



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIODIVERSIDADE

**Análise funcional de promotores para expressão
heteróloga e biofortificação para aumento de folatos em
alface (*Lactuca sativa* L.)**

Tatiane Rosa Monteiro

Brasília-DF/Brasil
2019

TATIANE ROSA MONTEIRO

Análise funcional de promotores para expressão heteróloga e biofortificação para aumento de folatos em alface (*Lactuca sativa* L.)

Tese apresentada a Universidade de Brasília, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Francisco José Lima Aragão

Brasília-DF/Brasil
2019

Análise funcional de promotores para expressão heteróloga e biofortificação para aumento de folatos em alface (*Lactuca sativa* L.)

Tatiane Rosa Monteiro

Esta tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biodiversidade.

Banca Examinadora:

Dr. Francisco José Lima Aragão
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Departamento de Biotecnologia e Biodiversidade, UnB
(Presidente)

Dr. Jonny Everson Scherwinski Pereira
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Departamento de Biotecnologia e Biodiversidade, UnB
(Membro titular)

Dra. Diva Maria de Alencar Dusi
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
(Membro titular)

Dr. Eduardo Romano de Campos Pinto
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
(Membro titular)

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Maria do Socorro Rosa Monteiro, grande mulher que amo e admiro muito; e a quem serei eternamente grata por todo amor, dedicação, educação e ensinamentos de vida.

Obrigada por tudo.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Maria do Socorro Rosa Monteiro, e irmãos, Marcelle Rosa Pereira, Thales Rosa Monteiro e Thiago Rosa Monteiro, muito obrigada pelo amor e apoio.

À Universidade de Brasília, especialmente ao Programa de Pós – graduação em Biotecnologia e Biodiversidade e a todo o corpo docente pelos ensinamentos que levarei na minha vida profissional.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), em especial ao Laboratório de Engenharia Genética Aplicada a agricultura Tropical (LEG), pela oportunidade de estudos e utilização das instalações para a realização dos estudos e experimentos.

Ao meu orientador, Dr. Francisco José Lima Aragão e a Dra. Glaucia Barbosa Cabral, pela orientação, apoio e confiança depositada durante a realização dos trabalhos.

Aos colegas do Laboratório de Engenharia Genética Aplicada a agricultura Tropical (LEG), Elsa Nogueira, Abdulrazak Ibrahim, Nátália Souza, Tomas Felipe, Lídia Queiroz, Angélica Gaag, Lorena Peixoto, Pedro Berbert, Raquel Faria, Thaís Cipriano, Jéssica Carrijo, Nathalia Aline, Giovanni Vianna, Kenny Bonfim, Lilian Hasegawa (“agregada” do lab.) pela troca de conhecimentos, convivência, momentos de descontração e amizade.

À minha irmã de coração, Elinea de Oliveira Freitas pelas trocas de conhecimentos, momentos de descontração, pela amizade, pelo carinho e apoio em todos os momentos.

Ao meu namorado, noivo e futuro marido Matheus dos Reis Sobreira por ter me apoiado, pela amizade, pelos momentos compartilhados e pelas palavras de incentivos sempre. Obrigada pelo amor, apoio e paciência durante esses anos. Te amo!

À minha nova família, Valdeina Hora, Elydia Hora, José Aloísio Sobreira, Cristina dos Reis, Mayra Sobreira, Dreyvison Herculano e André Sobreira, agradeço pelo carinho e amor ao me receberem em suas vidas e no ciclo de sua família.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Muito obrigada!

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

Cora Coralina

RESUMO

Monteiro, Tatiane Rosa. Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade, Universidade de Brasília, julho 2019. **Análise funcional de promotores para expressão heteróloga e biofortificação para aumento de folatos em alface (*Lactuca sativa* L.)**. Orientador: Dr. Francisco José Lima Aragão.

A alface é uma hortaliça com ampla distribuição por todo o país, representando uma das plantas mais cultivadas e a folha mais consumida no Brasil e no mundo. No entanto, o sistema de produção da alface no Brasil é afetado por vários fatores ambientais, doenças e pragas que causam grandes prejuízos aos produtores. Neste contexto, a transformação genética de plantas se destaca como uma importante ferramenta biotecnológica e tem sido empregada com os mais diversos objetivos. Contudo, o sucesso no processo de transformação de plantas está associado à utilização de promotores estáveis. Sendo relatado em alface uma dificuldade na manutenção da estabilidade da expressão de transgenes, possivelmente pela utilização do promotor 35SCaMV. No primeiro capítulo o objetivo do trabalho foi testar dois novos promotores, visando alternativas para trabalhos de transformação genética de alface. Foram obtidas 12, 8 e 5 linhagens geneticamente modificadas expressando o gene *gus* sob o controle dos promotores pACT2, pAVP1 e p35SCaMV, respectivamente. Cada planta foi analisada por PCR e ensaio histoquímico em cada geração (T0, T1 e T2). A atividade de GUS foi detectada no tecido foliar de todas as plantas transgênicas (T0) obtidas com o pACT2, em 3 das 8 plantas de pAVP1, e 2 das 5 plantas de p35SCaMV. As plantas transgênicas também foram submetidas ao ensaio fluorimétrico para a quantificação da atividade de GUS. No segundo capítulo o objetivo foi a biofortificação para aumento de folatos em plantas geneticamente modificadas de alface. Experimentos de transformação genética de alface mediada por *Agrobacterium tumefaciens* foram realizados para obtenção das linhagens geneticamente modificadas expressando os genes *gchl* e *adcs*, sob o controle dos promotores ACT2 e AVP1, respectivamente. Foram confirmadas 3 linhagens transgênicas após análise por PCR. As linhagens transgênicas obtidas apresentam um aumento de até 6,3 vezes mais folatos totais quando comparadas a alface não transgênica (controle). E até 2,5 vezes mais folatos quando comparadas ao espinafre (*Spinacea oleracea*), que é uma planta rica em folatos.

Palavras-chave: ACT2, AVP1, *gus*, transformação genética, folatos.

ABSTRACT

Monteiro, Tatiane Rosa. Biotechnology and Biodiversity PhD Program, University of Brasilia, July 2019. **Functional analysis of promoters for heterologous expression and biofortification for folate increase in lettuce (*Lactuca sativa* L.)**. Advisor: PhD Francisco José Lima Aragão.

Lettuce is a vegetable widely distributed throughout the country, representing one of the most cultivated plants and the most consumed leaf in Brazil and in the world. However, the lettuce production system in Brazil is affected by several environmental factors, diseases and pests that cause great damage to producers. In this context, the genetic transformation of plants stands out as an important biotechnological tool and has been employed for the most diverse purposes. However, success in the plant transformation process is associated with the use of stable promoters. Being reported in lettuce a difficulty in maintaining the stability of transgene expression, possibly due to the use of the 35SCaMV promoter. In the first chapter the objective of this work was to test two new promoters, aiming at alternatives for lettuce genetic transformation works. Twelve, 8 and 5 genetically modified strains expressing the *gus* gene were obtained under the control of the pACT2, pAVP1 and p35SCaMV promoters, respectively. Each plant was analyzed by PCR and histochemical assay in each generation (T0, T1 and T2). GUS activity was detected in the leaf tissue of all transgenic (T0) plants obtained with pACT2 in 3 of 8 pAVP1 plants and 2 of 5 p35SCaMV plants. The transgenic plants were also submitted to fluorimetric assay to quantify GUS activity. In the second chapter the objective was biofortification for folate increase in genetically modified lettuce plants. *Agrobacterium tumefaciens* mediated lettuce genetic transformation experiments were carried out to obtain genetically modified strains expressing the *gchl* and *adcs* genes, under the control of the ACT2 and AVP1 promoters, respectively. Three transgenic strains were confirmed after PCR analysis. The transgenic strains obtained showed an increase of up to 6.3 times more total folates when compared to non transgenic lettuce (control). And up to 2.5 times more folate compared to spinach (*Spinacea oleracea*), which is a folate-rich plant.

Keywords: ACT2, AVP1, *gus*, genetic transformation, folates.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
1.1. Aspectos gerais da alface.....	18
1.2. Importância econômica e problemas fitossanitários da cultura.....	19
1.3. Transformação genética de plantas.....	20
1.4. Gene de seleção <i>in vitro</i> e repórteres.....	23
1.5. Promotores.....	24
1.5.1. Gene da actina 2 de <i>Arabidopsis thaliana</i> (ACT2).....	25
1.5.2. Gene AVP1 da bomba de prótons vacuolar H ⁺ pirofosfatase de <i>Solanum lycopersicum</i> (SIAVP1).....	27
1.6. Características gerais dos Folatos.....	28
1.6.1. Importância econômica e problemas	31
1.6.2. Quantificação de folato pelo método microbiológico	33
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
3. OBJETIVOS.....	46
3.1. Objetivo Geral	46
3.2. Objetivos Específicos	46

CAPÍTULO I: Análise funcional de dois promotores para expressão heteróloga em alface (*Lactuca sativa* L.) como alternativa ao promotor 35SCaMV

RESUMO	48
ABSTRACT	50
1. INTRODUÇÃO.....	52
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	54

2.1. Local de condução dos experimentos	54
2.2. Construção dos vetores	54
2.2.1. Clonagem no vetor	54
2.2.2. Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (EHA105) com o vetor de interesse	55
2.3. Transformação genética de alface	55
2.3.1 Preparação dos cotilédones de alface	56
2.3.2. Cocultura dos cotilédones de alface com <i>Agrobacterium</i>	56
2.3.3. Regeneração, enraizamento e aclimatização de plântulas transformadas	57
2.4. Análise das plantas regeneradas	58
2.5. Detecção da proteína PAT no tecido foliar de plantas transgênicas de alface	59
2.6. Ensaio histoquímico para a detecção da atividade de GUS.....	59
2.7. Ensaio fluorimétrico para a quantificação da atividade de GUS	60
2.8. Análise das progênies	60
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
3.1. Construção dos vetores.....	62
3.2. Transformação genética de plantas de alface via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	64
3.3. Detecção da proteína PAT no tecido foliar em plantas de alface.....	65
3.4. Ensaio histoquímico para a detecção da atividade de GUS	67
3.5. Ensaio fluorimétrico para a quantificação da atividade de GUS	71
4. CONCLUSÃO.....	80
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

CAPÍTULO II: Biofortificação para incremento de folatos em plantas geneticamente modificadas de alface (*Lactuca sativa* L.)

RESUMO	86
ABSTRACT	87
1. INTRODUÇÃO.....	88
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	90
2.1. Local de condução dos experimentos.....	90
2.2. Construção do vetor para transformação mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	90
2.3. Transformação da <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (EHA105) com o vetor de interesse...	90
2.4. Transformação genética de alface	91
2.5. Análise das plantas regeneradas	91
2.6. Detecção da proteína PAT no tecido foliar de plantas transgênicas de alface	92
2.7. Análise das progênes	92
2.8. Quantificação de folatos totais pelo método microbiológico	92
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	94
3.1. Construção dos vetores.....	94
3.2. Transformação genética de alface via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	95
3.3. Detecção da proteína PAT no tecido foliar	96
3.4. Quantificação de folatos totais pelo método microbiológico	97
4. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	102
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACT - Actina

ACT2 - gene da actina de *Arabidopsis thaliana*

ANA - Ácido naftalenacético

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AS - Acetoseríngona

BAP - 6-benzilaminopurina

BSA - albumina sérica bovina

°C – Graus Celsius

DFTN - Defeitos de fechamento do tubo neural

DHF – Dihidrofolato

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dNTP - Desoxinucleotídeos trifosfatos

MS – Meio de cultura formulado por Murashige e Skoog, 1962

μM– Micromolar

g - Grama (unidade de medida de massa).

GA - Glufosinato de amônia

GUS - β-glucuronidase

GTP - Guanosina trifosfato

IBA - Ácido indolbutírico

L - Litro (unidade de medida de volume)

mL - Mililitro (unidade de medida de volume)

MUG - 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronídeo

MU - 4-metilumbeliferona

NaCl - Cloreto de sódio

OD – Densidade ótica

OGM - Organismos Geneticamente Modificados

OMS - Organização Mundial da Saúde

PAT - Fosfinotricina acetiltransferase

PCR – Reação em cadeia de polimerase (*Polymerase chain reaction*)

PPT - Herbicida fosfinotricina

pb - Pares de base

rpm - Rotação por minuto

THF - Tetrahydrofolato

X-Gluc - 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronídeo

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I: Análise funcional de dois promotores para expressão heteróloga em alface (*Lactuca sativa* L.) como alternativa ao promotor 35SCaMV

Tabela 1. Condições de temperatura e tempo da PCR (35 ciclos de amplificação).....59

Tabela 2. Análises dos ensaios histoquímicos do gene *gus* e PCRs das plantas positivas.....69

Tabela 3. Análise de segregação do gene *gus* em plantas transgênicas de alface, geração T1.....70

CAPÍTULO II: Biofortificação para incremento de folatos em plantas geneticamente modificadas de alface (*Lactuca sativa* L.)

Tabela 1. Condições de temperatura e tempo da PCR (primers AtGCH1F e AtGCH1R)..91

Tabela 2. Condições de temperatura e tempo da PCR (primers ADCSF e ADCSR).....92

Tabela 3. Análise de segregação dos genes *adcs* e *gchI* em plantas transgênicas de alface, geração T1.....96

Tabela 4. Análise de segregação dos genes *adcs* e *gchI* em plantas transgênicas de alface, geração T2.....96

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I: Análise funcional de dois promotores para expressão heteróloga em alface (*Lactuca sativa* L.) como alternativa ao promotor 35SCaMV

Figura 1. Representação esquemática do vetor pC3301ACT2 utilizado para a transformação genética de alface. O promotor ACT2 aparece em azul controlando o gene *gus* (em vermelho).....62

Figura 2. Representação esquemática do vetor pC3301SlAVPpro, utilizado para a transformação genética de alface. O promotor AVP1 aparece em roxo controlando o gene *gus* (em vermelho).....63

Figura 3. Representação esquemática do vetor pC330135S, utilizado para a transformação genética de alface. O promotor 35SCaMV controla o gene *gus*, em vermelho.....64

Figura 4. Etapas do processo de transformação genética de alface via *Agrobacterium tumefaciens*. A. Sementes germinadas após 3 dias de cultivo (Barra: 1 mm). B. Cotilédones de alface excisados após a cocultura (Barra: 1 mm). C. Brotos regenerando via organogênese na presença do agente seletivo glufosinato de amônia (Barra: 3 mm). D. Plântula em meio de enraizamento (Barra: 5 mm).....65

Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando a presença de fragmento de 423 pb amplificado por PCR a partir de plantas de alfaves transgênicas regeneradas (T0) para detecção do gene *gus*. O DNA do vetor utilizado na transformação foi empregado como controle positivo, e a alface não transgênica como controle negativo.....66

Figura 6. Teste imunocromatográfico de fluxo lateral realizado com extrato de folha de alface para a detecção da proteína PAT. A. Controle negativo, referente à folha de alface não transformada, no qual a linha do controle negativo foi observada. B. Teste com a folha de alface transgênica, no qual o surgimento da linha inferior demonstra a presença da proteína PAT.....67

Figura 7. Ensaio histoquímico nas folhas de alface transgênicas para a detecção da expressão de GUS, primeira geração (T1). A. Disco foliar de alface transgênica (promotor 35SCaMV) (Barra: 1 mm). B. Disco foliar de alface transgênica (promotor AVP1) (Barra: 1 mm). C. Disco foliar de alface transgênica (promotor ACT2) (Barra: 1 mm).....67

Figura 8. Quantificação da atividade de GUS em folhas de plantas transgênicas de alface (T0) transformadas com construções em que o gene *gus* está sob o controle dos promotores ACT2, AVP1 e 35SCaMV.....72

Figura 9. Quantificação da atividade de GUS em folhas de plantas transgênicas de alface (T1) transformadas com construções em que o gene *gus* está sob o controle dos promotores ACT2, AVP1 e 35SCaMV. Cada coluna representa à média de 4 análises independentes, com o respectivo erro padrão indicado pela barra vertical.....73

Figura 10. Quantificação da atividade de GUS em folhas de plantas transgênicas de alface (T2) transformada com a construção em que o gene *gus* está sob o controle do promotor ACT2.....74

Figura 11. Quantificação da atividade de GUS em folhas de plantas transgênicas de alface (T2) transformada com a construção em que o gene *gus* está sob o controle do promotor AVP1.....75

Figura 12. Quantificação da atividade de GUS em folhas de plantas transgênicas de alface (T2) transformada com a construção em que o gene *gus* está sob o controle do promotor 35SCaMV.....75

CAPÍTULO II: Biofortificação para incremento de folatos em plantas geneticamente modificadas de alface (*Lactuca sativa* L.)

Figura 1. Representação esquemática do vetor GS60846-11 pAVPproADCS-ACT2GCHI utilizado para a transformação genética de alface. O promotor AVP1 controlando o gene *adcs*, e o promotor ACT2 controlando o gene *gchI*94

Figura 2. Análise de PCR para detecção dos transgenes em plantas transgênicas de alface. Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando os fragmentos de 296 pb e 405 pb amplificados por PCR das plantas de alfices transgênicas regeneradas (T0) para detecção dos genes *adcs* e *gchI*, respectivamente. Alface não transgênica (controle negativo), e o DNA do vetor utilizado na transformação como controle positivo. Linhagens denominadas L18, L12 e L1.....95

Figura 3. Teste imunocromatográfico de fluxo lateral realizado com extrato de folha de alface transgênica para a detecção da proteína PAT. A. Alface transgênica. B. Teste com a folha de alface transgênica positiva, no qual o surgimento da linha do controle negativo foi observado.....97

Figura 4. Quantificação de folatos totais pelo método microbiológico. Curva padrão (pontos 1 a 6), planta de alface não transformada geneticamente (C1), espinafre (C2), amostras das linhagens transgênicas da segunda geração - T2 (L1, L12 e L18) nas fileiras verticais 4, 5, 6 e 7.....98

Figura 5. Quantificação de folatos totais em plantas de alface transgênica, segunda geração (T2) pelo método microbiológico. Valores de folatos de 3 linhagens obtidas foram significativamente diferentes dos obtidos nos controles (alface não transgênica - Barra Branca) e espinafre (*Spinacea oleracea* - Barra Preta). O espinafre foi utilizado por ser a planta cultivada mais rica em folatos.....99

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Aspectos gerais da alface

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma dicotiledônea, pertencente à família Asteraceae, subfamília Chichorioideae, gênero *Lactuca* e espécie *Lactuca sativa* L. É originária de regiões de clima temperado. Destaca-se como uma das hortaliças folhosas mais produzida e consumida em todo o mundo (Resende *et al.*, 2007). Seu consumo se dá principalmente *in natura*, em saladas, e é considerada como uma planta de propriedades tranquilizantes, e devido ao fato de ser consumida crua preserva todas as suas propriedades nutritivas, sendo fonte de vitaminas A, do complexo B e C, além de apresentar boas concentrações dos minerais ferro (Fe), cálcio (Ca) e fósforo (P), cujos teores variam de acordo com a cultivar (Resende *et al.*, 2007; Sala e Costa, 2012).

Alface é uma planta anual, herbácea, de ciclo curto, com caule diminuto e não ramificado, ao qual estão inseridas as folhas, parte comestível da planta. A disposição das folhas é em forma de roseta no caule (Filgueira, 2008). A espécie possui grande variabilidade com relação à forma, coloração e textura das folhas. As folhas são verdes, inteiras, podendo, conforme a variedade apresentar-se lisa, crespa, recortada, e inclusive colorida (verde-arroxeadas). As suas flores são pequenas margaridas amarelas, reunidas em inflorescência do tipo panícula. As raízes são do tipo pivotante e podem atingir até 60 cm de profundidade (Filgueira, 2000; Filgueira, 2008).

Embora cultivada o ano todo, a cultura é altamente influenciada pelas condições climatológicas. O fotoperíodo, a intensidade luminosa e a temperatura podem influenciar o crescimento e o desenvolvimento. Esta cultura adapta-se melhor sob temperaturas amenas, apresentando em condições de campo maior produção nas épocas mais frias do ano. A variação de rendimento ocorre em função da mudança climática durante o ano e de cultivares (Oliveira *et al.*, 2004).

As cultivares comerciais de alface são classificadas em seis grupos de acordo com a características morfológicas das folhas (Filgueira, 2000; Filgueira, 2008):

Solta-Crespa: as folhas são crespas, consistentes e soltas, não forma cabeça. Exemplo a cultivar Verônica.

Solta-lisa: as folhas são lisas e soltas, não forma cabeça. Exemplo as cultivares Babá de Verão e Regina.

Americana: as folhas são crespas, com nervuras salientes e forma uma cabeça compacta. Exemplo as cultivares Lucy Brown e Lorca.

Mimosa: as folhas são delicadas e as bordas apresentam um aspecto "ondulado", não forma cabeça compacta. Exemplo as cultivares Salad Bowl e Greenbowl.

Repolhuda-manteiga: as folhas são lisas e tenras formando uma cabeça compacta. Exemplo as cultivares Brasil 303 e Elisa.

Romana: as folhas são alongadas, consistentes e com nervuras protuberantes, formando cabeça, com folhas sobrepostas. Exemplo as cultivares Romana Branca de Paris e Romana Balão.

1.2. Importância econômica e problemas fitossanitários da cultura

A alface é fonte de vitaminas, sais minerais, apresenta baixo teor de calorias, possui sabor agradável e boa aceitação pela população, sendo bastante recomendada para dietas alimentares (Filgueira, 2008). Além disso, o custo de produção da alface em cultivo tradicional é relativamente baixo quando comparado a outros vegetais, e também apresenta larga adaptação às condições climáticas e a possibilidade de cultivos sucessivos no mesmo ano, conferindo-lhe grande importância econômica e social (Medeiros *et al.*, 2007).

Essa hortaliça é um dos alimentos com maiores teores de água, aproximadamente 94,4%, possui vitaminas A, do complexo B e C, minerais (Fe, Ca, P), além de fibras que auxiliam na digestão. Em geral as hortaliças possuem grandes concentrações de compostos bioativos, como os carotenóides e os compostos fenólicos, que são estruturas químicas presentes em alimentos de origem vegetal que podem exercer efeitos preventivos/curativos em distúrbios fisiológicos nos humanos, que incluem flavonóides e antocianinas, dentre outros (Souza, 2012). Esses fitoquímicos presentes nos vegetais possuem ação antioxidante e atuam prevenindo o envelhecimento e controlando estresses oxidativos relacionados à ação do excesso de radicais livres, que desencadeiam doenças crônicas não transmissíveis como aterosclerose, doenças coronárias e algumas neoplasias (Souza, 2012).

Dentre as hortaliças folhosas, a alface é a mais plantada e consumida pela população brasileira, sendo o estado de São Paulo o principal produtor, além de ter o maior mercado consumidor do Brasil (Camargo Filho e Camargo, 2008). As cultivares de alface do tipo crespa, predominam no setor produtivo brasileiro, representando cerca de 70% da produção, enquanto que a americana detém 15%, a lisa 10% e as demais 5%. O destaque

para alface do tipo crespa é devido ao fato de apresentar as menores perdas com relação ao transporte e armazenamento (Costa e Sala, 2005).

O sistema de produção da alface no Brasil é afetado por vários fatores ambientais, como por exemplo, o fotoperíodo longo, a alta incidência luminosa e, principalmente, as altas temperaturas. A ação conjunta desses fatores pode causar danos fisiológicos às plantas, além de aumentar a evaporação da água do solo e a diminuição da atividade radicular, causando perdas na produção (Bezerra Neto *et al.*, 2005; Blat *et al.*, 2011).

Além desses fatores, a cultura é afetada também por diversas doenças e pragas que causam prejuízos aos produtores. Dentre as muitas doenças que afetam o cultivo da alface destacamos as mais importantes como a septoriose, causada pelo fungo *Septoria lactucae* (Sousa *et al.*, 2003); mancha de cercospora ou cercosporiose, causada pelo fungo *Cercospora longissima* (Gomes *et al.*, 2006); podridão mole, causada pela bactéria *Erwinia* sp; o mosaico da alface causado pelo vírus *Lettuce mosaic virus* - LMV (Chung *et al.*, 2004), além de viroses causadas por Tospovírus, como o *Groundnut ringspot virus* - GRSV (Colariccio e Chaves, 2017)

1.3. Transformação genética de plantas

A transformação genética de plantas se destaca como uma importante ferramenta biotecnológica e tem sido empregada com os mais diversos objetivos, permitindo que características agronômicas de interesse como resistência a doenças, pragas, herbicidas e tolerância a estresses abióticos, e melhoramento nutricional possam ser introduzidas em plantas cultivadas (Aragão, 2002).

A transformação genética implica na modificação do genoma de um organismo de forma intencional, sendo definida como a introdução de ácidos nucleicos em um genoma receptor por técnicas de engenharia genética, excluindo-se a introdução por fecundação ou cruzamento. Os organismos transformados geneticamente ou transgênicos recebem a denominação de organismos geneticamente modificados (OGM), e os genes inseridos são denominados de transgenes. Diferentes técnicas de transformação genética de plantas foram estabelecidas com o desenvolvimento da cultura de tecidos, no qual fragmentos de plantas (denominados explantes) são cultivados em meio de cultura previamente definido, sob condições controladas, possibilitando assim, a regeneração de uma planta a partir de uma única célula ou de um grupo de células vegetais; e também da utilização da engenharia genética, que permitiu inserir novos caracteres em uma planta (Brasileiro e

Carneiro, 1998; Brasileiro e Carneiro, 2015). Os métodos de transformação genética de plantas podem ser agrupados em duas categorias: transferência direta e transferência indireta de genes (Brasileiro e Carneiro, 2015).

A transferência direta de DNA não requer a utilização de vetores biológicos, e baseia-se em métodos físicos ou químicos que objetivam romper a barreira da parede celular e da membrana plasmática para livre penetração do DNA exógeno na célula (Fisk e Dandekar, 1993).

Já a transferência indireta é aquela em que, para intermediar a transferência de genes, utiliza-se um vetor, como as bactérias *Agrobacterium tumefaciens* (Chilton *et al.*, 1977) ou *Agrobacterium rhizogenes* (Chilton *et al.*, 1982), pertencentes à família Rhizobiaceae (Zambrisky, 1988). Estas são conhecidas como vetores biológicos e sua importância para os estudos de transformação de plantas reside na capacidade natural que esses patógenos possuem de introduzir parte de seu DNA plasmidial em plantas hospedeiras. Esse DNA é integrado e passa a ser expresso como parte do genoma da planta (Hohn, 1992).

