



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

**CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA PROTEÍNA PROMOTORA DE
FLORESCIMENTO**

NATALIA CRISTINA SOARES

**Araras
2023**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA PROTEÍNA PROMOTORA DE
FLORESCIMENTO

NATALIA CRISTINA SAORES

ORIENTADOR: Prof. Dr. MARCO AURÉLIO TAKITA

COORIENTADORA: Profa. Dra. RAQUEL LUCIANA BOSCARIOL CAMARGO

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Produção
Vegetal e Bioprocessos Associados
como requisito parcial à obtenção do
título de MESTRE EM PRODUÇÃO
VEGETAL E BIOPROCESSOS
ASSOCIADOS

Araras

2023

Soares, Natalia Cristina

Clonagem e expressão heteróloga da proteína promotora de florescimento / Natalia Cristina Soares -- 2023.
58f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras

Orientador (a): Marco Aurélio Takita

Banca Examinadora: Jean Carlos Cardoso, Reinaldo Rodrigues de Souza Neto

Bibliografia

1. Juvenildade. 2. Florígeno. 3. Proteína recombinante.
I. Soares, Natalia Cristina. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Helena Sachi do Amaral - CRB/8
7083



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Natalia Cristina Soares, realizada em 18/08/2023.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Marco Aurelio Takita (IAC)

Profa. Dra. Raquel Luciana Boscarol Camargo (IAC)

Prof. Dr. Jean Carlos Cardoso (UFSCar)

Prof. Dr. Reinaldo Rodrigues de Souza Neto (IAC)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pela força e sabedoria para trilhar o caminho até este momento.

Agradeço aos meus pais, Hilda e Antonio, de todo o meu coração. Eu só cheguei até aqui porque vocês me permitiram. Foram anos de trabalho duro para me proporcionar a melhor educação possível. Eu sou eternamente grata.

Agradeço meu namorado, Bruno, meu companheiro da vida e de profissão. Obrigada por todo o apoio, pela companhia nos expedientes estendidos no laboratório, pelas palavras de incentivo nos momentos difíceis. Ter você ao meu lado deixou essa experiência mais leve.

Agradeço meus orientadores, Dr. Marco Aurélio Takita e Dra. Raquel Luciana Boscariol-Camargo, pela confiança, paciência e por todo o conhecimento transmitido.

Um agradecimento especial à Dra. Raquel, que lá em 2016 aceitou uma aluna que recém tinha iniciado o curso de Ciências Biológicas. A profissional que sou e todas as portas que se abriram para mim é graças a você que confiou em mim anos atrás. Muito obrigada, de todo o meu coração.

Agradeço também à CAPES pela concessão da bolsa de mestrado, ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira pelo espaço e recursos para o desenvolvimento do meu projeto e à PPGPVBA por todo o conhecimento e aprendizado.

Agradeço aos meus colegas de laboratório: Cristina, Sinara, Silvia, Clara, Victória, Nathália M., Nathália F., Giovana, Thaís, Reinaldo, Isis, Guilherme, Samira, Maria Júlia e Dhiôvanna pelo companheirismo e risadas nesses últimos anos.

Agradeço à minha colega de turma, Carla, pelo companheirismo (mesmo à distância), conversas e conselhos.

E agradeço a todos aqui que não citei, mas que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

Muito obrigada a todos!

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	06
3 REVISÃO DA LITERATURA	07
3.1 O gênero <i>Citrus</i>	07
3.2 Aspectos econômicos.....	07
3.3 Fases do desenvolvimento de plantas perenes: fase juvenil.....	08
3.4 Processo de florescimento.....	10
3.5 Produção de proteína recombinante em <i>Escherichia coli</i>	13
4 MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1 Caracterização físico-química das proteínas.....	16
4.2 Localização sub-celular das proteínas.....	16
4.3 Clonagem inicial.....	16
4.3.1 Vetor de expressão e linhagens de <i>Escherichia coli</i>	16
4.3.2 Construção gênica.....	18
4.3.3 Transformação das células competentes para expressão...	19
4.3.4 Confirmação da transformação.....	19
4.3.5 Extração do plasmídeo.....	19
4.3.6 Sequenciamento.....	20
4.4 Indução da expressão de proteína.....	20
4.5 Extração da proteína.....	20
4.6 Purificação da proteína pelo método de cromatografia de afinidade a níquel.....	21
4.7 Quantificação da proteína.....	21
4.8 Ensaio de Dot-Blotting.....	22
4.9 Testes de indução do florescimento.....	22
4.9.1 Testes <i>in vitro</i>	23
4.9.2 Testes <i>ex vitro</i>	23

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 Caracterização físico-química <i>in sílico</i> das proteínas.....	27
5.2 Predição da localização sub-celular das proteínas.....	28
5.3 Clonagem.....	28
5.4 Sequenciamento do plasmídeo recombinante.....	32
5.5 Expressão heteróloga da proteína.....	33
5.6 Purificação da proteína pelo método de cromatografia de afinidade a metal (níquel).....	35
5.7 Quantificação da proteína.....	36
5.8 Teste de estabilidade da proteína.....	36
5.9 Ensaio de Dot-Blotting.....	37
5.10 Testes de indução do florescimento.....	38
5.10.1 Testes <i>in vitro</i>	38
5.10.2 Testes <i>ex vitro</i>	40
6 HIPÓTESES PARA O NÃO FLORESCIMENTO DAS PLANTAS DE CITROS, TABACO E TOMATE INOCULADAS COM AS PROTEÍNAS CiFT3 E SFT	42
7 CONCLUSÕES	44
8 LITERATURA CITADA	45

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Primers utilizados para a amplificação dos genes de interesse contendo o sítio de restrição NdeI e <i>EcoRI</i> , respectivamente. Os sítios de restrição estão marcados em negrito.....	17
Tabela 2. Identificação das sequências e proteínas CiFT3 e SFT.....	24
Tabela 3. Alinhamento das sequências codificadoras dos genes FT de <i>Arabidopsis thaliana</i> , CiFT3 de citros e SFT de tomate realizado na plataforma Clustal Omega (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/).....	25
Tabela 4. Alinhamento das proteínas codificadas pelas sequências dos genes FT de <i>Arabidopsis thaliana</i> , CiFT3 de citros e SFT de tomate realizado na plataforma Clustal Omega (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/).....	25
Tabela 5. Caracterização físico-química (número de aminoácidos, peso molecular, índices de instabilidade e alifático e hidropaticidade) das proteínas obtida através da ferramenta ProtParam (https://web.expasy.org/protparam/).	26
Tabela 6. Localização sub-celular das proteínas, utilizando as ferramentas SignalP 5.0, UniProt e LOCTree3.....	27
Tabela 7. Sequência CiFT3 (GenBank: BAF96645.1) e sequência códon-otimizada para <i>E. coli</i>	28
Tabela 8. Quantificações das proteínas CiFT3 e SFT pelo método de Bradford (1976). A tabela apresenta as quantificações totais das proteínas e suas respectivas médias.....	35
Tabela 9. Teste de indução do florescimento em plântulas juvenis de citros da variedade de laranja doce Hamlin por meio de infiltração a vácuo das proteínas CiFT3 e SFT pelas raízes.....	36
Tabela 10. Teste de indução do florescimento em plantas juvenis de citros da variedade de laranja doce Hamlin e Pera por meio de absorção da proteína SFT pelas raízes.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema da via de floração em árvores tropicais e subtropicais. Estímulos ambientais promovem a estabilização do fator de transcrição CO, nas folhas, que regula positivamente a transcrição da proteína FT.....	12
Figura 2. Construção dos vetores de expressão.....	16
Figura 3. Otimizações realizadas pela empresa FastBio (https://www.fastbio.com.br/) na sequência <i>CiFT3</i> para expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i>	29
Figura 4. A: Gel de agarose 2% com a amplificação do fragmento correspondente ao gene SFT (534 pb) por PCR. B: Gel de agarose a 2% do vetor pET28a (5369 pb), vetor pET28a e amplicon clivados com as enzimas de restrição EcoRI e NdeI. L: Marcador de 1kb plus (Fermentas).....	30
Figura 5. Avaliação da clonagem do gene <i>SFT</i> em pET28a.....	31
Figura 6. Busca de similaridade no Blastx. A sequência obtida foi utilizada para busca por similaridade na base de dados do NCBI. Fonte: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	31
Figura 7. Sequência do plasmídeo recombinante pET28a_SFT com 100% de identidade com “ <i>protein single flower truss</i> ” de tomate (<i>SFT</i>).....	32
Figura 8. Ensaio de expressão das proteínas codificadas pelos genes <i>CiFT3</i> e <i>SFT</i> a 37°C com 1 mM de IPTG nos tempos de indução T ₀ , T ₂ , T ₄	33
Figura 9. Ensaio de expressão das proteínas codificadas pelos genes <i>CiFT3</i> e <i>SFT</i> a 37°C com diferentes concentrações do indutor de expressão IPTG (0,2 mM, 1 mM e 2 mM) em diferentes tempos de indução (T ₂ , T ₄ e T _{ov}).....	33
Figura 10. Purificações das proteínas <i>CiFT3</i> e <i>SFT</i> em resina Ni-NTA Agarose foram visualizadas em gel de SDS-PAGE a 12%.....	34
Figura 11. Teste de degradação e estabilidade das proteínas <i>CiFT3</i> e <i>SFT</i> armazenadas no freezer -20°C com amostras aplicadas no gel logo após o descongelamento, 1, 3 e 7 dias dia após descongelamento e mantidas em temperatura ambiente.....	35
Figura 12. Esquemática do teste <i>in vitro</i> de infiltração a vácuo das proteínas <i>CiFT3</i> e <i>SFT</i> pelas raízes.....	37
Figura 13. Plântulas do teste de indução de florescimento <i>in vitro</i>	38

