
consensus                   166 DKARNAvALA LSPVVrALVD PDGAL  IRD LD vSFSeWF LSKGGT  SI

ZDS_[Solanum_lycopersicum]  201 QRMWDPVAYA LGFIDCDNMS ARCMLTIFAL FATKTEASLL RMLKGSPDVY
TC2199                      201 QRMWDPVAYA LGFIDCDNIS ARCMLTIFAL FATKTEASLL RMLKGSPDVY
consensus                   221 QRMWDPVAYA LGFIDCDNmS ARCMLTIFAL FATKTEASLL RMLKGSPDVY

ZDS_[Solanum_lycopersicum]  251 LSGPIKKYIM DKGGRFHLRW GCREVLYETS SDGSMYVSGL AMSKATQKKI
TC2199                      251 LSGPIRKYIT DKGGRFHLRW GCREILYDKA ANAETYVKGL AMSKATDKKV
consensus                   276 LSGPIkKYI  DKGGRFHLRW GCREvLYe     g  YV GL AMSKAT KKi

ZDS_[Solanum_lycopersicum]  301 VKADAYVAAC DVPGIKRLVP QKWRELEFFD NIYKLVGVPV VTVQLRYNGW
TC2199                      301 VQADAYVAAC DVPGIKRLLP SSWREMKIFN NIYALVGVPV VTVQLRYNGW
consensus                   331 V ADAYVAAC DVPGIKRLvP   WREl  F  NIY LVGVPV VTVQLRYNGW

ZDS_[Solanum_lycopersicum]  351 VTELQDLERS RQLKRAAGLD NLLYTPDADF SCFADLALAS PDDYYIEGQG
TC2199                      351 VTELQDLERS RQLRRALGLD NLLYTPDADF SCFADLALTS PEDYYREGQG
consensus                   386 VTELQDLERS RQLkRA GLD NLLYTPDADF SCFADLAL S PdDYY EGQG

ZDS_[Solanum_lycopersicum]  401 SLLQCVLTPG DPYMPLSNDE IIKRVTKQVL ALFPSSQGLE VTWSSVLKIG
TC2199                      401 SLLQCVLTPG DPYMPLPNDE IIRRVAKQVL ALFPSSQGLE VIWSSVVKIG
consensus                   441 SLLQCVLTPG DPYMPL NDE IIkRV KQVL ALFPSSQGLE V WSSVlKIG

ZDS_[Solanum_lycopersicum]  451 QSLYREGPGK DPFRPDQKTP VENFFLAGSY TKQDYIDSME GATLSGRQAS
TC2199                      451 QSLYREGPGK DPFRPDQKTP VKNFFLAGSY TKQDYIDSME GATLSGRQAS
consensus                   496 QSLYREGPGK DPFRPDQKTP V NFFLAGSY TKQDYIDSME GATLSGRQAS

ZDS_[Solanum_lycopersicum]  501 AYICNVGEQL MALRKKITAA ELNDISKGVS LSDELSLV.
TC2199                      501 AYICNAGEEL VALRKQLAAF ESQEQMEAPT TINDELSLV
consensus                   551 AYICN GE L mALRK i A  E nd   g s  s e   vv
```

Figura 24c - Alinhamentos gerados no programa ClustalW, das sequências traduzidas relativa ao gene *ZDS* da via de biossíntese de carotenóides de tomate e o agrupamento de ESTs de *Citrus*. A identidade dos aminoácidos das sequências alinhadas representada em preto, similaridade em cinza e a diferença em branco (Programa Boxshade, http://www.isrec.isb-sib.ch/software/)

```
CRTISO_[Solanum_lycopersicum]   1 LCGLSWGVDK AKGRRGGTVS NLKAVVDVDK RVESYGSSDV EGNESGSYDA
TC19375                         1 .......... .......... .......... .......... ..........
consensus                       1 lcglswgvdk akgrrggtvs nlkavvdvdk rvesygssdv egnesgsyda

CRTISO_[Solanum_lycopersicum]  51 IVIGSGIGGL VAATQLAVKG AKVLVLEKYV IPGGSSGFYE RDGYKFDVGS
TC19375                         1 .......... .......... .......... .......... ..........
consensus                      56 ivigsgiggl vaatqlavkg akvlvlekyv ipggssgfye rdgykfdvgs

CRTISO_[Solanum_lycopersicum] 101 SVMFGFSDKG NLNLITQALA AVGRKLEVIP DPTTVHFHLP NDLSVRIHRE
TC19375                         1 .......... .......... .......... .......... ..........
consensus                     111 svmfgfsdkg nlnlitqala avgrklevip dpttvhfhlp ndlsvrihre

CRTISO_[Solanum_lycopersicum] 151 YDDFIEELVS KFPHEKEGII KFYSECWKIF NSLNSLELKS LEEPIYLFGQ
TC19375                         1 .......... .......... .......... .......... ..........
consensus                     166 yddfieelvs kfphekegii kfysecwkif nslnslelks leepiylfgq

CRTISO_[Solanum_lycopersicum] 201 FFKKPLECLT LAYYLPQNAG SIARKYIRDP GLLSFIDAEC FIVSTVNALQ
TC19375                         1 .......... .......... .......... .......... ..........
consensus                     221 ffkkpleclt layylpqnag siarkyirdp gllsfidaec fivstvnalq

CRTISO_[Solanum_lycopersicum] 251 TPMINASMVL CDRHFGGINY PVGGVGEIAK SLAKGLDDHG SQILYRANVT
TC19375                         1 .......... .......... .......... .......... ..........
consensus                     276 tpminasmvl cdrhfgginy pvggvgeiak slakgldhg sqilyranvt

CRTISO_[Solanum_lycopersicum] 301 SIILDNGKAV GVKLSDGRKF YAKTIVSNAT RWDTFGKLLK AENLPKEEEN
TC19375                         1 .......... .......... .......... .......... ..........
consensus                     331 siildngkav gvklsdgrkf yaktivsnat rwdtfgkllk aenlpkeeen

CRTISO_[Solanum_lycopersicum] 351 FQKAYVKAPS FLSIHMGVKA DVLPPDTDCH HFVLEDDWTN LEKPYGSIFL
TC19375                         1 .......... .....MGVKA EVLPPDTDCH HFVLEDDWNR LEEPYGSIFL
consensus                     386 fqkayvkaps flsihMGVKA dVLPPDTDCH HFVLEDDW   LE PYGSIFL

CRTISO_[Solanum_lycopersicum] 401 SIPTVLDSSL APEGHHILHI FTTSSIEDWE GLSPKDYEAK KEVVAERIIS
TC19375                        36 SIPTVLDSSL APEGQHILHI FTICSIEDWE GLAQKDYDAK KELVADEIIN
consensus                     441 SIPTVLDSSL APEG HILHI FT  SIEDWE GL  KDYeAK KEvVAe II

CRTISO_[Solanum_lycopersicum] 451 RLEKTLFPGL KSSILFKEVG TPKTHRRYLA RDSGTYGPMP RGTPKGLLGM
TC19375                        86 RLENKLFPGL KQSIAFREIG SPKTHRRYLA RDQGTYGPMP RGTPKGLLGM
consensus                     496 RLE  LFPGL K SI FkEvG tPKTHRRYLA RD GTYGPMP RGTPKGLLGM

CRTISO_[Solanum_lycopersicum] 501 PFNTTAIDGL YCVGDSCFPG QGVIAVAFSG VMCAHRVAAD LGEEKKSDVL
TC19375                       136 PFNTTGINGL YCVGDSCFPG QGVIAVAFSG VMCAHRVAAD IGLDKKSPVL
consensus                     551 PFNTTaI GL YCVGDSCFPG QGVIAVAFSG VMCAHRVAAD lG eKKS VL

CRTISO_[Solanum_lycopersicum] 551 DSALLRLLGW LRTLA
TC19375                       186 DAGLLRLLAW LRSMA
consensus                     606 D aLLRLLgW LRtlA
```

Figura 24d - Alinhamentos gerados no programa ClustalW, das sequências traduzidas relativa ao gene *CRTISO* da via de biossíntese de carotenóides de tomate e o agrupamento de ESTs de *Citrus*. A identidade dos aminoácidos das sequências alinhadas representada em preto, similaridade em cinza e a diferença em branco (Programa Boxshade, http://www.isrec.isb-sib.ch/software/)

```
LCYe_[Solanum_lycopersicum]    1 GSDSCVVDKE DFADEEDYIK AGGSQLVFVQ MQQKKDMDQQ SKLSDELRQI SAGQT
TC4815                         1 .......... .......... .......... .......... .MDMFILPPI SIGNS
consensus                      1 gsdscvvdke dfadeedyik aggsqlvfvq mqqkkdmdqq s     L  I S Gqt

LCYe_[Solanum_lycopersicum]   56 VLDLV VIGCGPAGLA LAAESAKLGL NVGLVGPDLP FTNNYGVWED EFKDLGLQAC
TC4815                        15 ILDLV VIGCGPAGLA LAAESAKLGL NVGLIGPDLP FTNNYGVWED EFRDLGLEGC
consensus                     61 vLDLV VIGCGPAGLA LAAESAKLGL NVGLvGPDLP FTNNYGVWED EFkDLGL aC

LCYe [Solanum lycopersicum]  111  IEHVWRDTIV YLDDDEPILI GRAYGRVSRH FLHEELLKRC VEAGVLYLNS KVDR
TC4815                        70  IEHVWRDTVV YIDEDEPILI GRAYGRVSRH LLHEELLRRC VESGVSYLSS KVES
consensus                    121  IEHVWRDTiV YlDdDEPILI GRAYGRVSRH  LHEELLkRC VE GV YL S KVd

LCYe_[Solanum_lycopersicum]  165 IVEATN GQSLVECEGD VVIPCRFVTV ASGAASGKFL QYELGGPRVS VQTAYGVEV
TC4815                       124 ITESTS GHRLVACEHD MIVPCRLATV ASGAASGKLL EYEVGGPKVS VQTAYGVEV
consensus                    181 I E T  G  LV CE D vviPCR  TV ASGAASGK L  YElGGPrVS VQTAYGVEV

LCYe_[Solanum_lycopersicum]  220 E VDNNPFDPSL MVFMDYRDYV FHDAQSLEAK YPTFLYAMPM SPTRVFFEET CLA
TC4815                       179 E VENNPYDPSL MVFMDYRDCT KQEVPSFESD NPTFLYVMPM SSTRVFFEET CLA
consensus                    241 E VdNNPfDPSL MVFMDYRD   r d  S E    PTFLY MPM S TRVFFEET CLA

LCYe_[Solanum_lycopersicum]  274 SKDAMPF DLLKKKLMLR LNTLGVRIKE IYEEEWSYIP VGGSLPNTEQ KTLAFGAA
TC4815                       233 SKDGLPF DILKKKLMAR LERLGIQVLK TYEEEWSYIP VGGSLPNTEQ RNLAYGAA
consensus                    301 SKDamPF DlLKKKLM R L  LGv i    YEEEWSYIP VGGSLPNTEQ k LAfGAA

LCYe_[Solanum_lycopersicum]  329 AS MVHPATGYSV VRSLSEAPKC ASVLANILRQ HYSKNMLTSS .SIPSISTQA WN
TC4815                       288 AS MVHPATGYSV VRSLSEAPNY ASAIAYILKH DHSRGRLTHE QSNENISMQA WN
consensus                    361 AS MVHPATGYSV VRSLSEAP   AS lA ILr    Sk  LT   qS   IS QA WN

LCYe_[Solanum_lycopersicum]  382 TLWPQERK RQRSFFLFGL ALILQLDIEG IRSFFRAFFR VPKWMWQGFL GSSLSSA
TC4815                       342 TLWPQERK RQRAFFLFGL ALILQLDIEG IRTFFRTFFR LPKWMWHGFL GSSLSSA
consensus                    421 TLWPQERK RQR FFLFGL ALILQLDIEG IRsFFR FFR vPKWMW GFL GSSLSSA

LCYe_[Solanum_lycopersicum]  437 DLM LFAFYMFIIA PNDMRKGLIR HLLSDPTGAT LIRTYLTF
TC4815                       397 DLI LFAFYMFIIA PNDLRKCLIR HLVSDPTGAT MVRTYLTL
consensus                    481 DLm LFAFYMFIIA PNDmRK LIR HLlSDPTGAT liRTYLT
```

Figura 24e - Alinhamentos gerados no programa ClustalW, das sequências traduzidas relativa ao gene *LCYε* da via de biossíntese de carotenóides de tomate e o agrupamento de ESTs de *Citrus*. A identidade dos aminoácidos das sequências alinhadas representada em preto, similaridade em cinza e a diferença em branco (Programa Boxshade, http://www.isrec.isb-sib.ch/software/)

```
LCYb_[Solanum_lycopersicum]    1 KHHN....FG SRKFCETLGR SVCVKGSSSA LLELVPETKK ENLDFELPMY DPSKG
TC5                            1 KIQNQELRFG LKKSRQKRNM SCFIKASSSA LLELVPETKK ENLEFELPMY DPSKG
consensus                      1 K  NqelrFG  rK        S  vKgSSSA LLELVPETKK ENLdFELPMY DPSKG

LCYb_[Solanum_lycopersicum]   52 VVVDL AVVGGGPAGL AVAQQVSEAG LSVCSIDPNP KLIWPNNYGV WVDEFEAMDL
TC5                           56 LVVDL AVVGGGPAGL AVAQQVSEAG LSVCSIDPSP KLIWPNNYGV WVDEFEAMDL
consensus                     61 vVVDL AVVGGGPAGL AVAQQVSEAG LSVCSIDP P KLIWPNNYGV WVDEFEAMDL

LCYb [Solanum lycopersicum]  107  LDCLDATWSG AAVYIDDNTA KDLHRPYGRV NRKQLKSKMM QKCIMNGVKF HQAK
TC5                          111  LDCLDTTWSG AVVHIDDNTK KDLDRPYGRV NRKLLKSKML QKCITNGVKF HQAK
consensus                    121  LDCLD TWSG A V IDDNT  KDL RPYGRV NRK LKSKMm QKCI NGVKF HQAK

LCYb_[Solanum_lycopersicum]  161 VIKVIH EESKSMLICN DGITIQATVV LDATGFSRSL VQYDKPYNPG YQVAYGILA
TC5                          165 VIKVIH EESKSLLICN DGVTIQAAVV LDATGFSRCL VQYDKPYNPG YQVAYGILA
consensus                    181 VIKVIH EESKSmLICN DGiTIQA VV LDATGFSR L VQYDKPYNPG YQVAYGILA

LCYb_[Solanum_lycopersicum]  216 E VEEHPFDVNK MVFMDWRDSH LKNNTDLKER NSRIPTFLYA MPFSSNRIFL EET
TC5                          220 E VEEHPFDLDK MVFMDWRDSH LNNNSELKEA NSKIPTFLYA MPFSSNRIFL EET
consensus                    241 E VEEHPFDv K MVFMDWRDSH L NNtdLKE  NSrIPTFLYA MPFSSNRIFL EET

LCYb_[Solanum_lycopersicum]  270 SLVARPG LRIDDIQERM VARLNHLGIK VKSIEEDEHC LIPMGGPLPV LPQRVVGI
TC5                          274 SLVARPG VPMKDIQERM VARLKHLGIK VRSIEEDEHC VIPMGGPLPV LPQRVVGI
consensus                    301 SLVARPG l i DIQERM VARL HLGIK VkSIEEDEHC lIPMGGPLPV LPQRVVGI

LCYb_[Solanum_lycopersicum]  325 GG TAGMVHPSTG YMVARTLAAA PVVANAIIQY LGSERSHSGN ELSTAVWKDL WP
TC5                          329 GG TAGMVHPSTG YMVARTLAAA PIVANAIVRS LSSDRSISGH KLSAEVWKDL WP
consensus                    361 GG TAGMVHPSTG YMVARTLAAA PvVANAIi   L SeRS SG   LS  VWKDL WP

LCYb_[Solanum_lycopersicum]  379 IERRRQRE FFCFGMDILL KLDLPATRRF FDAFFDLEPR YWHGFLSSRL FLPELIV
TC5                          383 IERRRQRE FFCFGMDILL KLDLPATRRF FDAFFDLEPR YWHGFLSSRL FLPELLV
consensus                    421 IERRRQRE FFCFGMDILL KLDLPATRRF FDAFFDLEPR YWHGFLSSRL FLPELiV

LCYb_[Solanum_lycopersicum]  434 FGL SLFSHASNTS RFEIMTKGTV PLVNMINNLL QDKE
TC5                          438 FGL SLFSHASNTS RLEIMAKGTL PLVNMINNLV QDTD
consensus                    481 FGL SLFSHASNTS R EIM KGTv PLVNMINNLl QD e
```

Figura 24f - Alinhamentos gerados no programa ClustalW, das sequências traduzidas relativa ao gene *LCY*β da via de biossíntese de carotenóides de tomate e o agrupamento de ESTs de *Citrus*. A identidade dos aminoácidos das sequências alinhadas representada em preto, similaridade em cinza e a diferença em branco (Programa Boxshade, http://www.isrec.isb-sib.ch/software/)

```
HYb_[Solanum_lycopersicum]   1 RRKPRLAVCF VLENEKLNST IESESEVIED RIQVEINEEK SLAASWLAEK LARKK
TC8364                       1 RKLNSFTVCF VLEEKKQSTQ IETFTDEEEE ESGTQIS... ..TAARVAEK LARKR
consensus                    1 Rr     VCF VLE  K  s  IEs se  Ed      I eek sl A  lAEK LARKk

HYb_[Solanum_lycopersicum]  56 SERFT YLVAAVMSSL GITSMAILAV YYRFSWQMEG GEVPFSEMLA TFTLSFGAAV
TC8364                      51 SERFT YLVAAVMSSF GITSMAVMAV YYRFWWQMEG GEVPLAEMFG TFALSVGAAV
consensus                   61 SERFT YLVAAVMSS  GITSMAilAV YYRF WQMEG GEVP  EM a TF LS GAAV

HYb_[Solanum_lycopersicum] 111  GMEYWARWAH RALWHASLWH MHESHHRPRE GPFEMNDVFA ITNAVPAIAL LSYG
TC8364                     106  GMEFWARWAH KALWHASLWH MHESHHRPRE GPFELNDVFA IINAVPAIAL LSFG
consensus                  121  GMEyWARWAH rALWHASLWH MHESHHRPRE GPFEmNDVFA I NAVPAIAL LSyG

HYb_[Solanum_lycopersicum] 165 FFHKGI VPGLCFGAGL GITVFGMAYM FVHDGLVHKR FPVGPIANVP YFRRVAAAH
TC8364                     160 FFHKGL VPGLCFGAGL GITVFGMAYM FVHDGLVHKR FPVGPIADVP YFRRVAAAH
consensus                  181 FFHKGi VPGLCFGAGL GITVFGMAYM FVHDGLVHKR FPVGPIA VP YFRRVAAAH