As agrobactérias são divididas de acordo com suas características fitopatogênicas em *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. rubi*, *A. vitis* e *A. radiobacter*. A *Agrobacterium tumefaciens* é o agente etiológico causal da doença galha-da-coroa, que afeta a maioria das plantas dicotiledôneas e caracteriza-se pelo crescimento de tumores na junção entre o caule e a raiz (coroa). A formação desses tumores é o resultado de um processo natural de transferência de genes de *Agrobacterium* spp. para o genoma da planta infectada. *A. rhizogenes* é uma bactéria de solo que infecta os tecidos da planta e leva a formação de raízes adventícias, chamadas de raízes em cabeleira. Já a *A. rubi* induz galhas especificamente em *Rubus* spp., *A. vitis* induz galhas especificamente em videiras e *A. radiobacter* é saprófita, ou seja não patogênica (Broothaerts *et al.*, 2005; Gelvin, 2003; Gelvin, 2010). *Agrobacterium tumefaciens* é a mais usada nos trabalhos de transformação genética de plantas e especificamente de alface (Dias *et al.*, 2006; Nunes *et al.*, 2009; Ibrahim *et al.*, 2017).

O processo de infecção por *Agrobacterium* é iniciado quando esta reconhece certos compostos fenólicos liberados pelas células vegetais que sofreram algum tipo de injúria física. A atração das agrobactérias pelas moléculas liberadas pelas células vegetais lesionadas se dá por quimiotactismo positivo, que é a tendência das células se moverem em uma determinada direção por influência de estímulos químicos (Stachel *et al.*, 1985). A

capacidade de infectar as células vegetais está associada à presença do plasmídeo, conhecido como Ti (do inglês: tumor inducing) em linhagens de *Agrobacterium tumefaciens* e Ri (do inglês: root inducing) em linhagens de *Agrobacterium rhizogenes* (Hohn, 1992, Gelvin, 2003). Este plasmídeo apresenta uma região, o T-DNA, que é capaz de ser transferido e integrado no genoma da célula vegetal hospedeira de modo estável. Os tumores obtidos após a infecção da célula vegetal são resultados da expressão de genes presentes no T-DNA, chamados oncogenes. Os oncogenes codificam enzimas envolvidas na biossíntese de hormônios vegetais, auxinas e citocininas. Esses hormônios sintetizados pelas células vegetais transformadas geram um desbalanço hormonal, e conseqüentemente uma multiplicação descontrolada das células, que originam o tumor ou galha-da-coroa em células infectadas por *A. tumefaciens* e o desenvolvimento de raízes em cabeleira em *A. rhizogenes* (Gelvin, 2000; Gelvin, 2003; Otten *et al.*, 2008).

O T-DNA é a única parte do plasmídeo transferida para a célula vegetal, delimitado por duas sequências repetidas de 25 pares de base (pb), conhecidas como bordas direita e esquerda (Hohn, 1992; Gelvin, 2003; Gelvin, 2010). As moléculas responsáveis pela iniciação da transferência do T-DNA são a acetoseringona (AS) ou a-hidroxi-acetoseringona (OH-AS) (Stachel *et al.*, 1985), chalconas e derivados do ácido cinâmico (Stachel *et al.*, 1985; Zambryski, 1988; Zambryski *et al.*, 1989), esses são indutores fenólicos ou moléculas sinalizadoras.

A transferência do T-DNA da agrobactéria para o genoma vegetal ocorre graças às moléculas sinalizadoras que ativam os genes localizados no plasmídeo, conhecida como região de virulência, ou região *vir* do plasmídeo (Goodner *et al.*, 2001). A região de virulência contendo os genes *vir* do plasmídeo forma um conjunto de operons corregulados pelas mesmas proteínas. Essas unidades transcricionais denominadas *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE* e *virG* possuem tamanho de aproximadamente 40 kb (Hooykaas e Beijersbergen, 1994; Păcurar *et al.*, 2011). Os *loci vir* são induzidos pela presença de compostos fenólicos (Păcurar *et al.*, 2011), e somente os quatro *loci virA*, *virB*, *virD* e *virG* são essenciais para a formação do tumor, os demais afetam a eficiência da transferência (Weising e Kahl, 1996).

As vantagens desse sistema de transformação mediado por *Agrobacterium* é o custo, que é menor quando comparado a outros sistemas, visto que não se utiliza equipamentos; os protocolos costumam ser mais simples, e resultam na integração de um segmento de DNA que é definido pelas bordas direita e esquerda do T-DNA, geralmente,

além de transferir segmentos grandes de DNA exógeno e introduzir poucas cópias, sendo que o menor número de cópias evita problemas de silenciamento gênico (Gelvin, 2000).

Atualmente, plantas transgênicas de alface são obtidas através do sistema de transformação mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. Essa metodologia consiste na regeneração de plântulas via organogênese, onde ocorre a diferenciação de células em gemas que se tornam brotos de um tecido vegetal. Este processo é constituído por várias etapas que envolvem trabalho intensivo a partir de co-cultivo de *Agrobacterium* com cotilédones, seguido pela indução da organogênese, em meio de cultura com agente de seleção, e a regeneração de gemas que se desenvolvem em plantas transformadas (Curtis *et al.*, 1994; Dias *et al.*, 2006; Ibrahim *et al.*, 2017).

1.4. Genes para seleção *in vitro* e repórteres

Durante o processo de transformação genética é essencial a presença de um sistema de seleção, com a finalidade de impedir a formação de plantas quiméricas e de diminuir o número de eventos não transformantes. Inserido juntamente com o gene de interesse, o gene de seleção, um potencial dominante nas plantas transformadas, são aqueles capazes de conferir resistência ou tolerância a antibióticos e a herbicidas, permitindo a seleção das células transgênicas. Genes de seleção são necessários para priorizar a divisão das células geneticamente modificadas, uma vez que permite o crescimento destas na presença do agente seletivo, que se convertem em plantas transgênicas, evitando assim o crescimento das células não transformadas que geram os escapes (Aragão e Brasileiro, 2002).

Os denominados agentes de seleção, que podem ser antibióticos ou herbicidas, são utilizados nas etapas iniciais após a transformação genética, para seleção de células ou plantas transgênicas (Sawahel, 1994). Os genes de resistência a herbicidas têm sido utilizados com frequência para seleção de plantas transformadas. Entre os mais usados, temos o gene *bar*, clonado de *Streptomyces hygroscopicus* (Murakami *et al.*, 1986), que codifica para a enzima fosfinotricina acetiltransferase (PAT), que inativa o herbicida fosfinotricina (PPT) (Mazur e Falco, 1989; Aragão e Brasileiro, 2002).

Também são utilizados genes repórteres que permitem diferenciar as células transgênicas por observação visual, como exemplo o gene *uidA* ou gene *gus*, que codifica para a enzima β -glucuronidase (GUS) isolado de *Escherichia coli* e que é amplamente utilizado como gene marcador/repórter, permitindo a identificação e confirmação da transgenia. Este é um dos genes mais utilizados em razão da simplicidade, rapidez e

versatilidade do método de detecção da atividade enzimática e ao fato de que a maioria das plantas não apresenta atividade endógena significativa (Jefferson, 1987).

No entanto, esse método de análise apresenta algumas limitações por ser destrutivo e em alguns casos, plantas ou tecidos, podem apresentar atividade similar a β -glucuronidase (Hodal *et al.*, 1992). A atividade da enzima β -glucuronidase pode ser detectada ou quantificada através de ensaio histoquímico ou fluorimétrico, respectivamente. O ensaio histoquímico é um método qualitativo de análise, baseado na clivagem do substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronídeo (X-Gluc) pela enzima β -glucuronidase. O produto dessa reação forma dímeros na presença de oxigênio, resultando numa precipitação de cor azul. O ensaio fluorimétrico é um método quantitativo de análise da atividade da GUS em plantas transformadas. O substrato 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronídeo (MUG) é hidrolisado pela enzima GUS, resultando em um composto fluorescente, ácido glucurônico e 4-metilumbeliferona (MU), podendo ser quantificado em fluorímetro (Jefferson, 1987).

1.5. Promotores

Promotores são sequências de DNA específicas essenciais para o início da transcrição, sendo reconhecidos por fatores de transcrição gerais e específicos que recrutam a RNA polimerase para realizar a síntese dos RNAs. Essas regiões promotoras são responsáveis pela regulação da expressão gênica, e as informações sobre controle local, temporal, ontogenético e respostas a estímulos ou sinalizações (Twyman, 2003; Dutt *et al.*, 2014).

A escolha de um promotor adequado/eficiente para direcionar a expressão do transgene pode diminuir a variabilidade de expressão. Isso porque a expressão do transgene não é uniforme nas plantas, mesmo quando são geradas em condições iguais, estando sujeitas a mecanismos de regulação endógenos (Cammue *et al.*, 2005).

Os promotores descritos com aplicação biotecnológica para geração de plantas geneticamente modificadas são classificados com base em seu funcionamento, tipo e nível de expressão gênica como: constitutivos, promovem a expressão generalizada em todos os tecidos do organismo; órgão/tecido/célula-específicos, são tecido-específico ou a atividade é restrita a um estágio específico de desenvolvimento; e induzíveis, garantem a expressão do gene após a percepção de um estímulo ambiental, químico ou injúria física e biológica (causada por organismos patogênicos ou não). A escolha do promotor a ser utilizado vai

dependem do objetivo do trabalho, seja para estudo da expressão gênica ou para uso comercial (Zuo *et al.*, 2000; Potenza *et al.*, 2004; Dutt *et al.*, 2014).

Esses promotores são obtidos dos mais diversos organismos, como vírus, bactérias, leveduras, fungos, animais e plantas. Como exemplos, temos o promotor p35SCaMV obtido do vírus do mosaico da couve flor (Odell *et al.*, 1985), nopalina sintase (pNOS) obtido de *Agrobacterium tumefaciens* (Chilton, 1983), actina (pACT2) obtido da planta modelo *Arabidopsis thaliana* (An *et al.*, 1996), dentre vários outros.

Um dos promotores mais utilizados em trabalhos com plantas geneticamente modificadas como dicotiledôneas é o promotor p35SCaMV. A utilização deste promotor resulta na expressão do gene dirigido por ele em todas as células da planta, em todos os estágios de desenvolvimento e sob uma vasta gama de condições fisiológicas (Tzafrir *et al.*, 1998; Dutt *et al.*, 2014). No entanto, é desejável que os promotores utilizados em trabalhos de transformação genética tenham origem na mesma espécie de planta ou em espécies filogeneticamente próximas, pois os sistemas regulatórios podem não agir da maneira prevista em espécies heterólogas distantes (Tyagi, 2001).

Na transformação genética de plantas, a utilização de promotores de origem viral, podem apresentar limitações no que diz respeito ao silenciamento do gene sob sua regulação, pois as células vegetais podem reconhecer esta sequência como estranha e promover sua modificação, por exemplo, promovendo a metilação. A metilação consiste na transferência de um grupo metil ao carbono 5 de citosinas através da ação de DNA metiltransferase, levando a excisão ou remodelamento da cromatina na região onde ela foi inserida, sendo que este grupo metil adicionado impede ou dificulta a ligação do complexo de transcrição gênica (Potenza *et al.*, 2004). Uma alternativa para esse problema é a utilização de promotores de origem vegetal capazes de atribuir expressão constitutiva ao transgene, como por exemplo, os do gene constitutivo de ubiquitina, actina e citocromo c (Cominelli e Tonelli, 2010). A utilização desses promotores é devida à conservação das sequências desses genes entre espécies de plantas, e à sua expressão em quase todas as células vegetais. Além disso, a possibilidade de silenciamento dos transgenes é menor quando se utilizam promotores constitutivos de origem vegetal (Potenza *et al.*, 2004).

1.5.1. Gene da actina 2 de *Arabidopsis thaliana* (ACT2)

A actina (ACT) é a principal proteína do citoesqueleto e tem papel fundamental no desenvolvimento de plantas, regulando processos tais como divisão e expansão celular

(Šljajcherová *et al.*, 2012). Os genes da actina são todos relativamente pequenos e estão espalhados no genoma (McKinney e Meagher, 1998). Esses genes são funcionais e fortemente expressos em algum momento e lugar durante o desenvolvimento da planta (An *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1997; McDowell *et al.*, 1996; Šljajcherová *et al.*, 2012), sendo as regiões promotoras desses genes ótimas candidatas para viabilizar uma expressão generalizada e constitutiva em plantas geneticamente modificadas.

O número de genes de actina em várias espécies de plantas estudadas, demonstrou que esta família de genes é bastante variável. A planta *Arabidopsis thaliana* contém 10 genes, dos quais oito genes codificam proteínas funcionais, e dois genes (*ACT5* e *ACT9*) são pseudogenes, ou seja, são similares a um gene de actina normal, mas não são funcionais. Os genes de actina funcionais são divididos em duas classes de acordo com sua filogenia e seus padrões de expressão, sendo expressos nos tecidos vegetativos ou nos órgãos reprodutivos. A primeira classe é formada pelas três actinas *ACT2*, *ACT7* e *ACT8*, sendo fortemente expressos em tecidos vegetativos, e das quais *ACT2* e *ACT8* são as mais similares, diferindo em apenas um aminoácido. E os outros cinco genes, *ACT1*, *ACT3*, *ACT4*, *ACT11* e *ACT12*, são expressos em tecidos reprodutivos (McDowell *et al.*, 1996; Meagher *et al.*, 1999; Nishimura *et al.*, 2003; Šljajcherová *et al.*, 2012).

Os genes *ACT2* e *ACT8* possuem expressão constitutiva elevada na maioria dos tecidos vegetais de *Arabidopsis thaliana*, onde foram reportados com maior intensidade em raízes, caules e folhas (An *et al.*, 1996). McDowell *et al.* (1996) também observaram um padrão de expressão forte e constitutivo em todos os tecidos vegetativos analisados com esses genes, sendo tal padrão consideravelmente diferente de qualquer outro padrão de expressão determinado para os demais genes de actina descritos.

Os genes de actina têm sido empregados como promotores na construção de vetores de expressão visando à transformação genética de plantas de interesse agrônomico. O promotor do gene *OsAct1* de arroz, mostrou-se de 5 a 10 vezes mais ativo do que o promotor do gene *Adh1* de milho em transformações em arroz, sendo este um promotor altamente eficiente no processo (McElroy *et al.*, 1990). Ainda em arroz, observou-se que o promotor do gene *OsAct2* também é capaz de conferir uma expressão constitutiva nas plantas transgênicas (He *et al.*, 2009).

O fato do gene *ACT2* ter um padrão de expressão forte e constitutivo nos tecidos vegetais foi determinante para a escolha do promotor deste gene para este estudo de análise funcional de promotores na transformação de plantas de alface.

1.5.2. Gene *AVPI* da bomba de prótons vacuolar H⁺pirofosfatase de *Solanum lycopersicum* (*SlAVPI*)

A H⁺pirofosfatase (H⁺-PPase) juntamente com a H⁺-ATPase são as maiores bombas de prótons eletrogênicas, sendo capazes de gerar um gradiente eletroquímico de prótons acidificando o vacúolo (organela delimitada por uma membrana simples designada tonoplasto e preenchida com fluido aquoso) nas células vegetais e fornecendo assim, energia para o transporte de íons inorgânicos, açúcares e ácidos orgânicos (Maeshina, 2000; Maeshina, 2001; Mohammed *et al.*, 2012). Essas bombas (H⁺-ATPase e H⁺-PPase), utilizam a energia proveniente da quebra de ligações de alta energia das moléculas de ATP e pirofosfato do substrato (PPi), respectivamente, para transportar H⁺ para o interior do vacúolo. Dessa forma um gradiente de prótons é gerado, o qual tem como componentes a variação de pH e a variação do potencial de membrana. A entrada de prótons realizada por essas bombas gera um potencial elétrico de membrana positivo do lado interno em relação ao lado externo do tonoplasto, bem como uma variação de pH, onde a concentração de H⁺ é maior no interior do vacúolo em relação ao meio citoplasmático (Maeshina, 2001).

A bomba de prótons H⁺-PPase apresenta algumas características, como ser altamente hidrofóbica; consistir em um único polipeptídeo com uma massa molecular de aproximadamente 80 kDa; essa enzima utiliza um pirofosfato de substrato (PPi) simples e de baixo custo que possui uma ligação fosfoanidreto de alta energia. O PPi é gerado como um subproduto de vários processos biossintéticos para macromoléculas, como proteína, RNA e celulose. E esta eficiente bomba de prótons coexiste com a bomba H⁺-ATPase em uma única membrana vacuolar em células vegetais. Esta propriedade está relacionada com a função fisiológica da H⁺-PPase nas células vegetais (Rea *et al.*, 1992; Mohammed *et al.*, 2012).

A H⁺-PPase é encontrada na maioria das plantas terrestres, algas, protozoários, bactérias e archeobactérias. Sendo que as PPases podem ser divididas em três classes: PPase solúvel, PPase associada a membrana e H⁺-PPases. No entanto, apenas a H⁺-PPase entre os três tipos tem a capacidade de transportar prótons através da membrana (Maeshina, 2000; Martinoia *et al.*, 2007; Mohammed *et al.*, 2012).

O gene *AVPI* faz parte da família de genes da bomba de prótons H⁺pirofosfatase (H⁺-PPase), e possui expressão constitutiva, exceto em frutos maduros (Mohammed *et al.*, 2012). Este gene tem sido relacionado com o desenvolvimento radicular e organogênese, associado à facilitação do fluxo de auxina e regulação da H⁺-ATPase de membrana (Li *et*

al., 2005). Em tomateiro (*Solanum lycopersicum*), a expressão aumentada do gene *AVPI* gerou aumento da resistência à seca, elevando o crescimento radicular, a absorção de água, o potencial hídrico foliar e a sobrevivência das plantas (Park *et al.*, 2005).

Foi demonstrado também que a superexpressão de *AVPI* em *Arabidopsis thaliana* resultou no aumento da divisão celular no começo da formação dos órgãos e aumentou o transporte de auxina (Gaxiola *et al.*, 2007). Também foi responsável por aumentar a biomassa total e a produtividade de sementes em *Arabidopsis*, arroz, e milho, sob condições de deficiência e suficiência de fósforo (Yang *et al.*, 2007; Pei *et al.*, 2012). O fato do promotor do gene *AVPI* também apresentar um padrão de expressão forte e constitutivo foi importante para a escolha deste para o estudo de análise funcional de promotores na transformação de plantas de alface.

1.6. Características gerais dos Folatos

As vitaminas são substâncias orgânicas requeridas em pequenas quantidades e indispensáveis à manutenção das funções metabólicas do organismo. Apesar de essenciais ao metabolismo, não são sintetizadas pelo organismo, necessitando ser adquiridas por meio de alimentos fonte. Essas são classificadas dependendo da solubilidade em água e em lipídeos, como hidrossolúveis e lipossolúveis, respectivamente (Fitzpatrick *et al.*, 2012).

Os folatos são vitaminas hidrossolúveis que contém a estrutura do ácido fólico (2-amino-4-hidroxi-6-metilenoaminobenzol-L-glutâmico), também denominado ácido pteroilglutâmico ou vitamina B₉, que foi isolado a partir de folhas do espinafre, em 1941, o que implicou em sua nomenclatura que é derivada da observação do composto nas folhas (*folium*, em latim) (Eskes, 2000). É uma molécula composta de três subunidades: a pteridina, ácido p-aminobenzóico (p-ABA) e o ácido glutâmico. É muito instável ao calor e na presença de ácidos fortes, sendo facilmente oxidada (Rebeille *et al.*, 2006; Akhtar *et al.*, 2010; Blancquaert *et al.*, 2014).

O termo folato representa o grupo de compostos que possui a mesma atividade vitamínica, o que inclui os folatos naturais e o ácido fólico, que é a forma sintética (monoglutâmica) utilizada para a fortificação/enriquecimento de alimentos ou para suplementos vitamínicos. A forma sintética proporciona uma melhor biodisponibilidade da vitamina, que é a acessibilidade do nutriente ingerido aos processos metabólicos, quando comparado ao de alimentos naturais (Iyer e Tomar, 2009). A quantidade absorvida desta vitamina por pessoa vai depender da quantidade ingerida, das condições fisiológicas como

crescimento ou gravidez, ou de condições patológicas como má absorção de nutrientes (Blancquaert *et al.*, 2014).

As principais fontes alimentares de folatos são leguminosas e oleaginosas (feijão, nozes, ervilha), folhas verdes (espinafre), frutas cítricas, legumes (brócolis, couve-flor), fígado, ovos e laticínios (leites e fermentados). E também podem ser obtido por meio de alimentos enriquecidos com ácido fólico ou através de medicamentos (Arcot e Shrestha, 2005; Kim, 2007).

A via de síntese de folato nas plantas ocorre em três compartimentos subcelulares, no citosol, plastídios e mitocôndrias. As pteridinas são formadas a partir de guanosina trifosfato (GTP) no citosol e o ácido p-aminobenzóico (p-ABA) é formado nos plastídios. Estes são transportados para a mitocôndria, em conjunto com o glutamato, para produzir dihidrofolato, que posteriormente é convertido em tetrahydrofolato (THF) (Hanson e Gregory, 2002; Hanson e Gregory, 2011; Ravanel *et al.*, 2011). O primeiro passo para a síntese de pterinas envolve a GTP no citosol controlando o fluxo da via de síntese do folato, passo este mediado por GTP ciclohidrolase I (GCHI), que converte GTP a dihidroneopterina (DHN) trifosfato. Em seguida um pirofosfato é quebrado por DHN trifosfato sintase (DHPS), formando dihidroneopterina monofosfato. Posteriormente, a dihidrofolato sintase (DHFS), encontrada na mitocôndria, catalisa a síntese de dihidroopteroato a 7,8 dihidrofolato, que é convertido em THF-monoglutamilado pela catalização da enzima dihidrofolato redutase (DHFR). Já a síntese de p-ABA é mediada por aminodeoxicorismato sintase (ADCS), que tem peptídeos sinais de endereçamento para os plastídios (Basset *et al.*, 2002; Hanson e Gregory, 2011; Ravanel *et al.*, 2011; Gorelova *et al.*, 2017).

O folato para se tornar biologicamente ativo precisa sofrer um processo de redução e se transformar em dihidrofolato (DHF) e tetrahydrofolato (THF), pela adição de átomos de hidrogênio nas posições 7, 8 e 5, 6, 7 e 8, respectivamente (Whitsett *et al.*, 2013). Pode ainda ligar unidades de carbono, que inclui grupos radicais metil (CH₃), formil (-CHO-) ou formimino, e metileno (CH₂) ligados aos átomos de nitrogênio, nas posições N⁵, N¹⁰, e N^{5,10}, conferindo a essa vitamina a função de coenzima em diferentes sistemas enzimáticos (Lucock, 2000). E para que chegue até os tecidos, precisa ser transportado pela circulação sanguínea sob a forma de 5-metiltetrahydrofolato (5-metil-THF) conjugado a proteínas ligantes de baixa afinidade por folato, como a albumina (Brito *et al.*, 2012).

Os folatos da dieta são encontrados na forma de monoglutamato e poliglutamato, sendo que a forma de poliglutamato compreende de 80 a 90% dos folatos presentes nos alimentos fonte (Gregory, 2001). Já na forma de suplemento, é mais estável e se encontra na forma de monoglutamato, que é absorvido rapidamente pelo organismo. A absorção intestinal do folato da dieta é de 60%, enquanto que a de suplementos ou alimentos fortificados é de 98% (Uehara e Rosa, 2010).

A absorção dessa vitamina ocorre pelas células da mucosa intestinal do duodeno e jejuno por transporte ativo e é mediado por carreador dependente de sódio em pH ótimo. No entanto, quando ingeridos em grandes quantidades pode ser absorvido por transporte passivo. Para atravessar a mucosa intestinal, os poliglutamatos são hidrolisados a monoglutamatos, que é a única forma absorvível de folato, pela ação da enzima (pteroilglutamato hidrolase) presente na borda em escova da mucosa intestinal. O folato captado pelos enterócitos é reduzido a THF que pode ser metilado a 5-metiltetrahidrofolato, que é a principal forma encontrada no plasma, e a forma de transporte via circulação para o fígado e tecidos periféricos; ou é mantido intracelularmente pela conversão a poliglutamato (folilpoliglutamato), por meio da enzima pteroilglutamato sintase. Essa vitamina é estocada principalmente no fígado e secretada na bile (Eskes, 2000).

Os folatos são importantes para diversos processos bioquímicos, atuando como coenzima (molécula não proteica cuja associação com uma enzima é indispensável a sua atividade catalítica) no metabolismo de aminoácidos (glicina) e síntese de purinas e pirimidinas, síntese de ácidos nucleicos, DNA e RNA, e são vitais para a divisão celular e síntese proteica (Blancquaert *et al.*, 2010; Leung *et al.*, 2013; Strobbe e Van Der Straeten, 2017). Tem um papel fundamental no processo da multiplicação celular, sendo imprescindível durante a gravidez. Sua carência pode ocasionar alterações na síntese de DNA e alterações cromossômicas. A síntese dos ácidos nucleicos e de proteínas é aumentada durante a embriogênese e no crescimento fetal, sendo que as necessidades de folatos aumentam durante a gestação. Esta vitamina influencia no aumento dos eritrócitos, no alargamento do útero e no crescimento da placenta e do feto (Geisel, 2003; Williams *et al.*, 2015).

É imprescindível que a mulher em idade fértil tenha acesso a uma quantidade adequada de ácido fólico antes de engravidar. A estratégia de estimular o consumo dessa vitamina antes da gestação tem como objetivo a prevenção. Por isso a necessidade de ações

voltadas para a conscientização da população sobre a importância de ingerir folatos. E as gestantes são mais propensas a desenvolver deficiência de folatos devido ao aumento da demanda desse nutriente durante a gestação. Outros fatores que contribuem são a dieta inadequada e influências hormonais. Sabe-se que a deficiência de folatos está associada ao aumento da ocorrência de defeitos de fechamento do tubo neural (DFTN) (Geisel, 2003; Pitkin, 2007; Imbard *et al.*, 2013; Williams *et al.*, 2015).

O tubo neural, estrutura embrionária que dará origem ao cérebro e a medula, tem seu fechamento na quarta semana após a concepção, período no qual muitas mulheres desconhecem ainda a gravidez. Quando o fechamento não é completado, podem ocorrer alterações cuja morfologia dependerá do tipo de falha e do local afetado, originando anormalidades congênitas. As mais frequentes são anencefalia (onde a extremidade superior do tubo neural não se fecha resultando na ausência total do encéfalo e da caixa craniana do feto) e a espinha bífida, malformação em que algumas vértebras que recobrem a medula espinhal não são totalmente formadas, permanecendo abertas e sem se fundirem (Eskes, 2000; Geisel, 2003; Imbard *et al.*, 2013; Williams *et al.*, 2015).

Doenças cardiovasculares também estão relacionadas à deficiência de folatos no organismo. Elas ocorrem quando há elevação dos níveis de homocisteína devido à deficiência dessa vitamina, que é necessária para a conversão da homocisteína em metionina. Há correlação na literatura médica que apontam a hiperhomocisteinemia como um fator de risco para doenças cardiovasculares (Scott e Weir, 1996; Ganguly e Alam, 2015).