- Figura 14.** A: Plantas juvenis de citrange Carrizo com necrose na folha e no pecíolo após aplicação da proteína por injeção com seringa. B: Testes para verificar qual tampão estava causando necrose nas folhas de citros juvenis.... 39
- Figura 15.** Dot-blotting das proteínas recombinantes CiFT3 e SFT sondadas com o anticorpo primário Anticorpo His-Tag para confirmar a presença das proteínas pós-purificação..... 41

CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA PROTEÍNA PROMOTORA DE FLORESCIMENTO

Autor: NATALIA CRISTINA SOARES

Orientador: Prof. Dr. MARCO AURÉLIO TAKITA

Co orientadora: Profa. Dra. RAQUEL LUCIANA BOSCARIOL CAMARGO

RESUMO

Citros são plantas lenhosas perenes e passam por diferentes fases de desenvolvimento durante seu ciclo de vida: germinação, fase juvenil, fase adulta vegetativa e fase reprodutiva. A fase juvenil é caracterizada pela ausência de flores e frutos, a qual pode variar de 6 a 20 anos, dependendo da variedade. O processo de florescimento é regulado por uma complexa e sincronizada rede regulatória que é compartilhada por diferentes espécies. O gene *CiFT3* de citros e o gene *SFT* de tomate são homólogos ao *FLOWERING LOCUS T (FT)* de *Arabidopsis thaliana*, o qual codifica um sinal móvel universal, conhecido como florigeno, que é conservado entre diferentes espécies e gêneros. Com a tecnologia do DNA recombinante, é possível a produção de proteínas recombinantes por meio da clonagem do gene de interesse em um vetor de expressão sob o controle de um promotor. Após a expressão, o próximo processo é a purificação para obtenção de uma molécula biologicamente ativa. O objetivo deste projeto foi a expressão e purificação das proteínas promotoras de florescimento de citros e tomate em um sistema heterólogo, de modo a possibilitar a aplicação e avaliação dos seus potenciais de indução de florescimento. Para isso, células competentes de *E. coli* BL21(DE3) foram transformadas utilizando o vetor pET28a contendo o gene *CiFT3* e *SFT*. Para a indução da expressão, foram utilizadas diferentes concentrações do indutor IPTG em diferentes tempos. A purificação das proteínas foi realizada pelo método de cromatografia de afinidade ao níquel. A melhor condição para a indução de expressão das proteínas foi 1 mM de IPTG a 37°C, com agitação de 200 rpm, durante 16 horas (T_{ov}). A expressão das proteínas recombinantes foi avaliada por SDS-PAGE, as quais apresentaram-se na fração solúvel. A proteína recombinante *CiFT3* apresentou rendimento variando de 14 a 153 ng/uL, enquanto a proteína *SFT* teve rendimento variando de 18 a 115 ng/uL. Testes de indução do florescimento foram realizados *in vitro*, através da absorção pelas raízes com e sem aplicação de vácuo, e *ex vitro*, através da absorção pelas folhas e meristema apical, em plantas juvenis de citros, tabaco e tomate, com concentrações de aplicações variando de 1 ng/ μ L até 33.600 ng/ μ L da proteína. Os testes de indução não obtiveram sucesso em promover o florescimento precoce. Uma possível explicação para isso, seria a não translocação efetiva da proteína das folhas, onde foram injetadas, para o meristema apical, ou ainda, quantidades significativas das proteínas promotoras do florescimento nas plantas para induzir o florescimento não foram atingidas. Para compreender melhor os resultados obtidos, análises complementares são necessárias a fim de investigar as possíveis causas do não florescimento nas plantas avaliadas.

Palavras-chave: juvenilidade, florigeno, expressão de proteínas, citros, *SFT*, *CiFT3*, proteína recombinante.

CLONING AND HETEROLOGOUS EXPRESSION OF THE FLOWERING PROMOTER PROTEIN

Author: NATALIA CRISTINA SOARES

Adviser: Prof. Dr. MARCO AURÉLIO TAKITA

Co-adviser: Prof. Dr. RAQUEL LUCIANA BOSCARIOL CAMARGO

ABSTRACT

Citrus are perennial woody plants and have different stages of development during their life cycle: germination, juvenile stage, growing stage, and reproductive stage. The juvenile stage is characterized by the absence of flowers and fruits that can vary from 6 to 20 years. The flowering process is composed of a complex and synchronized regulatory network that is shared by different species. The citrus *CiFT3* gene and tomato *SFT* gene, homologous to *FLOWERING LOCUS T (FT)* from *Arabidopsis thaliana*, encode an universal mobile signal, known as florigen, that is shared among different species. With the recombinant DNA technology, it's possible to produce proteins through the expression of cloned genes under the control of promoters. These proteins can be purified in order to obtain a pure biologically active molecule. The objective of this project is the expression and purification of the flowering-promoting proteins of citrus and tomato in a heterologous system, in order to enable the application and evaluation of their effects. The *CiFT3* and *SFT* genes were cloned in the vector pET28a, introduced in competent *E. coli* BL21(DE3) cells and expressed by inducing with different concentrations of IPTG using different times. So far, the recombinant proteins from citrus and tomato have been purified using immobilized metal affinity chromatography. The best condition for the expression was obtained by using 1mM of IPTG at 37°C under stirring of 200 rpm for 16 hours (T_{ov}). The expression of the recombinant protein was evaluated by SDS-PAGE, which was present in the soluble fraction. The purified CiFT3 protein had yields ranging from 14 to 153 ng/uL, while the purified SFT protein had yields ranging from 18 to 115 ng/uL. Flowering induction tests were performed *in vitro*, through root absorption with and without vacuum application, and *ex vitro*, through leaf and apical meristem absorption, in juvenile citrus, tobacco, and tomato plants. The protein concentrations used in the tests varied from 1 ng/ μ L to 33,600 ng/ μ L. Induction tests were not successful in promoting early flowering. A possible explanation for this would be the non-effective translocation of the protein from the leaves, where they were injected, to the apical meristem or significant amounts of flowering-promoting proteins may not have been reached to induce flowering in the plants. To better understand the results obtained, complementary analyses are necessary to investigate the possible causes of non-flowering in the evaluated plants.

Keywords: juvenility, florigen, protein expression, *citrus*, SFT, CiFT3, recombinant protein.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e exportador de laranja doce do mundo (CEPEA, 2020; SPREEN *et al.*, 2020; USDA 2022), sendo responsável por três quartos das exportações globais de suco de laranja (USDA, 2023). A cadeia citrícola está presente em mais de três mil municípios brasileiros, gerando mais de duzentos mil empregos de forma direta ou indireta, promovendo assim o crescimento socioeconômico do país (NEVES *et al.*, 2014; SANTIAGO, 2017).

Citros são plantas lenhosas perenes e passam por diferentes fases de desenvolvimento durante seu ciclo de vida (BÄURLE; DEAN, 2006; HA, 2014; SANTIAGO, 2017). A fase juvenil é caracterizada pela ausência de flores e frutos, a qual pode variar de 6 a 20 anos, dependendo da variedade (ENDO *et al.*, 2018). Durante a fase juvenil, as plantas são insensíveis aos sinais ambientais de indução floral, sendo a mudança para a fase reprodutiva marcada por uma transição para floração (HA, 2014).