HYb_[Solanum_lycopersicum] 220 Q LHHSDKFDGV PYGLFLGPKE LEEVGGLEEL EKEVNRRIKI SKGIL.
TC8364                     215 Q LHHSDKFHGV PYGLFLGPKE LEEVGGLEEL EKEISKRIKS YNRVPK
consensus                  241 Q LHHSDKF GV PYGLFLGPKE LEEVGGLEEL EKEv rRIK     l k
```

Figura 24g - Alinhamentos gerados no programa ClustalW, das sequências traduzidas relativa ao gene *HY*β da via de biossíntese de carotenóides de tomate e o agrupamento de ESTs de *Citrus*. A identidade dos aminoácidos das sequências alinhadas representada em preto, similaridade em cinza e a diferença em branco (Programa Boxshade, http://www.isrec.isb-sib.ch/software/)

```
ZEP_[Solanum_lycopersicum]   1 VKGVKVKATI AEAPVTPTEK TDSGANGDLK VPQKKLKVLV AGGGIGGLVF ALAAK
TC19033                      1 .......... .......... .......... .......... .......... .....
consensus                    1 vkgvkvkati aeapvtptek tdsgangdlk vpqkklkvlv agggigglvf alaak

ZEP_[Solanum_lycopersicum]  56 KRGFD VLVFERDLSA IRGEGQYRGP IQIQSNALAA LEAIDLDVAE DIMNAGCITG
TC19033                      1 ..... .......... .......... .......... .......... ..MRAGCVTG
consensus                   61 krgfd vlvferdlsa irgegqyrgp iqiqsnalaa leaidldvae diM AGCiTG

ZEP_[Solanum_lycopersicum] 111  QRINGLVDGI SGNWYCKFDT FTPAVERGLP VTRVISRMTL QQILARAVGE EIIM
TC19033                      9  DRINGLVDGI SGSWYIKFDT FTPAAEKGLP VTRVISRMTL QQILAKAVGD EIIL
consensus                  121   RINGLVDGI SG WY KFDT FTPA ErGLP VTRVISRMTL QQILArAVGe EIIm

ZEP_[Solanum_lycopersicum] 165 NESNVV DFEDDGEKVT VVLENGQRFT GDLLVGADGI RSKVRTNLFG PSEATYSGY
TC19033                     63 NESNVI DFKDHGDKVS VVLENGQCYA GDLLIGADGI WSKVRKNLFG PQEAIYSGY
consensus                  181 NESNVv DF D GeKVt VVLENGQ f  GDLLvGADGI  SKVR NLFG P EA YSGY

ZEP_[Solanum_lycopersicum] 220 T CYTGIADFVP ADIDTVGYRV FLGHKQYFVS SDVGGGKMQW YAFYNEPAGG ADA
TC19033                    118 T CYTGIADFVP ADIESVGYRV FLGHKQYFVS SDVGAGKMQW YAFHKEPAGG VDG
consensus                  241 T CYTGIADFVP ADIdtVGYRV FLGHKQYFVS SDVGgGKMQW YAF  EPAGG  Da

ZEP_[Solanum_lycopersicum] 274 PNGKKER LLKIFGGWCD NVIDLLVATD EDAILRRDIY DRPPTFSWGR GRVTLLGD
TC19033                    172 PEGKKER LLKIFEGWCD NVVDLILATD EEAILRRDIY DRTPIFTWGR GRVTLLGD
consensus                  301 P GKKER LLKIF GWCD NViDLlvATD EdAILRRDIY DR P FsWGR GRVTLLGD

ZEP_[Solanum_lycopersicum] 329 SV HAMQPNLGQG GCMAIEDSYQ LALELEKACS RSAEFGSPVD IISSLRSYES AR
TC19033                    227 SV HAMQPNLGQG GCMAIEDGYQ LAVELEKACK KSNESKTPID IVSALKSYER AR
consensus                  361 SV HAMQPNLGQG GCMAIED YQ LAlELEKAC  rS E  sPvD IiS LrSYE  AR

ZEP_[Solanum_lycopersicum] 383 KLRVGVIH GLARMAAIMA STYKAYLGVG LGPLSFLTQY RIPHPGRVGG RVFIDLG
TC19033                    281 RLRVAVIH GLARSAAVMA STYKAYLGVG LGPLSFLTKF RIPHPGRVGG RFFIDLT
consensus                  421 kLRVgVIH GLAR AAiMA STYKAYLGVG LGPLSFLT y RIPHPGRVGG R FIDL

ZEP_[Solanum_lycopersicum] 438 MPL MLSWVLGGNG DKLEGRIKHC RLSEKANDQL RKWFEDDDAL ERATDAEWLL L
TC19033                    336 MPL MLSWV..... .......... .......... .......... .......... .
consensus                  481 MPL MLSWVlggng dklegrikhc rlsekandql rkwfedddal eratdaewll l

ZEP_[Solanum_lycopersicum] 492 PAGNGSSGL EAIVLSRDED VPCTVGSISH TNIPGKSIVL PLPQVSEMHA RISCKD
TC19033                        .......... .......... .......... .......... .......... ......
consensus                  541 pagngssgl eaivlsrded vpctvgsish tnipgksivl plpqvsemha risckd

ZEP_[Solanum_lycopersicum] 547 GAFF VTDLRSEHGT WVTDNEGRRY RTSPNFPTRF HPSDVIEFGS DKAAFRVKAM
TC19033                        .... .......... .......... .......... .......... ..........
consensus                  601 gaff vtdlrsehgt wvtdnegrry rtspnfptrf hpsdviefgs dkaafrvkam