1.6.1. Importância econômica e problemas

O folato é sintetizado por microorganismos e plantas, mas não por mamíferos, para os quais é um nutriente essencial, necessitando ser ingerido por meio da dieta (Basset *et al.*, 2002; Blancquaert *et al.*, 2014). A recomendação dietética diária de folatos para homens adultos é de 200 µg, mulheres adultas de 180 µg, gestantes de 400 µg e mulheres que estão amamentando de 280 µg. No entanto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a ingestão diária de 400 µg de ácido fólico para todas as mulheres em idade fértil como prevenção em caso de gestações não planejadas. Esta vitamina pode ser obtida por meio de suplementos, alimentos com alta concentração de folatos ou consumo de alimentos fortificados.

Pesquisas apontam uma ingestão insuficiente de vários nutrientes por parte da população mundial, sendo a nutrição inadequada um problema com sérias implicações a saúde. Uma das principais estratégias empregadas para minimizar este problema é a fortificação de alimentos, devido a sua abrangência, biodisponibilidade e baixo custo. Essa prática tem como objetivo reforçar o valor nutritivo e prevenir ou corrigir deficiências de um ou vários nutrientes essenciais da dieta de uma população (Alaburda e Shundo, 2007; Soeiro *et al.*, 2010). A fortificação de produtos cereais e grãos com ácido fólico é uma prática comum em muitos países. Outra opção que vem sendo bastante pesquisada é o aumento do teor de folatos em plantas por meio da engenharia genética (De la Garza *et al.*, 2007; Nunes *et al.*, 2009; Blancquaert *et al.*, 2014; Blancquaert *et al.*, 2017).

A falta de vitaminas pode causar sérias doenças aos seres humanos. Nos últimos anos, os folatos tem despertado um grande interesse devido a sua ligação na prevenção e redução significativa do risco de malformação do tubo neural (Youngblood *et al.*, 2013; Imbard *et al.*, 2013; Williams *et al.*, 2015), bem como na prevenção de doenças cardiovasculares (Scott e Weir, 1996; Ganguly e Alam, 2015), alguns tipos de cânceres (Choi e Mason, 2000; Choi e Friso, 2005; Rashedi *et al.*, 2018), e problemas neuropsiquiátricos, tais como demência e Alzheimer (Seshadri *et al.*, 2002), entre outras doenças.

Nesse contexto, a fortificação de alimentos com folato tem crescido com as descobertas relacionadas às suas funções nos diversos processos metabólicos no organismo humano. E em 1998, nos Estados Unidos, a Food and Drug Administration (FDA) determinou que cereais manufaturados (farinha, arroz, pães, macarrão, etc.) fossem enriquecidos com ácido fólico na concentração de 140 µg/100 g de produto (Brent *et al.*, 2000).

No Brasil, devido aos altos índices de doenças causadas pela carência de folatos, tornou-se obrigatória a fortificação das farinhas de trigo e milho desde junho de 2004, devendo a cada 100 g de farinha ter no mínimo 150 µg de ácido fólico, por meio da resolução do Ministério da Saúde e a da Agência Nacional de Vigilância (Anvisa) – RDC nº 344 de 13 dezembro de 2002 (Brasil, 2002; Pacheco *et al.*, 2009). A escolha desses produtos é baseada no grande consumo da população por produtos feitos a partir dessas farinhas (Pacheco *et al.*, 2009). Na Europa a fortificação não é obrigatória, apesar de reconhecerem os benefícios e a importância dos folatos para a saúde humana, e em alguns países a fortificação é somente voluntária.

O enriquecimento dos alimentos tem sido uma estratégia para aumentar os níveis de folatos, tendo a vantagem de alcançar uma ampla parte da população. A escolha do produto alimentício depende dos hábitos alimentares da população, dos aspectos logísticos do processo de fortificação e a relação química entre o ácido fólico e o produto que será fortificado, sendo a farinha de trigo, o alimento mais frequentemente escolhido (Alaburda e Shundo, 2007).

O folato é muito instável ao calor e por isso o processamento de alimentos a temperaturas elevadas resulta em perdas consideráveis da vitamina; além disso, o cozimento dos alimentos reduz bastante a sua concentração, até 70 % de sua quantidade natural pode ser destruída durante o cozimento, processamento ou estocagem dos alimentos. Fatores como temperatura, luz, pH, presença de catalisadores e agentes oxidantes também são responsáveis pela degradação dos folatos (Scott *et al.*, 2000; Hanson e Gregory, 2002; Hanson e Gregory, 2010).

Nesse sentido, a biofortificação em plantas por engenharia genética, que consiste em aumentar o nível de vitamina natural das culturas alimentares, é defendido como um poderoso método complementar para combater a desnutrição vitamínica (Bekaert *et al.*, 2008; Blancquaert *et al.*, 2017; Saltzman *et al.*, 2017). Diversos trabalhos de biofortificação já foram relatados em *Arabidopsis* (Hossain *et al.*, 2004; Blancquaert *et al.*, 2013), tomate (Diaz de la Garza *et al.*, 2004; De la Garza *et al.*, 2007), arroz (Storozhenko *et al.*, 2007), alface (Nunes *et al.*, 2009), milho branco (Naqvi *et al.*, 2009) e batata (Blancquaert *et al.*, 2013).

1.6.2. Quantificação de folatos totais pelo método microbiológico

O método mais utilizado para análise da quantificação de folatos é o ensaio microbiológico que se baseia na relação quantitativa entre o conteúdo de folatos e o crescimento do microrganismo a partir da medida da turbidez da solução. O crescimento do microrganismo depende da quantidade de folatos presentes nas amostras, sendo que este crescimento é proporcional à turbidez do meio. Este ensaio requer equipamentos de baixo custo, determina a quantidade de folatos totais e é muito sensível. Este ensaio é baseado no fato do folato estimular o crescimento de microorganismos lácticos, como o *Lactobacillus rhamnosus*. Esta bactéria tem sido a mais utilizada na determinação de ácido fólico nos alimentos, devido à sua resposta as diversas formas de folato (Arcot e Shrestha, 2005; Fajardo *et al.*, 2015).

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alaburda, J.; Shundo, L. Ácido fólico e fortificação de alimentos. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.66, n.2, 2007.

Akhtar, T. A., Orsomando, G., Mehrshahi, P., Lara-Núñez, A., Bennett, M. J., Gregory, J. F., III, Hanson, A. D. A central role for gamma-glutamyl hydrolases in plant folate homeostasis. *The Plant Journal*, v.64, n.2, p.256–266, 2010.

An, Y. Q.; McDowell, J. M.; Huang, S.; McKinney, E. C.; Chambliss, S.; Meagher, R. B. Strong, constitutive expression of the Arabidopsis ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. *The Plant Journal*, v.10, n.1, p.107–121, 1996.

Arcot, J.; Shrestha, J. Folate: methods of analysis. *Trends Food Science & Technology*, v. 16, n.6, p.253–266, 2005.

Aragão, F. J. L.; Brasileiro, A. C. M. Positive, negative and marker-free strategies for transgenic plant selection. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v.14, n.1, p.1-10, 2002.

Basset, G.; Quinlivan, E. P.; Ziemak, M. J.; De la Garza, R.; Fischer, M.; Schiffmann, S.; Bacher, A.; Gregory, J. F.; Hanson, A. D. Folate synthesis in plants: the first step of the pterin branch is mediated by a unique bimodular GTP cyclohydrolase I. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v.99, n.19, p.12489–12494, 2002.

Bekaert, S.; Storozhenko, S.; Mehrshahi, P.; Bennett, M. J.; Lambert W.; Gregory III, J. F.; Schubert, K.; Hugenholz, J.; Van Der Straeten D.; Hanson, A. D. Folate biofortification in food plants. *Trends in Plant Science*, v.13, n.1, p.28-35, 2008.

Blancquaert, D.; Storozhenko, S.; Loizeau, K.; De Steur H, De Brouwer, V.; Viaene, J.; Ravel, S.; Rebeille, F.; Lambert, W.; Van Der Straeten, D. Foliates and folic acid: from fundamental research toward sustainable health. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.29, n.1, p.14- 35, 2010.

Bezerra Neto, F.; Rocha, R. H. C.; Rocha, R. C. C.; Negreiros, M. Z.; Leitão, M. M. V. B. R.; Nunes, H. S.; Sobrinho, J. E.; Queiroga, R. C. F. Sombreamento para produção de mudas de alface em alta temperatura e ampla luminosidade. *Horticultura Brasileira*, v.23, n.1, p.133-137, 2005.

Blancquaert, D., Storozhenko, S., Van Daele, J., Stove, C., Visser, R. G., Lambert, W., Van Der Straeten, D. Enhancing pterin and para-aminobenzoate content is not sufficient to

successfully biofortify potato tubers and *Arabidopsis thaliana* plants with folate. *Journal of Experimental Botany*, v.64, n.12, p.3899–3909, 2013.

Blancquaert, D.; Steur, H. De; Gellynck, X.; Van Der Straeten D. Present and future of folate biofortification of crop plants. *Journal of Experimental Botany*, v.65, n.4, p.895–906, 2014.

Blancquaert, D.; Steur, H.; Gellynck, X.; Van Der Straeten, D. Metabolic engineering of micronutrients in crop plants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.1390, n.1, 59–73, 2017.

Blat, S. F.; Branco, R. B. F.; Trani, P. E. Desempenho de cultivares de alface em Ribeirão Preto (SP) no cultivo de primavera. *Pesquisa & Tecnologia*, v.8, p.9, 2011.

Brasil. Resolução – RDC nº 344 de 13 de dezembro de 2002. Regulamento Técnico para Fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico. *Diário Oficial da União*, Brasília, 18 de dezembro de 2002.

Brasileiro, A. C. M.; Carneiro, V. T. C. Manual de transformação genética de plantas. Brasília/DF:Embrapa-SPI:Embrapa-Cenargen, p.309, 1998.

Brasileiro, A. C. M.; Carneiro, V. T. C. Manual de transformação genética de plantas. Brasília/DF:Embrapa, 2º Edição revista e ampliada, 2015.

Brito, A.; Hertrampf, E.; Olivares, M.; Gaitán, D.; Sánchez, H.; Allen L. H.; Uauy, R. [Folate, vitamin B12 and human health]. *Revista Médica de Chile*, v.140, n.11, p.1464-75, 2012.

Brent, R. L.; Oakley, G. P.; Mattison, D. R. The unnecessary epidemic of folic acid-preventable spina bifida and anencephaly. *Pediatrics*, v.106, n.4, p.825-827, 2000.

Broothaerts, W.; Mitchell, H. J.; Weir, B.; Kaines, S.; Smith, L. M. A.; Yang, W.; Mayer, J. E.; Roa-Rodríguez, C.; Jefferson, R. A. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature*, v.433, p.629-633, 2005.

Camargo Filho, W. P.; Camargo, F. P. Planejamento da produção sustentável de hortaliças folhosas: organização das informações decisórias ao cultivo. *Informações Econômicas*, São Paulo, v.38, n.3, p.27-36, 2008.

Cammue, B. P. A.; Butaye, K. M. J.; Delaure, S. L.; De Bolle, M. F. C. Approaches to minimize variation of transgene expression in plants. *Molecular Breeding*, v.16, p.79–91, 2005.

Chilton, M. D.; Currier, T. C.; Farrand, S. K.; Bendich, A. J.; Gordon, M. P.; Nester, E. W. *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, DC, v.71, n.9, p.3672-3676, 1974.

Chilton, M. D.; Drummond, M. H.; Merlo, D. J.; Sciaky, D.; Montoya, A. L.; Gordon, M. P.; Nester, E. W. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell*, v.11, p.263-271, 1977.

Chilton, M. D.; Tepfer, D. A.; Petit, A.; David, C.; Cassedelbart, F.; Tempé, J. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into genomes of the host-plant root cells. *Nature*, v.295, p.432-434, 1982.

Chilton, M. D. A vector for introducing new genes into plants - *Agrobacterium tumefaciens*, genetic engineering. *Scientific American*, v.248, p.50-59, 1983.

Choi, S. W.; Mason, J. B. Folate and Carcinogenesis: An Integrated Scheme. *The Journal of Nutrition*, v.130, n.2, p.129-132, 2000.

Choi, S. W.; Friso, S. Interactions between folate and aging for carcinogenesis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v.43, n.10, p.1151-1157, 2005.

Chung, R. M.; Azevedo, F. J. A.; Colariccio, A. avaliação da reação de genótipos de alface (*Lactuca sativa* L.) ao lettuce mosaic virus (LMV). *Bragantina, Campinas*, v.66, n.1, 2004.

Cominelli, E.; Tonelli, C. Transgenic crops coping with water scarcity. *New Biotechnology*, v.27, n.5, p.473-477, 2010.

Colariccio, A.; Chaves, A. L. R. Boletim Técnico: Aspectos Fitossanitários da Cultura da Alface. São Paulo: Instituto Biológico, p.51-54, 2017.

Costa, C. P.; Sala, F. C. A evolução da alfacultura brasileira. *Horticultura Brasileira*, Brasília, DF, v.23, n.1, 2005.

Curtis, I. S.; Power, J.B.; Blackhall, N.M.; de Laat, A. M. M.; Davey, M. R. Genotype-independent transformation of lettuce using *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Experimental Botany*, v.45, p.1441-1449, 1994.

De la Garza, R. D.; Quinlivan, E. P.; Klaus, S. M. J.; Basset, G. J. C.; Gregory III, J. F.; Hanson, A. D. Folate biofortification in tomatoes by engineering the pteridine branch of folate synthesis. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, v.101, n.38, p.13720-13725, 2004.

De la Garza, R. I. D.; Gregory III, J. F.; Hanson, A. D. Folate biofortification of tomato fruit. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v.104, n.10, p.4218–4222, 2007.

Dias, B. B. A.; Cunha, W. G.; Morais, L. S.; Vianna, G. R.; Rech, E. L.; Capdeville, G.; Aragão, F. J. L. Expression of an oxalate decarboxylase gene from *Flammulina* sp. in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) plants and resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology*, n.55, p.187–193, 2006.

Dutt, M.; Dhekney, S. A.; Soriano, L.; Kandel, R.; Grosser, J. W. Temporal and spatial control of gene expression in horticultural crops. *Horticulture Research*, v.1, n.14047, 2014.

Eskes, T. K. A. B. From anemia to spina bifida — the story of folic acid: A tribute to Professor Richard Smithells. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v.90, n.2, p.119-123, 2000.

Fajardo, V.; Alonso-Aperte, E.; Varela-Moreiras, G. Folate content in fresh-cut vegetable packed products by 96-well microtiter plate microbiological assay. *Food Chemistry*, v.169, p.283–288, 2015.

Filgueira, F. A. R. *Novo manual de olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças*. Viçosa: UFV, p.402, 2000.

Filgueira, F. A. R. *Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 2º edição - revista e ampliada*. Viçosa: UFV. 2008.

Fisk, H. J.; Dandekar, A. M. The introduction and expression of transgenes in plants. *Scientia Horticulture*, v.55, p.5-36, 1993.

Fitzpatrick, T. B.; Basset, G. J. C.; Borel, P.; Carrari, F.; DellaPenna, D.; Fraser, P. D.; Hellmann, H.; Osorio, S.; Rothan, C.; Valpuesta, V.; Caris-Veyrat, C.; Fernie, A. R. Vitamin deficiencies in humans: can plant science help? *Plant Cell*, v.24, p.395-414, 2012.

Fox, J.; Stover, P. J. Folate-mediated one-carbon metabolism. In: *Folic Acid and Folates, Vitamins and Hormones*, v.79, p.22-29, 2008.

Ganguly, P.; Alam, S. F. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutrition Journal*, v.14, n.6, p.1-10, 2015.

Gaxiola, R. A.; Palmgren, M. G.; Schumacher, K. Plant proton pumps. *FEBS Letters*, v.581, n.12, p.2204-2214, 2007.

Geisel, J. Folic acid and neural tube defects in pregnancy? A review. *The Journal of Perinatal and Neonatal Nursing*, v.17, n.4, p.268–279, 2003.

Gelvin, S. B. *Agrobacterium* and plant genes involved in TDNA transfer and integration. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v.51, p.223-256, 2000.

Gelvin, S. B. *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.67, n.1, p.16–37, 2003.

Gelvin, S. B. Plant proteins involved in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *Annual Review of Phytopathology*, v.48, p.45-68, 2010.

Gomes, A. M. A.; Michereff, S. J.; Mariano, R. L. R.; Rodrigues, V. J. L. B. Intensidade da cercosporiose da alface em cultivos convencionais e orgânicos em Pernambuco. *Summa Phytopathologica*, v.32, n.4, p.384-385, 2006.

Goodner, B.; Hinkle, G.; Gattung, S.; Miller, N.; Blanchard, M.; Quorollo, B.; Goldman, B. S.; Cao, Y.; Askenazi, M.; Halling, C.; Mullin, L.; Houmiel, K.; Gordon, J.; Vaudin, M.; Lartchouk, O.; Epp, A.; Liu, F.; Wollam, C.; Allinger, M.; Doughty, D.; Scott, C.; Lappas, C.; Markels, B.; Flanagan, C.; Crowell, C.; Gurson, J.; Lomo, C.; Sear, C.; Strub, G.; Cielo, C.; Slater, S. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*, v.294, n.5550, p.2323-2328, 2001.

Gorelova, V.; Ambach, L.; Rébeillé, F.; Stove, C.; Van Der Straeten, D. Foliates in Plants: Research Advances and Progress in Crop Biofortification. *Frontiers in Chemistry*, v.5, n.21, 2017.

Gregory, J. F. Case study: folate bioavailability. *Journal of Nutrition*, v.131, n.4, p.1376S - 1382S, 2001.

Hanson, A. D.; Gregory III, J. F. Synthesis and turnover of folates in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, v.5, n.3, p.244-249, 2002.

Hanson, A. D.; Gregory, J. F. Folate biosynthesis, turnover, and transport in plants. *Annual Review of Plant Biology*, v.62, p.105-125, 2011.

He, C.; Lin, Z.; McElroy, D.; Wu, R. Identification of a rice Actin2 gene regulatory region for high-level expression of transgenes in monocots. *Plant Biotechnology Journal*, v.7, p. 227–239, 2009.

Hossain, T.; Rosenberg, I.; Selhub, J.; Kishore, G.; Beachy, R.; Schubert, K. Enhancement of folate in plants through metabolic engineering. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v.101, n.14, p.5158–5163, 2004.

Hodal, L.; Bocharadt, A.; Nielsen, J. E.; Mattson, O.; Okkels, F. T. Detection, expression and specific elimination of endogenous β -glucuronidase activity in transgenic and non-transgenic plants. *Plant Science*, v.87, n.1, p.115-122, 1992.

Hooykaas, P. J. J.; Beijersbergen, A. G. M. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Annual Review of Phytopathology*, v.32, p.157-179, 1994.

Hohn, B. Exploration of *Agrobacterium tumefaciens*. In: Russo, V. E. A.; Brody, S.; Cove, D.; Ottolenghi, S. Development: the molecular genetic approach. Springer Berlin Heidelberg, p.206-207, 1992. DOI:10.1007/978-3-642-77043-2_15

Huang, S.; An, Y. Q.; McDowell, J. M.; Mckinney, E. C.; Meagher, R. B. The *Arabidopsis thaliana* ACT4/ACT12 actin gene subclass is strongly expressed throughout pollen development. *The Plant Journal*, v.10, n.2, p.189-202, 1996.

Huang, S.; An, Y. Q.; McDowell, J. M.; Mckinney, E. C.; Meagher, R. B. The *Arabidopsis* ACT11 actin gene is strongly expressed in tissues of the emerging inflorescence, pollen, and developing ovules. *Plant Molecular Biology*, v.33, n.1, p.125-39, 1997.

Ibrahim, A. B.; Monteiro, T. R.; Cabral, G. B.; Aragão, F. J. L. RNAi-mediated resistance to whitefly (*Bemisia tabaci*) in genetically engineered lettuce (*Lactuca sativa*). *Transgenic Research - Springer*, v.26, p.613–624, 2017.

Iyer, R.; Tomar, S. K. Folate: a functional food constituent. *Journal of Food Science*, v.74, n.9, p.R114-R122, 2009.

Imbard, A.; Benoist, J. F.; Blom, H. J. Neural tube defects, folic acid and methylation. *International journal of environmental research and public health*, v.10, n.9, p.4352-89, 2013.

Jefferson, R. A.; Burgess, S. M.; Hirsh, D. Beta-glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.83, n.22, p.8447-8451, 1986.

Jefferson, R. A. Assaying Chimeric Genes in Plants: The GUS gene Fusion System. *Plant Molecular Biology Reporter*, v.5, n.4, p.387-405, 1987.

Kim, Y. I. Folate and colorectal cancer: An evidence-based critical review. *Molecular Nutrition Food Research*, v.51, n.3, p.267-92, 2007.

Leung, K. Y.; De Castro, S. C.; Cabreiro, F.; Gustavsson, P.; Copp, A. J.; Greene, N. D. Folate metabolite profiling of different cell types and embryos suggests variation in folate one-carbon metabolism, including developmental changes in human embryonic brain. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v.378, p.229–236, 2013.

Li, J.; Yang, H.; Peer, W. A.; Richter, G.; Blakeslee, J.; Bandyopadhyay, A.; Titapiwantakun, B.; Undurraga, S.; Khodakovskaya, M.; Richards, E. L.; Krizek, B.; Murphy, A. S.; Gilroy, S.; Gaxiola, R. Arabidopsis H⁺-PPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development. *Science*, v.310, n.5745, p.121–125, 2005.

Li, B.; Wei, A.; Song, C.; Li, N.; Zhang, J. Heterologous expression of the *TsVP* gene improves the drought resistance of maize. *Plant Biotechnology Journal*, v.6, p. 146–159, 2008.

Lucock, M. Folic Acid: Nutritional Biochemistry, Molecular Biology, and Role in Disease Processes. *Molecular Genetics and Metabolism*, v.71, n.1–2, p.121-138, 2000.

Martinoia, E.; Maeshima, M.; Neuhaus, E. Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *Journal of Experimental Botany*, v.58. p.83-102, 2007.

Maeshima, M. Tonoplast transporters: organization and function. *Annual Review of the Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v.52, p. 469-497, 2001.

Maeshima, M. Vacuolar H⁺-pyrophosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes*, v.1465, n.1-2, p.37-51, 2000.

Mazur, B. J.; Falco, S. C. The development of herbicide resistant crops. *Annual Reviews of Plant Physiology and Molecular Biology*, v.40, p.441-470, 1989.

McDowell, J. M.; Huang, S. R.; McKinney, E. C.; An, Y. Q.; Meagher, R. B. Structure and evolution of the actin gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, v.142, p.587–602, 1996.

McKinney, E. C.; Meagher, R. B. Members of the Arabidopsis Actin Gene Family Are Widely Dispersed in the Genome. *Genetics*, v.149, n.2, p 663-675, 1998.

Mcelroy, D.; Rothenberg, M.; Reece, K. S. R.; Wu, R. Characterization of the rice (*Oryza sativa*) actin gene family. *Plant Molecular Biology*, v.15, p.257-268, 1990.

Meagher, R. B.; McKinney, E. C.; Kandasamy, M. K. Isovariant dynamics expand and buffer the responses of complex systems: the diverse plant actin gene family. *The Plant Cell*, v.11, p.995–1005, 1999.

Medeiros, D. C.; Lima, B. A. B.; Barbosa, M. R.; Anjos, R. S. B.; Borges, R. D.; Cavalcante Neto, J. G.; Marques, L. F. Produção de mudas de alface com biofertilizantes e substratos. *Horticultura Brasileira*, v.25, p.433-436, 2007.

Mohammed, S. A.; Nishio, S.; Takahashi, H.; Shiratake, K.; Ikeda, H.; Kanahama, K.; Kanayama, Y. Role of Vacuolar H⁺-pyrophosphatase in tomato fruit development. *Journal of Experimental Botany*, v.63, n.15, p.5613-5621, 2012.

Murakami, T.; Anzai, H.; Imai, S.; Satoh, A.; Nagaoka, K.; Thompson, C. J. The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus*: molecular cloning and characterization of the gene cluster. *Molecular and General Genetics*, v.205, p.42-50, 1986.

Naqvi, S.; Zhu, C.; Farre, G.; Ramessar, K.; Bassie, L.; Breitenbach, J.; Conesa, D. P.; Ros, G.; Sandmann, G.; Capell, T.; Christou, P. Transgenic multivitamin corn through biofortification of endosperm with three vitamins representing three distinct metabolic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.106, n.19, p.7762-7767, 2009.

Nishimura, T.; Yokota, E.; Wada, T.; Shimmen T.; Okada, K. An *Arabidopsis ACT2* dominant-negative mutation, which disturbs F-actin polymerization, reveals its distinctive function in root development. *Plant & Cell Physiology*, v.44, n.11, p.1131-1140, 2003.

Nunes, A. C. S.; Kalkmann, D. C.; Aragão, F. J. L. Folate biofortification of lettuce by expression of a codon optimized chicken GTP cyclohydrolase I gene. *Transgenic Research*, n.18, p.661-667, 2009.

Odell, J. T.; Nagy, F.; Chua, N.H. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, v.313, p.810- 812, 1985.

Okumura, A.; Shimada, A.; Yamasaki, S.; Horino, T.; Iwata, Y.; Koizumi, N.; Nishihara, M.; Mishiba, K. CaMV-35S promoter sequence-specific DNA methylation in lettuce. *Plant Cell Reports*, n.35, p.43–51, 2016.

Oliveira, A. C. B.; Sedyama, M. A. N.; Pedrosa, M. W.; Garcia, N. C. P.; Garcia, S. L. R. Divergência genética e descarte de variáveis em alface cultivada sob sistema hidropônico. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v.26, n.2, p. 211-217, 2004.

Otten, L.; Burr, T.; Szegedi, E. *Agrobacterium*: a disease-causing bacterium. In: Tzfira, T.; Citovsky, V. (Ed.). *Agrobacterium*: from biology to biotechnology. New York Springer, p.1-46, 2008.

Păcurar, D. I.; Thordal-Christensen, H.; Păcurar, M. L.; Pamfil, D.; Botez, C.; Bellini, C. *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.76, p.76-81, 2011.

Pacheco, S. S.; Braga, C.; Souza, A. I.; Figueiroa, J. N. Efeito da fortificação alimentar com ácido fólico na prevalência de defeitos do tubo neural. *Revista Saúde Pública*, v.43, n.4, p.565-571, 2009.

Park, S.; Li, J.; Pittman, J. K.; Berkowitz, G. A.; Yang, H.; Undurraga, S.; Morris, J.; Hirschi, K. D.; Gaxiola, R. A. Up-regulation of H⁺-pyrophosphatase (H⁺-PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.102, p.18830-18835, 2005.