A indução da floração é regulada por uma complexa e sincronizada rede de genes (SOARES *et al.*, 2020) compartilhada por diferentes espécies (ODIPIO *et al.*, 2020) e responsivas a estímulos endógeno e exógenos (ambientais) (ANDRÉS; COUPLAND, 2012; BLÜMEL; DALLY; JUNG, 2015). Em *Arabidopsis thaliana*, espécie modelo, a floração é promovida por condições de dia curto (fotoperíodo), baixa temperatura, vernalização, via autônoma e via regulada pelas giberelinas (HANANO; GOTO, 2011; SOARES *et al.*, 2020), enquanto em citros, a floração é promovida por baixas temperaturas (15–20°C) e estresse por déficit hídrico (CASSIN *et al.*, 1969; NISHIKAWA *et al.*, 2007; CHICA; ALBRIGO, 2013; NISHIKAWA, 2013). Em relação aos fatores endógenos, diversos genes estão envolvidos no processo de indução floral, sendo eles: *FLOWERING LOCUS T (FT)*, *CONSTANS (CO)*, *LEAFY (LFY)*, *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)*, *APETALA 1 (AP1)*, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANTS 1 (SOC1)*, *FLOWERING LOCUS D (FD)* e *FLOWERING LOCUS C (FLC)* (ROUSE *et al.* 2002; ENDO *et al.*, 2005; TAN; SWAIN, 2006; CORBESIER *et al.*, 2007; NISHIKAWA *et al.*, 2007; CAUSIER; SCHWARZ-SOMMER; DAVIES, 2010; NISHIKAWA, 2013).

A base do conhecimento atual sobre os mecanismos moleculares envolvidos no processo de florescimento vem de estudos realizados com *Arabidopsis thaliana*, uma planta anual de estrutura simples e vida curta (TAN; SWAIN, 2007; SOARES *et*

al., 2020). Homólogos da maioria desses genes foram descobertos em outras espécies de plantas, o que implica que foram conservados durante a evolução (TAN; SWAIN, 2007).

O gene *FT* e seus ortólogos são amplamente distribuídos em todas as angiospermas e possuem funções conservadas relacionadas à indução da floração (PIN; NILSOON, 2012; WICKLAND; HANZAWA, 2015). Estudos anteriores confirmam que a proteína codificada pelo gene *FT* é a componente chave dos genes integrados da via de indução floral, sendo o responsável por promover o florescimento (ENDO *et al.*, 2005; CORBESIER *et al.*, 2007; KOBAYASHI; WEIGEL, 2007; TURCK; FORNARA; COUPLAND, 2008). Em *Arabidopsis thaliana*, o fator de transcrição *CONSTANS (CO)*, através da detecção do fotoperíodo, é o responsável por ativar transcrição do gene *FT* nas folhas (PUTTERILL *et al.*, 1995; WU *et al.*, 2022). No meristema, a proteína *FT* e o fator de transcrição bZIP *FD* formam um complexo proteico que interagem com o *SOC1*, *AP1* e *LFY* para induzir o florescimento (WIGGE *et al.*, 2005; JAEGER; WIGGE, 2007; COLLANI *et al.*, 2019). Os genes *AP1* e *LFY* estão envolvidos no estabelecimento da identidade do meristema floral, a perda da função de um dos genes resulta na conversão de flor em broto ao longo da inflorescência (WEIGEL *et al.*, 1992; PILLITTERI; LOVATT; WALLING, 2004a). A proteína codificada pelo gene *SOC1* é multifuncional, regulando o tempo de floração, padrão floral e determinação do meristema floral (LIU *et al.*, 2007; MELZE *et al.* 2008; LIU *et al.*, 2009). Os genes *FLC* e *TFL1* são repressores florais, o *FLC* reprime diretamente a expressão do *FT* ligando-se ao fator de transcrição *FD*, impedindo assim o florescimento até que as plantas adquiram competência para florescer (SEARLE *et al.*, 2006; LEE; LEE, 2010) e o *TFL1* reprime os genes de identidade do meristema floral (*AP1* e *LFY*), mantendo o crescimento indeterminado do meristema apical caulinar (*SAM: shoot apical meristem*) (HANZAWA; MONEY; BRADLEY, 2005).

Em citros, ortólogos putativos desses genes foram isolados e caracterizados (PILLITTERI; LOVATT; WALLING, 2004a, 2004b; ENDO *et al.*, 2005, 2006; NISHIKAWA *et al.*, 2007; TAN; SWAIN, 2007). Embora os genes envolvidos na regulação da floração em citros sejam funcionalmente semelhantes aos seus homólogos de *Arabidopsis thaliana* (PILLITTERI; LOVATT; WALLING, 2004b; NISHIKAWA *et al.*, 2007; TAN; SWAIN, 2007; SOARES *et al.*, 2020), os mecanismos específicos que regulam a expressão desses genes evoluíram para responder a

estímulos diferentes daqueles que induzem floração em *Arabidopsis* (CHICA; ALBRIGO, 2013).

A proteína codificada pelo gene *FT*, conhecida como florígeno, inicialmente identificada em *Arabidopsis thaliana*, percebe a duração do dia nas folhas (fotoperíodo) e induz a transcrição e tradução do *FT* (NAKAMURA *et al.*, 2019). O florígeno é sintetizada nas células companheiros do floema (MATHIEU *et al.*, 2007; SOARES *et al.*, 2020) e é transportada do seu local de produção, as folhas, para o seu local de ação, o meristema apical, através do floema (CORBESIER *et al.*, 2007; MATHIEU *et al.*, 2007; TAMAKI *et al.*, 2007; NOTAGUCHI *et al.*, 2008). No meristema apical, o florígeno interage com o fator de transcrição *FD* e induz a expressão de outros genes integradores da via floral (*SOC1*, *LFY* e *AP1*), desencadeando a formação de meristemas florais (LIU *et al.*, 2013).

A repressão do gene *FT* causa um florescimento tardio em plantas, enquanto a superexpressão do gene *FT* resulta em um florescimento precoce independente de fatores ambientais (KOBAYASHI *et al.*, 1999). Em plantas transgênicas de *Arabidopsis* que expressavam constitutivamente o gene *FT*, mesmo com a ausência de folhas ocorreu o florescimento precoce (ZEEVAART, 2006).

Genes ortólogos ao *FT* já foram identificados em outras espécies, como arroz, cucurbitáceas, tomate e em citros, no qual foi chamado de *CiFT* (ALBRIGO; CHICA, 2013; LIU *et al.*, 2013). Estudos mostraram que a expressão constitutiva do gene *CiFT* resultou no florescimento precoce em *P. trifoliata* (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) (ENDO *et al.*, 2005) e que independe de fatores ambientais (NISHIKAWA *et al.*, 2007), indicando que homólogos de *FT* são cruciais para regular a floração em plantas cítricas (ENDO *et al.*, 2018).

Estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa no Laboratório de Biotecnologia no Centro de Citricultura 'Sylvio Moreira' em Cordeirópolis (SP), envolvendo o gene *SFT* (*SINGLE FLOWER TRUSS*) de tomate, homólogo do *FT* de *Arabidopsis*, obteve plantas transgênicas expressando constitutivamente o gene *SFT* com os quatro genótipos utilizados (porta-enxerto limão Cravo, citrumelo Swingle, citrange Carrizo e laranja doce Hamlin), demonstrando que sua função interespecífica é conservada. A expressão do transgene ocasionou florescimento precoce, com presença de flores ainda na fase *in vitro*, ocasionando a redução da juvenildade em todas as plantas transformadas, passando de 6 a 20 anos para 45 a 100 dias. Análises de expressão gênica realizadas por RT-qPCR mostraram

aumento no nível da expressão do transgene nestas plantas, as quais variaram de 10 vezes até 4.000 vezes mais do que o controle não transformado (SOARES; SANTOS; BOSCARIOL-CAMARGO, 2018; SOARES *et al.* 2018; SOARES; MACHADO; BOSCARIOL-CAMARGO, 2020)

Em experimentos de enxertias realizados com plantas da família das crassuláceas, Zeevaart (2006) demonstrou que o florígeno é translocado de um porta-enxerto em floração (doador) para uma copa de não floração (receptor), induzindo o florescimento desta. Com isso, experimentos de indução de florescimento em laranja através da superexpressão do gene *SFT* em porta-enxerto transgênicos foram realizados por nosso grupo de trabalho. Plantas transgênicas foram selecionadas e multiplicadas por estaquia e enxertadas com borbulhas de laranja doce juvenil. Após 18 meses ocorreu o florescimento da copa não-transgênica de alguns eventos, evidenciando que o florígeno é translocado do porta-enxerto para copa (SOARES; MACHADO; BOSCARIOL-CAMARGO, 2020). Soares *et al.* (2020), em experimentos com plantas expressando constitutivamente o gene *CiFT3*, observaram florescimento em plantas transgênicas de citrange Carrizo 16 meses após a transformação e a indução de florescimento em copas não-transformadas 30-40 dias após enxertia em porta-enxertos transgênicos.