ZEP_[Solanum_lycopersicum] 601 KFPLKTSERK EEREAVEAA
TC19033                        .......... .........
consensus                  661 kfplktserk eereaveaa
```

Figura 24h - Alinhamentos gerados no programa ClustalW, das sequências traduzidas relativa ao gene *ZEP* da via de biossíntese de carotenóides de tomate e o agrupamento de ESTs de *Citrus*. A identidade dos aminoácidos das sequências alinhadas representada em preto, similaridade em cinza e a diferença em branco (Programa Boxshade, http://www.isrec.isb-sib.ch/software/)

5.4 Desenvolvimento de iniciadores gene-específico para via de carotenóides

Foram desenhados iniciadores específicos dos oito genes da via de carotenóides em *Citrus sinensis* [L.] Osbeck, (Tabela 1), a partir da sequência gênica traduzida. Seguida a construção de iniciadores, foi realizada a extração de RNA total das amostras de tecidos/órgãos (primeiro experimento) em duplicata biológica e das amostras de polpa dos frutos (segundo experimento) das laranjas pigmentadas (‘SM’ e ‘CC’) e da laranja controle ‘P’ em triplicata biológica, nos diferentes locais (Cordeirópolis - CCSM, Mogi - Mirim - MM e São Bento do Sapucaí - SBS) e tempos de coleta (270, 300 e 330 DAF), que foram então analisadas por eletroforese em gel de agarose (Figuras 25 e 26), respectivamente e quantificado em espectrofotômetro. Depois de confirmada a integridade do RNA total, as amostras foram submetidas à síntese de cDNA por RT-PCR.

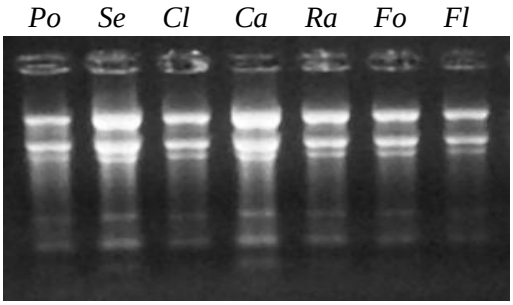

Figura 25 - RNA total da variedade pigmentada ‘SM’ de laranja obtido pelo protocolo Tao et al. (2004), com modificações (1ª repetição biológica). Amostras de tecidos/órgãos: polpa (*Po*), semente (*Se*), caule (*Cl*), casca (*Ca*), raiz (*Ra*), folha (*Fo*) e flor (*Fl*)

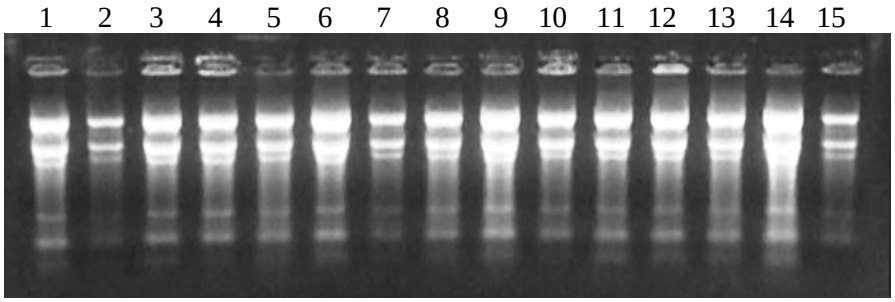

Figura 26 - RNA total de polpa do fruto das variedades pigmentadas ‘SM’ e ‘CC’ e da variedade controle ‘P’ de laranja obtido pelo protocolo Tao et al. (2004), com modificações (1ª repetição biológica). Amostras de polpa de fruto: P CCSM 270 DAF (1), CC CCSM 270 DAF (2), SM CCSM 270 DAF (3), SM SBS 270 DAF (4), SM MM 270 DAF (5), P CCSM 300 DAF (6), CC CCSM 300 DAF (7), SM CCSM 300 DAF (8), SM SBS 300 DAF (9), SM MM 300 DAF (10), P CCSM 330 DAF (11), CC CCSM 330 DAF (12), SM CCSM 330 DAF (13), SM SBS 330 DAF (14), SM MM 330 DAF (15)

Para validar a eficiência da síntese de cDNA, as amostras do primeiro e segundo ensaio foram utilizadas com DNA molde para as amplificações com o iniciador de referência (*housekeeping gene*) *EF*. Os produtos da amplificação foram separados e visualizados por eletroforese em gel de agarose (Figuras 27 e 28).

Em seguida, para confirmar a identidade dos produtos de amplificação (*amplicom*) dos iniciadores dos genes da via de carotenóides foi realizada uma amplificação com os oito iniciadores específicos empregando o cDNA da variedade pigmentada 'SM' como DNA molde, visando à clonagem, transformação e o sequenciamento. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose, cada fragmento obtido foi excisado do gel, clonado, transformado e sequenciado.

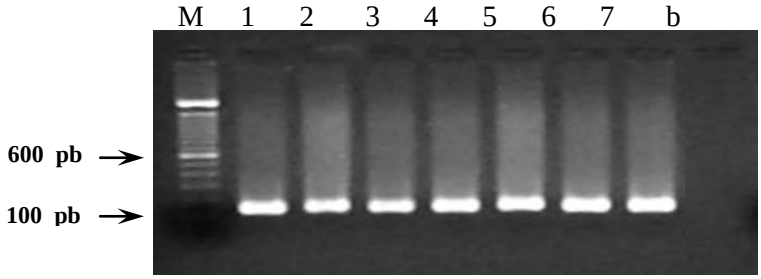

Figura 27 - Amplificação dos tecidos/órgãos com o iniciador de referência *EF*. (M) marcador de peso molecular 100 pb, (1) Po; (2) Se; (3) Cl; (4) Ca; (5) Ra; (6) Fo; (7) Fl e (7) branco

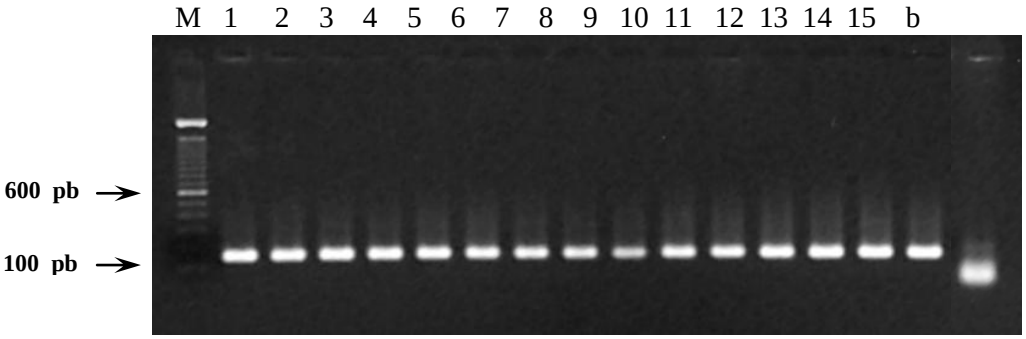

Figura 28 - Amplificação dos tecidos/órgãos com o iniciador de referência *EF*. (M) marcador de peso molecular 100 pb, (1) P CCSM 270 DAF, (2) CC CCSM 270 DAF, (3) SM CCSM 270 DAF, (4) SM SBS 270 DAF, (5) SM MM 270 DAF, (6) P CCSM 300 DAF, (7) CC CCSM 300 DAF, (8) SM CCSM 300 DAF, (9) SM SBS 300 DAF, (10) SM MM 300 DAF, (11) P CCSM 330 DAF, (12) CC CCSM 330 DAF, (13) SM CCSM 330 DAF, (14) SM SBS 330 DAF e (15) SM MM 330 DAF

Para avaliar a presença de íntron na sequência os iniciadores específicos (Tabela 1) foram utilizados os cDNAs das variedades de polpa clara ‘P’ e vermelha ‘SM’ (segundo experimento) e DNA genômico da laranja ‘P’. Dos oito pares de iniciadores dos genes (*PSY*, *PDS*, *ZDS*, *CRTISO*, *LCY*ε, *LCY*β, *HY*β e *ZEP*) testados somente o *LCY*ε não amplificou. Os demais genes amplificaram as sequências de cDNAs e de DNA genômico, foi observado que não houve diferença de tamanho do *amplicom* (Figuras 29 e 30). Já os genes *ZDS* e *ZEP* ambos amplificaram, mas o tamanho do *amplicom* na sequência genômica foi maior que nos cDNAs, isso indica a presença de um íntron na sequência (Figuras 29 e 30).

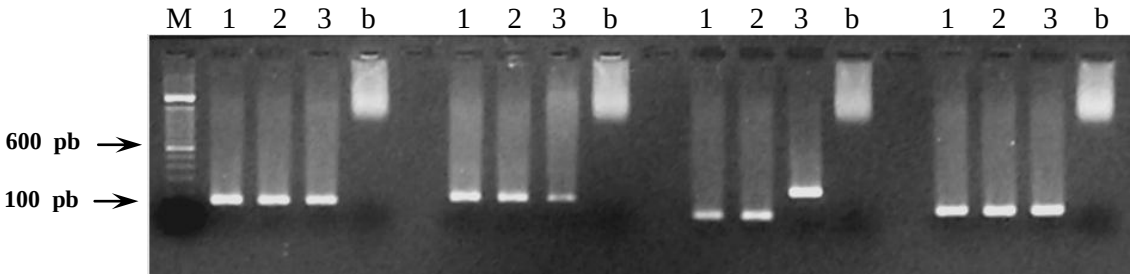

Figura 29 - Amplificação dos genes alvos *PSY*, *PDS*, *ZDS* e *LCY*β a partir dos cDNAs de ‘P’ (1) e de ‘SM’ (2), DNA genômico de P (3) e controle negativo (b)

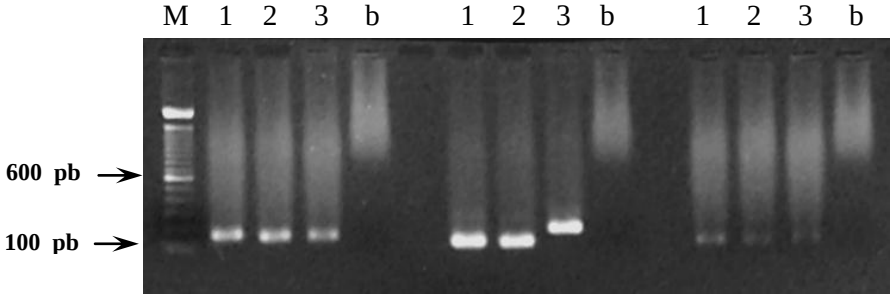

Figura 30 - Amplificação dos genes alvos *HY*β, *ZEP* e *CRTISO* a partir dos cDNAs de polpa clara ‘P’ (1) e de polpa vermelha ‘SM’ (2), DNA genômico de ‘P’ (3) e controle negativo (b)

Após as análises individuais das sequências no BLAST pelo *Orange Gene Index*, foi observado que os sete produtos de amplificação referentes aos genes-alvo de citros tiveram a sua identidade confirmada no banco de dados.

5.5 Quantificação de transcritos reversos dos genes da via de carotenóides

5.5.1 Análise de quantificação dos transcritos dos genes de carotenóides nos tecidos/órgãos

Os iniciadores específicos para os genes de *Citrus* foram utilizados na análise de expressão gênica por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR). Foi utilizado cDNA de polpa da variedade pigmentada 'SM', diluído serialmente a 10^{-1}, 10^{-2} e 10^{-3} para determinação da eficiência de amplificação, R^2 e curva de dissociação.

Todos os oito pares de iniciadores (*PSY*, *PDS*, *ZDS*, *CRTISO*, *LCY*ε, *LCY*β, *HY*β e *ZEP*) foram considerados como funcionais na validação. A eficiência de amplificação (E) foi de aproximadamente 2, variando de 1,96 (gene *LCY*β) a 2,09 (*PSY*), com coeficiente R^2 maior que 0,99. Os valores médios de C_T gerados nas corridas foram de 19,4 a 28,7. O uso de iniciadores derivados da sequência de ESTs/*clusters* a eles associados para confirmar a variação de expressão de transcritos tem sido empregado em experimentos de RT-PCR semi-quantitativo (ASAMIZU et al., 2005), *northern blot* (FREGENE et al., 2004) ou RT-qPCR (PAPINI-TERZI et al., 2005).

Para se calcular o valor de expressão dos genes foram necessários os valores de eficiência da reação e o CT das amostras na amplificação (BUSTIN et al., 2005; FREEMAN; WALKER; VRANA, 1999). O C_T não indica diretamente a mensuração da sua transcrição, pois esta depende também da eficiência da amplificação obtida para este gene (ou cDNA) com os iniciadores específicos (PFAFFL, 2001). Este método de análise foi considerado relativo, uma vez que a transcrição do gene de interesse não será expressa em número absoluto de transcritos da amostra, porém será expresso em termos da quantidade relativa de transcritos em relação a outro gene expresso e constante, denominado gene de referência. A quantificação consiste em obter a razão de expressão entre um gene-alvo (de interesse) numa amostra de cDNA, em relação a outro denominado gene de referência para a mesma amostra de cDNA (PFAFFL, 2001). De acordo com Pfaffl (2001), o método relativo de quantificação foi adequado para a investigação de mudanças fisiológicas em termos de expressão gênica. As tendências e processos biológicos podem ser mais bem explicados por este método, porém os resultados obtidos dependem do gene de referência escolhido e dos procedimentos de normalização utilizados.

Os genes de referência mais utilizados experimentalmente geralmente são responsáveis por funções universais de importância para a manutenção do funcionamento celular, cuja expressão já foi tida como constante através dos estádios de desenvolvimento, tipos celulares/tecidos e condições fisiológicas. É importante que o gene de referência selecionado para ser o referencial da quantificação relativa mantenha uma expressão constante nas condições experimentais. Bas et al. (2004) demonstraram que a escolha equivocada do gene de referência pode resultar na alteração da validação biológica de genes de interesse. Dentre os genes-candidato para uso como referência neste experimento (Tabela 2), os genes *IF3*, *IF5A* e *Rpl35* se destacaram nas análises realizadas nos programas *Genorm* e *NormFinder*, por apresentarem a menor variação quantitativa de expressão nas amostras de tecidos/órgãos de citros analisados (dados não apresentados).

O nível de transcritos dos genes da via de carotenóides nos diversos tecidos/órgãos foi estimado de forma relativa aos genes de referências *IF3*, *IF5A* e *Rpl35*, analisados por RT-qPCR, e como referência da análise foi utilizado arbitrariamente o cDNA da polpa do fruto de 'SM', o tecido-alvo para o experimento seguinte. Segundo Pfaffl (2001) o modelo de quantificação relativa inclui além do gene de referência, uma amostra de referência (cDNA controle) para a determinação do valor de expressão do gene alvo.

A análise de RT-qPCR dos genes da via de carotenóides teve a finalidade de medir o nível de transcritos dos genes nos diferentes tecidos/órgãos da variedade pigmentada 'SM' (*Se*, *Cl*, *Ca*, *Ra*, *Fo*, *Fl*) em relação ao tecido/órgão polpa (*Po*). A análise foi para identificar a especificidade o(s) gene(s) em um tecido/órgão ou grupo de tecidos. Os valores de expressão acima de 1 indicaram o aumento no número de transcritos dos genes nos diferentes tecidos/órgãos e os valores abaixo de 1 indicaram maior quantidade de transcritos no tecido controle polpa (*Po*).

Em relação aos genes da via, os tecidos/órgãos (*Po*, *Se*, *Cl*, *Ca*, *Ra*, *Fo*, *Fl*) que apresentaram maior número de transcritos dos genes quando comparados à polpa foram folha, seguido da flor, caule, semente, casca e raiz (Figura 28). Em laranja doce, o perfil de expressão dos ESTs identificados *in silico* nos tecidos/órgãos foi maior na polpa do fruto, seguindo pela folha, depois a flor, casca e por fim, na semente (CHEN et al., 2010).

Na casca e no fruto fresco da laranja Cara-Cara, acúmulo dos transcritos dos genes de biossíntese de carotenóides foi maior durante o desenvolvimento e maturação dos frutos, quando comparados a laranja controle Washington Navel. A acumulação dos transcritos dos genes *ZDS* e *LCY*β foi ligeiramente maior na casca de Cara-Cara em relação a controle, mas não havia diferenças na acumulação de transcritos destes genes nos demais tecidos, de ambas

as variedades. Análise de quantidade de transcritos do gene *LCY*β foi diferencialmente observada entre a variedade pigmentada Cara-Cara e a controle, com polpa clara (ALQUEZAR; RODRIGO; ZACARÍAS, 2008).

No presente estudo, o primeiro gene da via *PSY* apresentou maior número de transcritos na folha, casca e caule; e menor número de transcritos na semente, raiz e flor em relação ao tecido polpa dos frutos da variedade pigmentada 'SM' (Figura 31). A expressão do gene *PSY* aumentou na casca e na polpa durante o amadurecimento do fruto de laranja Cara-Cara (IKOMA et al., 2001; KIM et al., 2001; TAO et al., 2007), o que corrobora os dados obtidos no presente trabalho (Figura 28).

Em tomate, os transcritos dos genes *PSY*I e *PSY*II foram detectados em vários tecidos avaliados (raiz, folha, sépala, pétala, antera, ovário e fruto), com exceção da raiz, que não apresentou os transcritos de *PSY*I. A quantidade de transcritos de *PSY*I foi maior no fruto, durante o amadurecimento, e os de *PSY*II, foram maiores em pétalas, em relação às folhas (FRAY; GRIERSON, 1993; GIORIO; STIGLIANI; D'AMBROSIO, 2008). Concluiu-se, que os transcritos de *PSY*I têm função direta na coloração do fruto durante o amadurecimento, e os de *PSY*II estão mais envolvidos na fotossíntese, na foto-oxidação e na formação de ácido abscísico (GIORIO; STIGLIANI; D'AMBROSIO, 2008).