Pei, L.; Wang, J.; Li, K.; Li, Y.; Li, B.; Gao, F.; Yang, A. Overexpression of *Thellungiella halophila* H⁺-pyrophosphatase gene improves low phosphate tolerance in maize. *PloS One*, v.7, n.8, p.43501, 2012.

Pitkin, R. M. Folate and neural tube defects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 85, n. 1, p. 285S–288S, 2007.

Potenza, C.; Aleman, L.; Gopalan, C. S. Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, v.40, p.1–22, 2004.

Ravanel, S.; Douce, R.; Rébeillé, F. Metabolism of folates in plants. *Advances in Botanical Research*, v.59, p.67–106, 2011.

Rashedi, J.; Akbarzadeh, M.; Ajami Khiyavi, H.; Haiaty, S.; Vahedian, V.; Hasanzadeh, O.; Maroufi, N. F. The role of folic acid in carcinogenesis, diagnosis, and treatment of cancer. *International Journal of Biomedicine and Public Health*, v.1, n.2, p.114-121, 2018.

Rebeille, F.; Ravanel, S.; Jabrin, S.; Douce, R.; Storozhenko, S.; Van Der Straeten, D. Folates in plants: biosynthesis, distribution, and enhancement. *Physiologia Plantarum*, v.126, n.3, p.330-342, 2006.

Rea, P. A.; Kim, Y.; Sarafian, V.; Poole, R. J.; Davies, J. M.; Sanders, D. Vacuolar H⁽⁺⁾-translocating pyrophosphatases: a new category of ion translocase. *Trends Biochemical Sciences*, v.17, n.9, p.348–353, 1992.

Resende, F. V.; Saminêz, T. C. O.; Vidal, M. C.; Souza, R. B.; Clemente, F. M. V. Cultivo de alface em sistema orgânico de produção. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, p.16. (Embrapa Hortaliças. Circular Técnica, 56), 2007.

Sala, F. C.; Costa, C. P. Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira. Horticultura Brasileira, v.30, p.187-194, 2012.

Sawahel, W. A. Transgenic plants: performance, release and containment. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v.10, p.139-144, 1994.

Saltzman, A.; Birol, E.; Oparinde, A.; Andersson, M. S.; Asare-Marfo, D.; Diressie, M. T.; Gonzalez, C.; Lividini, K.; Moursi, M.; Zeller, M.. Availability, production, and consumption of crops biofortified by plant breeding: current evidence and future potential. Annals of the New York Academy of Sciences, v.1390, n.1, p.104–114, 2017.

Scott, J.; Rebeille, F.; Fletcher, J. Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. Journal of the Science of Food and Agriculture, v.80, p.795-824, 2000.

Scott, J.; Weir, D. Homocysteine and cardiovascular disease. QJM: An International Journal of Medicine, v.89, n.8, p.561–563, 1996.

Seshadri, S.; Beiser, A.; Selhub, J.; Jacques, P. F.; Rosenberg, I. H.; D'Agostino, R. B.; Wilson, P. W. F., Wolf, P. A. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. The New England Journal of Medicine, v.346, p.476–483, 2002.

Šljajčeroová, K.; Fišerová, J.; Fischer, L.; Schwarzerová, K. Multiple Actin Isoforms in Plants: Diverse Genes for Diverse Roles? Frontiers in Plant Science, v.3, n.226, 2012.

Soeiro, B. T.; Boen, T. R.; Pereira-Filho, E. R.; Pallone, J. A. L. Investigação da qualidade de farinhas enriquecidas utilizando análise por componentes principais (PCA). Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.30, n.3, p.618-624, 2010.

Sousa, C. S.; Kerr, W. E.; Santos, M. R.; Arruda, A. S.; Spini, V. B. M. G.; Juliatti, F. C.; Takatsu, A. Mancha de Septoria da alface: isolamento, inoculação e avaliação de cultivares em condições de campo e casa de vegetação. Fitopatologia Brasileira, v.28 p.555-558. 2003.

Stachel, S. E.; Messens, E.; Montagu, M. V.; Zambryski, P. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. Nature, Londres, n.318, p.624-629, 1985.

Storozhenko, S.; De Brouwer, V.; Volckaert, M.; Navarrete, O.; Blancquaert, D.; Zhang, G. F.; Van Der Straeten, D. Folate fortification of rice by metabolic engineering. *Nature Biotechnology*, v.25, p.1277–1279, 2007.

Strobbe, S.; Van Der Straeten, D. Folate biofortification in food crops. *Current Opinion in Biotechnology*, v.44, p.202–211, 2017.

Tyagi, A. K. Plant genes and their expression. *Current Science*, v.80, n.2, p.161-169, 2001.

Twyman, R. M. Growth and Development: Control of Gene Expression, Regulation of Transcription. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, p.558-567, 2003.

Tzafirir, I.; Torbert, K. A.; Lockhart, B. E.; Somers, D. A.; Olszewski, N. E. The sugarcane bacilliform badnavirus promoter is active in both monocots and dicots. *Plant Molecular Biology*, Heidelberg, v.38, p.347-356, 1998.

Uehara, S. K.; Rosa, G. Associação da deficiência de ácido fólico com alterações patológicas e estratégias para sua prevenção: uma visão crítica. *Revista de Nutrição*, v.23, n.5, 2010.

Weising, K.; Kahl, G. Natural genetic engineering of plants cells: the molecular biology of crown gall and hairy root disease. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.12, p.327-351, 1996.

Williams, J.; Mai, C. T.; Mulinare, J.; Isenburg, J.; Flood, T. J.; Ethen, M.; Frohnert, B.; Kirby, R. S. Updated estimates of neural tube defects prevented by mandatory folic acid Fortification—United States, 1995–2011. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*, v.64, p.1-5, 2015.

Whitsett, J.; Rangel Filho, A.; Sethumadhavan, S.; Celinska, J.; Widlansky, M.; Vasquez-Vivar, J. Human endothelial dihydrofolate reductase low activity limits vascular tetrahydrobiopterin recycling. *Free Radical Biology & Medicine*, v.63, p.143-150, 2013.

Yang, H.; Knapp, J.; Koirala, P.; Rajagopal, D.; Peer, W. A.; Silbart, L. K.; Enhanced phosphorus nutrition in monocots and dicots over-expressing a phosphorus-responsive type I H⁺-pyrophosphatase. *Plant Biotechnology Journal*, v.5, n.6, p.735–45, 2007.

Youngblood, M. E.; Williamson, R.; Bell, K. N.; Johnson, Q.; Kancherla, V.; Oakley, G. P. Jr. 2012 Update on global prevention of folic acid-preventable spina bifida and anencephaly. *Birth Defects Research Part A Clinical and Molecular Teratology*, v.97, n.10, p.658-663, 2013.

Zambryski, P. Basic Processes Underlying *Agrobacterium*-mediated DNA Transfer to Plant Cells. Annual Review of Genetics, Cambridge, v.22, p.1-30, 1988.

Zambryski, P.; Tempe, J.; Schell, J. Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants. Cell, v.56, n.2, p.193-201, 1989.

Zuo, J.; Niu, Q. W.; Chua, N. H. An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. Plant Journal, v.24, p.266-273, 2000.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- ✓ Avaliar a funcionalidade de dois promotores distintos para serem usados na transformação genética de alface, como alternativa ao promotor p35SCaMV. E a biofortificação para o aumento de folatos em plantas geneticamente modificadas de alface (*Lactuca sativa* L.) usando promotores estáveis.

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Gerar plantas geneticamente modificadas de alface expressando o gene *gus* dirigido por três promotores distintos (pACT2, pAVP1 e p35SCaMV);
- ✓ Analisar a funcionalidade dos três promotores nas plantas transgênicas, pela expressão da GUS em ensaios histoquímicos e fluorimétricos;
- ✓ Analisar o padrão de segregação das progênies obtidas para cada construção gênica.
- ✓ Aumentar a concentração de folatos em plantas geneticamente modificadas de alface;
- ✓ Analisar o padrão de segregação das progênies;
- ✓ Quantificação total de folatos.

CAPÍTULO I

Análise funcional de dois promotores para expressão heteróloga em alface (*Lactuca sativa* L.) como alternativa ao promotor 35SCaMV

RESUMO

Monteiro, Tatiane Rosa. Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade, Universidade de Brasília, julho 2019. **Análise funcional de dois promotores para expressão heteróloga em alface (*Lactuca sativa* L.) como alternativa ao promotor 35SCaMV.** Orientador: Dr. Francisco José Lima Aragão.

Devido à dificuldade na manutenção da estabilidade da expressão de transgenes na cultura de alface, possivelmente pela utilização do promotor do RNA 35S do vírus do mosaico da couve flor (35SCaMV), o objetivo deste trabalho foi testar dois novos promotores, visando alternativas para trabalhos de transformação genética de alface. Foram realizados experimentos de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* para obtenção de linhagens geneticamente modificadas de alface expressando o gene *gus* sob o controle dos promotores pACT2, pAVP1 e p35SCaMV. Foram confirmadas 12, 8 e 5 plantas de alface transgênicas com os promotores pACT2, pAVP1 e p35SCaMV, respectivamente, após análise por PCR com primers específicos para o gene *gus*. Cada planta foi analisada por PCR e ensaio histoquímico em cada geração (T0, T1 e T2). A atividade de GUS foi detectada no tecido foliar de todas as plantas transgênicas (T0) obtidas com o pACT2, em 3 das 8 plantas de pAVP1, e 2 das 5 plantas de p35SCaMV. As plantas transgênicas também foram submetidas ao ensaio fluorimétrico para a quantificação da atividade de GUS. O nível de expressão do gene sob o controle dos diferentes promotores mostrou que a expressão das linhagens transgênicas regeneradas (T0) de pACT2 correspondeu a atividade de 148,76 a 500,68 pmol de MU, pAVP1 de 92,78 a 145,92 pmol MU, e 35SCaMV de 100,13 e 105,94 pmol MU. Posteriormente, 10 sementes de cada linhagem (T1) foram analisadas por PCR e ensaio histoquímico. Foi quantificada a atividade de *gus* de 4 plantas de cada linhagem por ensaio fluorimétrico. As progênies das linhagens de pACT2 continuaram a manter a expressão do gene, no entanto, houve uma diminuição do nível de expressão, de 100,31 a 231,80 pmol MU. Todas as progênies (T1) de cada linhagem de pAVP1, apresentaram expressão do *gus*, o que inicialmente não foi observado em todas as linhagens T0. Além disso, as progênies apresentaram um aumento, média de 130,47 a 264,31 pmol MU. A linhagem 35SL10 parou de expressar o transgene. A linhagem 35SL7 apresentou um aumento do nível de expressão, quando comparada com os outros promotores, 635,02 pmol MU. E as linhagens

35SL4 e 35SL5 começaram a expressar o gene, porém, apresentaram nível baixo de expressão, média 80,11 e 136,84 pmol MU, respectivamente. As progênies (T2) de ACT2 continuaram a manter a expressão do gene em quase todas as gerações, no entanto, uma das repetições com avaliação de 10 plantas, de ACT2L2, ACT2L8 e ACT2L10 tiveram plantas positivas por PCR, mas não apresentaram expressão no ensaio histoquímico. Com relação ainda às progênies, houve um aumento da atividade de *gus* em algumas plantas, 449,95 pmol MU. As progênies (T2) das linhagens pAVP1, também continuaram a manter a expressão do gene, com exceção, a linhagem AVP1L4. E uma das repetições com avaliação de 10 plantas, de AVPL6 e AVPL7 apresentarem plantas positivas por PCR, mas não apresentaram expressão no ensaio histoquímico, não sendo quantificadas. As progênies (T2) das linhagens 35SL7 continuaram a apresentar expressão do gene, porém, houve uma diminuição da atividade. As progênies (T2) de duas repetições (plantas), com análise de 10 plantas cada, da linhagem 35SL5 deixaram de expressar o transgene. Sendo analisada somente uma repetição com 10 plantas. As demais linhagens obtidas com o promotor 35SCaMV (35SL4, 35SL10 e 35SL13) não foram quantificadas por ensaio fluorimétrico, pois não apresentaram expressão do gene após o ensaio histoquímico.

Palavras-chave: ACT2, AVP1, *gus*, transformação genética.

ABSTRACT

Monteiro, Tatiane Rosa. Biotechnology and Biodiversity PhD Program, University of Brasilia, July 2019. **Functional analysis of two promoters for heterologous expression in lettuce (*Lactuca sativa* L.) as an alternative to the 35SCaMV promoter.** Advisor: PhD Francisco José Lima Aragão.

Due to the difficulty in maintaining the stability of transgene expression in lettuce culture, possibly due to the use of the 35S Cauliflower Mosaic Virus (35SCaMV) RNA promoter, the objective of this work was to evaluate two new promoters, seeking alternatives to genetic transformation of lettuce. *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation experiments were performed to obtain genetically modified lettuce strains expressing the *gus* gene under the control of the pACT2, pAVP1 and p35SCaMV promoters. Twelve, 8 and 5 transgenic lettuce plants were confirmed with the pACT2, pAVP1 and p35SCaMV promoters, respectively, after PCR analysis with *gus* specific primers. Each plant was analyzed by PCR and histochemical assay in each generation (T0, T1 and T2). GUS activity was detected in the leaf tissue of all transgenic (T0) plants obtained with pACT2 in 3 of 8 pAVP1 plants and 2 of 5 p35SCaMV plants. The transgenic plants were also submitted to fluorimetric assay to quantify GUS activity. The gene expression level under the control of the different promoters showed that the expression of pACT2 regenerated transgenic (T0) lines corresponded to the activity of 148,76 to 500,68 pmol MU, pAVP1 from 92,78 to 145,92 pmol MU, and 35SCaMV of 100,13 and 105,94 pmol MU. Subsequently, 10 seeds of each strain (T1) were analyzed by PCR and histochemical assay. The *gus* activity of 4 plants of each strain was quantified by fluorometric assay. The progenies of pACT2 strains continued to maintain gene expression, however, there was a decrease in expression level from 100,31 to 231,80 pmol MU. All progenies (T1) of each pAVP1 strain showed *gus* expression, which was not initially observed in all T0 strains. In addition, progenies showed an average increase of 130,47 to 264,31 pmol MU. The 35SL10 line stopped expressing the transgene. The 35SL7 strain showed an increased expression level when compared to the other promoters, 635,02 pmol MU. And the 35SL4 and 35SL5 strains started to express the gene, however, presented low expression level, average 80,11 and 136,84 pmol MU, respectively. ACT2 progenies (T2) continued to maintain gene expression in almost all generations, however,

one of the 10 plant repeat evaluations of ACT2L2, ACT2L8, and ACT2L10 had PCR positive plants but did not express in the assay histochemical. Regarding the progenies, there was an increase of gus activity in some plants, 449,95 pmol MU. The progenies (T2) of pAVP1 strains also continued to maintain gene expression, except for the AVP1L4 strain. And one of the 10 plant repeat evaluations of AVPL6 and AVPL7 had PCR positive plants, but were not expressed in the histochemical assay and not quantified. The progenies (T2) of 35SL7 strains continued to show gene expression, but there was a decrease in activity. The progenies (T2) of two replicates (plants), with analysis of 10 plants each, from the 35SL5 line no longer express the transgene. Being analyzed only one repetition with 10 plants. The other strains obtained with the 35SCaMV promoter (35SL4, 35SL10 and 35SL13) were not quantified by fluorimetric assay because they did not show gene expression after the histochemical assay.

Keywords: ACT2, AVP1, *gus*, genetic transformation.

1. INTRODUÇÃO

A alface é uma hortaliça com ampla distribuição por todo o país, representando uma das plantas mais cultivadas e a folha mais consumida no Brasil e no mundo (Resende *et al.*, 2007). Isso pode ser atribuído às mudanças no hábito alimentar da população, no que se refere a uma tendência de consumo de hortaliças na forma *in natura*. Essas são fontes de vitaminas, sais minerais e apresentam baixo teor de calorias, sendo bastante recomendadas para dietas alimentares (Filgueira, 2008). Além disso, as hortaliças, em geral, possuem grandes concentrações de compostos bioativos como os carotenoides e compostos fenólicos, que incluem flavonoides e antocianinas, dentre outros. Esses fitoquímicos presentes nos alimentos de origem vegetal possuem ação antioxidante e atuam prevenindo o envelhecimento e controlando estresses oxidativos relacionados à ação do excesso de radicais livres que desencadeiam doenças crônicas não transmissíveis como aterosclerose (doença vascular), doenças coronárias e algumas neoplasias (proliferação anormal de um determinado tecido) (Souza, 2012).

No entanto, o sistema de produção da alface no Brasil é afetado por vários fatores ambientais, como fotoperíodo longo, alta incidência luminosa e altas temperaturas (Medeiros *et al.*, 2007). Além de doenças que afetam o cultivo da espécie, como a septoriose (Sousa *et al.*, 2003), a mancha de cercospora (Gomes *et al.*, 2006) e o mosaico da alface (Chung *et al.*, 2004); e pragas que causam também grandes prejuízos aos produtores. Estes fatos fazem crescer o interesse no melhoramento genético das hortaliças, em especial da alface que apresenta baixo custo de produção e a possibilidade de cultivos sucessivos no mesmo ano (Medeiros *et al.*, 2007).

Nesse contexto, a transformação genética de plantas se destaca como uma importante ferramenta biotecnológica e tem sido empregada com os mais diversos objetivos, permitindo que características agrônômicas de interesse possam ser introduzidas em plantas cultivadas (Aragão, 2002). Atualmente, o sistema de transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*, que é a transferência indireta de genes, está sendo bastante utilizada nos trabalhos de transformação genética de alface (Dias *et al.*, 2006; Nunes *et al.*, 2009; Ibrahim *et al.*, 2017).

No entanto, há uma dificuldade na manutenção da estabilidade da expressão de transgenes na cultura de alface, uma possível justificativa é a utilização do promotor 35S do vírus do mosaico da couve flor (p35SCaMV). Esse promotor constitutivo tem sido o

mais utilizado nos processos de transformação genética de plantas dicotiledôneas, no entanto, foi descrito em alface o silenciamento por metilação (Okumura *et al.*, 2016). Este trabalho tem como objetivo estudar dois novos promotores constitutivos, visando alternativas ao uso do p35SCaMV para alface. Esses promotores são o do gene da actina 2 de *Arabidopsis thaliana* (pACT2) e o do gene da proteína AVP1 de *Solanum lycopersicum* (pAVP1). Para testar a atividade e a tecido-especificidade desses promotores, ambos controlaram a expressão do gene *gus* (Jefferson *et al.*, 1986), que é um gene repórter bastante utilizado no estudo e monitoramento da expressão gênica; sempre comparativamente com o promotor p35SCaMV. Os promotores analisados apresentaram níveis elevados de expressão constitutiva nas plantas de origem ou sistema homólogo, podendo ser uma alternativa para o uso do promotor 35SCaMV nos trabalhos de transformação genética de alface.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local de condução dos experimentos

Os estudos de transformação genética e as análises moleculares foram realizados no Laboratório de Engenharia Genética Aplicada à Agricultura Tropical (LEG) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília-DF.

2.2. Construção dos vetores

Foram usados o promotor do gene da actina 2 de *Arabidopsis thaliana* (ACT2), do gene que codifica a proteína AVP1 de *Solanum lycopersicum* (AVP1) e o p35SCaMV. Os promotores ACT2 e AVP1 foram inseridos no vetor pCAMBIA 3301, no cassete para expressão do gene *gus*, substituindo o promotor 35SCaMV. O 35SCaMV foi utilizado comparativamente. Além disso, os vetores possuem o gene *bar* que confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio, usado para selecionar as plantas transgênicas de alface.

2.2.1. Clonagem no vetor

A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 1% e a quantificação do DNA foi realizada em equipamento NanoDrop (Thermo Scientific). Alíquotas de 6 µL de pCAMBIA 3301 e pACT2 foram digeridas com as enzimas NcoI e PstI, e o pAVP1 com MfeI e HindIII, em banho-maria a 37 °C, overnight. Um fragmento dos promotores, de 1.402 pb, e 1.093 pb respectivamente, foi isolado do gel de agarose com o auxílio de uma lâmina de bisturi e purificado utilizando o kit Wizard SV gel and PCR clear up system (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante.

As ligações de ACT2 e AVP1 ao vetor pCAMBIA 3301 foram realizadas na proporção de 3:1 (inserto:vetor), utilizando 2 µL de tampão de ligação 5x (Invitrogen) e 1 µL de T4 DNA ligase (Invitrogen). A ligação ficou em banho-maria a 16 °C, overnight, e o produto da ligação foi utilizado para transformação de células de *Escherichia coli*. As transformações foram realizadas pelo método de eletroporação (uso de um pulso elétrico de alta voltagem para criar poros na membrana celular e permitir a entrada do DNA exógeno), e em seguida plaqueadas em meio de cultura semissólido LB (Miller, 1972), contendo o antibiótico canamicina (100 mg.L⁻¹) e cultivadas em estufa a 37 °C.

Colônias isoladas foram inoculadas em meio de cultura líquido LB contendo canamicina (100 mg.L^{-1}) e incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 16 horas sob agitação. Após o crescimento, o DNA plasmidial foi extraído e a clonagem foi confirmada por PCR.

2.2.2. Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* (EHA105) com o vetor de interesse

A linhagem desarmada de *Agrobacterium tumefaciens* (EHA105) foi transformada pelo método de eletroporação e inserido o vetor de interesse. A transformação da *Agrobacterium* foi realizada igualmente para cada um dos três vetores de interesse. Para isso, todo o plasmídeo foi homogeneizado em suspensão bacteriana previamente armazenada a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ em glicerol 10%. Essa mistura foi submetida à eletroporação em cubetas conservadas em gelo até o momento da emissão do pulso. Em seguida, as células foram recuperadas em $600 \text{ } \mu\text{L}$ de meio de cultura líquido LB. Esse material foi transferido para tubo tipo eppendorf de $1,5 \text{ mL}$ e armazenado em estufa a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ por 40 minutos. Posteriormente foi plaqueado $100 \text{ } \mu\text{L}$, $200 \text{ } \mu\text{L}$ e $300 \text{ } \mu\text{L}$ da suspensão em meio de cultura semissólido LB contendo os antibióticos canamicina (100 mg.L^{-1}) e rifampicina (50 mg.L^{-1}), para seleção das agrobactérias transformadas. As placas foram cultivadas em incubadora a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 dias.

As colônias de agrobactérias que se multiplicaram no meio contendo agente de seleção foram inoculadas em tubo de centrifuga tipo Falcon de 15 mL contendo 3 mL de meio de cultura líquido LB e $3 \text{ } \mu\text{L}$ de canamicina (100 mg.L^{-1}), e armazenadas em agitador a $28 \text{ }^\circ\text{C}$, overnight. A transformação foi confirmada por PCR utilizando os *primers* específicos para GUS (251: $5'$ -TTGGGCAGGCCAGCGTATCGT- $3'$ e 671C: $5'$ -ATCACGCAGTTCAACGCTGAC- $3'$), que amplificam um fragmento de 423 pb . Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%.

As colônias confirmadas para a presença dos vetores foram cultivadas em meio de cultura líquido LB suplementado com canamicina (100 mg.L^{-1}) e rifampicina (50 mg.L^{-1}), e armazenadas em glicerol 25%, a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.3. Transformação genética de alface

A transformação genética de plantas de alface (*Lactuca sativa* L.) foi feita segundo a metodologia de Dias *et al.*, 2006, com modificações.

2.3.1. Preparação dos cotilédones de alface

No laboratório e em condições assépticas, sementes de alface (cultivar Verônica), foram submetidas a um processo de desinfestação por imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2,0 - 2,5% (solução de alvejante comercial) por 20 minutos, em câmara de fluxo laminar. Posteriormente foram efetuados seis a sete enxágues com água destilada e autoclavada para a remoção residual dos agentes desinfestantes utilizados.

Após a desinfestação, as sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri (15 x 90 mm) contendo aproximadamente 20 mL de meio de cultura meia força MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 10 g.L⁻¹ de sacarose e 8 g.L⁻¹ do solidificante Ágar (Sigma). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 ± 0,1 antes da esterilização em autoclave à 121°C e 1,5 atm por 20 minutos.

As placas de Petri contendo as sementes foram seladas com filme transparente de PVC e acondicionadas por 2 a 3 dias no escuro, até a germinação. Concomitante à germinação das sementes, foi plaqueada uma alíquota de *Agrobacterium* transformada em meio de crescimento semissólido AB (Chilton *et al.*, 1974), suplementado com os antibióticos rifampicina (100 mg.L⁻¹) e canamicina (100 mg.L⁻¹), por 2 a 3 dias.

2.3.2. Cocultura dos cotilédones de alface com *Agrobacterium*

No dia da cocultura, foi coletada com o auxílio de uma espátula a agrobactéria crescida e transferida para tubo Falcon contendo meio de cultura líquido MS, suplementado com 1% de glicose e 100 µM de acetoseringona. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,2 ± 0,1 antes da filtração com filtro Millipore. Posteriormente, foi homogeneizada a suspensão bacteriana em agitador tipo Vortex, e determinada a sua absorbância a 600 nm (A₆₀₀) por leitura em espectrofotômetro. A suspensão bacteriana estava em fase exponencial de crescimento de A₆₀₀ entre 0,550 a 1.

Em câmara de fluxo laminar, cotilédones de alface foram excisados em uma placa de Petri contendo meio de cultura líquido com a *Agrobacterium* transformada. Os explantes cortados ficaram imersos na suspensão bacteriana por 15 minutos. Após a cocultura líquida, foram transferidos para placa Petri contendo papel de filtro estéril para retirar o excesso da suspensão bacteriana. Depois os explantes foram inoculados em meio semissólido denominado LR1A (MS suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 0,05 mg/L de naphthaleneacetic acid (ANA) e 0,2 mg/L de 6-benzylaminopurina (BAP)).

As placas de Petri contendo os explantes foram seladas com filme transparente de PVC e acondicionadas em sala de crescimento com temperatura de 20°C, por 48 horas no escuro. Estes foram transferidos para o novo meio de cultura semissólido denominado LR1B (descrito anteriormente, no entanto, contendo 4 mg/L de glufosinato de amônia (GA), 100 mg/L de timetim, 200 mg/L de cefotaxina e 0,5 mg/L de Benomil), acondicionados em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas. Os meios de cultura renovados a cada duas semanas de cultivo.

Os meios de cultura LR1A e LR1B foram solidificados com 8 g.L^{-1} de Ágar e tiveram o pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da esterilização por autoclavagem à 121°C e 1,5 atm por 20 minutos.

2.3.3. Regeneração, enraizamento e aclimatização de plântulas transformadas

Os primeiros calos contendo brotos foram transferidos para meio de cultura semissólido denominado LR2 (MS suplementado com 30 g.L^{-1} sacarose, 0,5mg/L de cinetina, 0,5mg/L de zeatina, 2 mg/L de glufosinato de amônia, 100 mg/L de timetim e 0,5 mg/L de Benomil).