Para acelerar ainda mais o processo de florescimento e ampliar sua aplicação sem a necessidade de transformação genética uma outra estratégia para indução de florescimento em laranja seria a clonagem e expressão heteróloga do gene codificador de proteína promotora do florescimento em *Escherichia coli*, a fim de realizar aplicações e estimular o florescimento precoce em plantas juvenis.

Atualmente vários sistemas procarióticos e eucarióticos foram desenvolvidos para produzir proteínas nativas de um organismo em escala laboratorial e industrial (NAG; KHAN; TRIPATHI; 2022). O sistema de expressão em *E. coli* é o sistema de expressão bacteriano mais amplamente utilizado, sendo a primeira escolha para pesquisas em laboratórios (KOEHN; HUNT, 2009) por apresentar crescimento em meios de cultivos baratos sob condições laboratoriais bem definidos, crescimento rápido (tempo de duplicação curto) (KAUR; KUMAR; KAUR, 2018), bioquímica celular e genética bem estabelecidos (NAG; KHAN; TRIPATHI; 2022), alta eficiência em incorporar DNA exógeno e alta taxas de expressão de proteínas (KAUR; KUMAR; KAUR, 2018). Em estudos anteriores, Ahn *et al.* (2006) e Nakamura *et al.* (2019) demonstraram que é possível a expressão do gene *FT* em *E. coli* e a

purificação da proteína a fim de isolar o florígeno para posteriores avaliações do seu potencial de indução do florescimento.

Considerando o exposto acima, o projeto visou a expressão e purificação das proteínas promotoras de florescimento de citros (CiFT) e de tomate (SFT) em um sistema heterólogo, com o objetivo de avaliar o seu potencial de indução de florescimento em plantas de citros, tabaco e tomate.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste projeto foi estabelecer protocolo de expressão e purificação das proteínas promotoras de florescimento de citros e tomate em um sistema heterólogo, de modo a possibilitar a aplicação e avaliação dos seus potenciais na indução de florescimento.

2.3 Objetivos específicos

- Estabelecimento das melhores condições para expressão das proteínas recombinantes promotoras do florescimento.
- Validação do método de expressão e purificação das proteínas CiFT e SFT.
- Avaliar o potencial de indução de florescimento destas proteínas em diferentes dosagens e métodos de aplicação.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O gênero *Citrus*

O gênero *Citrus* e gêneros associados (*Fortunella*, *Poncirus*, *Eremocitrus* e *Microcitrus*) pertencem à família *Rutaceae*, subfamília das angiospermas *Aurantioideae*, que é amplamente distribuída no sul e sudeste da Ásia, Arquipélago de Bismarck, nordeste da Austrália, Nova Caledônia, Melanésia e ilhas da Polinésia Ocidental, Américas e Europa (REUTHER; WEBBER; BATCHELOR, 1967) e abrange algumas das frutas mais amplamente cultivadas em todo mundo (WU *et al.*, 2018). Dentre esses gêneros os que apresentam maior interesse econômico são *Fortunella* (Kumquat), *Poncirus* (monoespecífico, mais utilizado como porta-enxertos devido à resistência a fatores bióticos) e principalmente *Citrus* (engloba a maioria das espécies, como laranjas doces (*C. sinensis*), tangerina comum (*C. reticulata*), limões (*C. limon*), entre outros), além de híbridos naturais (REUTHER; WEBBER; BATCHELOR, 1967; AGUSTÍ *et al.*, 2014). Apesar das grandes diferenças morfológicas e fisiológicas entre *Fortunella*, *Poncirus*, *Citrus*, *Eremocitrus* e *Microcitrus* são sexualmente compatíveis (KRUEGER; NAVARRO, 2007; GARCIALOR *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2018).

O centro de origem das plantas cítricas foi Sopé localizado no sudeste do Himalaia, no continente Asiático (WU *et al.*, 2018), no entanto, o comércio entre as nações e as guerras dispersam o cultivo dos citros para diversos países (NEVES *et al.*, 2010) como o Brasil, Índia, China, Estados Unidos, México e Espanha, sendo consideradas as principais fruteiras do mundo (SPIEGEL-ROY; GOLDSCHMIDT, 2008). No Brasil, acredita-se que os citros foram introduzidos durante as primeiras expedições de colonização portuguesa, provavelmente na Bahia (LOPES *et al.*, 2011) e posteriormente propagadas no estado de São Paulo (LIMA, 2014). A laranja encontrou no país melhores condições de cultivo e produção comparado a região de origem e expandiu-se por todo território nacional, descartando-se em diversos estados (NEVES *et al.*, 2010).

3.2 Aspectos econômicos

As frutas cítricas são uma das frutas mais populares do mundo (MA *et al.*, 2020), sendo amplamente consumidas na forma de suco ou em frutas frescas (WU *et al.*, 2014). O setor citrícola brasileiro é de importância mundial, ocupando a

posição de maior produtor de laranja do mundo (CEPEA, 2020), detendo quase três quartos das exportações globais de suco de laranja (USDA, 2022). A produção de citros concentra-se principalmente no estado de São Paulo, representando cerca de 80% da produção nacional de frutas cítricas do país (CEPEA, 2020), produzindo 12.501.859 toneladas de 16.214.982 toneladas produzidos em território brasileiro (IBGE, 2021).

A produção do Brasil para 2022/2023 é estimada para 16,5 milhões de toneladas (produção global estimada em 47,5 milhões de toneladas), 408.000 toneladas a menos do que a safra anterior devido ao clima desfavorável durante a segunda florada, resultando em uma redução da frutificação (para fins comparativos: produção do Brasil nas safras de 2021/2022 foi de 16,6 milhões de toneladas e a produção global foi de 48,8 milhões de toneladas) (USDA, 2022 e 2023).

A União Europeia (72,48%) e os Estados Unidos (21,46%) são os principais destinos das exportações brasileira de suco de laranja (CITRUSBR, 2020). O suco de laranja é a bebida à base de frutas mais tomada no mundo e a cada cinco copos consumidos no mundo, três são produzidos em fabricas brasileira (NEVES *et al.*, 2010). A citricultura é um importante segmento da agroindústria brasileira e tem contribuído de forma significativa para o desenvolvimento do país desde 1962 quando iniciaram as primeiras exportações do setor (NEVES *et al.*, 2010).

3.3 Fases do desenvolvimento de plantas perenes: fase juvenil

Citros são plantas lenhosas perenes e passam por diferentes fases de desenvolvimento durante seu ciclo de vida: germinação, fase juvenil, fase adulta vegetativa e fase adulta reprodutiva (BÄURLE; DEAN, 2006; HA, 2014; SANTIAGO, 2017), sendo a juvenil e adulta as mais distintas (VISSER; VERHAEGH; VRIES, 1976). A transição entre essas fases é dependente de processos genéticos de desenvolvimento que são desencadeados e modulados por estímulos ambientais e endógenos (HUIJSER; SCHMID, 2011).

A germinação é a transição do modo de crescimento embrionário para o pós-embrionário. Após a germinação a plântula entra na fase juvenil, a qual não é competente para florescer e se reproduzir. Durante esse período, as plantas geralmente aumentam rapidamente sua capacidade fotossintética, tamanho e massa. A fase juvenil é seguida pela transição para a fase adulta vegetativa na qual a planta pode responder aos sinais indutivos florais como o estresse hídrico,

fotoperíodo, temperatura, hormônios vegetais, entre outros. Por fim, com a transição para floração, quando o meristema vegetativo do caule é convertido em meristema floral, a planta entra na fase adulta reprodutiva (PEÑA *et al.*, 2001; BÄURLE; DEAN, 2006; HUIJSER; SCHMID, 2011; LIU *et al.*, 2013; ODIPIO *et al.*, 2020).