Os resultados observados no presente trabalho sugerem que o comportamento do gene *PSY* em *Citrus* parece estar mais relacionado aos transcritos de *PSY*II do que os de *PSY*I, porque o gene *PSY* acumulou maior número de transcritos na folha em relação aos demais tecidos (Figura 31). Os genes *PSY*I e *PSY*II em tomate não apresentam diferenças na região central da sequência (região conservada). Para se distinguir as isoformas seria necessário alinhar as sequências de *Citrus* na região 5' ou 3'-UTR do gene em tomate, mas não foi possível encontrar em laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) uma sequência que cobrisse a região UTR. Provavelmente os iniciadores foram desenhados em uma sequência de *PSY* que não é específico de fruto, mas que tem uma expressão em todos os tecidos.

O gene *PDS* teve um aumento no nível de transcritos somente na folha e uma diminuição na semente, flor, raiz, caule e casca, em relação à expressão na polpa dos frutos. O *ZDS* apresentou um elevado número de transcritos na folha e uma diminuição no número dos transcritos no caule, flor, raiz, semente e folha. Enquanto que o gene *CRTISO* teve um aumento no número de transcritos na raiz e caule e nos demais tecidos, observou-se uma diminuição em relação ao tecido controle, a polpa (Figura 31). O gene *PDS* teve sua expressão aumentada na polpa do fruto durante a maturação, mas depois do fruto amadurecido manteve-se constante (KIM et al., 2001; KITA et al., 2001).

O gene *LCY*ε apresentou um maior número de transcritos em todos os tecidos, em relação aos transcritos da polpa. Já o gene *LCY*β teve um aumento no número de transcritos em todos os tecidos, com exceção de flor (Figura 31). Ambos os transcritos de *LCY* foram detectados nas folhas de laranja doce (RODRIGO; MARCOS; ZACARÍAS, 2004).

Em laranja amarela e em pomelos pigmentados foram identificados dois genes *LCY*β, o *LCY*β-1 e o *LCY*β-2 (ALQUÉZAR; ZACARÍAS; RODRIGO, 2008). Os transcritos do gene *LCY*β-1 foram detectados nas folhas, raízes, pétalas e polpa dos frutos, enquanto que os do gene *LCY*β-2 foram dificilmente detectáveis nos tecidos verdes. Durante a maturação dos frutos, a expressão de *LCY*β-2 foi altamente induzida, em ambos os tecidos: casca e polpa, em contraste com o *LCY*β-1, cuja expressão foi constante durante o processo (ALQUÉZAR; ZACARÍAS; RODRIGO, 2008).

Além disto, os autores afirmam ter identificado dois alelos do gene *LCY*β-2, sendo que um deles é não funcional. Curiosamente, a laranja Washington Navel (polpa clara) expressa preferencialmente o alelo funcional enquanto que o pomelo pigmentado Star Ruby, predominantemente expressa o alelo *LCY*2β não funcional, durante a maturação dos frutos. Assim, conclui-se que a presença de diversos alelos do gene *LCY*2, que codificam para enzimas com atividades alteradas, pode se constituir num mecanismo regulatório adicional da síntese de carotenóides e pode resultar no acúmulo de licopeno (ALQUÉZAR; ZACARÍAS; RODRIGO, 2008).

O gene *HY*β foi mais expresso em todos os tecidos/órgãos que em polpa (Figura 28). O mesmo gene também foi descrito em tomate, resultando no acúmulo dos transcritos em pétalas e folhas (GIORIO; STIGLIANI; D'AMBROSIO, 2008). O gene *ZEP* apresentou um aumento no nível de transcritos nos tecidos de folha, flor, semente e caule; bem como uma diminuição no número de transcritos na casca e na raiz (Figura 28).

Em geral, os genes *PDS*, *ZDS*, *LCY*β-1, e *LCY*ε mostraram um perfil de expressão semelhante em tecidos dos frutos (polpa e casca) da laranja Washington Navel e o pomelo Star Ruby (pigmentado), enquanto que diferenças foram detectadas nos genes *PSY*, *LCY*β-2, *HY*β e *ZEP*.

Na polpa, os transcritos dos genes *PSY* e *ZEP* mostraram diferenças menores entre as duas variedades, mas com acúmulo sempre maior no pomelo Star Ruby. Já para os genes *LCY*β-2 e *HY*β as diferenças observadas entre as duas variedades foram muito mais nítidas (ALQUÉZAR; ZACARÍAS; RODRIGO, 2008).

Em resumo, na polpa da laranja vermelha ‘SM’ os genes *PSY*, *PDS*, *ZDS*, *CRTISO* e *LCY*β foram os que apresentaram maior número de transcritos, enquanto que os *LCY*ε, *HY*β e *ZEP* tiveram menor acúmulo. Estes genes que apresentaram maior número de transcritos estão relacionados à síntese dos pigmentos carotenos (principalmente licopeno e β-caroteno)

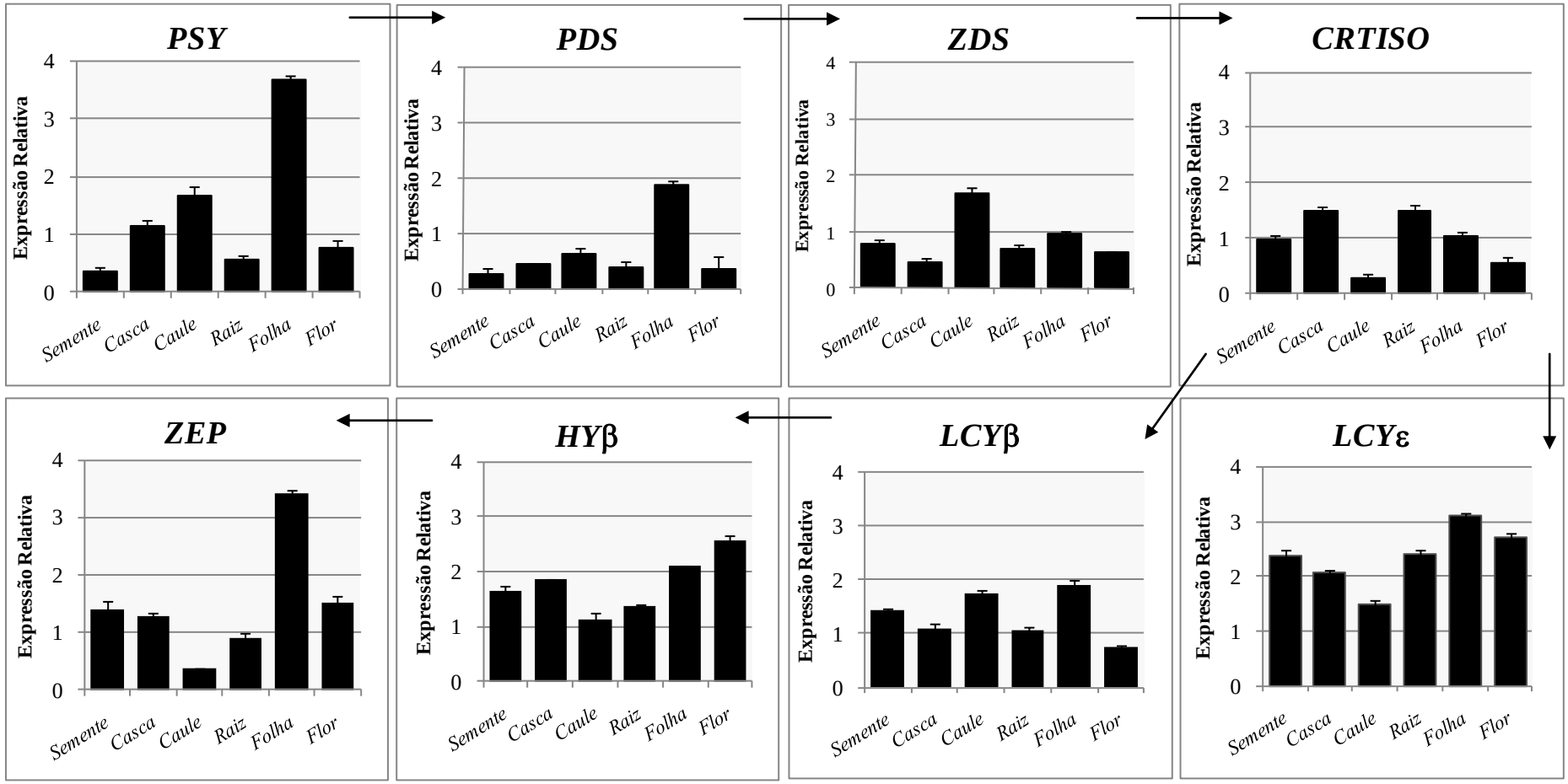

Figura 31 - Expressão relativa dos genes da via de biossíntese de carotenóides nos diferentes tecidos/órgãos em relação ao tecido polpa da variedade 'SM' calculada empregando o programa REST2009. Valores médios e o desvio padrão (barra). Eixo X: tecidos/órgãos da variedade pigmentada 'SM'. Eixo Y: expressão relativa, indicando o número de vezes que o gene é expresso nos diferentes tecidos/órgãos em relação ao tecido Polpa. As setas indicam a sequências dos genes na via de carotenóides.

5.5.2 Análise de quantificação dos transcritos dos genes de carotenóides na polpa dos frutos

Foi investigada a expressão diferencial dos genes da via de carotenóides por RT-qPCR nas variedades ‘P’, ‘CC’ e ‘SM’, com coletas em três locais e em três tempos (estádios de maturação). Foram testados os oito pares de iniciadores dos genes de *Citrus* utilizando o cDNA específico para cada análise (efeito de variedade ou local em função do estádio de maturação), diluídos serialmente a 10^{-1}, 10^{-2} e 10^{-3} para determinar a eficiência de amplificação (E) e o coeficiente R^2 obtido na curva de diluições.

Todos os oito iniciadores testados foram considerados funcionais, com eficiência de amplificação variando entre 1,85 (gene *LCY*ε) a 2,04 (*ZEP*) e coeficiente R^2 maiores que 0,99. Os valores médios de C_t foram de 17,14 a 26,47.

Os genes de referência não devem ser empregados nas mensurações quantitativas via PCR em Tempo Real sem serem previamente testados para as condições experimentais específicas, e avaliados quanto ao objetivo (hipótese) da aplicação (HUGGETT et al., 2005). Dentre os genes candidatos a referência (Tabela 2), os três genes *IF3*, *MDH* e *PHS* se destacaram nas análises realizadas nos programas *Genorm* e *NormFinder*, por apresentarem menor variação quantitativa na expressão nas amostras de polpa de laranja, portanto foram considerados como genes-referência para o experimento seguinte.

5.5.2.1 Perfil dos transcritos dos genes da via entre as variedades (polpa clara e polpa vermelha)

As análises de expressão na polpa de frutos de diferentes variedades (‘P’, ‘CC’ e ‘SM’), com coletas no mesmo local Cordeirópolis (CCSM) e diferentes estádios de maturação (270, 300 e 330 DAF) tiveram como finalidade quantificar o nível de transcritos dos genes da via de carotenóides nas variedades de polpa vermelha (‘CC’ e ‘SM’) em relação aos de laranja de polpa clara ‘P’, para identificar um padrão diferenciado do perfil de expressão de genes dessa via.

No processo de desenvolvimento e amadurecimento do fruto, ocorre a formação de carotenóides, em consequência da evolução dos cloroplastos a cromoplastos (organelas

associadas ao acúmulo de carotenóides) (FRASER; SCHUCH; BRAMLEY, 2000; RODRIGO; MARCOS; ZACARÍAS, 2004). Durante o amadurecimento do fruto, a expressão de alguns genes (principais responsáveis pela síntese de carotenos) da biossíntese de carotenóides é aumentada, o que indica que a regulação transcricional é um importante aspecto no controle de formação dos metabólitos nos tecidos (RÖMER et al., 1993).

Fazendo uma análise mais detalhada da via de biossíntese de carotenóides, foi observado que os genes *PSY* e *PDS* na variedade pigmentada 'CC' não tiveram alteração no número de transcritos em relação ao seu controle 'P' em todos os tempos de coleta. Já os mesmos genes na variedade 'SM' tiveram um aumento gradativo no número de transcritos durante as coletas (270, 300 e 330 DAF) em relação ao controle (laranja de polpa clara) (Figura 32). Os maiores níveis de expressão desses genes refletem o maior acúmulo de fitoflueno na laranja pigmentada 'SM' (Figura 18).

A super expressão do gene *PSY* e do *PDS* elevou o conteúdo de carotenóide, estes genes exercem o máximo de controle no fluxo dos metabólitos, por serem os precursores da via, resultados obtidos em tomate (BUSCH; SEUTER; HAIR, 2002; FRASER et al., 1994; FRASER et al., 1995; FRASER; SCHUCH; BRAMLEY, 2000; GIULIANO; BARTLEY; SCOLNIK, 1993; PECKER et al., 1992) e pimenta (RÖMER et al., 1993). Em laranja doce, foi demonstrado que há um aumento na expressão do gene *PSY* no início da coloração da fruta aumentando assim a síntese de carotenos lineares e fluxo para dentro da via, confirmando assim o papel do *PSY* na regulação global da produção de carotenóides (IKOMA et al., 2001; KATO et al., 2004; KIM et al., 2001; RODRIGO; MARCOS; ZACARÍAS, 2004; ZHANG et al., 2012). No amadurecimento dos frutos de melão, os transcritos do gene *PSY* estavam presentes em quantidades baixas nos frutos verdes, atingindo níveis mais elevados quando os frutos começaram a amadurecer, e depois os níveis se mantiveram baixo durante os estádios posteriores da maturação (KARVOUNI et al., 1995).

Os genes precursores de licopeno e β-caroteno; *ZDS*, *CRTISO* e *LCY*β tiveram um discreto aumento no número de transcritos na variedade de polpa vermelha 'CC', em relação a controle, em todos os tempos de coleta (Figura 32). A outra variedade de polpa vermelha, 'SM' apresentou o nível de expressão seis vezes maior que o controle (laranja de polpa clara) no tempo 330 DAF, enquanto que os genes *CRTISO* e *LCY*β tiveram um padrão gradativo de aumento de transcritos nos três tempos avaliados (Figura 32). O acúmulo diferenciado de licopeno e β-caroteno entre as duas variedades de polpa vermelha podem estar relacionados aos diferentes níveis de expressão dos genes *ZDS*, *CRTISO* e *LCY*β (Figuras 18 e 32).

O fluxo da via para o acúmulo de luteína é dependente da expressão do gene *LCY*ε. Os maiores níveis de luteína encontrados em laranja de polpa clara 'P' refletem a maior expressão do gene *LCY*ε quando comparada as variedades pigmentadas (Figuras 18 e 32). Entre as laranjas vermelhas, a 'CC' não teve aumento no número de transcritos a 270 e nem 300 DAF, mas teve uma diminuição a 330 DAF. No caso da variedade 'SM' teve uma discreta diminuição no nível de transcritos ao longo do tempo de coleta (Figura 32). O acúmulo de licopeno em tomate se dá pela diminuição na expressão de dois genes da via o *LCY*ε e o *LCY*β (RONEN et al., 1999). No entanto, no presente trabalho foram encontrados apenas níveis reduzidos de transcritos do gene *LCY*ε (Figura 32).

A menor quantidade de transcritos dos genes *HY*β e *ZEP* nas variedades pigmentadas 'CC' e 'SM' levou ao menor acúmulo nos níveis de zeaxantina e violaxantina quando comparada a laranja de polpa clara 'P' (Figuras 32 e 18).

Em laranja doce, foi demonstrado que durante o desenvolvimento dos frutos, a expressão diferencial dos genes ao nível transcricional explica as diferenças no acúmulo dos carotenóides (KATO et al., 2004; RODRIGO; MARCOS; ZACARIAS, 2004). Kato et al. (2004) estudaram a expressão dos genes da via de biossíntese utilizando vários genótipos pertencentes a diferentes espécies. Estes autores demonstraram que o mecanismo que leva à diversidade na composição de xantofilas entre tangerina *Satsuma* e laranja Valência é devido à especificidade do substrato de *HY*β e ao desequilíbrio de expressão dos genes acima da via (*PSY*, *PDS*, *ZDS*, e *LCY*β) e dos genes abaixo (*HY*β e *ZEP*). A regulação da expressão do gene ao nível transcricional parece ser o principal mecanismo para controlar o acúmulo de carotenóides durante a maturação e as diferenças no acúmulo de carotenóides entre variedades (KATO et al., 2004; RODRIGO; MARCOS; ZACARIAS, 2004).

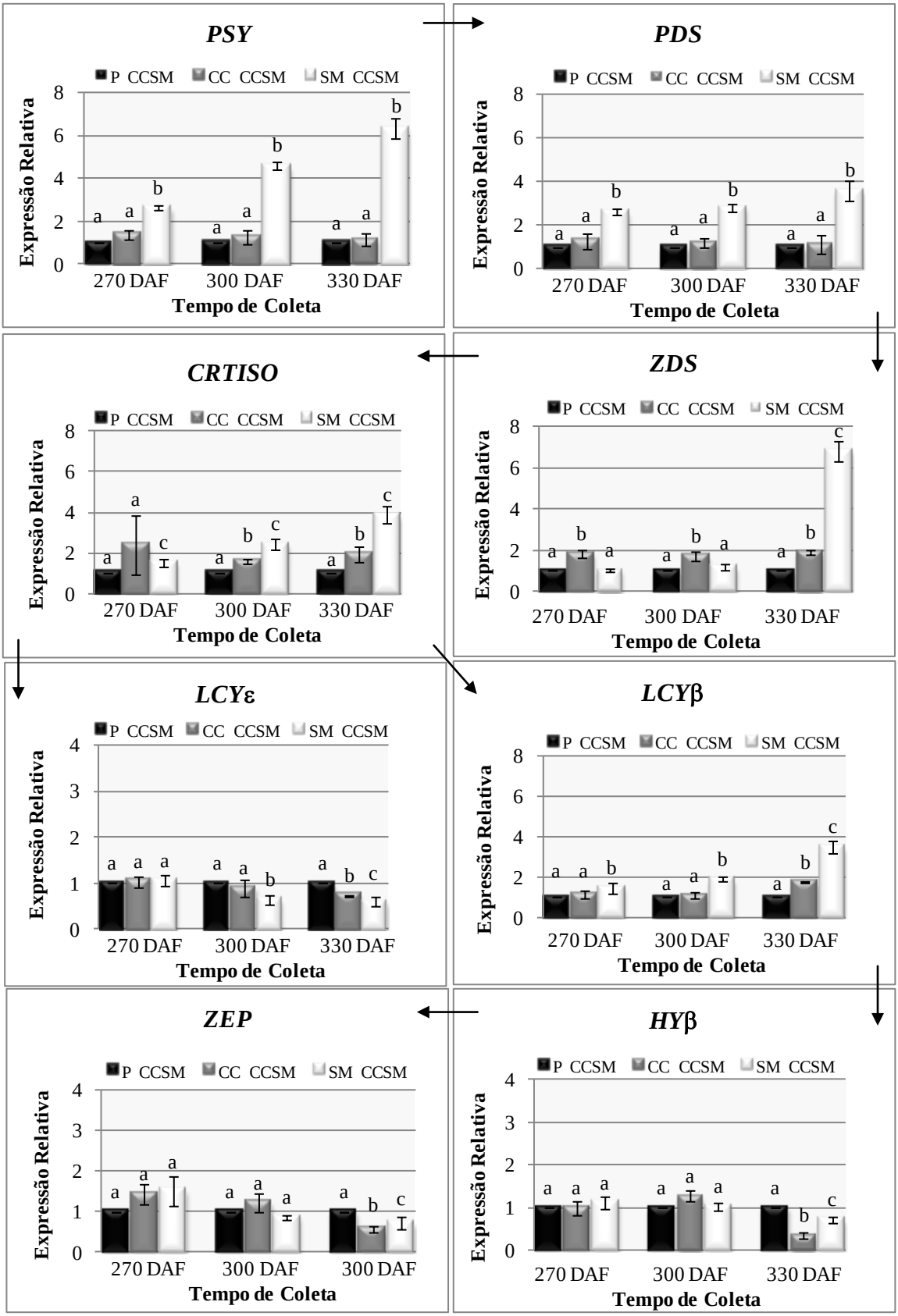

Figura 32 - Expressão relativa dos genes nas variedades 'CC' e 'SM' de *Citrus* em relação à 'P'. Eixo X: tempo de coleta (270, 300 e 330 DAF), com valores médios e o desvio padrão (barra). Médias seguidas de letras distintas no mesmo tempo de coleta diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Eixo Y: expressão relativa, indicando o número de vezes que foi expresso na variedade ao longo do tempo. As setas indicam a sequências dos genes na via de carotenóides.