As primeiras plântulas desenvolvidas foram isoladas e transferidas para frascos contendo meio semissólido de enraizamento denominado LR3 (MS suplementado com 20 g.L^{-1} sacarose, 1 mg/L de ácido indolbutírico (IBA), 100 mg/L de timetim e 0,5 mg/L de Benomil). Estas foram acondicionadas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas de LED brancas-fria.

Os meios de cultura LR2 e LR3 foram solidificados com 8 g.L^{-1} de Ágar e tiveram o pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da esterilização em autoclave à 121°C e 1,5 atm por 20 minutos.

Assim que enraizadas, as plantas foram retiradas dos frascos e submetidas à lavagem de suas raízes em água corrente para eliminar o meio de cultura. Em seguida, foram plantadas em copos descartáveis (250 mL de capacidade), preenchidos com solo fertilizado e vermiculita (3:1 v/v), e a parte aérea coberta com saco plástico transparente. Estas foram mantidas em de casa de vegetação sob condições parcialmente controladas de temperatura (25°C a 30°C) e umidade ($\sim 80\%$). Na primeira semana, foram abertas as extremidades do saco plástico para permitir a aclimatação gradativa das plantas, e ao final

da segunda semana os sacos foram completamente retirados, e posteriormente a planta foi transferida para vaso contendo solo adubado. E por fim, mantidas em casa de vegetação até a produção e colheita das sementes.

2.4. Análise das plantas regeneradas

As plantas de alface regeneradas após o processo de transformação genética foram analisadas para a detecção dos transgenes utilizando a técnica de Polymerase Chain Reaction (PCR) com o DNA genômico isolado segundo a metodologia de Doyle e Doyle (1987). Além disso, essas plantas foram analisadas por ensaio histoquímico e fluorimétrico para detecção e quantificação da expressão do gene *gus*.

Inicialmente foi extraído o DNA pelo método CTAB (Doyle e Doyle, 1987), modificado. Em tubos tipo eppendorf foram coletados discos foliares jovens e macerados em 400 µL de solução CTAB 2%, depois acondicionados em banho-maria a 65 °C durante 20 minutos. Em seguida, foi adicionado 400 µL de clorofórmio:álcool isolamílico (24:1), sendo os tubos agitados manualmente, e o material centrifugado por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo eppendorf, a qual foi adicionado 0,7 µL do volume de isopropanol, misturado por inversão e centrifugado por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e adicionado 200 µL de etanol 70% gelado, e centrifugado por 5 minutos. O etanol 70% foi descartado por inversão do tubo e o DNA secou em temperatura ambiente sobre papel toalha. Por fim, o DNA foi ressuspenso em água Milli-Q estéril.

Para cada amostra analisada por PCR, 1 µL de DNA foi adicionado à reação: 2,5 µL de tampão 10X; 0,75 µL de MgCl₂; 1 µL de dNTP (4 µM); 0,4 µL de cada primer; 18,65 µL de H₂O e 0,3 µL de Taq polimerase. Foram utilizados na reação os primers GUS251 (5'-TTGGGCAGGCCAGCGTATCGT-3') e 671C (5'-ATCACGCAGTTCAACGCTGAC-3'), para amplificar uma sequência de 423 pb dentro da sequência codificante do gene *gus*. As condições de tempo e temperatura da PCR encontram-se na Tabela 1. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% usando o tampão TBE 0,5X.

Tabela1. Condições de temperatura e tempo da PCR (35 ciclos de amplificação).

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
Desnaturação inicial	95°	5 minutos
Desnaturação	95°	1 minuto
Anelamento dos primers	55°	1 minuto
Alongamento das fitas de DNA	72°	2 minutos
Extensão final	72°	7 minutos
Manutenção	4°	Indeterminado

2.5. Detecção da proteína PAT no tecido foliar de plantas transgênicas de alface

As plantas transgênicas regeneradas de alface (T0) após a transformação genética foram submetidas ao teste imunocromatográfico de fluxo lateral com Kit Trait LL (Strategic Diagnostic Inc.), para a verificação da presença do gene *bar*. O ensaio baseia-se na utilização de uma tira que é colocada numa pequena quantidade de extrato de folha da planta que contém a proteína PAT (fosfinotricina acetiltransferase). A tira possui duas zonas de captura, uma específica para a proteína PAT e uma específica para o anticorpo acoplado ao reagente colorido que não reagiu. As zonas de captura exibem uma coloração vermelha. Sendo que o resultado positivo é indicado pela presença de duas linhas vermelhas, enquanto que apenas uma linha superior indica um resultado negativo, controle da reação.

2.6. Ensaio histoquímico para a detecção da atividade de GUS

O ensaio histoquímico para detecção da atividade de GUS foi realizado de acordo com a metodologia de Jefferson, 1987. Este ensaio detectou a atividade da enzima β -glucuronidase nos tecidos transformados utilizando o substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronídeo (X-Gluc), que uma vez processado se torna azulado.

O substrato X-Gluc foi dissolvido em DMSO e diluído em tampão de reação (100 mM de Tampão fosfato de sódio 1M, pH 7,0; 2 mM de Ferricianeto de potássio ($K_3Fe(CN)_6$); 10 mM de $Na_2EDTA \cdot 2 H_2O$; 0,1% de Triton X-100). As amostras (explantes foliares) foram coletadas, imersas no tampão de reação e incubadas à temperatura de 37 °C, na ausência de luz, por no mínimo 16 horas. Após este período, as amostras foram lavadas com álcool 70% para remover a clorofila e conservar o material, permitindo assim a visualização da coloração azul no tecido vegetal.

2.7. Ensaio fluorimétrico para a quantificação da atividade de GUS

O ensaio fluorimétrico para a quantificação da atividade de GUS baseia-se na hidrólise do substrato 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronídeo (MUG) pela enzima GUS, resultando em um composto fluorescente, 4-metilumbeliferona (MU). Após a reação, a fluorescência total é medida e a concentração do produto é calculada com base na curva de calibração MU (Jefferson, 1987).

Explantos foliares (3 discos) foram coletados e macerados em 400 μ l de tampão de extração GUS (100 mM de tampão fosfato de sódio 1M, pH7,0; 10 mM de EDTA 500 mM, pH 8,0; 0,1% de sarcosil 30 %; 0,1% de Triton X-100; 1 mM de DTT 1M; 10 mM de β -mercaptoetanol). As amostras foram centrifugadas durante 10 minutos, a 12.000 rpm. O extrato proteico (precipitado) foi retirado e utilizado para análise da atividade de GUS.

As amostras foram preparadas (cada uma contendo 100 μ L do tampão de reação MUG 2 mM e 100 μ L do extrato proteico). Estas foram incubadas a 37 °C, no escuro, e uma alíquota de 20 μ L foi retirada a cada 15 minutos após o início da reação e transferida para 1.980 μ L de tampão de parada (21,2 g de Na₂CO₃ dissolvido em 1 L de água destilada esterilizada), para interromper a reação. Foram coletados 5 intervalos de tempo (0, 15, 30, 45 e 60 minutos). A fluorescência foi medida com o Fluorímetro VersaFluor (Bio-Rad Laboratories, CA, EUA), e calibrado utilizando a solução de MU diluída para traçar a curva padrão.

A determinação da concentração de proteína de cada amostra foi feita pelo ensaio colorimétrico baseado no método desenvolvido por Bradford (1976). A curva padrão de concentração foi construída utilizando albumina sérica bovina (BSA). E a leitura foi realizada em espectrofotômetro na absorbância de 595nm.

2.8. Análise das progênies

As plantas transgênicas regeneradas positivas (T0) foram aclimatadas e cada linhagem avançada até a segunda geração (T2). Sementes obtidas de cada planta de alface transgênica da geração T0 foram plantadas em copos descartáveis (250 mL de capacidade), preenchidos com solo fertilizado e vermiculita (3:1 v/v). Foram analisadas 10 plantas de cada linhagem obtida de cada um dos promotores estudados, na T1, e isoladas 3 repetições (plantas) de cada uma das linhagens. Posteriormente, foram analisadas 10 plantas de cada uma das 3 repetições selecionadas da (T1) de cada linhagem transgênica, na T2, num total de 30 plantas. Discos foliares foram coletados para extração do DNA e análise via PCR. O

isolamento do DNA foi realizado conforme a metodologia de Doyle e Doyle (1987). Foi realizado ensaio histoquímico em todas as plantas, além de ensaio fluorimétrico (naquelas plantas positivas confirmadas pelo ensaio histoquímico).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Construção dos vetores

Com o propósito de encontrar um promotor adequado para a transformação genética de alface, foram construídos os vetores abaixo, com o plasmídeo pCAMBIA3301, contendo o gene da actina 2 de *Arabidopsis thaliana* (pACT2) (Figura 1), o gene da proteína AVP1 de *Solanum lycopersicum* (pAVP1) (Figuras 2), e para controle foi utilizado o vetor contendo o promotor do 35SCaMV.

Todos os vetores utilizados contem o gene de seleção *bar*, que foi utilizado para transformar as plantas pelo sistema mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. O promotor 35SCaMV foi utilizado como controle neste estudo, porque na maioria dos trabalhos de transformação genética de alface, os genes introduzidos estão sob o controle deste promotor constitutivo.

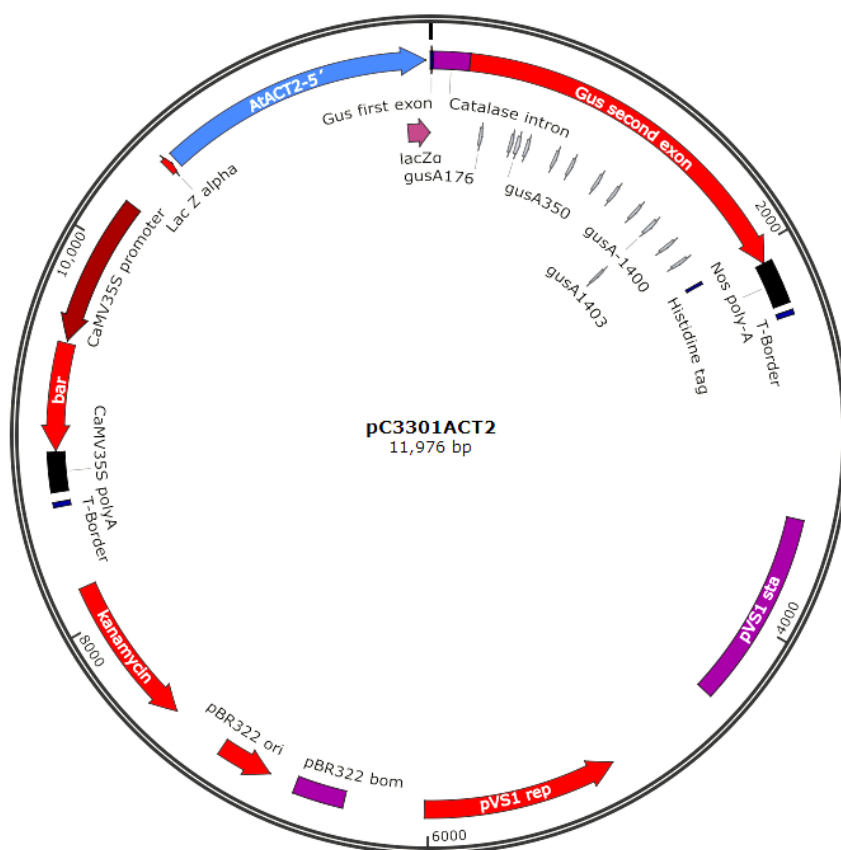


Figura 1. Representação esquemática do vetor pC3301ACT2 utilizado para a transformação genética de alface. O promotor ACT2 aparece em azul controlando o gene *gus* (em vermelho).

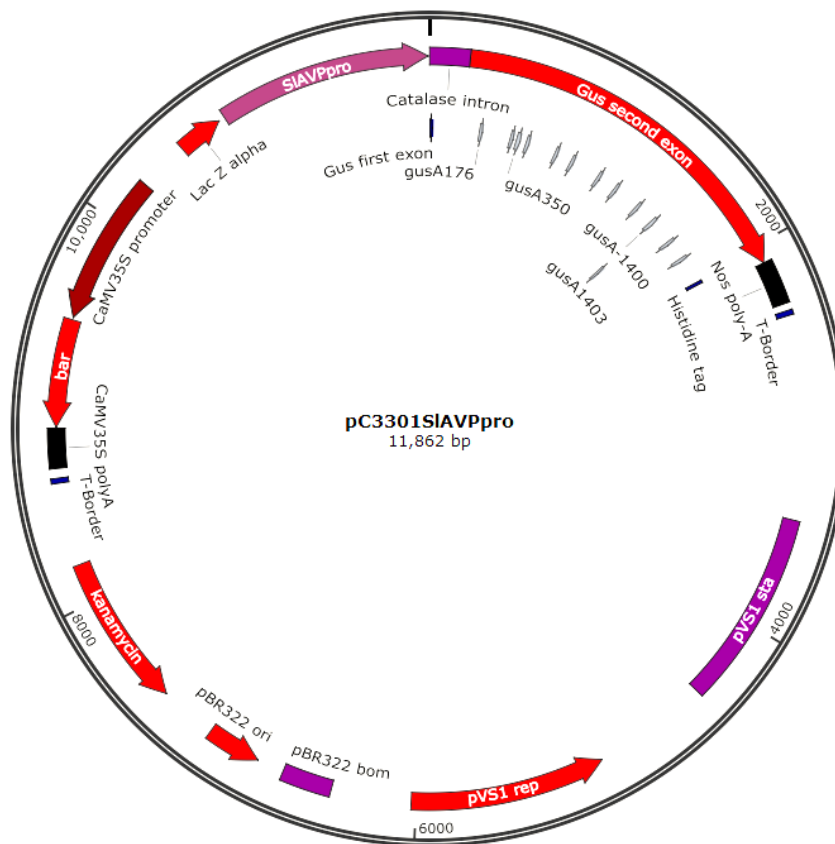


Figura 2. Representação esquemática do vetor pC3301SIAVPpro, utilizado para a transformação genética de alface. O promotor AVP1 aparece em roxo controlando o gene *gus* (em vermelho).

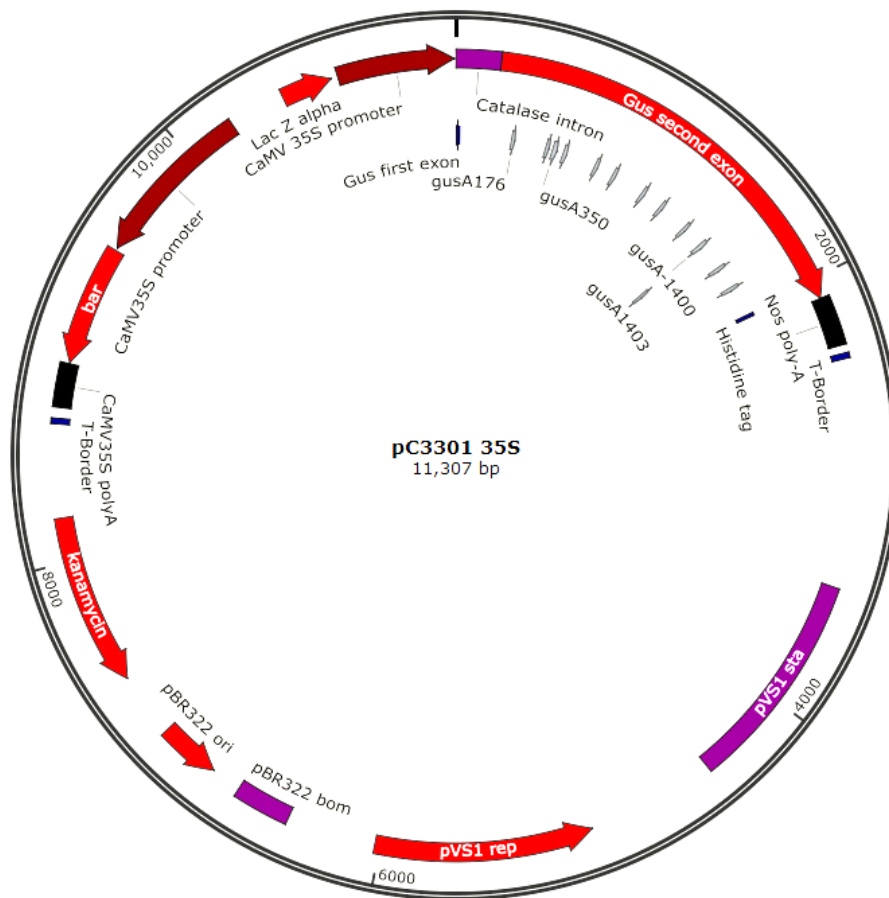


Figura 3. Representação esquemática do vetor pC330135S, utilizado para a transformação genética de alface. O promotor 35SCaMV controla o gene *gus*, em vermelho.

3.2. Transformação genética de plantas de alface via *Agrobacterium tumefaciens*

No presente trabalho todos os experimentos de transformação genética de alface via *Agrobacterium tumefaciens* regeneraram brotos/plântulas transgênicas (Figura 4). Foram usados 1.561 cotilédones de alface com o promotor de ACT2, 2.510 cotilédones com o promotor de AVP1, e aproximadamente 3.790 cotilédones com o promotor 35SCaMV, e obtidas 25, 8 e 5 plantas GUS positivo, respectivamente. No entanto, 13 plantas transformadas com pACT2 morreram durante o processo de regeneração e aclimação, restando 12 plantas transgênicas. A taxa de eficiência de transformação via *Agrobacterium* das plantas de alface foi de 1,60% com pACT2, 0,31% com pAVP1 e 0,13% com p35SCaMV, após análise via PCR.

A presença do gene *gus* nas linhagens obtidas de alface transgênica foi confirmada por PCR, apresentando bandas de tamanho 423 pb (Figura 5). As plantas positivas foram

aclimatadas e cada linhagem avançada até a segunda geração (T2). Não foram observadas diferenças fenotípicas entre as plantas transgênicas e o controle (alface não transgênica). As folhas de cada planta foram analisadas por PCR e ensaio histoquímico em cada geração (T0, T1 e T2) para avaliar a presença e expressão do transgene *gus*.

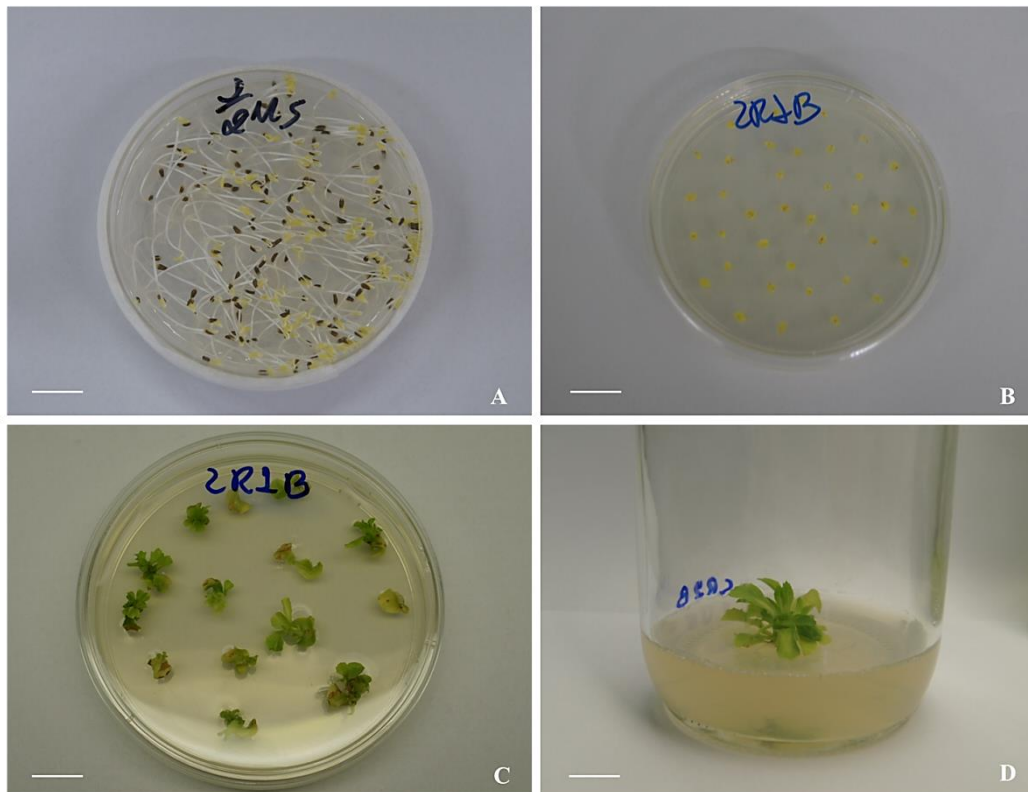


Figura 4. Etapas do processo de transformação genética de alface via *Agrobacterium tumefaciens*. A. Sementes germinadas após 3 dias de cultivo (Barra: 1 mm). B. Cotilédones de alface excisados após a cocultura (Barra: 1 mm). C. Brotos regenerando via organogênese na presença do agente seletivo glufosinato de amônia (Barra: 3 mm). D. Plântula em meio de enraizamento (Barra: 5 mm).

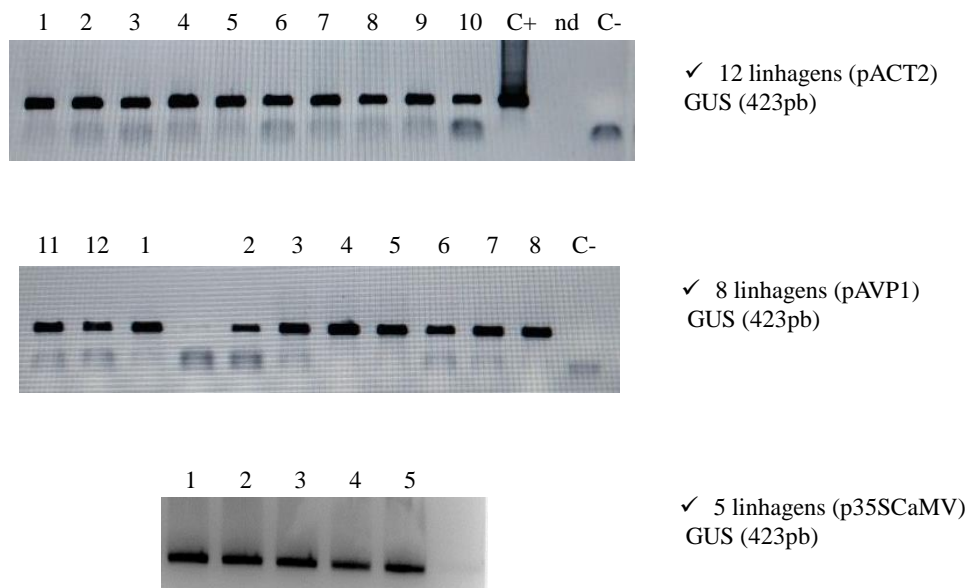


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando a presença de fragmento de 423 pb amplificado por PCR a partir de plantas de alfaces transgênicas regeneradas (T0) para detecção do gene *gus*. O DNA do vetor utilizado na transformação foi empregado como controle positivo, e a alface não transgênica como controle negativo.

3.3. Detecção da proteína PAT no tecido foliar em plantas de alface

Os vetores construídos para transformar alface possuem o gene *bar*, sob o controle do 35SCaMV, que codifica para a enzima fosfotricina acetiltransferase (PAT) e que permite selecionar as plantas com o herbicida glufosinato de amônio (GA). As plantas regeneradas após a transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* foram submetidas à análise com o Teste Kit Trait LL (Strategic Diagnostic Inc.), para a verificação da proteína PAT, confirmada com o aparecimento da linha inferior no imunoteste (Figura 6). Todas as plantas transformadas foram testadas para a presença da proteína PAT. Foram obtidas pela transformação 12 linhagens de plantas do pACT2, sendo 8 plantas PAT positivas, 8 linhagens do pAVP1 (somente 2 plantas PAT positivas) e 5 linhagens de 35SCaMV, tendo somente uma planta confirmada pelo imunoteste.



Figura 6. Teste imunocromatográfico de fluxo lateral realizado com extrato de folha de alface para a detecção da proteína PAT. A. Controle negativo, referente à folha de alface não transformada, no qual a linha do controle negativo foi observada. B. Teste com a folha de alface transgênica, no qual o surgimento da linha inferior demonstra a presença da proteína PAT.

3.4. Ensaio histoquímico para a detecção da atividade de GUS

O ensaio histoquímico para a detecção da atividade de GUS foi realizada nas plantas transgênicas obtidas a partir de cada construção gênica e nas progênies. Explantes foliares foram coletados e imersos na solução contendo X-Gluc, de acordo com o protocolo descrito no item 4.6. A análise da expressão considerou como resultado positivo os explantes foliares que apresentaram coloração azul, após o teste histoquímico (Figura 7).

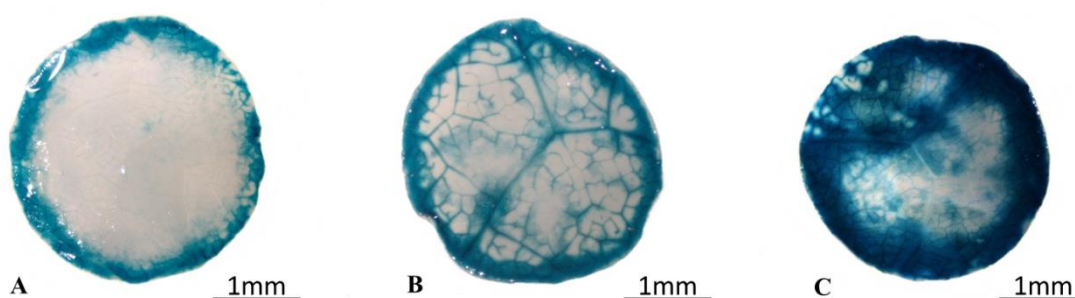


Figura 7. Ensaio histoquímico nas folhas de alface transgênicas para a detecção da expressão de GUS, primeira geração (T1). A. Disco foliar de alface transgênica (promotor 35SCaMV) (Barra: 1 mm). B. Disco foliar de alface transgênica (promotor AVP1) (Barra: 1 mm). C. Disco foliar de alface transgênica (promotor ACT2) (Barra: 1 mm).

A atividade de GUS foi detectada no tecido foliar de todas as plantas transgênicas obtidas com o promotor ACT2. Com relação às plantas obtidas e analisadas do promotor AVP1 apenas 3 das 8 plantas transgênicas apresentaram coloração azul após o ensaio histoquímico. Já as plantas transformadas com o promotor 35SCaMV, somente 2 das 5 plantas obtidas apresentaram expressão de GUS. As plantas positivas foram aclimatadas e cada linhagem avançada até a segunda geração (T2). Cada planta foi analisada por PCR e ensaio histoquímico em cada geração para avaliar a presença do gene *gus*, sendo analisadas 10 plantas na geração T1, de cada linhagem obtida. Posteriormente, foram avaliadas 10 plantas de cada uma das 3 repetições de cada linhagem, na geração T2, com um total de 30 plantas analisadas (Tabela 2).