A fase juvenil é caracterizada pela ausência de flores e frutos (ENDO *et al.*, 2018). Durante essa fase as plantas são incapazes de produzir flores por serem insensíveis aos sinais de indução florais ambientais (endógenos) (PILLITTERI *et al.*, 2004a; HAMMAMI *et al.*, 2021). O período de juvenilidade varia entre as espécies. Em outras culturas, a exemplo das anuais, essa fase pode durar apenas algumas semanas ou meses, como por exemplo *Arabidopsis thaliana* que completa seu ciclo de vida em dois meses; portanto passa por uma fase juvenil muito curta (HA, 2014). Em contraste, espécies perenes, como os citros, florescem e frutificam após uma extensa fase juvenil que pode vir a variar de 6 a 20 anos, dependendo do ambiente e do genótipo (ZIMMERMAN, 1971; PILLITTERI; LOVATT; WALLING, 2004b; ENDO *et al.*, 2018; MANUELA; XU, 2020). A mudança para a fase adulta reprodutiva é marcada pela transição para a floração (BÄURLE; DEAN, 2006; MCDONALD; KWONG., 2005).

Do ponto de vista fisiológico, a fase juvenil proporciona alta taxa de crescimento vegetativo e crescimento foliar abundante e vigoroso (GROSSER; GMITTER, 1990). Durante este período as plantas geralmente aumentam rapidamente sua capacidade fotossintética, tamanho e massa (HUIJSER; SCHMID, 2011). No entanto, o longo período juvenil é um fator limitante para técnicas de melhoramento vegetal convencional ou biotecnológico (PENÃ *et al.*, 2001; NISHIKAWA, 2013), estudos genéticos (ENDO *et al.*, 2006), práticas de reprodução tradicionais ou transgênicas (PILLITTERI; LOVATT; WALLING, 2004b), retardando processos de seleção, aumentando custos e limitando o número de novas seleções (ITO *et al.*, 1999; LAURENS *et al.*, 2000)

Para solucionar esses problemas, muitos pesquisadores têm investigado a regulação da floração (NISHIKAWA, 2013) e obtiveram avanços significativos na compreensão da regulação da transição do desenvolvimento da fase adulta vegetativa para fase adulta reprodutiva (BÄURLE; DEAN, 2006). Com isso, métodos fisiológicos e moleculares têm sido explorados afim de reduzir a fase juvenil e acelerar o processo de florescimento (MATSOUKAS; MASSIAH; THOMAS, 2012).

3.4 Processo de florescimento

A transição do crescimento vegetativo para o reprodutivo requer reprogramação genética e epigenética, e a realocação de recursos metabólicos e bioquímicos em toda planta (KAZAN; LYONS, 2015). O processo de florescimento é regulado por uma complexa e sincronizada rede (KAWAMOTO *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2020) responsiva a estímulos endógenos e exógenos (ambientais) (ANDRÉS; COUPLAND, 2012; BLÜMEL; DALLY; JUNG, 2015) compartilhada por diferentes espécies, tais como: *Arabidopsis thaliana*, citros, mandioca, batata, cebola, entre outras (ODIPIO *et al.*, 2020).

A floração é uma parte essencial do processo reprodutivo das angiospermas (POETHIG, 2003) e por essa razão muitas pesquisas foram conduzidas sobre os mecanismos moleculares que controlam o processo de florescimento, e numerosos genes que contribuem com as diferentes vias reguladores ambientais e endógenos foram identificados (HONG; JACKSON, 2015).

Em sentido amplo, as plantas dependem da combinação de dois fatores para fornecer as informações sobre quando iniciar a floração (AMASINO, 2010). Uma é ambiental, por exemplo: mudanças na temperatura, fotoperíodo, níveis de fitormônios e carboidratos para regular o tempo de florescimento até a época do ano apropriada para floração (JACKSON, 2008; AMASINO, 2010; KIM *et al.*, 2012; SRIKANTH; SCHMID, 2011; MATSOUKAS; MASSIAH; THOMAS, 2012). A outra via é endógena, em que genes estão envolvidos neste processo de indução floral, sendo eles: *FLOWERING LOCUS T (FT)*, *CONSTANS (CO)*, *LEAFY (LFY)*, *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)*, *APETALA 1 (AP1)*, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANTS 1 (SOC1)*, *FLOWERING LOCUS D (FD)* e *FLOWERING LOCUS C (FLC)* (ROUSE *et al.* 2002; ENDO *et al.*, 2005; TAN; SWAIN, 2006; CORBESIER *et al.*, 2007; NISHIKAWA *et al.*, 2007; CAUSIER; SCHWARZ-SOMMER; DAVIES, 2010; NISHIKAWA, 2013).

Em *Arabidopsis thaliana* é bem definido que as principais vias que controlam a floração em respostas aos sinais ambientais são a vias do fotoperíodo, temperatura ambiente e vernalização, que respondem à duração do dia, temperatura ambiente e exposição prolonga ao frio, respectivamente (JACKSON, 2008; FORNARA; MONTAIGU; COUPLAND, 2010). Em citros, baixas temperaturas (15 a 20°C) e a seca (estresse por déficit hídrico) são os dois principais fatores ambientais

indutores da floração (CASSIN *et al.*, 1969; NISHIKAWA *et al.*, 2007; CHICA; ALBRIGO, 2013; NISHIKAWA, 2013; LI *et al.*, 2017; TANG; LOVATT, 2019).

Os genes *FT*, *LFY* e *SOC1* são conhecidos coletivamente como integradores de vias florais (TAN; SWAIN, 2007). No meristema apical, esses integradores ativam o gene de identidade do meristema *AP1*, causando transição dos ápices vegetativos para meristema de inflorescência (TAN; SWAIN, 2006; LIU *et al.*, 2013).

O gene *FT* codifica um sinal móvel universal, conhecido como florígeno, que é conservado entre diferentes espécies e gêneros de plantas (ZEEVAART, 2006). *FT* codifica uma pequena proteína de 20 kDa (KAWAMOTO *et al.*, 2015), similar à proteína de ligação a fosfatidiletanolamina de mamífero (*PEBP*) (ENDO *et al.*, 2018), que é expressa nas folhas sob condições indutivas de floração, a proteína se move através do floema para o meristema apical onde se liga ao fator de transcrição *bZIP FD* para ativar a transcrição do gene de identidade do meristema floral *AP1* (HECHT *et al.*, 2011). Por isso, o gene *FT* é o componente chave dos genes integradores da via floral, sendo o responsável por promover o florescimento (ENDO *et al.*, 2005; CORBESIER *et al.*, 2007; KAZAN; LYONS, 2015). O *FD* é um fator de transcrição que, quando ligado ao *FT*, forma um complexo de proteína nas folhas que interage com *SOC1*, *AP1* e *LFY* para induzir o florescimento (ODIPIO *et al.*, 2020). Nas folhas, estímulos ambientais promovem a estabilização do fator de transcrição *CO* que regula positivamente a transcrição da proteína *FT* (WILKIE; SEDGLEY; OLESEN, 2008; SOARES *et al.*, 2020) (Figura 1).