Em complementação aos resultados obtidos com a quantificação de transcritos de genes da via de biossíntese dos carotenóides foi realizada uma Análise de Componentes Principais (ACP), com a finalidade de identificar um padrão de expressão de genes ou de um grupo de genes específicos e associá-lo a alguma variedade e/ou ao tempo de coleta.

Os resultados demonstraram que dois componentes principais explicaram 72,0 % da variabilidade total dos dados (Figura 33). Além disto, pôde-se observar que houve a separação das variedades em grupos distintos, sendo as variedades pigmentadas (‘CC’ e ‘SM’) foram reunidas num grupo, e a variedade ‘P’, em outro grupo. Na análise de componentes principais (ACP), os genes (*PSY*, *PDS*, *ZDS* e *CRTISO*) precursores dos carotenos identificados (fitoflueno, licopeno e β-caroteno) se agruparam mais próximos das variedades ‘CC’ e ‘SM’. Para a variedade controle ‘P’, houve uma tendência de associação aos demais genes (*LCY*ε, *LCY*β, *HY*β e *ZEP*), precursores das xantofilas (luteína, violaxantina e zeaxantina) (Figura 33).

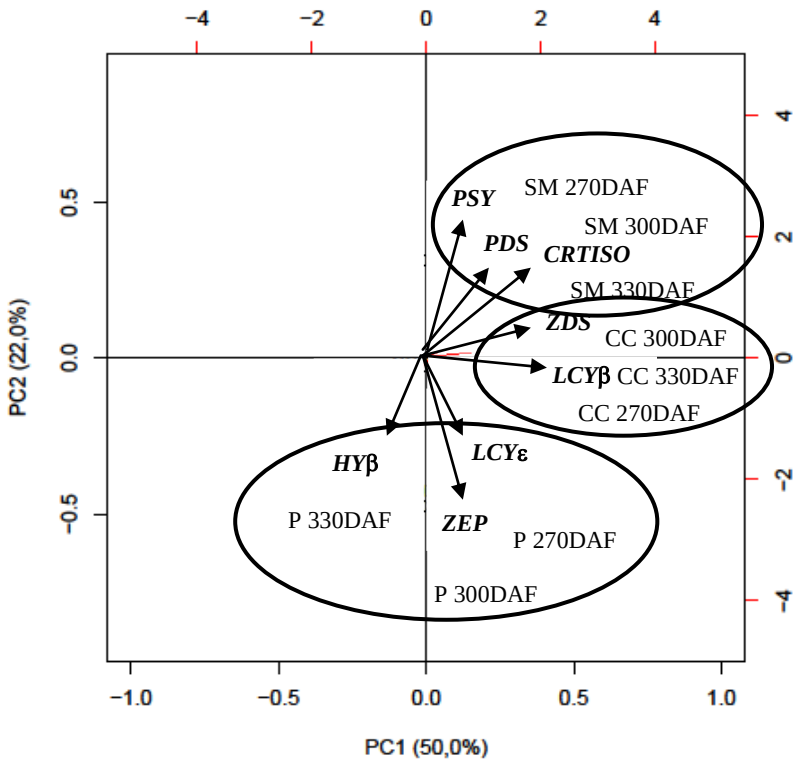

Figura 33 - Análise de Componentes Principais (ACP) dos genes da via entre as variedades pigmentadas ‘SM’ e ‘CC’ e controle polpa clara ‘P’ no mesmo local de coleta Cordeirópolis CCSM, nos diferentes tempos de coleta 270, 300 e 330 DAF.

Em resumo, a variedade pigmentada ‘SM’ apresentou um aumento significativo no número de transcritos dos genes *PSY*, *PDS*, *ZDS*, *CRTISO* e *LCY*β, levando assim ao maior acúmulo dos pigmentos de carotenóides do grupo dos carotenos (principalmente licopeno e β-caroteno) em relação à variedade de polpa clara ‘P’. Na variedade ‘CC’ foi observado apenas alto níveis de expressão dos genes *ZDS*, *CRTISO* e *LCY*β, levando ao acúmulo diferenciado apenas dos metabólitos licopeno e β-caroteno. A variedade de polpa clara ‘P’ acumulou mais xantofilas (zeaxantina e violaxantina), em função do maior número de transcritos dos genes *HY*β e *ZEP*. A expressão diferenciada dos genes da via de biossíntese de carotenóides durante a fase de amadurecimento do fruto, possivelmente induz a um perfil diferenciado de carotenóides acumulados na polpa, o que resulta no fenótipo também diferenciado da polpa dos frutos.

5.5.2.2 Perfil dos transcritos dos genes da via de carotenóides na variedade de polpa vermelha entre os diferentes locais

Esta análise de expressão na polpa da mesma variedade (‘SM’), nos diferentes locais (Cordeirópolis - CCSM, São Bento do Sapucaí - SBS e Mogi-Mirim - MM) e no mesmo estádio de maturação (270, 300 e 330 DAF) teve a finalidade de quantificar o nível de transcritos dos genes da via de carotenóides nos locais distintos (SBS e MM) em relação ao local CCSM.

No período de maturação dos frutos de laranja, a quantidade de transcritos dos genes da via de carotenóides é influenciada pelas mudanças climáticas, especialmente de temperatura e de luz, bem como origem geográfica, maturidade dos frutos (DHUIQUE-MAYER et al., 2009; FANCIULLINO et al., 2006; FANCIULLINO et al., 2008; KATO et al., 2004; MATSUMOTO et al., 2007).

Quando cultivada em São Bento do Sapucaí (SBS), local de clima frio, a variedade de polpa vermelha ‘SM’ apresentou maiores níveis de expressão dos gene *PSY* e *PDS* apenas em 330 DAF. Em Mogi Mirim (MM), região de clima quente, houve um aumento de 3,5 vezes no número de transcritos de *PSY* e 4,0 vezes, nos do gene *PDS* (Figura 34). No entanto, essas diferenças nos níveis de expressão não influenciaram no acúmulo do fitoflueno (Figura 21).

Em tomate, as condições ambientais influenciam a primeira etapa da biossíntese de carotenóides catalisada pela *PSY* (GAUTIER et al., 2008).

O aumento dos transcritos dos genes *PSY* e *ZDS* resulta em aumento do fluxo dos pigmentos precursores da via dos carotenóides que são os carotenos lineares (KATO et al., 2004; RODRIGO; MARCOS; ZACARÍAS, 2004).

O aumento nos níveis de transcritos dos genes *ZDS* e *CRTISO* nos tempos de coleta de 300 e 330 DAF foram independentes do local, porém em clima quente (MM) a expressão foi de 4 e 3 vezes maior em relação ao clima frio (SBS), respectivamente (Figura 34). Esses resultados complementaram a maior quantidade de licopeno encontrada na variedade de polpa vermelha 'SM', quando cultivada em MM (clima quente) (Figura 21).

Frutos colhidos e mantidos a temperatura elevada por mais de duas semanas, tiveram um aumento considerável dos carotenóides totais (principalmente de licopeno). A expressão dos genes da via de biossíntese também foi avaliada e observou-se uma expressão diferencial do gene *ZDS* na variedade pigmentada Bahia Cara-Cara (XU et al., 2006a).

O acúmulo de luteína e β-caroteno observado em local de clima quente (MM) para a variedade pigmentada 'SM' pode ter resultado dos maiores níveis de expressão dos genes *LCY*ε e *LCY*β (Figuras 21 e 34).

A progressiva diminuição na expressão do gene *LCY*ε e por um aumento concomitante na expressão do gene *HY*β, que atua no direcionamento do fluxo de carotenóide para a acumulação de pigmentos coloridos durante o amadurecimento (KATO et al., 2004; RODRIGO; MARCOS; ZACARÍAS, 2004).

Para os genes *HY*β e *ZEP* as principais diferenças no acumulo de transcritos ocorreram aos 330 DAF (Figura 34), sendo que o nível de transcritos desses genes foram maiores em locais de clima frio (SBS), levando assim ao maior acúmulo das xantofilas (zeaxantina e violaxantina). Por sua vez, os baixos níveis de expressão desses genes em clima quente (MM) levaram ao maior acúmulo do caroteno licopeno (Figuras 34 e 21).

Durante o amadurecimento do fruto, a degradação dos pigmentos de clorofila em locais de temperatura mais elevada leva a formação de carotenóides totais na polpa das variedades de laranja doce este processo é decorrente da maior expressão dos genes precursores da via de biossíntese (KATO et al., 2004; RODRIGO; MARCOS; ZACARIAS, 2004).

Concluindo, o cultivo de plantas em locais com diferentes climas (principalmente temperatura) é um fator que influencia diretamente a quantidade dos transcritos dos principais genes da via de carotenóides. Na variedade de polpa vermelha 'SM', o gene *HY*β apresentou perfil transcricional diferenciado dos demais genes da via (*PSY*, *PDS*, *ZDS*, *CRTISO*, *LCY*ε e *LCY*β) em funçao do local de cultivo, aumentando a sua expressão em clima frio (SBS) e diminuindo a mesma, quando cultivada em clima quente (MM). Em clima frio (SBS), a variedade de polpa vermelha apresentou o perfil semelhante ao de uma laranja de polpa clara (da qual foi originada), acumulando os carotenóides do grupo das xantofilas, mas com a presença de licopeno. Enquanto que em clima quente MM, a variedade apresentou o perfil mais característico das laranjas pigmentadas, acumulando mais carotenos. O acúmulo de pigmentos específicos, em locais distintos (clima quente e frio) serviu para caracterizar o perfil dos carotenóides na laranja pigmentada 'SM'.

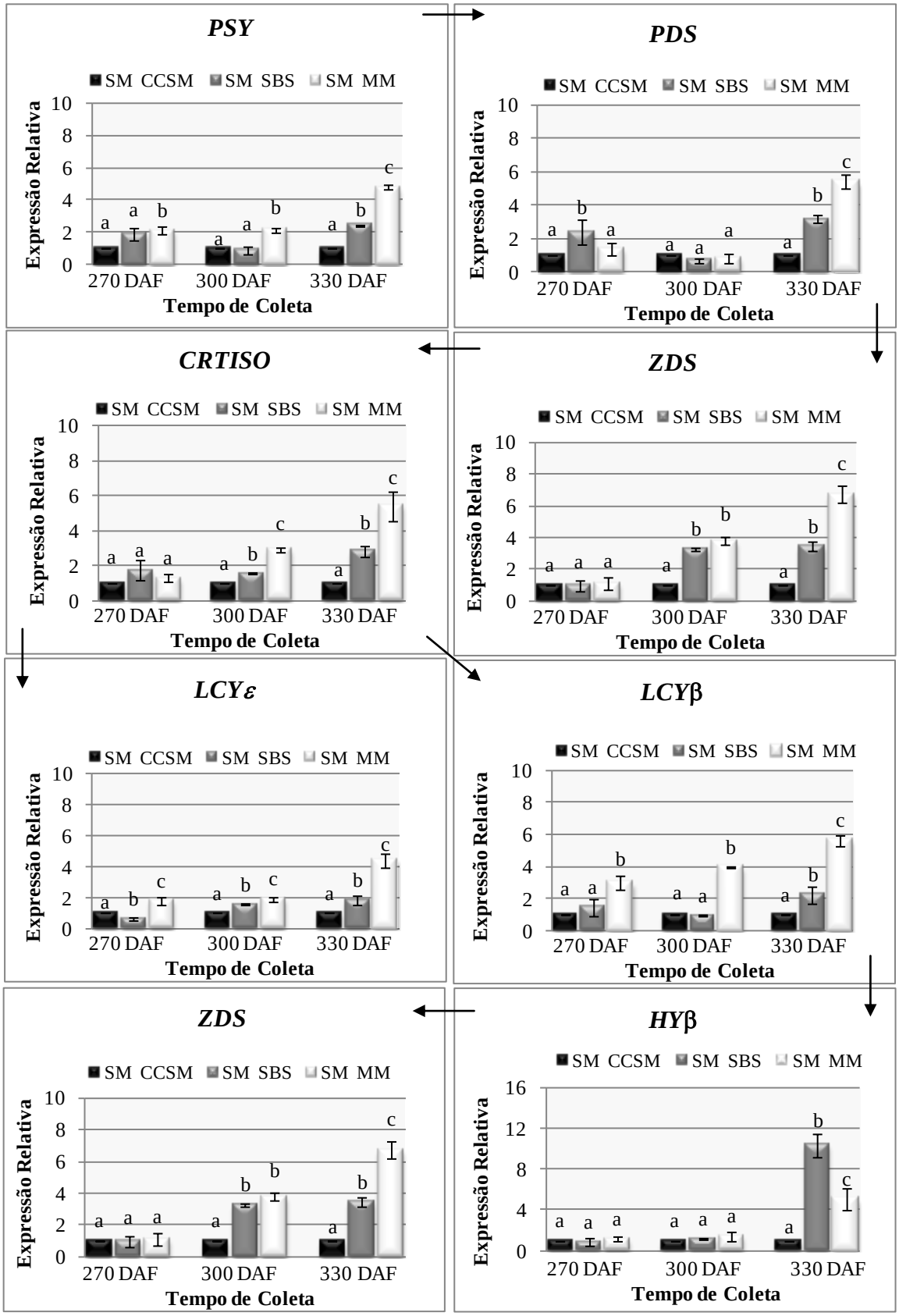

Figura 34 - Expressão relativa dos genes nos locais SBS e MM em relação à CCSM. Eixo X: tempo de coleta (tempo de coleta (270, 300 e 330 DAF), com valores médios e o desvio padrão (barra). Médias seguidas de letras distintas no mesmo tempo de coleta diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Eixo Y: expressão relativa, indicando o número de vezes que foi expresso nos diferentes locais ao longo do tempo. As setas indicam a sequências dos genes na via de carotenóides.

5.6 Identificação de mutações pontuais em regiões das sequências de genes que codificam as proteínas da via de carotenóides

Foram realizadas as clonagens das sequências de ESTs referente os genes que codificam as proteínas da via dos carotenóides, com a finalidade de identificar mutações pontuais (*SNP*) nas sequências de nucleotídeos entre as variedades. Estes *SNPs* poderiam ajudar a entender as diferenças observadas nas variedades (polpa clara e de polpa vermelha), em relação ao acúmulo de carotenóides na polpa e no suco dos frutos.

Na reação de PCR foi utilizado cDNA das variedades de polpa clara 'P' e de polpa vermelha 'SM', como DNA molde amplificados com os iniciadores específicos (Tabela 3). A amplificação de cada gene seguiu a termociclagem recomendada e exigida de cada par de iniciador (Apêndice A). Dos oito pares de genes amplificados, clonados, transformados e sequenciados nas duas variedades ('P' e 'V'), somente sete deles (*PSY*, *PDS*, *ZDS*, *CRTISO*, *LCY*β, *HY*β e *ZEP*) foram confirmados. O gene *LCY*ε não foi clonado corretamente no vetor, sendo confirmado pelo sequenciamento.

O resultado do sequenciamento do gene *PSY* nas duas variedades foi analisado, as sequências foram traduzidas e alinhadas entre si. A partir daí foram observadas diferenças nas sequências de base, alterando a sequência dos aminoácidos quando traduzida. A primeira diferença na sequência de aminoácido foi na posição 181 da variedade 'P', onde foi observado o aminoácido Serina (Ser ou S). Este faz parte do grupo polar neutro, tem cadeias laterais polares eletricamente neutras (sem cargas) em pH neutro. Nesta mesma posição de 'P' equivalente a posição 82 da variedade 'SM', outro aminoácido foi encontrado, a Fenilalanina (Phe ou P) do grupo de aminoácido com cadeia lateral apolar (Figura 35).

Segunda diferença foi observada uma substituição do aminoácido Alanina (Ala ou A) na posição 236 da sequência de polpa clara 'P' e para a Glicina (Gly ou G) na posição 137 da 'SM', mas ambos os resíduos são do grupo com cadeias laterais apolares. Esta substituição do aminoácido provavelmente não tenha sofrido alteração na atividade da enzima, porque as bases mutadas codificam os aminoácidos similares, ambas consideradas apolares (Figura 35).

Terceira substituição observada foi do aminoácido Arginina (Arg ou R) na posição 320 da sequência de 'P' e para a Glutamina (Gln ou Q) na posição 220 da variedade de polpa vermelha 'SM'. O resíduo de aminoácido R é um aminoácido polar básico, com cadeias laterais básicas carregada positivamente em pH neutro ou perto dele. Já o aminoácido Q é um polar neutro, cadeias laterais polares eletricamente neutras em pH neutro (Figura 35).

A última substituição foi observada a mutação na posição 358 da sequência da variedade de polpa clara ‘P’ foi observada o aminoácido Isoleucina (Iso ou I). Resíduo de aminoácido que faz parte do grupo apolar com cadeias laterais apolares. Na mesma posição de ‘P’ equivalente a posição 259 da variedade de polpa vermelha ‘SM’, outro aminoácido foi observado, a Asparagina (Asn ou N). Aminoácido que faz parte do grupo polar neutro, tem cadeias laterais polares eletricamente neutras (sem cargas) em pH neutro (Figura 35).

A variação na composição dos carotenóides nas variedades cultivadas pode estar relacionada à questão de evolução ou de mutação alélica ou gênica (FANCIULLINO et al., 2006).

Em mandioca, foi identificado um polimorfismo em um dos dois genes *PSY*, que tem a capacidade de aumentar o fluxo de carbono conduzindo, assim, ao acúmulo de carotenóides precursores de provitamina A nas raízes tuberosas (WELSCH et al., 2010). Um polimorfismo de DNA gerou a troca de aminoácido de uma região altamente conservada do gene *PSY2*, ocorrendo um aumento da atividade catalítica (ganho de função) de *PSY2*. Este alelo mutado de *PSY*2 caracterizado fornece meios para melhorar o teor de provitamina A nas raízes de mandioca (WELSCH et al., 2010).

O gene *PSY* da laranja Bahia Cara-Cara foi transferido para Kumquat Hong Kong, e resultaram em frutos com 2,5 vezes mais do carotenóide fitoeno, assim como níveis mais elevados de licopeno, β-caroteno e β-criptoxantina, resultando numa mudança significativa na cor da polpa e da casca dos frutos, de amarelo para laranja (ZHANG el al., 2009). Porém os autores não descrevem se a maior atividade da proteína era devida a alteração na sequência do gene PSY da laranja Cara-Cara. Os exemplos observados em mandioca e Kumquat Hong Kong demonstram que alterações pontuais no gene *PSY* podem resultar em ganho de função, acumulando mais carotenóides nos tecidos.