Esses resultados demonstram que os promotores em estudo são funcionais e promovem a expressão do gene *uidA*. No entanto, foram observadas diferenças no padrão de expressão no tecido foliar entre os promotores estudados, havendo um menor nível de expressão para o promotor 35SCaMV, que necessita de maior tempo de incubação na solução de X-Gluc (mínimo de 48 horas) para confirmação da expressão do *gus*. E algumas plantas positivas nas análises por PCR, não apresentaram expressão do gene no ensaio histoquímico.

Tabela 2. Análises dos ensaios histoquímicos do gene *gus* e PCRs das plantas positivas.

Promotor Linhagem	Ensaio Histoquímico	Ensaio Histoquímico/PCR (porcentagem)	Ensaio Histoquímico/PCR (porcentagem)
	T0*	T1**	T2**
ACT2L1	+	9/9 (100%)	25/27 (92,6%)
ACT2L2	+	5/10 (50%)	13/22 (59,1%)
ACT2L3	+	6/7 (85,7%)	25/26 (96,1%)
ACT2L4	+	6/7 (85,7%)	22/25 (88%)
ACT2L5	+	7/9 (77,8%)	25/28 (89,3%)
ACT2L6	+	6/8 (75%)	22/26 (84,6%)
ACT2L7	+	4/6 (66,7%)	27/29 (93,1%)
ACT2L8	+	5/9 (55,5%)	16/24 (66,7%)
ACT2L9	+	5/7 (71,4%)	25/29 (86,2%)
ACT2L10	+	5/9 (55,6%)	18/26 (69,2%)
ACT2L11	+	6/7 (85,7%)	23/25 (92%)
ACT2L12	+	5/8 (62,5%)	24/27 (88,9%)
AVP1L1	+	6/8 (75%)	22/29 (75,9%)
AVP1L2	+	5/9 (55,5%)	21/27 (77,8%)
AVP1L3	-	8/9 (88,9%)	25/28 (89,3%)
AVP1L4	-	1/5 (20%)	0/11 (0%)
AVP1L5	-	7/9 (77,8%)	13/24 (54,2%)
AVP1L6	-	4/7 (57,1%)	10/19 (52,6%)
AVP1L7	-	3/6 (50%)	15/22 (68,2%)
AVP1L8	+	9/9 (100%)	27/28 (96,4%)
35SL4	-	3/8 (37,5%)	0/23 (0%)
35SL5	-	3/5 (60%)	5/24 (20,8%)
35SL7	+	6/8 (75%)	20/27 (74,1%)
35SL10	+	0/6 (0%)	0/28 (0%)
35SL13	-	0/6 (0%)	0/23 (0%)

*Todas as plantas (T0) foram PCR positivas. ** Ensaio Histoquímico/PCR (porcentagem: plantas positivas por ensaio histoquímico/plantas positivas confirmadas por PCR*100). Na T1 foram analisadas 10 plantas, e na T2 analisadas 30 plantas por linhagem.

Os dados da análise de segregação Mendeliana obtidos das linhagens transgênicas de alface com os promotores pACT2, pAVP1 e p35SCaMV, na geração T1, são apresentados na tabela 3. Foram colocadas para germinar 10 sementes de cada linhagem, e as progênies analisadas por PCR. Todas as progênies T1 das linhagens transgênicas de alface apresentaram padrão Mendeliano de segregação 3:1 (positivo:negativo) para o gene *gus*.

Tabela 3. Análise de segregação do gene *gus* em plantas transgênicas de alface, geração T1.

Promotor/Linhagem	Positivas*	Negativas*	χ^2	P^a
ACT2L1	9	1	1,2	0,27
ACT2L2	10	0	0,6	0,41
ACT2L3	7	3	0,13	0,71
ACT2L4	7	3	0,13	0,71
ACT2L5	9	1	1,2	0,27
ACT2L6	8	2	0,13	0,71
ACT2L7	6	4	1,2	0,27
ACT2L8	9	1	1,2	0,27
ACT2L9	7	3	0,13	0,71
ACT2L10	9	1	1,2	0,27
ACT2L11	7	3	0,13	0,71
ACT2L12	8	2	0,13	0,71
AVP1L1	8	2	0,13	0,71
AVP1L2	9	1	1,2	0,27
AVP1L3	9	1	1,2	0,27
AVP1L4	5	5	3,3	0,06
AVP1L5	9	1	1,2	0,27
AVP1L6	7	3	0,13	0,71
AVP1L7	6	4	1,2	0,27
AVP1L8	9	1	1,2	0,27
35SL4	8	2	0,13	0,71
35SL5	5	5	3,3	0,06
35SL7	8	2	0,13	0,71
35SL10	6	4	1,2	0,27
35SL13	6	4	1,2	0,27

* Plantas testadas por PCR para a presença do gene *gus* (geração T1).

P^a é a probabilidade de que as proporções observadas reflitam a segregação esperada de 3:1.

3.5. Ensaio fluorimétrico para a quantificação da atividade de GUS

Foi feita uma comparação entre a expressão/quantificação da atividade de GUS em plantas de alface transgênica com os promotores pACT2, pAVP1 e p35SCaMV (Figuras 8, 9, 10, 11 e 12). Para a elaboração destes gráficos as variáveis consideradas foram promotores (pACT2, pAVP1 e 35SCaMV), linhagens, quantidade de MU produzido e atividade enzimática. O nível de atividade enzimática foi medido sabendo-se a quantidade de proteína total, aferida através do método de Bradford, e a fluorescência apresentada no ensaio fluorimétrico, que indica o teor/nível de β -glucuronidase nas amostras. O método é de alta sensibilidade e, portanto foram feitas repetições biológicas, a média entre a emissão de fluorescências dessas amostras foi realizada, no entanto, é possível notar que o erro padrão ainda é alto.

Folhas de todas as plantas transgênicas obtidas com o promotor ACT2 foram submetidas ao ensaio fluorimétrico, enquanto foram analisadas 3 linhagens de AVP1 e 2 linhagens de 35SCaMV. Foram analisadas somente as linhagens transgênicas positivas em ensaio histoquímico do *gus*. O nível de expressão do gene *uidA* sob o controle dos diferentes promotores mostrou que a expressão das linhagens de pACT2 correspondeu a atividade em média de 148,76 a 500,68 pmol de MU, pAVP1 média de 92,78 a 145,92 pmol MU, e 35SCaMV média de 100,13 e 105,94 pmol MU – picomoles (pmol) de MU (produto da reação) por μ g de proteína presente na reação, por minuto (Figura 8).

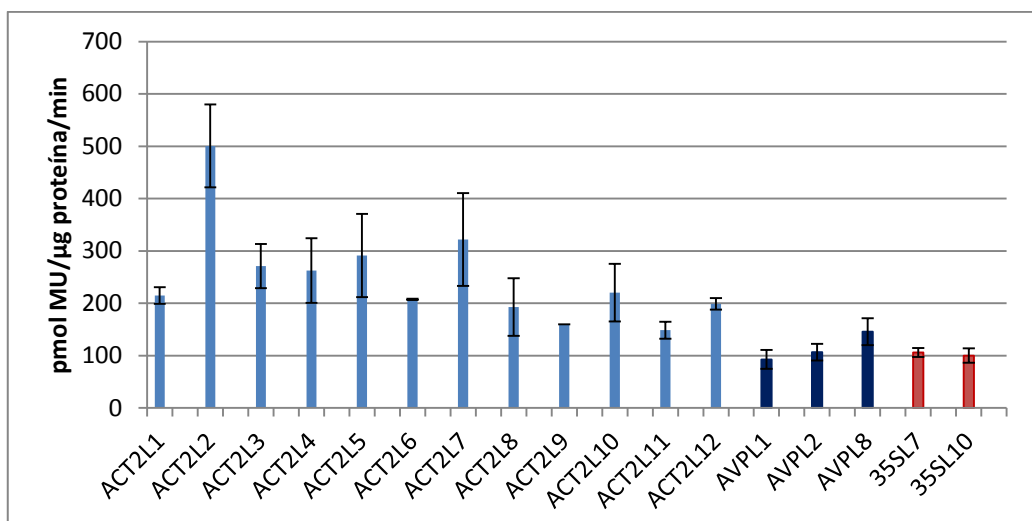


Figura 8. Quantificação da atividade de GUS em folhas de plantas transgênicas de alfaca (T0) transformadas com construções em que o gene *gus* está sob o controle dos promotores ACT2, AVP1 e 35SCaMV.

A atividade de GUS foi detectada no tecido foliar de todas as plantas transgênicas obtidas com o pACT2. E as linhagens transgênicas obtidas apresentaram maior nível de expressão da atividade de *gus* que as linhagens transformadas com os pAVP1 e p35SCaMV. Nem todas as linhagens transformadas com pAVP1 foram analisadas pelo ensaio fluorimétrico, somente as linhagens AVP1L1, AVP1L2 e AVP1L8, que foram confirmadas positivas para o ensaio histoquímico. Estas linhagens transgênicas apresentaram maior expressão de *gus* quando comparadas com as plantas transgênicas obtidas com o p35SCaMV, linhagens 35SL7 e 35SL10. Somente essas duas linhagens transgênicas transformadas com p35SCaMV foram analisadas por ensaio fluorimétrico. Nas demais plantas não foram quantificadas a expressão da atividade de *gus* porque estas não demonstraram ser positivas após ensaio histoquímico, somente através da análise por PCR (Figura 8).

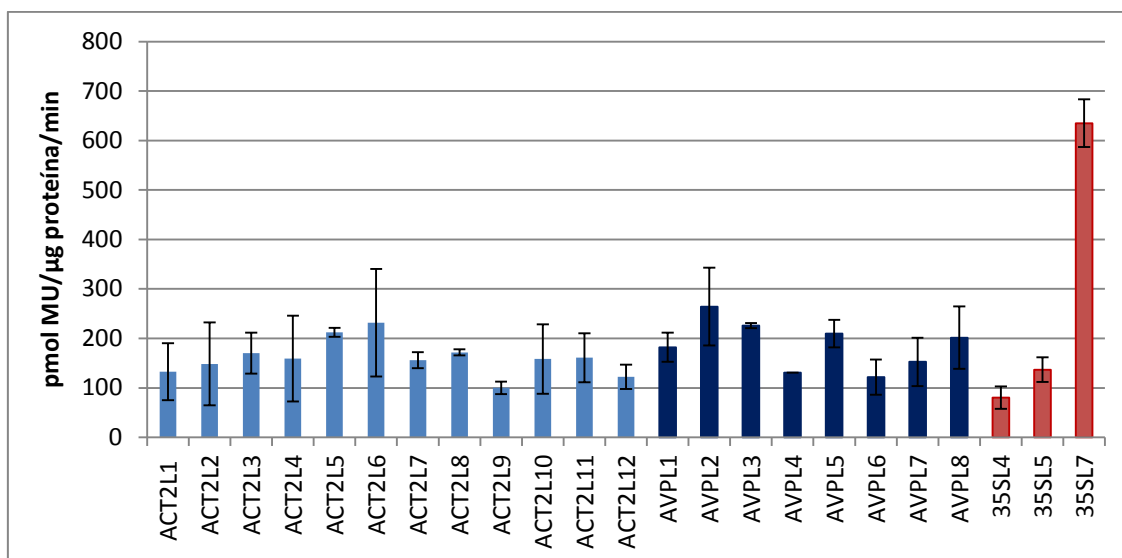


Figura 9. Quantificação da atividade de GUS em folhas de plantas transgênicas de alface (T1) transformadas com construções em que o gene *gus* está sob o controle dos promotores ACT2, AVP1 e 35SCaMV. Cada coluna representa à média de 4 análises independentes, com o respectivo erro padrão indicado pela barra vertical.

As linhagens transgênicas obtidas foram aclimatadas e mantidas em casa de vegetação até a colheita das sementes. Posteriormente, foram colocadas para germinar 10 sementes de cada linhagem, e as progênies (T1) foram analisadas inicialmente por PCR e ensaio histoquímico das folhas. Após a confirmação da expressão do transgene no ensaio histoquímico, foi quantificada a atividade de *gus* de 4 plantas de cada linhagem por ensaio fluorimétrico. As progênies obtidas com o pACT2 continuaram a manter a expressão do gene *gus*, no entanto, houve uma diminuição do nível de expressão, atividade em média de 100,31 a 231,80 pmol de MU (Figura 9).

Todas as progênies (T1) obtidas de cada linhagem com pAVP1, apresentaram expressão do *gus*, o que inicialmente não foi observado em todas as linhagens (T0). Estas não foram positivas no ensaio histoquímico e por isso não foram analisadas por ensaio fluorimétrico. Além disso, as progênies apresentaram um aumento da expressão, atividade em média de 130,47 a 264,31 pmol de MU. A linhagem 35SL10 parou de expressar o transgene, como observado no ensaio histoquímico. A linhagem 35SL7 apresentou um aumento do nível de expressão, quando comparada todas as linhagens dos outros promotores analisados neste estudo, média 635,02 pmol de MU. E as linhagens 35SL4 e 35SL5 começaram a expressar o gene *gus*. porém apresentaram um nível baixo de expressão do transgene; média de 80,11 e 136,84 pmol de MU, respectivamente (Figura 9).

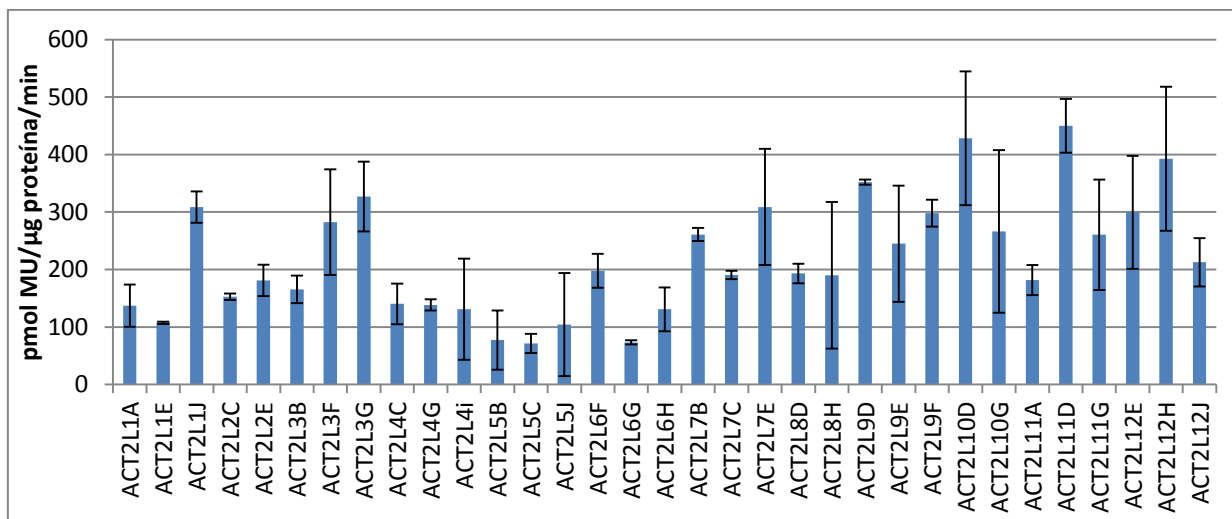


Figura 10. Quantificação da atividade de GUS em folhas de plantas transgênicas de alface (T2) transformada com a construção em que o gene *gus* está sob o controle do promotor ACT2.

Foram mantidas em casa de vegetação 3 das 4 plantas de cada linhagem analisada na geração T1, para a colheita das sementes. Posteriormente 10 sementes de cada um dessas repetições (plantas) de cada linhagem pertencente aos promotores estudados foram colocadas para germinar e analisadas por PCR e ensaio histoquímico. As progênes (T2) de ACT2 continuaram a manter a expressão do gene *gus* em quase todas as gerações, no entanto, uma das repetições com avaliação de 10 plantas, de ACT2L2, ACT2L8 e ACT2L10 apresentarem plantas positivas por PCR, mas não apresentaram expressão no ensaio histoquímico e por isso não foram quantificadas pelo ensaio fluorimétrico. Com relação ainda às progênes (T2) das linhagens de ACT2, houve um aumento da atividade de *gus* em algumas plantas, chegando à média de 449,95 pmol de MU (Figura 10). As progênes (T2) das linhagens pAVP1, também continuaram a manter a expressão do gene, com exceção da linhagem AVP1L4. E uma das repetições com avaliação de 10 plantas, de AVPL6 e AVPL7 apresentaram plantas positivas por PCR, mas não apresentaram expressão no ensaio histoquímico e conseqüentemente não foram quantificadas por ensaio fluorimétrico (Figura 11).

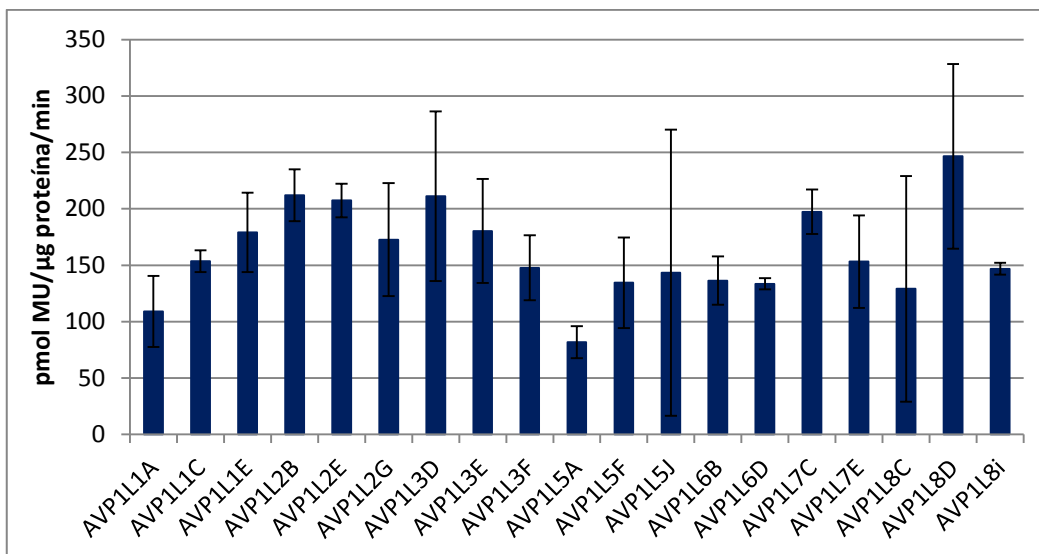


Figura 11. Quantificação da atividade de GUS em folhas de plantas transgênicas de alface (T2) transformada com a construção em que o gene *gus* está sob o controle do promotor AVP1.

As progênes (T2) das linhagens 35SL7 continuaram a expressar o gene, porém, houve uma diminuição da atividade de *gus*. As progênes de duas repetições (plantas), com análise de 10 plantas, da linhagem 35SL5 param de expressar o transgene. Sendo analisada somente uma repetição com 10 plantas, na T2. As demais linhagens obtidas, 35SL4, 35SL10, 35SL13, não foram quantificadas por ensaio fluorimétrico, pois não apresentaram expressão do gene após o ensaio histoquímico, somente confirmadas por PCR.

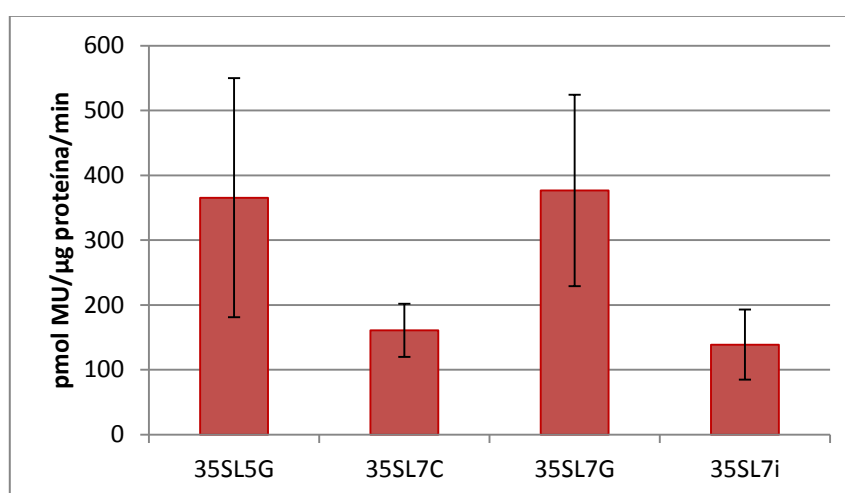


Figura 12. Quantificação da atividade de GUS em folhas de plantas transgênicas de alface (T2) transformada com a construção em que o gene *gus* está sob o controle do promotor 35SCaMV.

De acordo com as análises realizadas nesse estudo, os promotores testados são bons candidatos a serem utilizados em trabalhos de transformação genética de alface. O promotor ACT2 demonstrou expressão do transgene de forma estável após duas gerações, apesar de poder apresentar uma redução ou aumento dos níveis de atividade. O pAVP também é um forte candidato, pois apesar de não ter apresentado expressão do transgene em algumas linhagens transgênicas regeneradas (T0), as progênies (T1 e T2) apresentaram expressão do gene, assim como um aumento da atividade em algumas plantas de alface. Os promotores (ACT2 e AVP1) analisados apresentaram melhor resposta da expressão e atividade do gene *gus* em relação ao 35S, podendo ser desejáveis para o uso em transformação genética de alface, pois são adequados para controlar a expressão de genes de forma constitutiva em tecidos foliares. Em relação ao p35SCaMV, foi observado maior instabilidade da expressão e atividade do transgene sob o controle deste promotor constitutivo.

Plantas transgênicas podem apresentar grande variação da expressão gênica mesmo quando transformadas com a mesma construção. Uma das fontes dessa variação é o número de inserções do transgene no genoma. Sendo que a integração de múltiplas cópias (em *loci* diversos ou em um mesmo *locus*) pode resultar na redução da expressão ou silenciamento gênico. Como a integração do transgene ocorre de forma aleatória, a posição em que foi integrado também pode afetar a sua expressão (Benyon *et al.*, 2013; Agarwal *et al.*, 2014). Essa grande variação na expressão gênica observada nesse trabalho mesmo em plantas contendo a mesma construção gênica dificulta a análise dos dados, porém é um fenômeno conhecido em plantas transgênicas e relatado em outros estudos que avaliaram promotores (Butaye *et al.*, 2005; Benyon *et al.*, 2013; Agarwal *et al.*, 2014).

O 35SCaMV é o promotor constitutivo mais utilizado nos trabalhos de transformação genética de alface e possui muitas vantagens, porém, um dos riscos envolvidos no uso do promotor 35SCaMV é o fenômeno de silenciamento de genes associado a metilação do DNA, notadamente observado em alface por Okumura *et al.* (2016). O processo de metilação de DNA refere-se à transferência de um grupo metil ao carbono 5 de citosinas através da ação de enzimas DNA metiltransferases, levando a uma redução da expressão gênica nos locais metilados. As regiões metiladas geralmente estão associadas às regiões promotoras dos genes, formando domínios que são conhecidos como ilhas CpG (citosina-fosfato-guanina). Essas ilhas, quando metiladas, promovem o silenciamento gênico. Em um estudo para avaliar se a metilação específica do promotor

35SCaMV poderia ocorrer em alface, Okumura et al. (2016) geraram e analisaram plantas geneticamente modificadas de alface (*Lactuca sativa* L.) com o gene *gfp* controlado pelo promotor 35SCaMV, e obtiveram 10 linhagens de plantas transgênicas, onde observaram a expressão forte, fraca e nenhuma do gene *gfp*. A análise de metilação por sequenciamento da região promotora 35SCaMV mostrou hipermetilação nos sítios CpG e CpWpG, em 9 de 10 linhagens transgênicas de alface analisadas.

Em trabalhos com genciana (*Gentiana triflora* x *Gentiana scabra*) transgênica os autores relataram metilação do DNA no promotor 35SCaMV que ocorreu independentemente do número de cópias e da localização genômica do T-DNA, causando silenciamento gênico (Mishiba *et al.*, 2005; Mishiba *et al.*, 2010). Hirai et al. (2011) analisaram os níveis de expressão de miraculina (MIR) dirigido pelo promotor 35SCaMV em linhagens de alface transgênica, a Miraculina é uma proteína que possui propriedade de converter o sabor amargo em doce. Os autores observaram que seus níveis de expressão variavam e estavam em níveis mais baixos quando comparados àqueles de linhagens de alface transgênica com gene MIR orientado pelo promotor de ubiquitina.

Os promotores dos genes que codificam para actina também têm sido empregados como promotores constitutivos na construção de vetores de expressão visando à transformação genética de plantas de interesse agrônomico. Os genes *ACT2* e *ACT8* são expressos em tecidos vegetativos, enquanto que os genes, *ACT1*, *ACT3*, *ACT4*, *ACT11* e *ACT12*, são expressos em tecidos reprodutivos (McDowell *et al.*, 1996; Meagher *et al.*, 1999; Nishimura *et al.*, 2003; Šlajcherová *et al.*, 2012).

He et al. (2009) isolaram e caracterizaram a região do gene actina 2 do arroz (*OsAct2*), e verificaram que este gene é capaz de conferir de forma eficiente a expressão constitutiva de genes em arroz transgênico. Os resultados histoquímicos indicaram uma expressão do gene *gus* controlado pelo promotor de *OsAct2* em plantas transgênicas de arroz.

Em arroz, o promotor do gene *OsAct1* demonstrou ser 5 a 10 vezes mais ativo do que o promotor do gene *Adh1* de milho em trabalhos de transformação genética, sendo este um promotor altamente eficiente no processo de transformação de arroz (McElroy *et al.*, 1990).

Em *Arabidopsis thaliana*, o gene *ACT2* possui expressão constitutiva e elevada na maioria dos tecidos vegetais, onde foi reportado com maior intensidade em raízes, caules e folhas (An *et al.*, 1996). McDowell et al. (1996) observaram um padrão de expressão forte

e constitutivo em todos os tecidos vegetativos analisados com o gene *ACT2*, sendo tal padrão diferente de qualquer outro padrão de expressão observado nos demais genes estudados que codificam para actina.

O gene *AVPI* faz parte da família de genes da bomba de prótons H^+ pirofosfatase (H^+ -PPase), e possui expressão constitutiva (Mohammed *et al.*, 2012). Este também é empregado como promotor na construção de vetores de expressão visando à transformação genética de plantas. Segundo Gaxiola *et al.* (2007), a expressão do gene *AVPIOX* em *Arabidopsis thaliana* afetou a abundância e a atividade da H^+ -ATPase da membrana plasmática, alterando o pH do apoplasto e o transporte de auxina em plantas. Após análises, estes autores observaram um aumento na tolerância à salinidade devido a maior absorção e acumulação de íons de sódio em seus vacúolos e conseqüentemente uma elevação na capacidade osmorregulatória. Essas plantas apresentam uma resistência a diferentes condições de estresses.