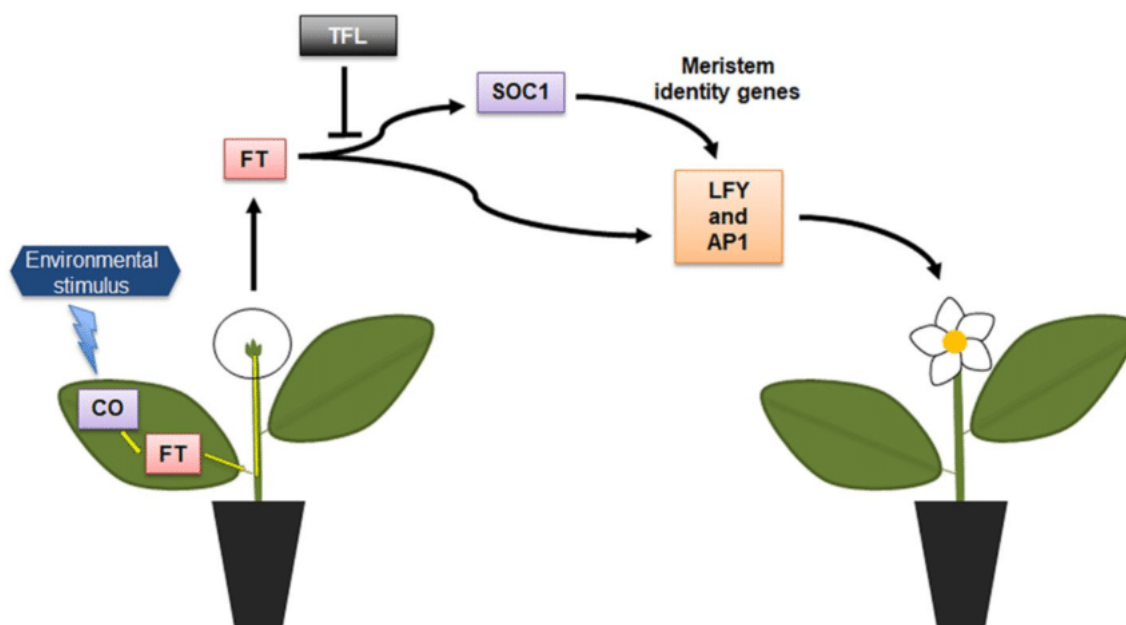


Figura 1 – Esquema da via de floração em árvores tropicais e subtropicais. Estímulos ambientais promovem a estabilização do fator de transcrição *CO*, nas folhas, que regula positivamente a transcrição da proteína *FT*. A proteína *FT* é sintetizada nas células companheiras do floema e transportada até o meristema apical caulinar (SAM: *shoot apical meristem*) através do floema. No SAM, a proteína *FT* induz a transcrição dos genes integradores da via floral (*LFY*, *SOC1*, *AP1*) e *TFL1* reprime os genes ativados por *FT*. O *FT* também pode agir numa via independente de *SOC1* induzindo a expressão de *AP1* e *LFY* convertendo o SAM vegetativo em SAM e inflorescência que posteriormente começa a produzir flores. A regulação positiva é representada por setas e a regulação negativa ou inibição é representada por “um T invertido” (Fonte: adaptado de Soares *et al.*, 2020).

Os genes *LFY*, *AP1* e *SOC1* são reguladores florais, *LFY* e *AP1* são responsáveis pela transcrição da fase juvenil para a fase adulta reprodutiva, enquanto o gene *SOC1* é responsável pela determinação do tempo de floração, padrão floral e determinação do meristema floral (BOSS *et al.*, 2004; PILLITTERI *et al.*, 2004a; LIU *et al.*, 2007; TAN; SWAIN, 2007; MELZE *et al.* 2008; LIU *et al.*, 2009). Os genes *TFL1* e *FLC* são repressores florais. O *FLC* reprime diretamente a expressão de *FT*, *FD* e *SOC1* ligando-se aos seus promotores e impedindo o florescimento até que as plantas adquiram competência para florescer (SEARLE *et al.*, 2006). O *TFL1* reprime a transcrição para a floração reprimindo a expressão dos genes de identidade do meristema floral (*AP1* e *LFY*), mantendo o crescimento indeterminado do meristema apical caulinar (HANZAWA; MONEY; BRADLEY, 2005).

A repressão do gene *FT* causa um florescimento tardio em plantas, enquanto a superexpressão do gene resulta em um florescimento precoce que independe de fatores ambientais (KOBAYASHI *et al.*, 1999). Em plantas transgênicas de

Arabidopsis thaliana que expressam constitutivamente o gene *FT*, mesmo com a ausência de folhas ocorreu o florescimento precoce (ZEEVAART, 2006).

Genes ortólogos ao *FT* já foram identificados em outras espécies, como: arroz, cucurbitáceas, tomate (*SINGLE FLOWER TRUSS (SFT)*) e em citros, onde foi chamado de *CiFT* (CHICA; ALBRIGO, 2013; LIU *et al.*, 2013). Em citros, pelo menos três locus codificam proteínas homólogas a *FT*, o *CiFT1*, *CiFT2* e *CiFT3* (ENDO *et al.*, 2005), no entanto, *CiFT1* e *CiFT2* são codificados pelo mesmo gene (SAMACH, 2013). Estudos mostraram que a expressão constitutiva do gene *CiFT* resultou no florescimento precoce em *P. trifoliata* (ENDO *et al.*, 2005) e citrange Carrizo, híbrido de *Citrus sinensis* (L.) e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. (SOARES *et al.*, 2020), que independem de fatores ambientais (NISHIKAWA *et al.*, 2007), indicando que homólogos do *FT* são cruciais para regular a floração em árvores cítricas (ENDO *et al.*, 2018).

Em experimentos de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, Soares, Santos e Boscariol-Camargo (2018) e Soares *et al.* (2018), com o gene *SFT*, e Soares *et al.* (2020) com o gene *CiFT3*, obtiveram plantas transgênicas as quais apresentaram redução da juvenilidade com florescimento ainda na fase *in vitro*. Com o gene *SFT*, a juvenilidade das plantas transformadas de 6 a 20 anos foi reduzida para 45 a 100 dias (SOARES; SANTOS; BOSCARIOL-CAMARGO, 2018; SOARES *et al.*, 2018).

3.5 Produção de proteína recombinante em *Escherichia coli*

A tecnologia do DNA recombinante é uma técnica que envolve a identificação, isolamento e inserção do gene de interesse em um vetor, como um plasmídeo ou bacteriófago, para formar uma molécula de DNA recombinante e produzir grandes quantidades desse fragmento de gene ou produto codificado por esse gene (BEGNA, 2020). Essa técnica permitiu a produção *in vitro* de proteínas (MACAULEY-PATRICK *et al.* 2005; BEGNA, 2020) e com isso, a expressão heteróloga de proteínas emergiu como uma ferramenta valiosa (NAG; KHAN; TRIPATHI, 2022).

De modo geral, a produção de uma proteína recombinante envolve a clonagem do gene de interesse, conhecido como inserto, em um vetor de expressão sobre o controle de um promotor. Após a expressão, realiza-se a purificação para obtenção da molécula de interesse (MAKRIDES, 1996). Vários sistemas, procarióticos (bactérias) e eucarióticos (leveduras, insetos, plantas e animais), foram

desenvolvidos para produzir proteínas em escalas laboratoriais e industriais (NAG; KHAN; TRIPATHI, 2022), no entanto *Escherichia coli* tem sido o meio mais popular para produção de proteínas recombinantes por mais de duas décadas, não apenas de origem procariótica, mas também eucariótica (KAUR; KUMAR, KAUR, 2018).

As bactérias são comumente utilizadas para a produção de proteínas recombinantes com menos de 30 kDa (DEMAIN, VAISHNAV, 2009). O sistema de expressão em *E. coli* domina os sistemas de expressão bacteriano, sendo a primeira escolha para investigações laboratoriais e desenvolvimento inicial de produtos comerciais (CHEN, 2012). Isto deve-se à sua capacidade de atingir rapidamente altas densidades celulares em substratos menos onerosos e em condições de crescimento relativamente simples, possuir genética bem caracterizada e sequências genômicas publicamente disponíveis, melhor nível de segurança em comparação com outros organismos e a disponibilidade de um grande número de vetores de clonagem e cepas hospedeiras mutantes (MAKRIDES, 1996; BLATTNER *et al.*, 1997; SØRENSEN; MORTENSEN, 2005; JEONG *et al.*, 2009; MARISCH *et al.*, 2013; HAYAT *et al.*, 2018). Além disso, as células de *E. coli* são altamente eficientes para incorporar DNA exógeno e expressar proteínas recombinantes em taxas altas (CRONAN, 2014).

Embora o sistema de expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* seja bem estabelecido com diversos benefícios, existem alguns limites no seu processo de produção (CHEN, 2012) como a incapacidade de realizar modificações pós-traducionais (PTMs) (glicosilação, formação de ligações dissulfeto, fosforilação e processamento proteolítico) que estão envolvidos nos processos de dobramento, estabilidade e atividade biológica; formação de corpos de inclusão e problemas com endotoxinas (MAKRIDES, 1996; FERRER-MIRALLES, *et al.*, 2009, LIU, *et al.*, 2019). Todavia, foi demonstrado que o DNA eucariótico poderia ser propagado em *E. coli* (MORROW *et al.*, 1974) e produtos funcionais poderiam ser sintetizados a partir de genes heterólogos clonados em plasmídeos bacterianos (RATZKIN; CARBON, 1977; VAPNEK *et al.*, 1977), uma vez que proteínas menores que 100 kDa são bem toleradas em *E. coli* e expressas em níveis significativos (SAUVONNET; POQUET; PUGSLEY, 1995; PALACIOS *et al.*, 2001).