```
P_PSY      101  MVASTAGEVAMSSEEMVYNVVLKQAALVNKQPSGVTRDLDVNPDIALPGTLSLLSEAYDR  160
                MVASTAGEVAMSSEEMVYNVVLKQAALVNKQPSGVTRDLDVNPDIALPGTLSLLSEAYDR
SM_PSY     1    MVASTAGEVAMSSEEMVYNVVLKQAALVNKQPSGVTRDLDVNPDIALPGTLSLLSEAYDR  60

P_PSY      161  CGEVCAEYAKTFYLGTLLMTSERRRAIWAIYVWCRRTDELVDGPNASHITPTALDRWESR  220
                CGEVCAEYAKTFYLGTLLMT ERRRAIWAIYVWCRRTDELVDGPNASHITPTALDRWESR
SM_PSY     61   CGEVCAEYAKTFYLGTLLMTPERRRAIWAIYVWCRRTDELVDGPNASHITPTALDRWESR  120

P_PSY      221  LEDLFRGRPFDMLDAALSDTVTKFPVDIQPFRDMIEGMRMDLRKSRYKNFDELYLYCYYV  280
                LEDLFRGRPFDMLDA LSDTVTKFPVDIQPFRDMIEGMRMDLRKSRYKNFDELYLYCYYV
SM_PSY     121  LEDLFRGRPFDMLDAGLSDTVTKFPVDIQPFRDMIEGMRMDLRKSRYKNFDELYLYCYYV  180

P_PSY      281  AGTVGLMSVPVMGIAPDSQATTESVYNAALALGIANQLTNILRDVGEDARRGRVYLPQDE  340
                AGTVGLMSVPVMGIAPDSQATTESVYNAALALGIANQLTNILRDVGEDA+RGRVYLPQDE
SM_PSY     181  AGTVGLMSVPVMGIAPDSQATTESVYNAALALGIANQLTNILRDVGEDAQRGRVYLPQDE  240

P_PSY      341  LAQAGLSDDDIFAGEVTIKWRNFMKNQIKRARMFFDMAENGVTELSEASRWPVWASLLLY  400
                LAQAGLSDDDIFAGEVT KWRNFMKNQIKRARMFFDMAENGVTELSEASRWPVWASLLLY
SM_PSY     241  LAQAGLSDDDIFAGEVTNKWRNFMKNQIKRARMFFDMAENGVTELSEASRWPVWASLLLY  300

P_PSY      401  RQILDEIEANDYNNFTKRAYVSKAKKIAALPIAYAKSLLRPSRIYTSKAX  450
                RQILDEIEANDYNNFTKRAYVSKAKKIAALPIAYAKSLLRPSRIYTSKAX
SM_PSY     301  RQILDEIEANDYNNFTKRAYVSKAKKIAALPIAYAKSLLRPSRIYTSKAX  350
```

Figura 35 - Alinhamento do gene *PSY* entre as sequências completas das proteínas das variedades de polpa clara ‘P’ e polpa vermelha ‘SM’. Sequência intermediária em negrito refere-se ao consenso entre a sequência de ‘P’ e a de ‘SM’. Retângulos mostram as mutações que foram ocorridas nos aminoácidos

No gene *PSY*, verificou-se a ocorrência de mutações pontuais que resultaram na substituição dos aminoácidos: S pelo P, A pelo G, R pelo Q, e I pelo N, da sequência genômica de laranja de polpa clara ‘P’, para a de polpa vermelha ‘SM’, respectivamente (Figura 35). Para confirmar se essas alterações nos aminoácidos na sequência de proteína da variedade de polpa vermelha ‘SM’ levaram a um ganho de função enzimática, apresentando maior desempenho da atividade da mesma seriam necessários estudos de expressão heteróloga em levedura mutantes, e ainda, realizar experimentos de transformação gênica com *PSY*. O ganho de função torna a enzima mais ativa podendo consecutivamente beneficiar o fluxo inicial dos carotenóides na via. Aumento da atividade da enzima aumenta a metabolização do substrato no produto fitoeno, que se constitui num substrato disponível em maior quantidade para a metabolização do próximo gene da via, o *PDS*.

Alterações significativas nas características fenotípicas dos frutos de tomate são caracterizadas pela variação dos perfis de carotenóides, onde uma série de mutações que afetam o teor total e diversidade de carotenóides já foi identificada. O mutante de tomate *r* é

caracterizado por produzir frutos com polpa amarela, devido a uma mutação que levou a perda de função do gene *PSY*I e consecutivamente não acumula carotenóides (FRAY; GRIERSON, 1993).

Os genes *PDS* (Figura 36), *LCY*β (Figura 39), *HY*β (Figura 40) e ZEP (Figura 41) não apresentaram nenhuma mutação pontual nas suas sequências comparando-se entre si as das variedades de polpa clara 'P' e de polpa vermelha 'SM'.

Em tomate, o mutante *delta* altera o fenótipo do fruto, com alteração da polpa vermelha para laranja, devido ao acúmulo de ζ-caroteno, ao invés do licopeno (pigmento principal). A mutação ocorrida no gene *LCY*ε leva ao ganho de função na atividade da enzima, codificada pelo mesmo. Durante o desenvolvimento do fruto de tomateiro, este gene *LCY*ε tem o nível de transcrito diminuído, mas no mutante *delta*, o nível de transcritos é bruscamente aumentado (RONEN et al., 1999).

Foram analisadas duas mutações no gene *LCY*β que afetam a pigmentação do fruto de tomate durante o amadurecimento: a mutação caracterizada pelo aumento do carotenóide β-caroteno (ganho de função da enzima codificada pelo gene) no fruto, ocorrida no mutante *Beta*; e a mutação caracterizada pela diminuição do carotenóide β-caroteno, ocorrida no mutante *old-gold* (*og*) é uma mutação recessiva que abole o β-caroteno e aumenta licopeno. Em tomate do tipo selvagem o nível do gene *LCY*β é baixo durante a fase de amadurecimento do fruto, enquanto que no mutante *Beta* a sua transcrição é significativamente aumentada (RONEN et al., 2000).

Em outras espécies de plantas, tem sido relatado que o polimorfismo em um gene *LCY* pode explicar a variação natural na cor em diferentes tecidos. Assim, os polimorfismos no gene *LCY*ε estão relacionados com o conteúdo dos carotenóides β-caroteno e β-criptoxantina nas diferentes cultivares de milho (HARJES; ROCHEFORD; BAI, 2008).

O gene *LCY*β de melancia foi isolado e tem sido proposto como o gene determinante para a coloração amarela e vermelha da polpa (BANG et al., 2007). A mutação de base que altera o aminoácido, na melancia vermelha parece ser no gene *LCY*β e que acaba reduzindo a atividade da β-ciclase, resultando na acumulação do pigmento. Já a melancia amarela não apresenta esta mutação no gene *LCY*β, o que resulta no contínuo funcionamento da via e leva o fruto ao fenótipo amarelo (BANG et al., 2007).

A conversão de licopeno (carotenóide vermelho) para o β-caroteno (pigmento amarelo) é catalisado pela enzima *LCY*β. Nos frutos de mamão Papaia, dois diferentes genes (*LCY*β1 e *LCY*β2) que codificam a *LCY*β foram clonados e caracterizados das cultivares Red (Tainung) e a amarela (Híbrido 1B) de mamão. A mutação ocorrida no gene *LCY*β2, inativa a sua atividade enzimática controlando a produção de licopeno na fruta. Este é o principal gene responsável pela diferença na produção de carotenóide variando de vermelho e amarelo na polpa de frutos papaia. O nível de expressão de ambos os genes *LCY*β1 e *LCY*β2 é semelhante e reduzido nas folhas, mas a expressão do *LCY*β2 aumenta acentuadamente nos frutos maduros. O isolamento do gene *LCY*β2 de mamão, que é preferencialmente expresso nos frutos e está correlacionada com a cor do fruto (DEVITT et al., 2010).

```
P_PDS      1    MSLCFSVSESAFNLRYGFRDSEPMGQSLKIRVKTGTRKGFCPSKVVCVDYPRPDIDNTSN  60
                MSLCFSVSESAFNLRYGFRDSEPMGQSLKIRVKTGTRKGFCPSKVVCVDYPRPDIDNTSN
SM_PDS     1    MSLCFSVSESAFNLRYGFRDSEPMGQSLKIRVKTGTRKGFCPSKVVCVDYPRPDIDNTSN  60

P_PDS      61   FLEAAYLSSSFRTSPRPSKPLKVVIAGAGLAGLSTAKYLADAGHKPLLLEARDVLGGKVA  120
                FLEAAYLSSSFRTSPRPSKPLKVVIAGAGLAGLSTAKYLADAGHKPLLLEARDVLGGKVA
SM_PDS     61   FLEAAYLSSSFRTSPRPSKPLKVVIAGAGLAGLSTAKYLADAGHKPLLLEARDVLGGKVA  120

P_PDS      121  AWKDGDGNWYETGLHIFFGAYPNIQNLFGELGINDRLQWKEHSMIFAMPNKPGEFSRFDF  180
                AWKDGDGNWYETGLHIFFGAYPNIQNLFGELGINDRLQWKEHSMIFAMPNKPGEFSRFDF
SM_PDS     121  AWKDGDGNWYETGLHIFFGAYPNIQNLFGELGINDRLQWKEHSMIFAMPNKPGEFSRFDF  180

P_PDS      181  PEVLPAPLNGILAILRNNEMLTWPEKVKFAIGLLPAIIGGQAYVEAQDGLTVQEWMRKQG  240
                PEVLPAPLNGILAILRNNEMLTWPEKVKFAIGLLPAIIGGQAYVEAQDGLTVQEWMRKQG
SM_PDS     181  PEVLPAPLNGILAILRNNEMLTWPEKVKFAIGLLPAIIGGQAYVEAQDGLTVQEWMRKQG  240

P_PDS      241  VPDRVTTEVFIAMSKALNFINPDELSMQCILIALNRFLQEKHGSKMAFLDGNPPERLCLP  300
                VPDRVTTEVFIAMSKALNFINPDELSMQCILIALNRFLQEKHGSKMAFLDGNPPERLCLP
SM_PDS     241  VPDRVTTEVFIAMSKALNFINPDELSMQCILIALNRFLQEKHGSKMAFLDGNPPERLCLP  300

P_PDS      301  IVEHIQSLGGEVRLNSRVQKIELNDDGTVKNFLLTNGNVIDGDAYVFATPVDILKLQLPE  360
                IVEHIQSLGGEVRLNSRVQKIELNDDGTVKNFLLTNGNVIDGDAYVFATPVDILKLQLPE
SM_PDS     301  IVEHIQSLGGEVRLNSRVQKIELNDDGTVKNFLLTNGNVIDGDAYVFATPVDILKLQLPE  360

P_PDS      361  NWKEMAYFKRLEKLVGVPVINIHIWFDRKLKNIYDHLLFSRSSLLSVYADMSLTCKEYYN  420
                NWKEMAYFKRLEKLVGVPVINIHIWFDRKLKNIYDHLLFSRSSLLSVYADMSLTCKEYYN
SM_PDS     361  NWKEMAYFKRLEKLVGVPVINIHIWFDRKLKNIYDHLLFSRSSLLSVYADMSLTCKEYYN  420

P_PDS      421  PNQSMLELVFAPAEEWISCSDSEIIDATMKELAKLFPDEISADQSKAKIVKYHVVKTPRS  480
                PNQSMLELVFAPAEEWISCSDSEIIDATMKELAKLFPDEISADQSKAKIVKYHVVKTPRS
SM_PDS     421  PNQSMLELVFAPAEEWISCSDSEIIDATMKELAKLFPDEISADQSKAKIVKYHVVKTPRS  480

P_PDS      481  VYKTIPNCEPCRPLQRSPVEGFYLAGDYTKQKYLASMEGAVLSGKLCAQAIVQDYVLLAA  540
                VYKTIPNCEPCRPLQRSPVEGFYLAGDYTKQKYLASMEGAVLSGKLCAQAIVQDYVLLAA
SM_PDS     481  VYKTIPNCEPCRPLQRSPVEGFYLAGDYTKQKYLASMEGAVLSGKLCAQAIVQDYVLLAA  540

P_PDS      541  RGKGRLAEASMCPX  554
                RGKGRLAEASMCPX
SM_PDS     541  RGKGRLAEASMCPX  554
```

Figura 36 - Alinhamento do gene *PDS* entre as sequências completas das proteínas das variedades de polpa clara ‘P’ e polpa vermelha ‘SM’. Sequência intermediária em negrito refere-se ao consenso entre a sequência de ‘P’ e a de ‘SM’

O sequenciamento do gene *ZDS* da variedade de polpa vermelha (SM) possibilitou a identificação de duas mutações. Na posição 52 da sequência de proteína da variedade de polpa clara 'P' foi observado o resíduo de aminoácido Ácido Glutâmico (Glu ou E). O aminoácido E que faz parte do grupo polar ácido que possuem grupos carboxila em suas cadeias laterais. Na posição de 'P' equivalente ao resíduo número 18 da variedade 'SM', outro aminoácido foi encontrado, a Glicina (Gly ou G) do grupo de aminoácido com cadeia lateral apolar (Figura 37).

Outra mutação foi à substituição do aminoácido Tirosina (Tyr ou Y) na posição 514 da sequência de 'P' e para Serina (Ser ou S) na posição 481 da variedade 'SM'. Ambos os resíduos de aminoácidos Y e S são polares neutros, com grupo de aminoácido que tem cadeias laterais polares eletricamente neutras (sem cargas) em pH neutro. Esta substituição do aminoácido provavelmente não tenha sofrido alteração nenhuma na atividade da enzima, porque são aminoácidos similares, ambos do grupo apolar (Figura 37).

Em suma, a mutação pontual ocorrida no gene *ZDS*, resultou na substituição do aminoácido E pelo G, nas sequências de 'P' e de 'SM', respectivamente. O resultado desta substituição na sequência de proteína da variedade de polpa vermelha 'SM', ou seja, se resultou ou não em ganho de função para a enzima, isto precisa ainda ser investigado em experimentos de re-complementação heteróloga em levedura ou transformação genética. Se for o caso, o ganho de função tornaria a enzima mais ativa podendo beneficiar o fluxo de carotenóides na via. Esta enzima *ZDS* aumenta a metabolização do substrato (ζ-caroteno) no produto licopeno (*cis*-), assim aumenta a disponibilidade do produto licopeno para o processamento do próximo gene que é o *CRTISO*, e assim sucessivamente.