Park *et al.* (2005) realizaram pesquisas sobre a superexpressão de *AVPIOX* da H^+ -PPase vacuolar em raiz de tomateiro (*Solanum lycopersicum*). Estudos bioquímicos e de transporte, confirmaram a expressão funcional do gene na linhagem dos tomates geneticamente modificados. Determinações da atividade hidrolítica da H^+ -PPase do tonoplasto de raízes de duas linhagens denominadas *XAVPID* e plantas controles, mostraram que as plantas transgênicas obtiverem em média 56% de aumento de sua atividade em relação às plantas controles. E quando submetidas ao estresse hídrico, demonstraram rápida recuperação após interrupção do estresse, e reidratação.

A superexpressão do gene *AVPI* de *Arabidopsis thaliana* também demonstrou melhorar a tolerância à salinidade de plantas transgênicas em condições de casa de vegetação. Em um estudo sobre o crescimento de cevada transgênica superexpressando o gene *AVPI* sob condições salinas em casa de vegetação, e de campo salino. A cevada transgênica cultivada em estufa produziu uma biomassa maior, com aumento da parte aérea, quando comparada com a cultivada em solo com cloreto de sódio (NaCl). Este aumento na biomassa da parte aérea da cevada transgênica ocorreu em condições não salinas também. Em um campo salino, a cevada transgênica expressando o gene *AVPI* também mostrou um aumento na biomassa da parte aérea e teve uma maior produtividade de grãos por planta em comparação com plantas não transgênicas. Este estudo indicou que a cevada transgênica expressando o gene *AVPI* é uma opção promissora para aumentar a produtividade das culturas de cereais em campos salinos (Schilling *et al.*, 2014).

Outros grupos de pesquisa demonstraram que a superexpressão de gene *AVPI* em *Arabidopsis*, tomate, arroz e algodão aumentam o desempenho das plantas sob condições de sal e seca, pois a regulação positiva da H⁺-PPase tipo I de *Arabidopsis thaliana* pode resultar em maior gradiente eletroquímico de prótons, o que facilita o sequestro de íons e açúcares para o vacúolo, reduzindo o potencial hídrico e resultando em aumento da tolerância à seca e ao sal quando comparado a plantas controles. Além disso, a superexpressão do gene *AVPI* estimula o transporte de auxinas no sistema radicular e leva ao aumento de sistemas radiculares, o que ajuda as plantas transgênicas a absorver água mais eficientemente sob condições de seca (Zhao *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008; Lv *et al.*, 2008; Lv *et al.*, 2009). Estas pesquisas demonstram que o gene *AVPI* tem o potencial para ser utilizado para melhorar a tolerância à seca e ao sal das culturas em áreas onde a água e a salinidade são fatores limitantes para a produtividade agrícola.

Pasapula *et al.*, (2011) geraram plantas de algodoeiro geneticamente modificadas expressando o gene *AVPI* e também testaram seu desempenho sob condições de alto teor de sal e redução na irrigação. As plantas de algodoeiro superexpressando o gene *AVPI* apresentaram crescimento mais vigoroso que as plantas não transgênicas (controle) na presença de NaCl sob condições de crescimento hidropônico. Estas exibiram também significativamente melhor tolerância às tensões de seca e sal em condições de casa de vegetação. Além disso, o rendimento de fibra do algodoeiro transgênico foi pelo menos 20% superior ao das plantas de algodoeiro não transformado.

4. CONCLUSÃO

Os promotores dos genes constitutivos que codificam para actina 2 de *Arabidopsis thaliana* (ACT2) e de AVP1 de *Solanum lycopersicum* (AVP1) foram analisados para serem usados em trabalhos de transformação genética de alface, como alternativa ao promotor p35SCaMV, que tem sido reportado apresentando silenciamento de genes associado a metilação do DNA. Os resultados desse estudo demonstram que os dois promotores testados, pACT2 e pAVP1, são bons candidatos a serem utilizados em trabalhos de transformação genética de alface para direcionar a expressão de genes de interesse de forma constitutiva em tecidos foliares por apresentarem maior estabilidade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal, P.; Garg, V.; Gautam, T.; Pillai, B.; Kanoria, S.; Burma, P. K. A study on the influence of different promoter and 5'UTR (URM) cassettes from *Arabidopsis thaliana* on the expression level of the reporter gene β glucuronidase in tobacco and cotton. *Transgenic Research*, v.23, n.2, p.351-363, 2014.

An, Y. Q.; McDowell, J. M.; Huang, S.; McKinney, E. C.; Chambliss, S.; Meagher, R. B. Strong, constitutive expression of the Arabidopsis ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. *The Plant Journal*, v.10, n.1, p.107-121, 1996.

Aragão, F. J. L.; Brasileiro, A. C. M. Positive, negative and marker-free strategies for transgenic plant selection. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v.14, n.1, p.1-10, 2002.

Benyon, L. S.; Stover, E.; Bowman, K. D.; Niedz, R.; Shatters, R. G.; Zale, J.; Belknap, W. GUS expression driven by constitutive and phloem-specific promoters in citrus hybrid US-802. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, v.49, n.3, p.255-265, 2013.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, New York, v.72, n.1-2, p.248-254, 1976.

Butaye, K. M. J.; Cammue, B. P. A.; Delauré, S. L.; De Bolle, M. F. C. Approaches to Minimize Variation of Transgene Expression in Plants. *Molecular Breeding*, v.16, n.1, p.79-91, 2005.

Chilton, M. D.; Currier, T. C.; Farrand, S. K.; Bendich, A. J.; Gordon, M. P.; Nester, E. W. *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, DC, v.71, n.9, p.3672-3676, 1974.

Chung, R. M.; Azevedo, F. J. A.; Colariccio, A. avaliação da reação de genótipos de alface (*Lactuca sativa* L.) ao lettuce mosaic virus (LMV). *Bragantina*, Campinas, v.66, n.1, 2004.

Dias, B. B. A.; Cunha, W. G.; Morais, L. S.; Vianna, G. R.; Rech, E. L.; Capdeville, G.; Aragão, F. J. L. Expression of an oxalate decarboxylase gene from *Flammulina* sp. in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) plants and resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology*, n.55, p.187-193, 2006.

Doyle, J. J.; Doyle, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, *Phytochem. Bull*, v.19, p.11-15, 1987.

Filgueira, F. A. R. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 2º edição - revista e ampliada. Viçosa: UFV. 2008.

Gaxiola, R. A.; Palmgren, M. G.; Schumacher, K. Plant proton pumps. FEBS Letters, v.581, n.12, p.2204-2214, 2007.

Gomes, A. M. A.; Michereff, S. J.; Mariano, R. L. R.; Rodrigues, V. J. L. B. Intensidade da cercosporiose da alface em cultivos convencionais e orgânicos em Pernambuco. Summa Phytopathologica, v.32, n.4, p.384-385, 2006.

He, C.; Lin, Z.; McElroy, D.; Wu, R. Identification of a rice Actin2 gene regulatory region for high-level expression of transgenes in monocots. Plant Biotechnology Journal, v.7, p. 227–239, 2009.

Hirai, T.; Shohael, A. M.; Kim, Y-W.; Yano, M.; Ezura, H. Ubiquitin promoter–terminator cassette promotes genetically stable expression of the taste-modifying protein miraculin in transgenic lettuce. Plant Cell Reports, v.30, n.12, p.2255–2265, 2011.

Jefferson, R. A.; Burgess, S. M.; Hirsh, D. Beta-glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. Proc Natl Acad Sci USA, v.83, n.22, p.8447-8451, 1986.

Jefferson, R. A. Assaying Chimeric Genes in Plants: The GUS gene Fusion System. Plant Molecular Biology Reporter, v.5, n.4, p.387-405, 1987.

Ibrahim, A. B.; Monteiro, T. R.; Cabral, G. B.; Aragão, F. J. L. RNAi-mediated resistance to whitefly (*Bemisia tabaci*) in genetically engineered lettuce (*Lactuca sativa*). Transgenic Research - Springer, v.26, p.613–624, 2017.

Li, J.; Yang, H.; Peer, W. A.; Richter, G.; Blakeslee, J.; Bandyopadhyay, A.; Titapiwantakun, B.; Undurraga, S.; Khodakovskaya, M.; Richards, E. L.; Krizek, B.; Murphy, A. S.; Gilroy, S.; Gaxiola, R. Arabidopsis H⁺-PPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development. Science, v.310, n.5745, p.121–125, 2005.

Li, B.; Wei, A.; Song, C.; Li, N.; Zhang, J. Heterologous expression of the *TsVP* gene improves the drought resistance of maize. Plant Biotechnology Journal, v.6, p.146–159, 2008.

Lv, S.; Zhang, K.; Gao, Q.; Lian, L.; Song, Y.; Zhang, J. R. Overexpression of an H⁺-PPase from *Thellungiella halophila* in cotton enhances salt tolerance and improves growth and photosynthetic performance. Plant & Cell Physiology., v.49, p.1150–1164, 2008.

- Lv, S. L.; Lian, L. J.; Tao, P. L.; Li, Z. X.; Zhang, K. W.; Zhang, J. R. Overexpression of *Thellungiella halophila* H⁺-PPase (TsVP) in cotton enhances drought stress resistance of plants. *Planta*, 229, n.4, p.899–910, 2009.
- McDowell, J. M.; Huang, S. R.; McKinney, E. C.; An, Y. Q.; Meagher, R. B. Structure and evolution of the actin gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, v.142, p.587–602, 1996.
- Mcelroy, D.; Rothenberg, M.; Reece, K. S. R.; Wu, R. Characterization of the rice (*Oryza sativa*) actin gene family. *Plant Molecular Biology*, v.15, p.257-268, 1990.
- Meagher, R. B.; McKinney, E. C.; Kandasamy, M. K. Isovariant dynamics expand and buffer the responses of complex systems: the diverse plant actin gene family. *The Plant Cell*, v.11, p.995–1005, 1999.
- Medeiros, D. C.; Lima, B. A. B.; Barbosa, M. R.; Anjos, R. S. B.; Borges, R. D.; Cavalcante Neto, J. G.; Marques, L. F. Produção de mudas de alface com biofertilizantes e substratos. *Horticultura Brasileira*, v.25, p.433-436, 2007.
- Miller, J. H. Experiments in molecular genetics. New York: Cold Spring Harbor; 1972.
- Mishiba, K-I.; Nishihara, M.; Nakatsuka, T.; Abe, Y.; Hirano, H.; Yokoi, T.; Kikuchi, A.; Yamamura, S. Consistent transcriptional silencing of 35S-driven transgenes in gentian. *Plant Journal*, v.44, n.4, p.541–556, 2005.
- Mishiba, K-I.; Yamasaki, S.; Nakatsuka, T.; Abe, Y.; Daimon, H.; Oda, M.; Nishihara, M. Strict de novo methylation of the 35S enhancer sequence in gentian. *PLoS One*, v.5, n.3, p.9670, 2010.
- Mohammed, S. A.; Nishio, S.; Takahashi, H.; Shiratake, K.; Ikeda, H.; Kanahama, K.; Kanayama, Y. Role of Vacuolar H⁺-pyrophosphatase in tomato fruit development. *Journal of Experimental Botany*, v.63, n.15, p.5613-5621, 2012.
- Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473–497, 1962.
- Nishimura, T.; Yokota, E.; Wada, T.; Shimmen T.; Okada, K. An *Arabidopsis ACT2* dominant-negative mutation, which disturbs F-actin polymerization, reveals its distinctive function in root development. *Plant & Cell Physiology*, v.44, n.11, p.1131-1140, 2003.

Nunes, A. C. S.; Kalkmann, D. C.; Aragão, F. J. L: Folate biofortification of lettuce by expression of a codon optimized chicken GTP cyclohydrolase I gene. *Transgenic Research*, n.18, p.661-667, 2009.

Okumura, A.; Shimada, A.; Yamasaki, S.; Horino, T.; Iwata, Y.; Koizumi, N.; Nishihara, M.; Mishiba, K. CaMV-35S promoter sequence-specific DNA methylation in lettuce. *Plant Cell Reports*, n.35, p.43–51, 2016.

Park, S.; Li, J.; Pittman, J. K.; Berkowitz, G. A.; Yang, H.; Undurraga, S.; Morris, J.; Hirschi, K. D.; Gaxiola, R. A. Up-regulation of H⁺-pyrophosphatase (H⁺-PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.102, p.18830-18835, 2005.

Pasapula, V.; Shen, G.; Kuppu, S.; Paez-Valencia, J.; Mendoza, M.; Hou, P.; Chen, J.; Qiu, X.; Zhu, L.; Zhang, X.; Auld, D.; Blumwald, E.; Zhang, H.; Gaxiola, R.; Payton, P. Expression of an *Arabidopsis* vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene (*AVPI*) in cotton improves drought- and salt tolerance and increases fibre yield in the field conditions. *Plant Biotechnology Journal*, v.9, p.88–99, 2011.

Resende, F. V.; Saminêz, T. C. O.; Vidal, M. C.; Souza, R. B.; Clemente, F. M. V. Cultivo de alface em sistema orgânico de produção. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, p.16. (Embrapa Hortaliças. Circular Técnica, 56), 2007.

Schilling R. K., Marschner P., Shavrukov Y., Berger B., Tester M., Roy S. J., Plett, D. C. Expression of the *Arabidopsis* vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene (*AVPI*) improves the shoot biomass of transgenic barley and increases grain yield in a saline field. *Plant Biotechnology Journal*, v.12, n.3, p.378–386, 2014.

Šljajcherová, K.; Fišerová, J.; Fischer, L.; Schwarzerová, K. Multiple Actin Isoforms in Plants: Diverse Genes for Diverse Roles? *Frontiers in Plant Science*, v.3, n.226, 2012.

Sousa, C. S.; Kerr, W. E.; Santos, M. R.; Arruda, A. S.; Spini, V. B. M. G.; Juliatti, F. C.; Takatsu, A. Mancha de Septoria da alface: isolamento, inoculação e avaliação de cultivares em condições de campo e casa de vegetação. *Fitopatologia Brasileira*, v.28 p.555-558, 2003.

Zhao, F.-Y.; Zhang, X.-J.; Li, P.-H.; Zhao, Y.-X.; Zhang, H. Co-expression of the *Suaeda salsa* *SsNHX1* and *Arabidopsis* *AVPI* confer greater salt tolerance to transgenic rice than the single *SsNHX1*. *Molecular Breeding*, v.17, n.4, p.341–353, 2006.

CAPÍTULO II

Biofortificação para incremento de folatos em plantas geneticamente modificadas de alface (*Lactuca sativa* L.)

RESUMO

Monteiro, Tatiane Rosa. Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade, Universidade de Brasília, julho 2019. **Biofortificação para incremento de folatos em plantas geneticamente modificadas de alface (*Lactuca sativa* L.)**. Orientador: Dr. Francisco José Lima Aragão.

O folato (também chamado de vitamina B9) é uma vitamina que desempenha inúmeras funções no metabolismo do organismo humano, e sua carência nutricional está relacionada a uma série de doenças. Mesmo sendo um nutriente necessário em pequenas quantidades, parte da população apresenta deficiência nutricional, devido à baixa ingestão de alimentos fonte de folatos. Nesse contexto, a biofortificação de plantas geneticamente modificadas tem sido apontada como uma alternativa para promover a ingestão dessa vitamina. O objetivo deste trabalho foi a biofortificação de folatos em plantas geneticamente modificadas de alface (*Lactuca sativa* L.). Foram manipuladas duas vias metabólicas precursoras da biossíntese de folatos em plantas, a via das pterinas, pela expressão do gene que codifica a enzima *GTP ciclohidrolase I (gchl)* e a via do ácido p-aminobenzóico pela expressão do gene que codifica a enzima *aminodeoxicorismato sintase (adcs)*. Experimentos de transformação genética de alface mediada por *Agrobacterium tumefaciens* foram realizados para obtenção das linhagens geneticamente modificadas expressando os genes *gchl* e *adcs*, sob o controle dos promotores ACT2 e AVP1, respectivamente. Foram confirmadas 3 linhagens transgênicas após análise por PCR com primers específicos para os genes de interesse. Os resultados mostraram que as linhagens transgênicas obtidas apresentam um aumento de até 6,3 vezes mais folatos totais quando comparadas a alface não transgênica (controle). E até 2,5 vezes mais folatos quando comparadas ao espinafre (*Spinacea oleracea*), que é uma planta rica em folatos.

Palavras-chave: Fortificação, ingestão, transformação genética.

ABSTRACT

Monteiro, Tatiane Rosa. Biotechnology and Biodiversity PhD Program, University of Brasilia, July 2019. **Biofortification for folate increase in genetically modified lettuce (*Lactuca sativa* L.)**. Advisor: PhD Francisco José Lima Aragão.

Folate (also called vitamin B9) is a vitamin that performs numerous functions in the metabolism of the human body, and its nutritional deficiency is related to a number of diseases. Even though it is a necessary nutrient in small quantities, part of the population has nutritional deficiency due to the low intake of folate source foods. In this context, biofortification of genetically modified plants has been pointed as an alternative to promote the intake of this vitamin. The objective of this work was the folate biofortification in genetically modified lettuce (*Lactuca sativa* L.) plants. Two precursor metabolic pathways of folate biosynthesis in plants, the pterine pathway, the expression of the gene coding for the enzyme *GTP cyclohydrolase I (gchI)* and the path of p-aminobenzoic acid were manipulated by expression of the gene encoding the enzyme *aminodeoxycysmorphim synthase (adcs)*. *Agrobacterium tumefaciens* mediated lettuce genetic transformation experiments were performed to obtain the genetically modified lines expressing the *gchI* and *adcs* genes, under the control of the ACT2 and AVP1 promoters, respectively. Three transgenic lines were confirmed after PCR analysis with primers specific for the genes of interest. The results showed that the transgenic lines obtained presented an increase of up to 6,3 times more total folates when compared to non-transgenic lettuce (control). And up to 2,5 times more folate when compared to spinach (*Spinacea oleracea*), which is a folate rich plant.

Keywords: Fortification, ingestion, genetic transformation.

1. INTRODUÇÃO

Folatos é o termo genérico para tetraidrofolato (THF) e seus derivados. Essa molécula é composta de três subunidades, a pteridina, ácido p-aminobenzóico (p-ABA) e o ácido glutâmico. E estão envolvidos em inúmeras reações metabólicas importantes (Akhtar *et al.*, 2010; Blancquaert *et al.*, 2014; Gorelova *et al.*, 2017). Os folatos participam de processos biológicos como, por exemplo, do ciclo de metilação e a biossíntese do DNA, fundamental para a manutenção das células (Fox e Stover, 2008). Sua deficiência nutricional está relacionada a várias de doenças como a anemia megaloblástica (Li *et al.*, 2003; Aslinia *et al.*, 2006), alguns tipos de câncer (Choi e Mason, 2000; Choi e Friso, 2005; Rashedi *et al.*, 2018), problemas cardíacos (Scott e Weir, 1996; Ganguly e Alam, 2015), malformações congênitas, como os defeitos do tubo neural (Geisel, 2003; Pitkin, 2007; Imbard *et al.*, 2013; Williams *et al.*, 2015), entre outras. Mesmo sendo uma vitamina necessária em pequenas quantidades, parte da população apresenta deficiência nutricional, devido à ingestão insuficiente de alimentos fonte, absorção e metabolismo deficiente ou demanda aumentada, principalmente nos períodos de gestação, lactação e crescimento. Além de perdas desse nutriente ocorridas durante o preparo do alimento ou pelo processamento industrial (Blancquaert *et al.*, 2014; Blancquaert *et al.*, 2017).

E como tentativa de amenizar este quadro, o Brasil estabeleceu a obrigatoriedade do enriquecimento ou fortificação de farinhas de trigo e milho com ácido fólico, por meio da resolução do Ministério da Saúde e a da Agência Nacional de Vigilância (Anvisa) – RDC nº 344 de 13 dezembro de 2002 (Brasil, 2002). A nutrição inadequada é um problema com sérias implicações para a saúde. Uma das principais estratégias empregadas para minimizar este problema é a fortificação de alimentos, devido a sua abrangência, biodisponibilidade e baixo custo. Essa prática tem como objetivo reforçar o valor nutritivo e prevenir ou corrigir deficiências de um ou vários nutrientes essenciais da dieta de uma população (Alaburda e Shundo, 2007; Soeiro *et al.*, 2010).

Outra opção que vem sendo bastante pesquisada é aumentar o nível de teor de folatos em plantas por engenharia genética (Bekaert *et al.*, 2008; Blancquaert *et al.*, 2014; Gorelova *et al.*, 2017), visto que as plantas são a principal fonte de nutrientes em dietas humanas, porém muitas têm baixa concentração desta vitamina (De la Garza *et al.*, 2004).

Neste contexto, a biofortificação, que consiste em aumentar o nível de vitamina natural das culturas alimentares, é defendido como um poderoso método complementar

para combater a carência vitamínica (Blancquaert *et al.*, 2017; Saltzman *et al.*, 2017). E a biofortificação para o aumento de folatos tem crescido nos últimos anos devido às descobertas relacionadas às suas funções nos diversos processos metabólicos no organismo humano. Muitos estudos de engenharia genética para a biofortificação de cultivares alimentares tem sido relatado, como em tomate (De la Garza *et al.*, 2004; De la Garza *et al.*, 2007), arroz (Storozhenko *et al.*, 2007), alface (Nunes *et al.*, 2009), milho (Naqvi *et al.*, 2009) e batata (Blancquaert *et al.*, 2013).

O objetivo do trabalho foi a biofortificação para incremento de folatos em plantas geneticamente modificadas de alface (*Lactuca sativa* L.), que é a hortaliça folhosa mais consumida “*in natura*” no mundo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local de condução dos experimentos

Os estudos de transformação genética e as análises moleculares foram realizados no Laboratório de Engenharia Genética Aplicada à Agricultura Tropical (LEG), da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília-DF.

2.2. Construção do vetor para transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Foram utilizados o promotor do gene da actina 2 de *Arabidopsis thaliana* (ACT2) e do gene que codifica a proteína AVP1 de *Solanum lycopersicum* (AVP1). Os promotores ACT2 e AVP1 foram inseridos no vetor pCAMBIA 3301, no cassete para expressão dos genes que codificam as enzimas GTP ciclohidrolase I (*gchI*) e aminodeoxicorismato sintase (*adcs*), respectivamente. Além disso, o vetor possui o gene *bar* que confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio, usado para selecionar as plantas transgênicas de alface.

2.3. Transformação da *Agrobacterium tumefaciens* (EHA105) com o vetor de interesse

A linhagem desarmada de *Agrobacterium tumefaciens* (EHA105) foi transformada pelo método de eletroporação e inserido o vetor de interesse. Para isso, o plasmídeo foi homogeneizado em suspensão bacteriana previamente armazenada a -80 °C em glicerol 10%. Essa mistura foi submetida à eletroporação em cubetas conservadas em gelo até o momento da emissão do pulso. Em seguida, as células foram recuperadas em 600 µL de meio de cultura líquido LB. Esse material foi transferido para tubo tipo eppendorf de 1,5 mL e armazenado em estufa a 28 °C por 40 minutos. Posteriormente foram plaqueados 100 µL, 200 µL e 300 µL da suspensão em meio de cultura semissólido LB contendo os antibióticos canamicina (100 mg.L⁻¹) e rifampicina (50 mg.L⁻¹), para seleção das bactérias transformadas. As placas foram colocadas em incubadora a 28 °C durante 2 dias.

As colônias de bactérias que se multiplicaram no meio contendo agente de seleção foram inoculadas em Falcon de 15 mL contendo 3 mL de meio de cultura líquido LB e 3 µL de canamicina (100 mg.L⁻¹), e armazenadas em agitador a 37 °C, overnight. A transformação foi confirmada por PCR utilizando *primers* específicos: ADCSF (5' - AACATGGGACGAAGGCCAAT- 3') e ADCSR (5' - TTCATG GACGGTTGAGTGGG

- 3'), AtGCH1F (5' - AAACGCTGAGGGTCTTGGAG - 3') e AtGCH1R (5' - CGAGCACCAACCTGAGACTT - 3') que amplificam fragmentos de 296 pb e 405 pb, respectivamente. Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%.

As colônias confirmadas para a presença dos vetores foram cultivadas em meio de cultura líquido LB suplementado com canamicina (100 mg.L⁻¹) e rifampicina (50 mg.L⁻¹), e armazenadas em glicerol 25%, a -80 °C.

2.4. Transformação genética de alface

A transformação genética de alface (*Lactuca sativa* L.) variedade Verônica, foi feita segundo a metodologia de Dias *et al.*, 2006, com modificações descritas na metodologia do capítulo I.

2.5. Análise das plantas regeneradas

As plantas transgênicas de alface regeneradas foram analisadas, utilizando a técnica de Polymerase Chain Reaction (PCR) com o DNA genômico isolado segundo a metodologia de Doyle e Doyle (1987), para a detecção do transgene.

Foram utilizados na reação os primers AtGCH1F e AtGCH1R (5' - AAACGCTGAGGGTCTTGGAG - 3' e 5' - CGAGCACCAACCTGAGACTT - 3'), que amplifica uma sequência de 405 pb. E os primers ADCSF e ADCSR (5' - AACATGGGACGAAGCCAAT - 3' e 5' - TTCATGGACGGTTGAGTGGG - 3'), que amplifica uma sequência de 296 pb. As condições de tempo e temperatura da PCR encontram-se na Tabela 1. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% usando o tampão TBE 0,5X.

Tabela 1. Condições de temperatura e tempo da PCR (primers AtGCH1F e AtGCH1R).

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
Desnaturação	95°	5 minutos
Desnaturação	95°	1 minuto
Anelamento dos primers	60°	1 minuto
Alongamento das fitas de DNA	72°	1 minuto
Extensão final	72°	7 minutos
Manutenção	4°	Indeterminado

Tabela 2. Condições de temperatura e tempo da PCR (primers ADCSF e ADCSR).

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
Desnaturação	95°	5 minutos
Desnaturação	95°	1 minuto
Anelamento dos primers	58°	1 minuto
Alongamento das fitas de DNA	72°	1 minuto
Extensão final	72°	7 minutos
Manutenção	4°	Indeterminado

2.6. Detecção da proteína PAT no tecido foliar de plantas transgênicas de alface

As plantas transgênicas regeneradas de alface (T0) após a transformação genética foram submetidas ao teste imunocromatográfico de fluxo lateral com Kit Trait LL (Strategic Diagnostic Inc.), para a verificação do gene *bar*. O ensaio baseia-se na utilização de uma tira que é colocada numa pequena quantidade de extrato de folha da planta que contém a proteína PAT (fosfinotricina acetiltransferase). A tira possui duas zonas de captura, uma específica para a proteína PAT e uma específica para o anticorpo acoplado ao reagente colorido que não reagiu. Estas zonas de captura exibem uma coloração vermelha. Sendo que o resultado positivo é indicado pela presença de duas linhas vermelhas, enquanto que apenas uma linha superior indica um resultado negativo.