Ahn *et al.* (2016) e Nakamura *et al.* (2019) sintetizaram a proteína recombinante de *FT* em *E. coli* para estudos de sua estrutura cristalina. Portanto, a proteína codificada pelo gene *FT* é passível de clonagem, expressão em bactérias e

purificação a fim de isolar o florígeno para posteriores avaliações do seu potencial na indução do florescimento.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido no Centro de Citricultura 'Sylvio Moreira', do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), em Cordeirópolis – SP, no Laboratório de Biotecnologia.

4.1 Caracterização físico-química *in silico* das proteínas

A caracterização físico-química foi obtida a partir da plataforma Expasy – ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>), e através dessa análise foi possível obter informações sobre a estrutura e propriedades das proteínas. A identificação das proteínas

Os parâmetros calculados pelo ProtParam incluem: número de aminoácidos, peso molecular, índices de estabilidade e alifático e hidropaticidade (GRAVY). O índice de instabilidade fornece uma estimativa da estabilidade da proteína, índices menores que 40 é predita como estável e índices maiores que 40 prediz que a proteína pode ser instável (RIBEIRO; BRANCO; CHOUPINA, 2021).

4.2 Predição da localização sub-celular das proteínas

A busca por peptídeo-sinal foi realizada utilizando a ferramenta SignalP 5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>). Peptídeos-sinais são pequenas sequências de aminoácidos que são clivadas durante a translocação da proteína através da membrana, permitindo assim prever sua localização na célula (EMANUELSSON et al., 2007).

A localização celular foi confirmada utilizando as ferramentas UniProt (<https://www.uniprot.org/>) e LOCTree3 (<https://roslab.org/services/loctree3/>) (YU *et al.*, 2006; CHOU; SHEN, 2010; GOLDBERG; HAMP; ROST, 2012; RIBEIRO; BRANCO; CHOUPINA, 2021).

4.3 Clonagem inicial

4.3.1 Vetor de expressão e linhagens de *Escherichia coli*

Neste projeto foram utilizadas as linhagens de *E. coli* DH5 α (supE44 Δ (lacZYA-argF) U196 (Φ 80 Δ lacZM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1) e

BL21(DE3) (F⁻ ompT hsdSB(rB⁻mB⁻) gal dem (λ lts857 ind1 Sam7 nin5 lavUV5-T7gene1).

Para a expressão heteróloga, foi utilizado o vetor pET28a (Novagen), que apresenta na extremidade N-terminal do MCS/POLYLINKER sítios His-Tag/trombina/T7 Tag, além de um His-Tag opcional na extremidade C-terminal do sítio de clonagem (Figura 2).

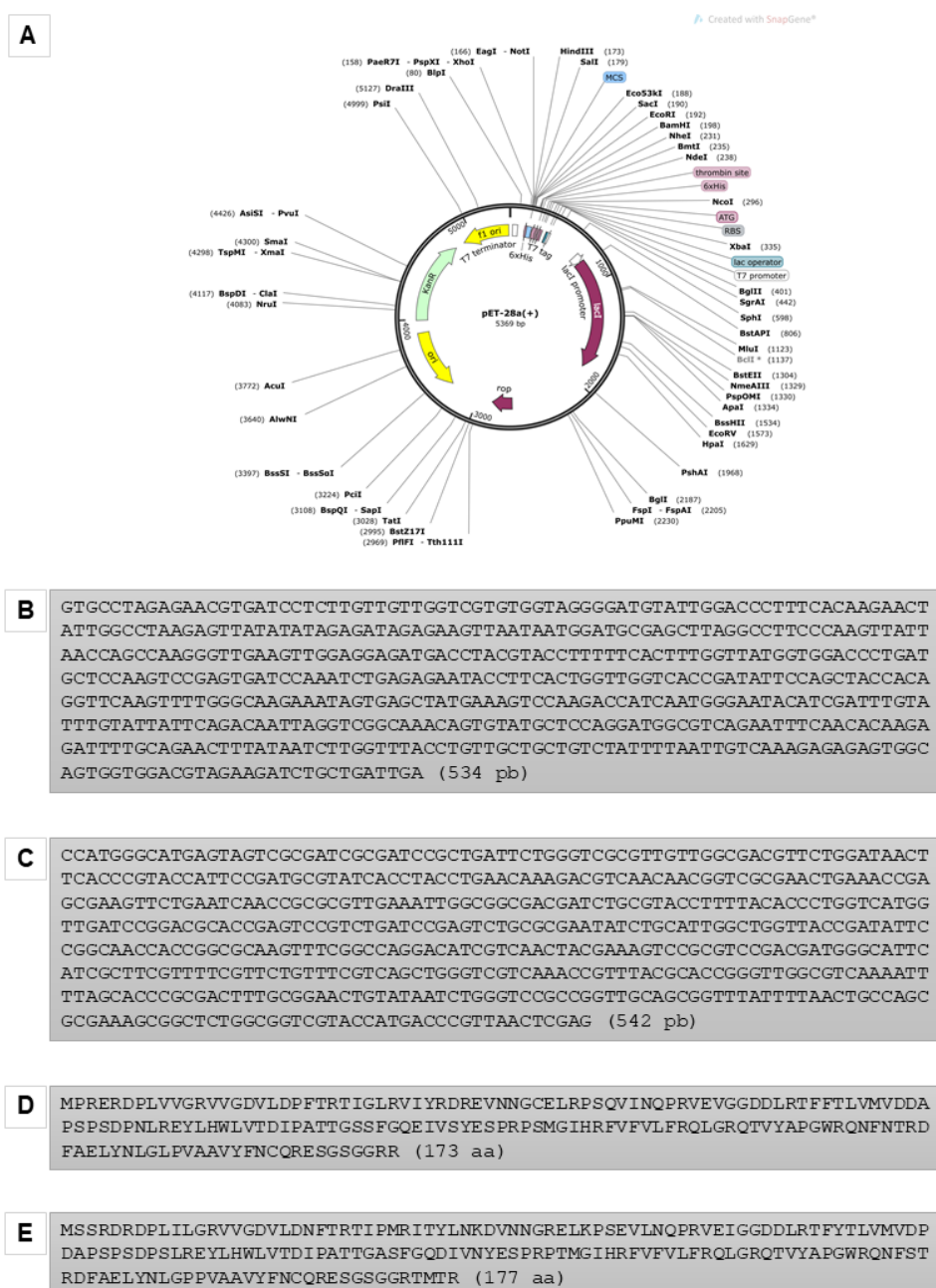


Figura 2 – Construção dos vetores de expressão. (A) mapa do plasmídeo pET28a(+) de expressão bacteriana de 5369 pb com resistência a canamicina . (B) Sequência gênica do inserto referente à

SFT. (C) Sequência gênica do inserto referente à *CiFT*. (D) Sequência predita da proteína recombinante *SFT*. (E) Sequência predita da proteína recombinante *CiFT*. Fonte: [https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=pET_and_duet_vectors_\(novagen\)&plasmid=pET-28a\(+\)](https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=pET_and_duet_vectors_(novagen)&plasmid=pET-28a(+)).

4.3.2 Construção gênica

A amplificação gênica do inserto de *CiFT* foi realizada a partir de cDNA de laranja doce Valência (*Citrus sinensis* L Osb.) obtido de 1 µg do RNA extraído e sintetizado utilizando o kit *Improm II™ Reverse Transcriptase* (Promega), seguindo as orientações do fabricante. O inserto de *SFT* foi obtido a partir do plasmídeo GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* contendo a sequência clonada. O vetor utilizado no presente projeto foi cedido pelo pesquisador Lázaro E. Pereira Peres, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), Piracicaba-SP. Os primers utilizados estão listados na Tabela 1. Os parâmetros da amplificação foram: 4 minutos a 95°C, seguidos por 35 ciclos de: 30 segundos a 95°C; 40 segundos a 56°C; 35 segundos a 72°C; e uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

Tabela 1 – Primers utilizados para a amplificação dos genes de interesse contendo o sítio de restrição *NdeI* e *EcoRI*, respectivamente. Os sítios de restrição estão marcados em negrito.