```
P_ZDS     34   MSTAVELLDQGHEVDIYEGRSFIGGKVGSFVDKRGNHIEMGLHVFFGCYNNLFRLMKKVG  93
               MSTAVELLDQGHEVDIY GRSFIGGKVGSFVDKRGNHIEMGLHVFFGCYNNLFRLMKKVG
SM_ZDS    1    MSTAVELLDQGHEVDIYGGRSFIGGKVGSFVDKRGNHIEMGLHVFFGCYNNLFRLMKKVG  60

P_ZDS     94   ADKNLLVKDHTHTFVNQGGEIGELDFRFPIGAPLHGIRAFLSTNQLKTYDKARNALALAL  153
               ADKNLLVKDHTHTFVNQGGEIGELDFRFPIGAPLHGIRAFLSTNQLKTYDKARNALALAL
SM_ZDS    61   ADKNLLVKDHTHTFVNQGGEIGELDFRFPIGAPLHGIRAFLSTNQLKTYDKARNALALAL  120

P_ZDS     154  SPVVKALVDPDGALKDIRDLDSISFSDWFLSKGGTQTSIQRMWDPVAYALGFIDCDNISA  213
               SPVVKALVDPDGALKDIRDLDSISFSDWFLSKGGTQTSIQRMWDPVAYALGFIDCDNISA
SM_ZDS    121  SPVVKALVDPDGALKDIRDLDSISFSDWFLSKGGTQTSIQRMWDPVAYALGFIDCDNISA  180

P_ZDS     214  RCMLTIFALFATKTEASLLRMLKGSPDVYLSGPIRKYITDKGGRFHLRWGCREILYDKAA  273
               RCMLTIFALFATKTEASLLRMLKGSPDVYLSGPIRKYITDKGGRFHLRWGCREILYDKAA
SM_ZDS    181  RCMLTIFALFATKTEASLLRMLKGSPDVYLSGPIRKYITDKGGRFHLRWGCREILYDKAA  240

P_ZDS     274  NAETYVKGLAMSKATDKKVVQADAYVAACDVPGIKRLLPSSWREMKFFNNIYALVGVPVV  333
               NAETYVKGLAMSKATDKKVVQADAYVAACDVPGIKRLLPSSWREMKFFNNIYALVGVPVV
SM_ZDS    241  NAETYVKGLAMSKATDKKVVQADAYVAACDVPGIKRLLPSSWREMKFFNNIYALVGVPVV  300

P_ZDS     334  TVQLRYNGWVTELQDLERSRQLRRALGLDNLLYTPDADFSCFADIALTSPEDYYREGQGS  393
               TVQLRYNGWVTELQDLERSRQLRRALGLDNLLYTPDADFSCFADIALTSPEDYYREGQGS
SM_ZDS    301  TVQLRYNGWVTELQDLERSRQLRRALGLDNLLYTPDADFSCFADIALTSPEDYYREGQGS  360

P_ZDS     394  LLQCVLTPGDPYMPLPNDEIIRRVAKQVLALFPSSQGLEVIWSSVVKIGQSLYREGPGKD  453
               LLQCVLTPGDPYMPLPNDEIIRRVAKQVLALFPSSQGLEVIWSSVVKIGQSLYREGPGKD
SM_ZDS    361  LLQCVLTPGDPYMPLPNDEIIRRVAKQVLALFPSSQGLEVIWSSVVKIGQSLYREGPGKD  420

P_ZDS     454  PFRPDQKTPVKNFFLAGSYTKQDYIDSMEGATLYGRQASAYICNAGEELVALRKQLAAFE  513
               PFRPDQKTPVKNFFLAGSYTKQDYIDSMEGATLYGRQASAYICNAGEELVALRKQLAAFE
SM_ZDS    421  PFRPDQKTPVKNFFLAGSYTKQDYIDSMEGATLYGRQASAYICNAGEELVALRKQLAAFE  480

P_ZDS     514  YQEQMEAPTTTNDELSLVX  532
               QEQMEAPTTTNDELSLVX
SM_ZDS    481  SQEQMEAPTTTNDELSLVX  499
```

Figura 37 - Alinhamento do gene *ZDS* entre as sequências completas das proteínas das variedades de polpa clara ‘P’ e polpa vermelha ‘SM’. Sequência intermediária em negrito refere-se ao consenso entre a sequência de ‘P’ e a de ‘SM’. Retângulos mostram as mutações que foram ocorridas nos aminoácidos

Para o gene *CRTISO*, uma mutação na sequência de nucleotídeo que codifica a proteína das variedades de polpa clara ‘P’ e de polpa vermelha ‘SM’ foi encontrada por sequenciamento. No resíduo de aminoácido 50 da sequência de ‘P’ foi observada a Glutamina (Gln ou Q) que é um aminoácido polar neutro, com grupo de aminoácido com cadeias laterais polares eletricamente neutras (sem cargas) em pH neutro. Na posição de ‘P’ equivalente ao resíduo 50 da variedade ‘SM’, outro aminoácido foi observado, a Histidina (His ou H) possui cadeia lateral básica, e em todos e eles cadeia lateral é carregada positivamente em pH neutro ou perto dele. (Figura 38).

A mutação pontual ocorrida no gene *CRTISO*, resultou na substituição do aminoácido Q pelo H das sequências de ‘P’ e de ‘SM’, respectivamente. A substituição do aminoácido na sequência de proteína da variedade ‘SM’ pode resultar na perda (parcial) da função da enzima, diminuindo a atividade da mesma. Considerando os altos níveis de licopeno identificados nas análises de metabólitos na variedade pigmentada ‘SM’ (Figura 18), a mutação encontrada no gene *CRTISO* pode ser responsável pelo fenótipo de coloração vermelha do fruto. A perda de função torna a enzima menos ativa ou inativa podendo interromper totalmente ou parcialmente o fluxo da via de carotenóides, gerando o acúmulo total ou parcial do metabólito licopeno (-*cis*). O acúmulo do licopeno (-*cis*) que não é ou é pouco convertido a licopeno (-*trans*) pela *CRTISO* (devido ao mau funcionamento) não consegue seguir o fluxo normal da via. Assim, este substrato pode ser pouco ou nada metabolizado pelo gene *LCY*β, o que acaba gerando um maior acúmulo deste metabólito (licopeno).

Fenótipo similar foi descrito no mutante *tangerine* de tomateiro assim chamado por causa da cor do fruto, reflete uma perda de atividade da *CRTISO*. Neste mutante ocorre o maior acúmulo do carotenóide pró-licopeno (*cis*-licopeno) ao invés de all-*trans*-licopeno (pequena fração deste é acumulada), já no tomateiro selvagem o all-*trans*-licopeno é sintetizado normalmente, porque a atividade da enzima *CRTISO* é normal (ISAACSON et al., 2002).

Correlacionando, os dados acima com os resultados obtidos no trabalho, podemos supor que o gene *CRTISO* tem uma perda parcial de função na sua atividade, e com isso resultar no maior acúmulo de prolicopeno nos frutos mesmo ocorrendo o prosseguimento da via. Esta característica genotípica pode resultar na produção do fenótipo avermelhado do fruto durante o amadurecimento, mas ensaios de expressão heteróloga em leveduras e/ou de transformação genética. Para se confirmar se o gene *CRTISO* da variedade pigmentada ‘SM’ não é funcional realmente, é necessário transformar a laranja ‘SM’ (polpa vermelha) com o

gene *CRTISO* da laranja Pêra (polpa amarela), que é funcional. Assim, se a hipótese estiver correta, as plantas transformadas de 'SM' passam a ter um gene *CRTISO* funcional da variedade Pêra e, portanto, passam a produzir frutos de coloração amarela.

```
P_CRTISO   1    MGVKAEVLPPDTDCHHFVLEDDWNRLEEPYGSIFLSIPTVLDSSLAPEGQHILHIFTICS  60
                MGVKAEVLPPDTDCHHFVLEDDWNRLEEPYGSIFLSIPTVLDSSLAPEG HILHIFTICS
SM_CRTISO  1    MGVKAEVLPPDTDCHHFVLEDDWNRLEEPYGSIFLSIPTVLDSSLAPEGHHILHIFTICS  60

P_CRTISO   61   IEDWEGLAQKDYDAKKELVADEIINRLENKLFPGLKQSIAFREIGSPKTHRRYLARDQGT  120
                IEDWEGLAQKDYDAKKELVADEIINRLENKLFPGLKQSIAFREIGSPKTHRRYLARDQGT
SM_CRTISO  61   IEDWEGLAQKDYDAKKELVADEIINRLENKLFPGLKQSIAFREIGSPKTHRRYLARDQGT  120

P_CRTISO   121  YGPMPRGTPKGLLGMPFNTTGINGLYCVGDSCFPGQGVIAVAFSGVMCAHRVAADIGLEK  180
                YGPMPRGTPKGLLGMPFNTTGINGLYCVGDSCFPGQGVIAVAFSGVMCAHRVAADIGLEK
SM_CRTISO  121  YGPMPRGTPKGLLGMPFNTTGINGLYCVGDSCFPGQGVIAVAFSGVMCAHRVAADIGLEK  180

P_CRTISO   181  KSPVLDAGLLRLLAWLRSMA  200
                KSPVLDAGLLRLLAWLRSMA
SM CRTISO  181  KSPVLDAGLLRLLAWLRSMA  200
```

Figura 38 - Alinhamento do gene *CRTISO* entre as sequências completas das proteínas das variedades de polpa clara 'P' e polpa vermelha 'SM'. Sequência intermediária em negrito refere-se ao consenso entre a sequência de 'P' e a de 'SM'. Retângulo mostra a substituição mutação do aminoácido na sequência

```
P_LCYβ    1    MYDPSKGLVVDLAVVGGGPAGLAVAQQVSEAGLSVCSIDPSPKLIWPNNYGVWVDEFEAM  60
               MYDPSKGLVVDLAVVGGGPAGLAVAQQVSEAGLSVCSIDPSPKLIWPNNYGVWVDEFEAM
SM_LCYβ   79   MYDPSKGLVVDLAVVGGGPAGLAVAQQVSEAGLSVCSIDPSPKLIWPNNYGVWVDEFEAM  138

P_LCYβ    61   DLLDCLDTTWSGAVVHIDDNTKKDLNRPYGRVNRKLLKSKMLQKCITNGVKFHQAKVIKV  120
               DLLDCLDTTWSGAVVHIDDNTKKDLNRPYGRVNRKLLKSKMLQKCITNGVKFHQAKVIKV
SM_LCYβ   139  DLLDCLDTTWSGAVVHIDDNTKKDLNRPYGRVNRKLLKSKMLQKCITNGVKFHQAKVIKV  198

P_LCYβ    121  IHEESKSLLICNDGVTIQAAVVLDATGFSRCLVQYDKPYNPGYQVAYGILAEVEEHPFDL  180
               IHEESKSLLICNDGVTIQAAVVLDATGFSRCLVQYDKPYNPGYQVAYGILAEVEEHPFDL
SM_LCYβ   199  IHEESKSLLICNDGVTIQAAVVLDATGFSRCLVQYDKPYNPGYQVAYGILAEVEEHPFDL  258

P_LCYβ    181  DKMVFMDWRDSHLNNNSELKEANSKIPTFLYAMPFSSNRIFLEETSLVARPGVPMKDIQE  240
               DKMVFMDWRDSHLNNNSELKEANSKIPTFLYAMPFSSNRIFLEETSLVARPGVPMKDIQE
SM_LCYβ   259  DKMVFMDWRDSHLNNNSELKEANSKIPTFLYAMPFSSNRIFLEETSLVARPGVPMKDIQE  318

P_LCYβ    241  RMVARLKHLGIKVKSIEEDEHCVIPMGGPLPVLPQRVVGIGGTAGMVHPSTGYMVARTLA  300
               RMVARLKHLGIKVKSIEEDEHCVIPMGGPLPVLPQRVVGIGGTAGMVHPSTGYMVARTLA
SM_LCYβ   319  RMVARLKHLGIKVKSIEEDEHCVIPMGGPLPVLPQRVVGIGGTAGMVHPSTGYMVARTLA  378

P_LCYβ    301  AAPIVANAIVRSLSSDRSISGHKLSAEVWKDLWPIERRRQREFFCFGMDILLKLDLPATR  360
               AAPIVANAIVRSLSSDRSISGHKLSAEVWKDLWPIERRRQREFFCFGMDILLKLDLPATR
SM_LCYβ   379  AAPIVANAIVRSLSSDRSISGHKLSAEVWKDLWPIERRRQREFFCFGMDILLKLDLPATR  438

P_LCYβ    361  RFFDAFF  367
               RFFDAFF
SM_LCYβ   439  RFFDAFF  445
```

Figura 39 - Alinhamento do gene *LCY*β entre as sequências completas das proteínas das variedades de polpa clara ‘P’ e polpa vermelha ‘SM’. Sequência intermediária em negrito refere-se ao consenso entre a sequência de ‘P’ e a de ‘SM’

```
P_HYβ     1    MSSFGITSMAVMAVYYRFWWQMEGGEVPLAEMFGTFALSVGAAVGMEFWARWAHKALWHA  60
               MSSFGITSMAVMAVYYRFWWQMEGGEVPLAEMFGTFALSVGAAVGMEFWARWAHKALWHA
SM_HYβ    67   MSSFGITSMAVMAVYYRFWWQMEGGEVPLAEMFGTFALSVGAAVGMEFWARWAHKALWHA  126

P_HYβ     61   SLWHMHESHHRPREGPFELNDVFAIINAVPAIALLSFGFFHKGLVPGLCFGAGLGITVFG  120
               SLWHMHESHHRPREGPFELNDVFAIINAVPAIALLSFGFFHKGLVPGLCFGAGLGITVFG
SM_HYβ    127  SLWHMHESHHRPREGPFELNDVFAIINAVPAIALLSFGFFHKGLVPGLCFGAGLGITVFG  186

P_HYβ     121  MAYMFVHDGLVHKRFPVGPIADVPYFRRVAAAHQLHHSDKFHGVPYGLFLGPKELEEVGG  180
               MAYMFVHDGLVHKRFPVGPIADVPYFRRVAAAHQLHHSDKFHGVPYGLFLGPKELEEVGG
SM_HYβ    187  MAYMFVHDGLVHKRFPVGPIADVPYFRRVAAAHQLHHSDKFHGVPYGLFLGPKELEEVGG  246

P_HYβ     181  LEELEKEISKRIKSYNRVPK  200
               LEELEKEISKRIKSYNRVPK
SM_HYβ    247  LEELEKEISKRIKSYNRVPK  266
```

Figura 40 - Alinhamento do gene *HY*β entre as sequências completas das proteínas das variedades de polpa clara ‘P’ e polpa vermelha ‘SM’. Sequência intermediária em negrito refere-se ao consenso entre a sequência de ‘P’ e a de ‘SM’

```
P_ZEP      14   MVSSMFYNSVNLSTTVFSRTHFPVPVYKHSCIDFSRYDHCINYKFRTGTSGQSKNPTQMK  73
                MVSSMFYNSVNLSTTVFSRTHFPVPVYKHSCIDFSRYDHCINYKFRTGTSGQSKNPTQMK
SM_ZEP     1    MVSSMFYNSVNLSTTVFSRTHFPVPVYKHSCIDFSRYDHCINYKFRTGTSGQSKNPTQMK  60

P_ZEP      74   AAVAESPTNNSDSENKKLRILVAGGGIGGLVFALAAKRKGFEVLVFEKDMSAIRGEGQYR  133
                AAVAESPTNNSDSENKKLRILVAGGGIGGLVFALAAKRKGFEVLVFEKDMSAIRGEGQYR
SM_ZEP     61   AAVAESPTNNSDSENKKLRILVAGGGIGGLVFALAAKRKGFEVLVFEKDMSAIRGEGQYR  120

P_ZEP      134  GPIQIQSNALAALEAIDLDVAEEVMRAGCVTGDRINGLVDGISGSWYIKFDTFTPAAEKG  193
                GPIQIQSNALAALEAIDLDVAEEVMRAGCVTGDRINGLVDGISGSWYIKFDTFTPAAEKG
SM_ZEP     121  GPIQIQSNALAALEAIDLDVAEEVMRAGCVTGDRINGLVDGISGSWYIKFDTFTPAAEKG  180

P_ZEP      194  LPVTRVISRMTLQQILAKAVGDEIILNESNVIDFKDHGDKVSVVLENGQCYAGDLLVGAD  253
                LPVTRVISRMTLQQILAKAVGDEIILNESNVIDFKDHGDKVSVVLENGQCYAGDLLVGAD
SM_ZEP     181  LPVTRVISRMTLQQILAKAVGDEIILNESNVIDFKDHGDKVSVVLENGQCYAGDLLVGAD  240

P_ZEP      254  GIWSKVRKNLFGPQEAIFSGYTCYTGIADFVPADIESVGYRVFLGHKQYFVSSDVGAGKM  313
                GIWSKVRKNLFGPQEAIFSGYTCYTGIADFVPADIESVGYRVFLGHKQYFVSSDVGAGKM
SM_ZEP     241  GIWSKVRKNLFGPQEAIFSGYTCYTGIADFVPADIESVGYRVFLGHKQYFVSSDVGAGKM  300

P_ZEP      314  QWYAFNKEPAGGVDGPEGKKERLLKIFEGWCDNVVDLILATDEEAILRRDIYDRTPIFTW  373
                QWYAFNKEPAGGVDGPEGKKERLLKIFEGWCDNVVDLILATDEEAILRRDIYDRTPIFTW
SM_ZEP     301  QWYAFNKEPAGGVDGPEGKKERLLKIFEGWCDNVVDLILATDEEAILRRDIYDRTPIFTW  360