2.7. Análise das progênes

Sementes obtidas de cada uma das três linhagens de alface da geração T0 foram plantadas em copos descartáveis (250 mL de capacidade), preenchidos com solo fertilizado e vermiculita (3:1 v/v). Foram analisadas 10 plantas de cada linhagem obtida, na T1 e T2. Discos foliares foram coletados para extração do DNA e posterior análise via PCR. O isolamento do DNA genômico foi realizado conforme a metodologia de Doyle e Doyle (1987).

2.8. Quantificação de folatos pelo método microbiológico

A quantificação de folatos das plantas transgênicas de alface (T2) foi realizada com o kit Microbiological microtiter plate test to quantitate folic Acid (fabricante R-Biopharm AG). O ensaio microbiológico baseia-se na medida de turbidez da solução. O folato é extraído da amostra e o extrato é diluído. O extrato diluído e o meio de teste de folato são pipetados nos poços de uma placa de microtitulação que é revestida com *Lactobacillus*

rhamnosus. O crescimento de *Lactobacillus rhamnosus* depende do suprimento de folato presente na amostra, sendo que este crescimento é proporcional à turbidez do meio. Após a adição de folato, as bactérias crescem até a vitamina ser consumida. A incubação é feita no escuro a 37 °C durante 44 a 48 h. A intensidade do metabolismo ou crescimento em relação ao folato extraído é medida como turbidez e comparada a uma curva padrão. A medição é feita usando um espectrofotômetro de placa de microtitulação a 540 - 550 nm.

Na preparação das amostras de alface para medição do teor total de folato, pesou-se 1 g de folha jovem macerada em nitrogênio líquido, para 40 mL de tampão de fosfato (0,05 mol/L; 0,1% de ascorbato; pH 7.2) contendo pancreatina (Chicken Pancreatin/Glutamylhydrolase) em um tubo Falcon de 50 ml; incubou-se em banho-maria durante 2 horas a 37°C, no escuro; e depois mais 30 minutos a 95°C, também no escuro. Em capela de fluxo laminar foi montado à curva padrão de acordo com o kit. Após a extração de folatos das amostras, 150 µl do meio de cultura e do extrato diluído (amostras) foram pipetados em poços de placa de microtitulação revestida com *Lactobacillus rhamnosus*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Construção do vetor

Para a transformação genética de alface foi construído o vetor abaixo, contendo o promotor do gene que codifica a proteína AVP1 de *Solanum lycopersicum* (AVP1), e o promotor do gene da actina 2 de *Arabidopsis thaliana* (ACT2), controlando os genes *adcs* e *gchI*, respectivamente (Figura 1), além do promotor do 35SCaMV controlando o gene de seleção *bar*, que foi utilizado para transformar as plantas pelo sistema mediado por *Agrobacterium tumefaciens*.

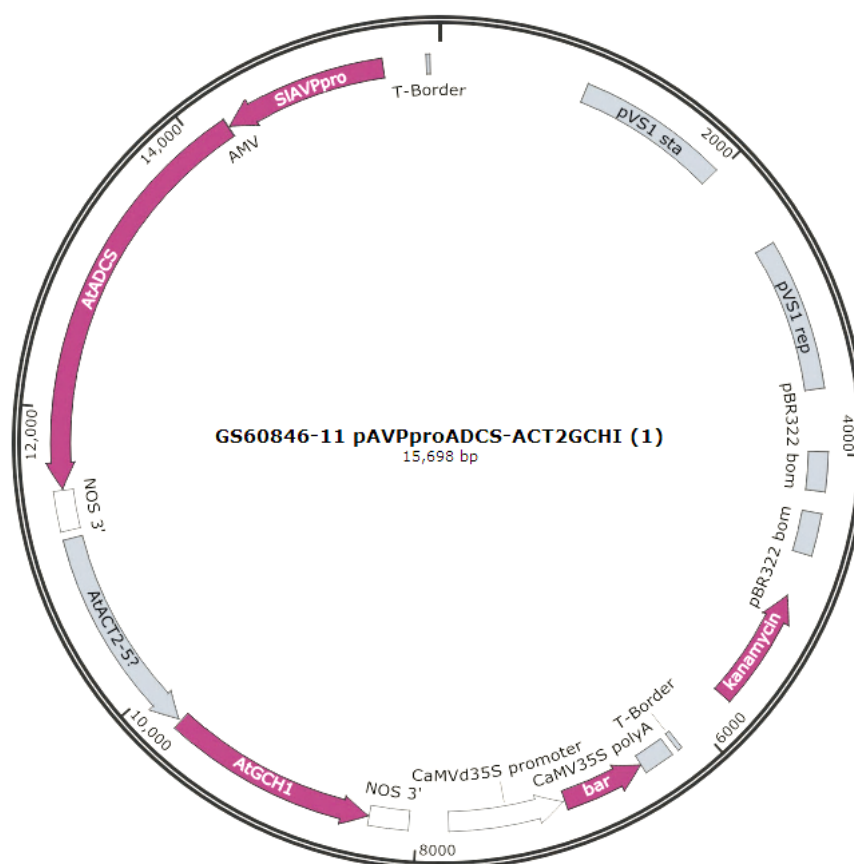


Figura 1. Representação esquemática do vetor GS60846-11 pAVPproADCS-ACT2GCHI utilizado para a transformação genética de alface. O promotor AVP1 controlando o gene *adcs*, e o promotor ACT2 controlando o gene *gchI*.

3.2. Transformação genética de alface via *Agrobacterium tumefaciens*

Foram obtidas 3 plantas geneticamente modificadas e a presença dos genes nas linhagens obtidas (T0) foi confirmada após análise por PCR, apresentando fragmentos amplificados de 296 pb e 405 pb para detecção dos genes *adcs* e *gchI*, respectivamente (Figura 2). As plantas transgênicas foram aclimatadas e mantidas em casa de vegetação até a colheita das sementes, sendo cada linhagem avançada até a segunda geração (T2). Não foram observadas diferenças fenotípicas entre as plantas transgênicas e o controle (alface não transgênica).

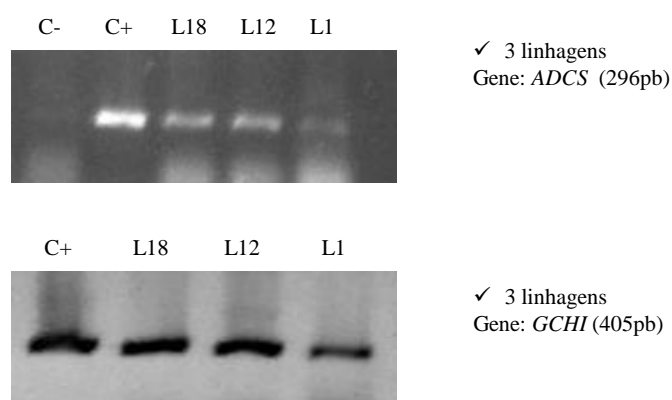


Figura 2. Análise de PCR para detecção dos transgenes em plantas transgênicas de alface. Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando os fragmentos de 296 pb e 405 pb amplificados por PCR das plantas de alfaces transgênicas regeneradas (T0) para detecção dos genes *adcs* e *gchI*, respectivamente. Alface não transgênica (controle negativo), e o DNA do vetor utilizado na transformação como controle positivo. Linhagens denominadas L18, L12 e L1.

Os dados da análise de segregação Mendeliana obtidos das linhagens transgênicas de alface regeneradas L1, L12 e L18, são apresentados nas tabelas 3 e 4. Foram colocadas para germinar 10 sementes de cada linhagem, e as progênies analisadas por PCR. As progênies T1 e T2 das linhagens transgênicas de alface apresentaram padrão mendeliano de segregação 3:1 (positivo:negativo), para os genes *adcs* e *gchI*.

Tabela 3. Análise de segregação dos genes *adcs* e *gchI* em plantas transgênicas de alface, geração T1.

Linhagem	PCR (<i>adcs</i>)	χ^2	P^a	PCR (<i>gchI</i>)	χ^2	P^a
	Positivas/negativas*			Positivas/negativas*		
L1	9/1	1,2	0,27	8/2	0,13	0,71
L12	8/2	0,13	0,71	9/1	1,2	0,27
L18	8/2	0,13	0,71	9/1	1,2	0,27

* Plantas testadas por PCR para a presença dos genes *adcs* e *gchI* (geração T1), plantas positivas/plantas negativas.

P^a é a probabilidade de que as proporções observadas refletem a segregação esperada de 3:1.

Tabela 4. Análise de segregação dos genes *adcs* e *gchI* em plantas transgênicas de alface, geração T2.

Linhagem	PCR (<i>adcs</i>)	χ^2	P^a	PCR (<i>gchI</i>)	χ^2	P^a
	Positivas/negativas*			Positivas/negativas*		
L1	10/0	3,3	0,06	10/0	3,3	0,06
L12	8/2	0,13	0,71	9/1	1,2	0,27
L18	10/0	3,3	0,06	9/1	1,2	0,27

* Plantas testadas por PCR para a presença dos genes *adcs* e *gchI* (geração T2), plantas positivas/plantas negativas.

P^a é a probabilidade de que as proporções observadas refletem a segregação esperada de 3:1.

3.3. Detecção da proteína PAT no tecido foliar de plantas transgênicas de alface

O vetor construído para transformar alface possui o promotor do 35SCaMV controlando gene de seleção *bar* que codifica para a proteína fosfinotricina acetiltransferase (PAT) e que permite selecionar as plantas transgênicas com o herbicida glifosinato de amônio (GA). As plantas regeneradas após a transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* foram submetidas à análise com o Teste Kit Trait LL (Strategic Diagnostic Inc.), para a verificação da proteína PAT. A presença dessa proteína

é confirmada com o aparecimento da linha inferior na tira no imunoteste (Figura 3). No entanto, nenhuma das 3 linhagens transgênicas obtidas apresentaram a presença da proteína PAT.



Figura 3. Teste imunocromatográfico de fluxo lateral realizado com extrato de folha de alface transgênica para a detecção da proteína PAT. A. Alface transgênica. B. Teste com a folha de alface transgênica positiva, no qual o surgimento da linha do controle negativo foi observado.

3.4. Quantificação de folatos totais pelo método microbiológico

Nas plantas, os folatos são sintetizados na mitocôndria a partir de precursores de pterina, que são sintetizados a partir de GTP no citosol, mediado por *gchI*, e p-ABA, derivado do corismato em plastídios, mediado por *adcs* (Hossain *et al.*, 2004; De la Garza *et al.*, 2004). Neste estudo, foram obtidas 3 linhagens de alfaces transgênicas expressando os genes *adcs* e *gchI*. As linhagens obtidas foram avançadas até a segunda geração (T2), quando foi realizada a quantificação de folatos totais. A partir da quantificação pelo método microbiológico foi possível observar que as linhagens transgênicas apresentavam um aumento no teor desta vitamina quando comparados com a planta de alface não transformada geneticamente e de espinafre (*Spinacea oleracea*). O crescimento do

microrganismo (*Lactobacillus rhamnosus*) depende da quantidade de folatos presente na amostra, sendo que este crescimento é proporcional à turbidez do meio observado no experimento (Figura 4).



Figura 4. Quantificação de folatos totais pelo método microbiológico. Curva padrão (pontos 1 a 6), planta de alface não transformada geneticamente (C1), espinafre (C2), amostras das linhagens transgênicas da segunda geração - T2 (L1, L12 e L18) nas fileiras verticais 4, 5, 6 e 7.

Em alface a quantidade de folatos totais presente nas folhas varia entre 30 a 198 μg por 100 g de peso fresco (Johansson *et al.*, 2007). As alfaces não transgênicas analisadas, apresentaram uma média de 82,86 μg de folatos totais por 100 g de peso fresco. Os resultados mostraram que as linhagens transgênicas obtidas apresentam um aumento significativo na quantidade de folatos, um aumento de até 6,3 vezes quando comparadas a alface não transgênica (controle). Além disso, também foi utilizado o espinafre (*Spinacea oleracea*) que é planta cultivada mais rica em folatos, e as linhagens obtidas de alface transgênica apresentaram até 2,5 vezes mais quantidades de folatos totais quando comparadas ao espinafre (Figura 5). Sendo assim, as plantas de alface biofortificadas neste trabalho poderão fornecer a quantidade necessária de folatos para adultos pela ingestão diária das folhas.

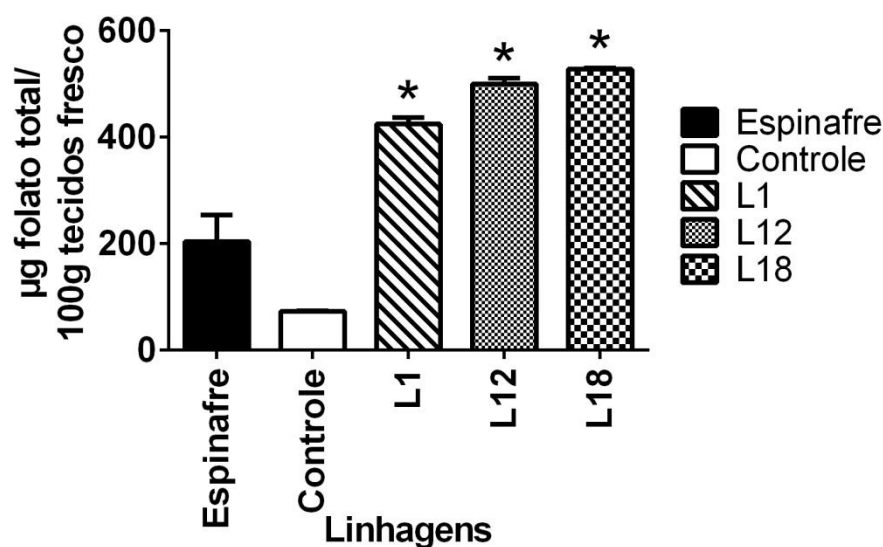


Figura 5. Quantificação de folatos totais em plantas de alface transgênica, segunda geração (T2) pelo método microbiológico. Valores de folatos de 3 linhagens obtidas foram significativamente diferentes dos obtidos nos controles (alface não transgênica - Barra Branca) e espinafre (*Spinacea oleracea* - Barra Preta). O espinafre foi utilizado por ser a planta cultivada mais rica em folatos.

Apesar das plantas serem fonte primária de folatos na dieta humana, a concentração de folatos da maioria dos vegetais consumidos é baixo. Entre as estratégias utilizadas para aumentar a ingestão de folatos pela população, está a suplementação/medicação, ou a fortificação de alimentos. No Brasil essa deficiência é suprida com a adição de ácido fólico em farinhas. No entanto, a maior parte do ácido fólico adicionado é perdido durante o processamento por calor e há um custo adicional para a indústria, além de não ser homogeneamente distribuído em distintos lotes de farinhas. A biofortificação foliar de culturas alimentares através de engenharia genética poderia oferecer uma alternativa para combater a deficiência de vitaminas como o folato, especialmente em países em desenvolvimento. Até o momento, a engenharia genética foi aplicada na superexpressão dos principais genes de biossíntese de folatos nas plantas. Já sendo relatados trabalhos de engenharia genética em *Arabidopsis* (Hossain *et al.*, 2004; Blancquaert *et al.*, 2013), tomate (De la Garza *et al.*, 2004; De la Garza *et al.*, 2007), arroz (Storozhenko *et al.*, 2007), alface (Nunes *et al.*, 2009), milho branco (Naqvi *et al.*, 2009) e batata (Blancquaert *et al.*, 2013). Estes trabalhos tiveram como objetivo a superexpressão de GTP ciclohidrolase I (GTPCHI), a primeira enzima no ramo de pterina da biossíntese de folato, ou a superexpressão combinada de GTPCHI e aminodesoxicorismato sintase (adcs), que é a primeira enzima no ramo p-ABA.

Nunes et al. (2009) geraram linhagens de alface transgênica expressando o gene GTP-ciclohidrolase I (*gchI*) para aumentar o conteúdo de folatos nas folhas. Sendo que 29 linhagens transgênicas foram geradas e análises confirmaram a presença do gene nas plantas. Dezenove dessas linhagens apresentaram aumento significativo de folatos. Para determinar se a expressão do gene *gchI* aumentou os folatos nas folhas de alface, o teor de folatos totais das linhagens transgênicas e não transgênicas (controle) foram medidos por ensaio microbiológico com *Lactobacillus rhamnosus*. Os resultados revelaram que as 19 linhagens exibiram um aumento significativo no conteúdo de folatos totais, variando de 2,1 a 8,5 vezes mais quando comparado à alface não transgênica, utilizada como controle. Os resultados revelaram também que algumas linhagens transgênicas de alface, identificadas como AA16-C3-3, 47B5, 47B2, apresentaram 72,6; 67,4 e 51,5%, respectivamente, mais folatos totais do que o encontrado no espinafre (*Spinacea oleracea*). No entanto, essas linhagens apresentaram uma redução na quantidade de folatos totais com o avanço das gerações. Uma vez que o promotor 35SCaMV foi utilizado para controlar a expressão dos genes naquelas linhagens, e é muito provável que essa redução esteja associada ao silenciamento gênico mediado por metilação do promotor.

Em uma estratégia similar, a expressão do gene GTP ciclohidrolase I da *Escherichia coli* que codifica a *gchI* resultou no aumento de 1.250 vezes das pterinas e conseqüentemente de 2 a 4 vezes mais folatos em folhas de *Arabidopsis thaliana* (Hossain et al., 2004) e frutos de tomate (De la Garza et al., 2004). Apesar do aumento do teor de folatos nos frutos de tomate em média 2 vezes maior, os frutos que foram colhidos e amadurecidos continham níveis de folatos semelhantes aos frutos de plantas controle que amadureceram na planta (De la Garza et al., 2004). Em todos os casos, a expressão do gene *gchI* gerou um aumento muito maior do conteúdo de pteridina quando comparado ao aumento do folatos (Hossain et al., 2004; De la Garza et al., 2004).

Os resultados obtidos nesse trabalho corroboram com aqueles observados na literatura, em que a síntese de pterinas e p-ABA simultaneamente, proporciona maior concentração de folatos totais quando comparado ao aumento obtido com a superexpressão de cada substrato da via de biossíntese isoladamente. De la Garza et al. 2004, observaram em tomate um aumento de duas vezes mais folatos quando comparado ao tomate não transgênico, com a superexpressão apenas da via de síntese de pterinas. No entanto, foi constatado um aumento de 25 vezes mais folatos em tomate, quando houve a expressão

dos genes *gchI* e *adcs*, ou seja, quando houve a síntese de pterinas e p-ABA (De la Garza *et al.*, 2007).

4. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

As plantas geneticamente modificadas de alface (*Lactuca sativa* L.), variedade Verônica, obtidas contendo o gene que codifica a proteína AVP1 de *Solanum lycopersicum* (AVP1), e o gene da actina 2 de *Arabidopsis thaliana* (ACT2), controlando os genes *adcs* e *gchl*, respectivamente, apresentaram um aumento significativo na quantidade de folatos totais, quando comparadas a alface não transgênica. Além disso, as linhagens de alface transgênica também apresentaram maior concentração de folatos (2,5 vezes mais), quando comparadas ao espinafre (*Spinacea oleracea*) que é a planta cultivada mais rica em folatos. Sendo assim, as plantas de alface biofortificadas neste trabalho poderão fornecer a quantidade necessária de folatos para adultos pela ingestão diária das folhas.

As linhagens de alface biofortificadas geradas devem ainda ser submetidas às análises de biossegurança para avaliação e possível liberação de um produto comercial. Além disso, é importante realizar estudos nutricionais com alface não transgênica e alface transformada para a avaliação da biodisponibilidade de folatos em animais, como por exemplo em camundongos. Sendo os estudos com animais necessários para se avaliar o risco de uso de alimentos geneticamente modificados, e após todas as análises, poder inserir essas linhagens transgênicas em programas de melhoramento genético para que tais características sejam transferidas para outras variedades de alface.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alaburda, J.; Shundo, L. Ácido fólico e fortificação de alimentos. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v.66, n.2, 2007.

Akhtar, T. A., Orsomando, G., Mehrshahi, P., Lara-Núñez, A., Bennett, M. J., Gregory, J. F., III, Hanson, A. D. A central role for gamma-glutamyl hydrolases in plant folate homeostasis. The Plant Journal, v.64, n.2, p.256–266, 2010.

Aslinia, F.; Mazza, J. J.; Yale, S. H. Megaloblastic anemia and other causes of macrocytosis. Clinical medicine & research, v.4, n.3, p.236-241, 2006.

Bekaert, S.; Storozhenko, S.; Mehrshahi, P.; Bennett, M. J.; Lambert W.; Gregory III, J. F.; Schubert, K.; Hugenholtz, J.; Van Der Straeten D.; Hanson, A. D. Folate biofortification in food plants. Trends in Plant Science, v.13, n.1, p.28-35, 2008.

Blancquaert, D., Storozhenko, S., Van Daele, J., Stove, C., Visser, R. G., Lambert, W., Van Der Straeten, D. Enhancing pterin and para-aminobenzoate content is not sufficient to successfully biofortify potato tubers and *Arabidopsis thaliana* plants with folate. Journal of Experimental Botany, v.64, n.12, 3899–3909, 2013.

Blancquaert, D.; Steur, H. De; Gellynck, X.; Van Der Straeten D. Present and future of folate biofortification of crop plants. Journal of Experimental Botany, v.65, n.4, p.895–906, 2014.

Blancquaert, D.; Steur, H.; Gellynck, X.; Van Der Straeten, D. Metabolic engineering of micronutrients in crop plants. Annals of the New York Academy of Sciences, v.1390, n.1, 59–73, 2017.

Brasil. Resolução – RDC nº 344 de 13 de dezembro de 2002. Regulamento Técnico para Fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico. Diário Oficial da União, Brasília, 18 de dezembro de 2002.

Choi, S. W.; Mason, J. B. Folate and Carcinogenesis: An Integrated Scheme. The Journal of Nutrition, v.130, n.2, p.129–132, 2000.

Choi, S. W.; Friso, S. Interactions between folate and aging for carcinogenesis. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, v.43, n.10, p.1151–1157, 2005.

De la Garza, R. D.; Quinlivan, E. P.; Klaus, S. M. J.; Basset, G. J. C.; Gregory III, J. F.; Hanson, A. D. Folate biofortification in tomatoes by engineering the pteridine branch of

folate synthesis. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, v.101, n.38, p.13720-13725, 2004.

De la Garza, R. I. D.; Gregory III, J. F.; Hanson, A. D. Folate biofortification of tomato fruit. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, v.104, n.10, p.4218-4222, 2007.

Dias, B. B. A.; Cunha, W. G.; Morais, L. S.; Vianna, G. R.; Rech, E. L.; Capdeville, G.; Aragão, F. J. L. Expression of an oxalate decarboxylase gene from *Flammulina* sp. in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) plants and resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Pathology, n.55, p.187-193, 2006.

Doyle, J. J.; Doyle, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, Phytochem. Bull, v.19, p.11-15, 1987.

Fox, J.; Stover, P. J. Folate-mediated one-carbon metabolism. In: Folic Acid and Folates, Vitamins and Hormones, v.79, p.22-29, 2008.

Ganguly, P.; Alam, S. F. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. Nutrition Journal, v.14, n.6, p.1-10, 2015.

Geisel, J. Folic acid and neural tube defects in pregnancy? A review. The Journal of Perinatal and Neonatal Nursing, v.17, n.4, p.268-279, 2003.

Gorelova, V.; Ambach, L.; Rébeillé, F.; Stove, C.; Van Der Straeten, D. Folates in Plants: Research Advances and Progress in Crop Biofortification. Frontiers in Chemistry, v.5, n.21, 2017.

Hossain, T.; Rosenberg, I.; Selhub, J.; Kishore, G.; Beachy, R.; Schubert, K. Enhancement of folate in plants through metabolic engineering. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, v.101, n.14, p.5158-5163, 2004.

Imbard, A.; Benoist, J. F.; Blom, H. J. Neural tube defects, folic acid and methylation. International journal of environmental research and public health, v.10, n.9, p.4352-89, 2013.

Johansson, M.; Jägerstad, M.; Frølich, W. Folates in lettuce: a pilot study. Scandinavian Journal of Food and Nutrition, v.51, n.1, p.22-30. 2007.

Naqvi, S.; Zhu, C.; Farre, G.; Ramessar, K.; Bassie, L.; Breitenbach, J.; Conesa, D. P.; Ros, G.; Sandmann, G.; Capell, T.; Christou, P. Transgenic multivitamin corn through biofortification of endosperm with three vitamins representing three distinct metabolic

pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.106, n.19, p. 7762-7767, 2009.

Nunes, A. C. S.; Kalkmann, D. C.; Aragão, F. J. L. Folate biofortification of lettuce by expression of a codon optimized chicken GTP cyclohydrolase I gene. *Transgenic Research*, v.18, p.661-667, 2009.

Pitkin, R. M. Folate and neural tube defects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v.85, n.1, p.285S-288S, 2007.

Rashedi, J.; Akbarzadeh, M.; Ajami Khiyavi, H.; Haiaty, S.; Vahedian, V.; Hasanzadeh, O.; Maroufi, N. F. The role of folic acid in carcinogenesis, diagnosis, and treatment of cancer. *International Journal of Biomedicine and Public Health*, v.1, n.2, p.114-121, 2018.

Saltzman, A.; Birol, E.; Oparinde, A.; Andersson, M. S.; Asare-Marfo, D.; Diressie, M. T.; Gonzalez, C.; Lividini, K.; Moursi, M.; Zeller, M. Availability, production, and consumption of crops biofortified by plant breeding: current evidence and future potential. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.1390, n.1, p.104–114, 2017.

Scott, J.; Rebeille, F.; Fletcher, J. Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.80, p.795-824, 2000.

Soeiro, B. T.; Boen, T. R.; Pereira-Filho, E. R.; Pallone, J. A. L. Investigação da qualidade de farinhas enriquecidas utilizando análise por componentes principais (PCA). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.30, n.3, p.618-624, 2010.

Storozhenko, S.; De Brouwer, V.; Volckaert, M.; Navarrete, O.; Blancquaert, D.; Zhang, G. F.; Van Der Straeten, D. Folate fortification of rice by metabolic engineering. *Nature Biotechnology*, v.25, p.1277–1279, 2007.

Williams, J.; Mai, C. T.; Mulinare, J.; Isenburg, J.; Flood, T. J.; Ethen, M.; Frohnert, B.; Kirby, R. S. Updated estimates of neural tube defects prevented by mandatory folic acid Fortification—United States, 1995–2011. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*, v.64, p.1-5, 2015.