P_ZEP      374  GRGRVTLLGDSVHAMQPNLGRGGCMAIEDGYQLAVELEKACKKSNESKTPIDIVSALKSY  433
                GRGRVTLLGDSVHAMQPNLGRGGCMAIEDGYQLAVELEKACKKSNESKTPIDIVSALKSY
SM_ZEP     361  GRGRVTLLGDSVHAMQPNLGRGGCMAIEDGYQLAVELEKACKKSNESKTPIDIVSALKSY  420

P_ZEP      434  ERARRLRVAVIHGLARSAAVMASTYKAYLGVGLGPLSFLT  473
                ERARRLRVAVIHGLARSAAVMASTYKAYLGVGLGPLSFLT
SM_ZEP     421  ERARRLRVAVIHGLARSAAVMASTYKAYLGVGLGPLSFKT  460
```

Figura 41 - Alinhamento do gene *ZEP* entre as sequências completas das proteínas das variedades de polpa clara ‘P’ e polpa vermelha ‘SM’. Sequência intermediária em negrito refere-se ao consenso entre a sequência de ‘P’ e a de ‘SM’

Com base nos resultados apresentados, os genes *PSY*, *ZDS* e *CRTISO* foram caracterizados por possuir mutações em algumas bases, nas sequências da variedade pigmentada ‘SM’, e estas puderam refletir alterando as sequências de aminoácidos das proteínas, em relação sequência da variedade de polpa clara ‘P’. Estas mutações nos genes foram caracterizadas como substituição de bases, e não adição ou deleção. Possivelmente, as mutações de base nas sequências dos genes acima descritos poderiam ajudar a entender as características do fenótipo do fruto na variedade de polpa vermelha ‘SM’ e a capacidade da mesma em acumular pigmentos de carotenóides do grupo dos carotenos, principalmente o pigmento licopeno que é específico das variedades pigmentas.

Baseando-se nos resultados desses experimentos realizados durante este trabalho de tese com a finalidade de caracterizar os mutantes de polpa vermelha ‘CC’ e ‘SM’, em relação

à variedade de polpa clara ‘P’, as mutações aqui descritas precisam ser melhor caracterizadas quanto à função desses genes. Ainda, é necessário identificar se as diferenças observadas entre as variedades de polpa vermelha podem estar diretamente relacionadas às mutações identificadas para os genes *PSY*, *ZDS* e *CRTISO*. O gene *CRTISO* é um candidato chave, responsável pelo maior acúmulo do pigmento prolicopeno, levando as variedades pigmentadas ao fenótipo avermelhado na polpa dos frutos.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos foi possível obter as seguintes conclusões:

a) A variedade controle Pêra (polpa clara) não apresenta o carotenóide licopeno no suco dos frutos;

b) Os frutos de laranja Sanguínea-de-Mombuca (‘SM’) têm a capacidade de acumular mais carotenóides totais, além dos carotenos: fitoflueno, licopeno e β-caroteno no suco, do que as variedades Pêra (‘P’ - controle) e a Bahia Cara-Cara (‘CC’), no estádio de 330 dias após o florescimento (DAF);

c) As amostras de frutos de laranja pigmentada ‘SM’ coletadas no pomar de Mogi-Mirim (MM), região de clima mais quente, induziram ao acúmulo de maiores teores de carotenóides totais, luteína, licopeno e β-caroteno na polpa, em relação às amostras colhidas no pomar de São Bento de Sapucaí (SBS), região de clima mais frio, no estádio de 330 DAF. Estas últimas apresentaram frutos com suco contendo maiores teores de zeaxantina e violaxantina, no mesmo estádio de maturação;

d) A variedade pigmentada ‘SM’ apresentou maior número de transcritos dos genes *PSY*, *PDS*, *ZDS*, *CRTISO* *LCY*β e menor número de transcritos dos genes *LCY*ε, *HY*β e *ZEP*, na polpa de frutos colhidos a 330 DAF, em comparação com os frutos de laranja ‘P’ e da outra variedade polpa vermelha ‘CC’. O mesmo resultado foi obtido quando a laranja ‘SM’ foi cultivada em local de clima quente MM;

e) O *PSY*, o *ZDS* e o *CRTISO* foram os únicos genes da via de biossíntese de carotenóides que apresentaram mutações pontuais na sequencia de laranja ‘SM’ em relação às sequências de laranja controle ‘P’. Estas alterações podem resultar em alteração na sequência de aminoácidos das proteínas traduzidas e podem ser os responsáveis pelo fenótipo do fruto com polpa pigmentada.

REFERÊNCIAS

ALBA, R.; CORDONNIER-PRATT M. M.; PRATT, L.H. Fruit-localized phytochromes regulate lycopene accumulation independently of ethylene production in tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 123 p. 363-370, 2000.

ALQUEZAR, B.; ZACARIAS, L.; RODRIGO, M. J. Molecular and functional characterization of a novel chromoplast-specific lycopene betacyclase from Citrus and its relation to lycopene accumulation. **Journal of Experimental Botany**, Cambridge, v. 60 p. 1783-1797, 2009.

ALQUEZAR, B.; RODRIGO, M. J.; ZACARÍAS, L. Regulation of carotenoid biosynthesis during fruit maturation in the red-fleshed orange mutant Cara Cara. **Phytochemistry**, Oxford, v. 69, n. 10, p. 1997-2007, 2008.

ARAB, L.; STECK, S. Lycopene and cardiovascular disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Rockville, v. 71, p. 1691S-1695S, 2000.

ARMSTRONG, G. A. Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: A colorful tale. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 51, p. 629-659, 1997.

ASAMIZU, E.; NAKAMURA, Y.; SATO, S.; TABATA S. Comparison of the transcript profiles from the root and the nodulating root of the model legume *Lotus japonicas* by serial analysis of gene expression. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 18, p. 487-498, 2005.

ASTORG, P. Food carotenoids and cancer prevention: An overview of current research. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 8, p. 406-413, 1997.

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

BANG, H.; KIM, S.; LESKOVAR, D.; KING, S. Development of a codominant CAPS marker for allelic selection between canary yellow and red watermelon based on SNP in lycopene β-cyclase (*LCYB*) gene. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 20, p. 63-72, 2007.

BARANSKA, M.; BARANSKI, R.; SCHULZ, H; NOTHNAGEL, T. Tissue-specific accumulation of carotenoids in carrot roots. **Planta**, Berlin, v. 224, p. 1028-1037, 2006.

BARRY, G. H.; VAN WYK, A. A. Low-temperature cold shock may induce rind colour development of `Nules Clementine' mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 40, p. 82-88, 2006.

BARTLEY, G. E.; ISHIDA, B. K. Zeta-carotene desaturase (Accession No. AF195507) from tomato (PGR99-181). **Plant Physiology**, Rockville, v. 121, p. 1384, 1999.

BAS, A.; FORSBERG, G.; HAMMARSTRÖM, S.; HAMMARSTRÖM, M. L. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T *lymphocytes*. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oxford, v. 59, n. 6, p. 566-573, 2004.

BECKER, E. M.; NISSEN, L. R.; SKIBSTED, L. H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 219, p. 561-571, 2004.

BITTERS, W. P. Physical characters and chemical composition as affected by scions and rootstocks. In: SINCLAIR, W. B. (Ed.). **The orange, its biochemistry and physiology**. Riverside: The University of California, 1961. p. 56-95.

BLUMER, S.; POMPEU JUNIOR, J.; GARCIA, V. X. P. Características de qualidade dos frutos de laranjas de maturação tardia. **Laranja,** Cordeirópolis, v. 24, n. 2, p. 423-431, 2003.

BOILEAU, T. W. M.; MOORE, A. C.; ERDMAN JUNIOR, J. W. Carotenoids and Vitamin A. In: PAPAS, A. M. (Ed.). **Antioxidant status, diet, nutrition and health**. Boca Raton, FL. CRC Press, 1999. p. 133-158.

BOILEAU, T. W. M.; BOILEAU, A. C.; ERDMANJUNIOR, J. W. Bioavailability of all-*trans* and all-*cis* isomers of lycopene. **Experimental Biology and Medicine**, London, v. 227, p. 914-919, 2002.

BOUVIER, F.; KELLER, Y.; D'HARLINGUE, A.; CAMARA, B. Xanthophyll biosynthesis in chromoplasts: isolation and molecular cloning of an enzyme catalyzing the conversion of 5,6-epoxycarotenoid into ketocarotenoid. **The Plant Journal**, Oxford, v. 6, p. 45-54, 1994.

BOUVIER, F.; KELLER, Y.; D'HARLINGUE, A.; CAMARA, B. Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (*Capsicum annuum L.*). **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1391, n. 3, p. 320-328, 1998.

BRITTON, G.; LIAANEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. **Carotenoids**. Vol. 1B: Spectroscopy. Basel, Switzerland: Birkhaüser Verlag, 1995.

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

BROWN, M. J.; FERRUZZI, M. G.; NGUYEN, M. L.; COOPER, D. A.; ELDRIDGE, A. L.; SCHWARTZ, S. J.; WHITE,W. S. Carotenoid bioavailability is higher from salads ingested with full-fat than with fat-reduced salad dressings as measured with electrochemical detection. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 80, p. 396-403, 2004.

BURBIDGE, A.; GRIEVE, T. M.; JACKSON, A.; THOMPSON, A.; TAYLOR, I. B. Structure and expression of a cDNA encoding a putative neoxanthin cleavage enzyme (NCE), isolated from a wilt-related tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) library. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 48, p. 2111-2112, 1997.

BUSCH, M.; SEUTER, A.; HAIN, R. Functional analysis of the early steps of carotenoid biosynthesis in tobacco. **Plant Physiology**, Rockville, v. 12, p. 439-453, 2002.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W. Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 34, n. 3, p. 597-601, 2005.

CASTENMILLER, J. J. M.; WEST, C. E. Bioavailability and bioconversion of carotenoids. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 18, p. 19-38, 1998.

CAZZONELLI, C. I.; POGSON, B. J. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. **Trends in Plant Science**, Killington, v. 15, p. 266–274, 2010.

CHEN, C.; COSTA, M. G. C.; YU, Q.; MOORE, G. A.; GMITTER JR., F. G. Identification of novel members in sweet orange carotenoid biosynthesis gene families. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 6, p. 905-914, 2010.

CLINTON, S.K. The dietary antioxidant network and prostate carcinoma. **Cancer**, New York, v. 86, p. 1629-1631, 1783-1792, 1999.

CLINTON, S. K. Lycopene: Chemistry, biology, and implications for human health and disease. **Nutrition Reviews**, Washington, DC, v. 56, p. 35-51, 1998.

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

D'AMBROSIO, C.; STIGLIANI, A. L.; GIORIO, G. Overexpression of CrtR-b2 (carotene beta hydroxylase 2) from *S. lycopersicum* L. differentially affects xanthophyll synthesis and accumulation in transgenic tomato plants. **Transgenic Research**, London, v. 20, n. 1, p. 47-60, 2011.

DEVITT, L. C.; FANNING, K.; DIETZGEN, R. G.; HOLTON, T. A. Isolation and functional characterization of a lycopene beta-cyclase gene that controls fruit color of papaya (*Carica papaya L.*). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, n. 1, p. 33-39, 2010.

DHUIQUE-MAYER, C.; FANCIULLINO, A. L.; DUBOIS, C.; OLLITRAULT, P. Effect of genotype and environment on citrus juice carotenoid content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 57, n. 19, p. 9160-9168, 2009.

DOMINGO, J. I.; FRANCISCO, R. T.; FRANCISCO, L.; EDWARDO, P. M.; MANUEL, T. In vivo sucrose stimulation of color change in citrus fruit epicarps; interaction between nutritional and hormonal signals. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 112, p. 244-250, 2001.

DOMINGUES, E. T.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; POMPEU JÚNIOR, J.; DE FIGUEIREDO, J. O.; TULMANN NETO, A. Caracterização de onze clones de laranja-'Pêra' e seis variedades assemelhadas. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 25, n. 1, p. 111-138, 2004.

EPLER, K. S.; ZEIGLER, R. G.; CRAFT, N. E. Liquid chromatographic method for the determination of carotenoids, retinoids and tocopherols in human serum and in foods. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 619, p. 37-48, 1993.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 8, n. 3, p. 186–194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 8, n. 3, p. 175–185, 1998.

FANCIULLINO, A. L.; CERCOS, M.; DHUIQUE-MAYER, C.; FROELICHE,R Y.; TALON, M.; OLLITRAULT, P.; MORILLON, R. Changes in carotenoid content and biosynthetic gene expression in juice sacs of four orange varieties (*Citrus sinensis*) differing in flesh fruit color. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 56, p. 3628-3638, 2008.

FANCIULLINO, A. L.; DHUIQUE-MAYER, C.; LURO, F.; CASANOVA, J.; MORILLON, R.; OLLITRAULT, P. Carotenoid diversity in cultivated citrus is highly influenced by genetic factors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 54, p. 4397-4406, 2006.

FELSENTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution: International Journal of Organic Evolution**, Lawrence, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.

FESTER, T.; HAUSE, B.; SCHMIDT, D.; HALFMANN, K.; SCHMIDT, J.; WRAY, V.; HAUSE, G.; STRACK, D. Occurrence and localization of apocarotenoids in arbuscular mycorrhizal plant roots. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 43, p. 256-265, 2002.

FNP CONSULTORIA E COMÉRCIO. Agrianual 2012: Anuário da Agricultura Brasileira. Citros - Laranja. São Paulo, 2012. p. 255-268.

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

FRASER, P. D.; SCHUCH, W.; BRAMLEY, P. M. Phytoene synthase from tomato (*Lycopersicum esculentum*) chloroplast-partial purification and biochemical properties. **Planta**, Berlin, v. 211, p. 361-369, 2000.

FRASER, P. D.; TRUESDALE, M. R.; BIRD, C. R.; SCHUCH, W.; BRAMLEY, P. M. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development evidence for tissue-specific gene expression. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, p. 405-413, 1994.

FRASER, P. D.; HEDDEN, P.; COOKE, D. T.; BIRD, C. R.; SCHUCH, W.; BRAMLEY, P. M. The effect of reduced activity of phytoene synthase on isoprenoid levels in tomato pericarp during fruit development and ripening. **Planta**, Berlin, v. 196, p. 321-326, 1995.

FRAY, R. G.; GRIERSON, D. Molecular-genetics of tomato fruit ripening. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 9, p. 438-443, 1993.

FREGENE, M.; MATSUMURA, H.; AKANO, A.; DIXON, A.; AND TERAUCHI, R. Serial analysis of gene expression (SAGE) of host-plant resistance to the cassava mosaic disease. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 56, p. 563-571, 2004.

FREEMAN, W. M.; WALKER, S. J.; VRANA, K. E. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. **BioTechniques**, Natick, MA, v. 26, n. 1, p. 112-122, 124-125, 1999.

GAMA, J. J. T.; SYLOS, C. M. Major carotenoid composition of Brazilian Valencia orange juice: Identification and quantification by HPLC. **Food Research International**, Ottawa, v. 38, p. 899-903, 2005.

GAMA, J. J. T.; SYLOS, C. M. Effect of thermal pasteurization and concentration on carotenoid composition of Brazilian Valencia orange juice. **Food Chemistry**, Barking, v. 100, p. 1686-1690, 2007.

GAUTIER, H.; DIAKOU-VERDIN, V.; BERNARD, C.; REICH, M.; BURET, M.; BOURGAUD, F.; POËSSEL, J. L.; CARIS-VEYRAT, C.; GÉNARD, M. How does tomato quality (sugar, acid, and nutritional quality) vary with ripening stage, temperature, and irradiance? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 56, p. 1241-1250, 2008.

GAZIANO, J. M.; HENNEKENS, C. H. The role of beta-carotene in the prevention of cardiovascular disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 691, p. 148-155, 1993.

GERSTER, H. The potential role of lycopene for human health. **Journal of the American College of Nutrition**, New York, v. 16, p. 109-126, 1997.

GIORIO, G.; STIGLIANI, A. L.; D'AMBROSIO, C. Phytoene synthase genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) - new data on the structures, the deduced amino acid sequences and the expression patterns. **The FEBS Journal**, Oxford, v. 275, p. 527-535, 2008.

GIOVANNUCCI, E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: Review of the epidemiological literature. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 91, p. 317-331, 1999.

GIOVANNUCCI, E.; RIMM, E. B.; LIU, Y.; STAMPFER, M. J.; WILLET, W. C. A prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 94, p. 391-398, 2002.

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

GIULIANO, G.; AL-BABILI, S.; VON LINTIG, J. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. **Trends Plant Science**, Kidlington, v. 8, p. 145-149, 2003.

GOODWIN, T. W.; BRITTON, G. Distribution and analysis of carotenoids. In: GOODWIN TW (Ed.). **Plant pigments**. New York: Academic Press, 1988. p. 62-132.

GOWER, J.; LUBBLE, S.; ROUX, N. **Understanding biplots**. New York: John Wiley & Sons, 2011.

GREEN, B. R.; DURNFORD, D. G. The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis. **Annual Reviews Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 685-714, 1996.

GROSS, J. **Pigments in fruits**. New York: Academic Press, 1987. p. 59-85.

HADLEY, C. W.; MILLER, E. C.; SCHWARTZ, S. J.; CLINTON, S. K. Tomatoes, lycopene, and prostate cancer: Progress and promise. **Experimental Biology and Medicine**, London, v. 227, p. 869-880, 2002.

HAGENIMANA, V.; OYUNGA, M. A.; LOW, J.; NJOROGE, S. M.; GICHUKI S. T.; KABIRA, J. **The effects of women farmers adoption of orange-fleshed sweet potatoes**: raising vitamin a intake in Kenya. Washington DC: ICRW, 1999. (Research Report, serie 3).

HARJES, C. E.; ROCHEFORD T. R.; BAI L.; BRUTNELL T. P.; KANDIANIS C. B.; SOWINSKI S. G.; STAPLETON A. E.; VALLABHANENI R.; WILLIAMS M.; WURTZEL E. T.; YAN J. B.; BUCKLER E. S. Natural genetic variation in *lycopene epsilon cyclase* tapped for maize biofortification. **Science**, Washington, DC, v. 319, p. 330-333, 2008.

HARE, D. J.; PEHRSON, J. E.; CLEMENS, T.; MENGE, J. A.; COGGINS, C. W.; EMBLETON, T. W.; MEYER, J. L. Effect of citrus red mite (Acari: Tetranychidae) and cultural practices on total yield, fruit size, and crop value of 'navel' orange: years 3 and 4. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 85, p. 486-495, 1992.

HIRSCHBERG, J. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, p. 210-218, 2001.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. Iowa State University. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 9, p. 868-877, 1999.

HUFF A. Nutritional control of regreening and degreening in citrus peel segments. **Plant Physiology**, Rockville, v. 73 p. 243-249, 1983.

HUFF A. Sugar regulation of plastic interconversions in epicarp of citrus fruits. **Plant Physiology**, Rockville, v. 73, p. 307-312, 1984.

HUGGETT, J.; DHEDA, K.; BUSTIN, S.; ZUMLA, A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes and Immunity**, London, v. 6, n. 4, p. 279-84, 2005.

IKOMA, Y.; KOMATSU, A.; KITA, M.; OGAWA, K.; OMURA, M.; YANO, M.; MORIGUCHI, T. Expression of a phytoene synthase gene and characteristic carotenoid accumulation during citrus fruit development. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 111, p. 232–238, 2001.

ISAACSON, T.; RONEN, G.; ZAMIR, D.; HIRSCHBERG, J. Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of beta-carotene and xanthophylls in Plants. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 14, p. 333-342, 2002.

JACKSON, M. J. The assessment of bioavailability of micronutrients: Introduction. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 51 p. S1-S2, 1997.

KARVOUNI, Z.; JOHN, I.; TAYLOR, J. E.; WATSON, C. F.; TURNER, A. J.; GRIERSON, D. Isolation and characterization of a melon cDNA clone encoding phytoene synthase. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 27, p. 1153-1162, 1995.

KATO, M.; IKOMA, Y.; MATSUMOTO, H.; SUGIURA, M.; HYODO, H.; YANO, M. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. **Plant Physiology**, Rockville, v. 134, n. 2, p. 824-837, 2004.

KATO, M.; MATSUMOTO, H.; IKOMA, Y.; OKUDA, H.; YANO, M. The role of carotenoid cleavage dioxygenases in the regulation of carotenoid profiles during maturation in citrus fruit. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57 p. 2153–2164, 2006.

KHACHIK, F.; CARVALHO, L.; BERNSTEIN, P. S.; MUIR, G. J.; ZHAO, D. Y.; KATZ, N. B. Chemistry, distribution, and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Malden, v. 227, p. 845-851, 2002.

KIM, I. J.; KO, K. C.; KIM, C. S.; CHUNG, W. I. Isolation and characterization of cDNAs encoding β-carotene hydroxylase in Citrus. **Plant Science**, Amsterdam, v. 161, p. 1005-1010, 2001.

KISHIMOTO, S.; OHMIYA, A. Regulation of carotenoid biosynthesis in petals and leaves of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 128, p. 436-447, 2006.

KITA, M.; KATO, M.; BAN, Y.; HONDA, C.; YAEGAKI, H.; IKOMA, Y.; MORIGUCHI, T. Carotenoid accumulation in japanese apricot (Prunusmume Siebold & Zucc.): molecular analysis of carotenogenic gene expression and ethylene regulation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 55, n. 9, p. 3414-20, 2007.

KITA, M.; KOMATSU, A.; OMURA, M.; YANO, M.; IKOMA, Y.; MORIGUCHI, T. Cloning and expression of CitPDS1, a gene encoding phytoene desaturase in Citrus. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 65, p. 1424-1428, 2001.

KRINSKY, N. I. Actions of carotenoids in biological systems. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 13, p. 561-587, 1993.

LATADO, R. R.; TOGNATO, P. C.; SILVA-STENICO, M. E.; NASCIMENTO, L. M.; SANTOS, P. C. Acúmulo de antocianinas e características físicas e químicas de frutos de laranjas sanguíneas durante o armazenamento a frio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 30, n. 3, p.604-610, 2008.

LEE, H. S. Characterization of carotenoids in juice of red navel orange (Cara-Cara). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 49, p. 2563-2568, 2001.

LEE, H. S.; COATES, G. A. Characterization of color fade during frozen storage of red grapefruit juice concentrates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 50, p. 3988-3991, 2002.

LI, F.; MURILLO, C.; WURTZEL, E. T. Maize Y9 encodes a product essential for 15-cis-ζ-carotene isomerization. **Plant Physiology**. Rockville, v. 144, p. 1188–1189, 2007.

LIU, Q.; XU, J.; LIU, Y.; ZHAO, X.; DENG, X.; GUO, L.; GU, J. A novel bud mutation that confers abnormal patterns of lycopene accumulation in sweet orange fruit (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 15/16, p. 4161-4171, 2007.

LIU, Q.; ZHU, A.; CHAI, L.; ZHOU, W.; YU, K.; DING, J.; XU, J.; DENG, X. Transcriptome analysis of a spontaneous mutant in sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] during fruit development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 3, p. 801–813, 2009.

MACKINNEY, G. Coloring matters. In: SINCLAIR, W.B. (Ed.) **The orange**. Its biochemistry and physiology. Berkeley: University of California, 1961. p. 302-333.

MANN, V.; PECKER, I.; HIRSCHBERG, J. Cloning and characterization of the gene for phytoene desaturase (*PDS*) from tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Plant Molecular Biology.** Dordrecht, v. 24, n. 3, p. 429-434, 1994.

MARTY, I.; BUREAU, S.; SARKISSIAN, G.; GOUBLE, B.; AUDERGON, J. M.; ALBAGNAC, G. Ethylene regulation of carotenoid accumulation and carotenogenic gene expression in color-contrasted apricot varieties (*Prunus armeniaca*). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, p. 1877-1886, 2005.

MATSUMOTO, H.; IKOMA, Y.; KATO, M.; NAKAJIMA, N.; HASEGAWA. Y. Effect of Postharvest Temperature and Ethylene on Carotenoid Accumulation in the Flavedo and Juice Sacs of Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) Fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 57, p. 4724-4732, 2009.

MATSUMOTO, H.; IKOMA, Y.; KATO, M.; KUNIGA, T.; NAKAJIMA, N.; YOSHIDA, T. Quantification of carotenoids in Citrus fruit by LC-MS and comparison of patterns of seasonal changes for carotenoids among Citrus varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 55, p. 2356-2368, 2007.

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

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

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; BRITTON, G.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. The complex carotenoid pattern of orange juices from concentrate. **Food Chemistry**, Barking, v. 109, p. 546-553, 2008.

MILBORROW, B. V. The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of aba biosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 359, p. 1145-1164, 2001.

MONSELISE, S. P.; HALEVY, A. H. Detection of lycopene in pink orange fruit. **Science**, Washington, DC, v. 133, p. 1478, 1961.

MOULY, P. P.; GAYDOU, E. M.; CORSETTI, J. Determination of the geographical origin of Valencia orange juice using carotenoid liquid chromatographic profiles. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 844, p. 149-159, 1999.

NAMBARA, E.; MARION-POLL, A. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. **Annual Reviews of Plant Biology**, Palo Alto, v. 56, p. 165-185, 2005.

NAMITHA, K. K.; NEGI, P. S. Chemistry and biotechnology of carotenoids**.** **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 50, n. 8, p. 728-60, 2010.

NEVES, M. F. (Coord.). **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: Markestrat, 2010. 138 p.

NIYOGI, K. Safety valves for photosynthesis. **Current Opinion Plant Biology**, London, v. 3, p. 455-460, 2000.

OLSON, J. A. Carotenoids and human health. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 49, p. 7S-11S, 1999.

PAGE, R. D. M. TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in the Biosciences**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 357-358, 1996.

PALOZZA, P.; KRINSKY, N. I. Antioxidant effects of carotenoids in vivo and in vitro: An overview. **Methods in Enzymology**, New York, v. 213, p. 403-420, 1992.

PAPINI-TERZI, F. S.; ROCHA, F. R.; VÊNCIO, R. Z.; OLIVEIRA, K. C.; FELIX, J. D. E. M.; VICENTINI, R.; ROCHA, C. D. E. S.; SIMÕES, A. C.; ULIAN, E. C.; DI MAURO, S. M.; DA SILVA, A. M.; PEREIRA, C. A.; MENOSSI, M.; SOUZA, G. M. Transcription profiling of signal transduction-related genes in sugarcane tissues. **DNA Research**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 27-38, 2005.

PARK, H.; KREUNEN, S. S.; CUTRISS, A. J.; DELLAPENNA, D.; POGSON, B. J. Identification of the carotenoid isomerase provides insight into carotenoid biosynthesis, promellar body formation and photomorphogenesis. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 14, p. 321-332, 2002.

PECKER, I.; CHAMOVITZ, D.; LINDEN, H.; SANDMANN, G.; HIRSCHBERG, J. A single polypeptide catalyzing the conversion of phytoene to ζ-carotene is transcriptionally regulated during tomato fruit ripening. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, Washington, DC, v. 89 p. 4962-4966, 1992.

PECKER, I.; GABBAY, R.; CUNNINGHAM JUNIOR, F. X.; HIRSCHBERG, J. Cloning and characterization of the cDNA for lycopene β-cyclase from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 30, p. 807-819, 1996.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLE, L. Relative Expression Software Tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, n. 9, p. e36, 2002.

PFAFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: bestkeeper – excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 26, n. 6, p. 509-515, 2004.

POGSON, B.; MCDONALD, K. A.; TRUONG, M.; BRITTON, G.; DELLAPENNA, D. Arabidopsis carotenoid mutants demonstrate that lutein is not essential for photosynthesis in higher plants. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 8, p. 1627-1639, 1996.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. 2010. Disponível em: <http://www.r-project.org/>.

RAO, A. V.; AGARWAL, S. Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: A review. **Nutrition Research**, Cambridge, v. 19, p. 305-323, 1999.

RISSANEN, T.; VOUTILAINEN, S.; NYYSSÖNEN, K.; SALONEN, J. T. Lycopene, atherosclerosis, and coronary heart disease. **Experimental Biology and Medicine**, London, v. 227, p. 900-907, 2002.

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

RODRIGO, M. J.; ZACARIAS, L. Effect of postharvest ethylene treatment on carotenoid accumulation and the expression of carotenoid biosynthetic genes in the flavedo of orange (*Citrus sinensis* (L). Osbeck) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 43, p. 14-22, 2007.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A. **Guide to carotenoid analysis in foods**. Washington, DC: Ilsi Press, 1999. 71 p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A. Nature and distribution of carotenoids in foods. In: CHARALAMBOUS, G. (Ed.). **Shelf life studies of foods and beverages**: chemical, biological, physical and nutritional aspects. Amsterdam: Elservier Science, 1993. p. 547-589.

RÖMER, S.; HUGUENEY, P.; BOUVIER, F.; CAMARA, B.; KUNTZ, M.. Expression of the genes encoding the early carotenoid biosynthetic enzymes in *Capsicum annuum*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 196, n. 3, p. 1414-1421, 1993.

RONEN, G.; CARMEL-GOREN, L.; ZAMIR, D.; HIRSCHBERG, J. An alternative pathway to β-carotene formation in plant chromoplast discovered by map-based cloning of beta and old-gold color mutations in tomato. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 97, p. 11102-11107, 2000.

RONEN, G.; COHEN, M.; ZAMIR, D.; HIRSCHBERG, J. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon cyclase is down regulated during ripening and is elevated in the mutant delta. **The Plant Journal**, Oxford, v. 17 p. 341–351, 1999.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning - A Laboratory Manual, Ed. 2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

SANDMANN, G. Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 223, p. 7-24, 1994.

SANDMANN, G. Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 385, p. 4-12, 2001.

SANDMANN, G.; RÖMER, S.; FRASER, P. D. Understanding carotenoid metabolism as a necessity for genetic engineering of crop plants. **Metabolic Engineering**, Brugge, v. 8, p. 291-302, 2006.

SAUNT, J. **Citrus varieties of the world**. Norwich, England: Sinclair International Limited: 2000. p. 16-17.

SCHOFIELD, A.; PALIYATH, G. Modulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit ripening through phytochrome regulation of phytoene synthase activity. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 43, p. 1052-1060, 2005.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 227-236, 2004.

SHEWMAKER, C. K.; SHEEHY, J. A.; DALEY, M.; COLBURN, S.; KE, D. Y. Seed specific overexpression of phytoene synthase increase in carotenoids and other metabolic effects. **The Plant Journal**, Oxford, v. 20, p. 401-412, 1999.

SIES, H.; STAHL, W. Lycopene: Antioxidant and biological effects and its bioavailability in the human. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Malden, v. 218, p. 121-124, 1998.

SIMKIN, A. J.; UHU, C.; KUNTZ, M.; SANDMANN, G. Light-dark regulation of carotenoid biosynthesis in pepper (*Capsicum annuum*) leaves. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 160, p. 439-443, 2003.

STACEWICZ-SAPUNTZAKIS, M.; BOWEN, P. E. Role of lycopene and tomato products in prostate health. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1740, p. 202-205, 2005.

STAHL, W.; SIES, H. Lycopene: a biologically important carotenoid for humans? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 336, p. 1-9, 1996.

STAHL, W.; SIES, H. Carotenoids and protection against solar UV radiation. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**, Basel, v. 15, p. 291-296, 2002.

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

SWOFFORD, D. L. **PAUP***: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods) 4.0 Beta. Sunderland: Sinauer Associates, 1998.

SYVERTSEN, J. P.; GOÑI, C.; OTERO, A. Fruit load and canopy shading affect leaf characteristics and net gas exchange of 'Spring' navel orange trees. **Tree Physiology**, Victoria, v. 23, n. 13, p. 899-906, 2003.

TANAKA, Y.; SASAKI, N.; OHMIYA, A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. **The Plant Journal**, Oxford, v. 54, p. 733-749, 2008.

TADEO, F. R.; CERCÓS, M.; COLMENERO-FLORES, J. M.; IGLESIAS, D. J.; NARANJO, M. A.; RÍOS, G.; CARRERA, E.; RUIZ-RIVERO, O.; LLISO, I.; MORILLON, R.; OLLITRAULT, P.; TALON, M. Molecular physiology of development and quality of citrus. **Advances in Botanical Research**, London, v. 47, p. 147-223, 2008.

TAO, N. G.; CHENG, Y. J.; XU, J.; XU, Q.; DENG, X. X. An effective protocol for the isolation of RNA from the pulp of ripening citrus fruits. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 22, p. 305a-305f, 2004.

TAO, N. G.; HU, Z.; LIU, Q.; XU, J.; CHENG, Y.; GUO, L.; GUO, W.; DENG, X. Expression of phytoene synthase gene (PSY) is enhanced during fruit ripening of Cara Cara navel orange (*Citrus sinensis Osbeck*) **Plant Cell Reports**, New York, v. 26, n. 6, p. 837-843, 2007.

UNLU, N. Z.; BOHN, T.; FRANCIS, D.; CLINTON, S. K.; SCHWART, S. J. Carotenoids absorption in human consuming tomato sauces obtained from tangerine or high-beta-carotene varieties of tomatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 55, p. 1597-1603, 2007.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, London, v. 3, n. 7, p.: res.0034.1–res.0034.11, 2002.

VAN HET HOF, K. H.; WEST, C. E.; WESTSTRATE, J. A.; AND HAUTVAST, J. G. A. J. Dietary factors that affect bioavailability of carotenoids. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, p. 503-506, 2000.

WELSCH, R.; ARANGO, J.; BÄR, C.; SALAZAR, B.; AL-BABILI, S.; BELTRÁN, J.; CHAVARRIAGA, P.; CEBALLOS, H.; TOHME, J.; BEYER, P. Provitamin A accumulation in cassava (*Manihot esculenta*) roots driven by a single nucleotide polymorphism in a phytoene synthase gene. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 22, p. 3348-3356, 2010.

WERTZ, K.; SILER, U.; GORALCZYK, R. Lycopene: modes of action to promote prostate health. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 430, p. 127-134, 2004.

XU, C. J.; CHEN, D. M.; ZHANG, S. L. Molecular cloning of full length capsanthin/capsorubin synthase homologous gene from orange (*Citrus sinensis*). **Shi Yan Sheng Wu Xue Bao**, Beijing, v. 34, p. 147-150, 2001.

XU, C. J.; TAO, N.; LIU, Q; DENG, X. Presence de diverse ratios of Lycopene/β-carotene in five pink and red-fleshed citrus variedads. **Scientia Horticulturae**, The Hague, v. 108, p. 181-184, 2006a.

XU, C. J.; FRASER, P. D.; WANG, W. J.; BRAMLEY, P. Differences in the carotenoid content of ordinary citrus and lycopene-accumulating mutants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 54, p. 5474-5481, 2006b.

ZHANG, J.; TAO, N.; XU, Q.; ZHOU, W.; CAO, H.; XU, J.; DENG, X. Functional characterization of *Citrus PSY* gene in Hongkong kumquat (*Fortunella hindsii* Swingle). **Plant Cell Reporters**, New York, v. 28, p. 1737-1746, 2009.

ZHANG, L.; MA, G.; KATO, M.; YAMAWAKI, K.; TAKAGI, T.; KIRIIWA, Y.; IKOMA, Y.; MATSUMOTO, H.; YOSHIOKA, T.; NESUMI, H. Regulation of carotenoid accumulation and the expression of carotenoid metabolic genes in citrus juice sacs in vitro. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 2, p. 871-886, 2012.

APÊNDICE

Apêndice A – Termociclagem dos iniciadores específicos dos genes da via de biossíntese de carotenóides, para amplificação das sequências inteiras dos genes que codificam as proteínas. Ciclagem definida pelo programa (http://www.mutationdiscovery.com/md/MD.com/home_page.jsp).

PSY complete

95ºC, 2 min.
95ºC, 30 sec.
53.1ºC decrescendo 0.5ºC } 14 X
a cada ciclo, 30 sec.
72ºC, 140.0 sec.
95ºC, 30 sec. } 19 X
46.1ºC, 30 sec.
72ºC, 140.0 sec.
72ºC, 5 min.
10ºC

PDS complete

95ºC, 2 min.
95ºC, 30 sec.
57.2ºC, 30 sec. } 29 X
72ºC, 170.0 sec.
72ºC, 5 min.
10ºC

ZDS complete

95ºC, 2 min.
95ºC, 30 sec.
56.2ºC, 30 sec. } 29 X
72ºC, 180.0 sec.
72ºC, 5 min.
10ºC

CRTISO complete

95ºC, 2 min.
95ºC, 30 sec.
60.5ºC, 30 sec. } 29 X
72ºC, 70.0 sec.
72ºC, 5 min.
10ºC

……....……Continua

……...……Continuação

LCYε complete

95ºC, 2 min.
95ºC, 30 sec. } 29 X
51.1ºC, 30 sec.
72ºC, 140.0 sec.
72ºC, 5 min.
10ºC

LCYβ complete

95ºC, 2 min.
95ºC, 30 sec. } 29 X
49.9ºC, 30 sec.
72ºC, 160.0 sec.
72ºC, 5 min.
10ºC

HYβ complete

95ºC, 2 min.
95ºC, 30 sec. } 14 X
58.4ºC decrescendo 0.5ºC
a cada ciclo, 30 sec.
72ºC, 100.0 sec. } 19 X
95ºC, 30 sec.
51.4ºC, 30 sec.
72ºC, 100.0 sec.
72ºC, 5 min.
10ºC

ZEP complete

95ºC, 2 min.
95ºC, 30 sec. } 29 X
50.6ºC, 30 sec.
72ºC, 200.0 sec.
72ºC, 5 min.
10ºC