Nome do Primer	Sequências 5' – 3'
<i>CiFT</i> F	TTAC CATATG TCTAGCAGGGAGAGAGA
<i>CiFT</i> R	TGAG AATTC ATCGTCTGACAGGC
<i>SFT</i> F	CCT CATATG CCTAGAGAGCGTGA
<i>SFT</i> R	TTT GAATTC AATCAGCAGACCTTCTACG

Os amplicons contendo os genes *CiFT* e *SFT* foram purificados utilizando o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), seguindo as orientações do fabricante. O vetor pET28a foi utilizado para clonagem e expressão heteróloga dos genes codificadores das proteínas que têm atividade como precursor do florígeno. O vetor em questão permite a fusão do gene de interesse ao peptídeo 6-histidinas localizadas na porção N-terminal, produzindo uma proteína de fusão passível de purificação por cromatografia de afinidade.

Para a ligação dos amplicons no vetor utilizou-se 10 ng do vetor pET28a(+) digerido com as enzimas de restrição *NdeI* e *EcoRI*, 100 ng de inserto dos genes *CiFT* e *SFT* digeridos com as mesmas enzimas, 1u T4 DNA ligase, tampão de ligação 10x e Nuclease-Free Water para completar a reação para 20 µL. A reação foi

incubada a 4°C overnight. Após incubação em temperatura ambiente por 1 hora, a reação de ligação foi utilizada para transformação de *E. coli* DH5α.

4.3.3 Transformação das células competentes para expressão

As células competentes de *E. coli* DH5α e BL21(DE3) foram obtidas através do método *Inoue* (IM; SAMBROOK; RUSSELL, 2011), e foram transformadas por choque térmico. Um total de 5 µL da ligação do vetor de expressão pET28a com os genes *FT* foi utilizado para a transformação misturando-se a 100 µL de células da linhagem bacteriana. As misturas foram incubadas no gelo por 30 minutos, e submetidas a choque térmico a 42°C, por 90 segundos. Após esse período, as células retornaram ao gelo por 2 minutos, e logo após foram adicionados 800µL de meio de cultura SOB (20 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 0,5 g de cloreto de sódio, 250 mM de cloreto de potássio e 2 mM de cloreto de magnésio em 1 L de água desligada, pH 7,0) suplementado com 20 mM glicose. Os tubos foram incubados a 37°C por 1 hora e 30 minutos sob agitação a 250 rpm. Em seguida, 200 µL de células foram plaqueados em meio LB sólido suplementado com 100 µg/mL canamicina. As placas foram incubadas em estufa a 37°C para crescimento das colônias bacterianas.

4.3.4 Confirmação da transformação

PCR de colônia foram realizadas para a amplificação dos genes *CiFT* e *SFT*, cujos amplicons apresentam 534pb e 548pb, respectivamente, para confirmação da transformação. Produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio.

4.3.5 Extração do plasmídeo

Os transformantes foram inoculados em 5 mL de LB líquido suplementado com 100 µg/mL canamicina e cultivados durante a noite. Foram feitas minipreparações utilizando o kit de *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), segundo protocolo do fabricante, para extração dos plasmídeos. Os plasmídeos extraídos foram confirmados por PCR e sequenciados para verificação da sequência.

4.3.6 Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado após a clonagem dos amplicons no vetor pET28a(+) a fim de confirmar a inserção dos genes percursores do florígeno. O primer utilizado foi T7 (5' TAATACGACTCACTATAGGG 3') e o sequenciamento dos plasmídeos foi realizado utilizando-se 2,5 pmol do primer T7, 0,4 µL de BigDye 3.1 (Applied Biosystems), 2 µL de tampão Save Money (2,5 µL MgCl₂ 2 M, 200 µL Tris-HCl pH 9,0 1 M em 1 mL) e 3 µL de DNA (450 ng) em um volume final de 10 µL. As condições de reação foram: 2 minutos a 96°C, seguidos por 25 ciclos de 96°C por 45 segundos, 56°C por 30 segundos, 60°C por 4 minutos. As reações foram precipitadas em 80 µL de isopropanol 65% e lavadas duas vezes com 200 µL de etanol 60%. Os DNAs foram secados e ressuspensos em 10 µL de HiDi formamida (Applied Biosystems). As corridas foram feitas em um sequenciador automático ABI3730 (Applied Biosystems).

4.4 Indução da expressão de proteína

Um pré-inóculo de 10 mL de LB líquido contendo 100 µg/mL canamicina foi preparado inoculando-se uma colônia bacteriana e incubando-se a 37°C sob agitação de 225 rpm, por 16 horas. Em seguida, o pré-inóculo foi adicionado em 100 mL de meio LB, contendo antibiótico, com OD_{600nm} ajustada em 0,1 e incubado a 37°C, sob agitação de 225 rpm até atingir uma OD_{600nm} entre 0,5 e 0,6. Neste ponto, uma alíquota de 20 mL de cultura foi retirada para ser utilizada como controle, sendo esse o T₀. Na cultura restante foi acrescentado IPTG (0,2; 1 e 2 mM) seguido de incubação a 37°C sob agitação de 225 rpm. Alíquotas foram retiradas após 2 (T₂), 4 (T₄) e 16 (T_{ov}) horas de indução, em volumes de 20 mL cada alíquota. Ao final do experimento, o meio de cultura foi centrifugado a 4°C, 6000 × g durante 20 minutos para coleta das células e descarte do sobrenadante.

4.5 Extração da proteína

O precipitado com as bactérias foi ressuspensado em 2 mL de tampão de fosfato de sódio 50 mM pH 7,8 (fosfato dissódico 12%, fosfato monossódico 0,072%, pH 7,5), 1mM de PMSF Protease Inhibitor (phenylmethylsulfonyl fluoride) e 100 mg/mL de lisozima, mantido no gelo por 20 minutos e sonificado por 5 vezes na potência de 40 Hz por 60 segundos, com intervalos de 5 minutos, quando era incubado no gelo. O lisado foi centrifugado a 1.100 × g por 40 minutos a 4°C e o

sobrenadante foi transferido para um novo tubo (fração solúvel). O precipitado foi ressuspenso em 500 µL de tampão de fosfato de sódio 50 mM pH 7,8, aquecido por 5 minutos a 95°C e centrifugado a 1.100 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante, por sua vez, foi transferido para um novo tubo (fração insolúvel). As proteínas foram separadas em SDS-PAGE 12% para verificar o rendimento e a solubilidade da proteína. O gel foi corado em solução *Coomassie Brilliant Blue R-250* (metanol 50%, *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,025% e ácido acético 10%) por 1 hora e descorado com uma solução de metanol (metanol 30% e ácido acético 10%) por 30 minutos.

4.6 Purificação da proteína pelo método de cromatografia de afinidade a níquel

As proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade a níquel em coluna de resina Ni-NTA Agarose (Qiagen). Para isso, foram adicionados 2 mL da resina Ni-NTA Agarose que, após empacotamento, resulta em 1mL de resina, sendo lavada com 10 volumes de água Milli-Q autoclavada e equilibrada com 10 volumes de tampão de fosfato de sódio 50 mM (pH 7,8), no qual as amostras foram ressuspendidas. As amostras foram injetadas na coluna de purificação, que em seguida foi lavada com 10 volumes do tampão de fosfato de sódio 50 mM (pH 7,8). As lavagens subsequentes foram realizadas utilizando o tampão de fosfato de sódio 50mM pH 7,8 com diferentes concentrações de Imidazol (20 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 200 mM e 500 mM) em volumes decrescentes dos respectivos tampões (10 volumes, 10 volumes, 7 volumes, 5 volumes, 3 volumes e 3 volumes). Alíquotas do eluato de cada etapa foram coletadas e visualizadas em SDS-PAGE 12%.

4.7 Quantificação da proteína

Para a quantificação foi utilizado o método de Bradford (1976), com a utilização de *Coomassie Brilliant Blue G-250* e a solução *Protein Assay* (Bio-Rad). As amostras de BSA foram diluídas nas concentrações 0 µg/mL; 5 µg/mL; 10 µg/mL; 15 µg/mL; 20 µg/mL; 25 µg/mL; 30 µg/mL; 50 µg/mL. As amostras de proteínas foram diluídas 50x (2 µL da amostra em 98µL de água Milli-Q autoclavada), adicionando-se 200 µL de solução *Protein Assay* (Bio-Rad) em cada amostra e incubando-se em temperatura ambiente por 5 minutos. Após esse período foi medida a absorbância das amostras em espectrofotômetro a 595nm. As amostras

foram avaliadas em triplicatas, e a partir do resultado obtido, foi realizado o cálculo da concentração de proteína da amostra fazendo uso da equação da curva padrão a partir de concentração conhecidas de BSA.

4.8 Ensaio de Dot-Blotting

Para realizar o ensaio de Dot-Blotting, aplicou-se 5 µL das proteínas purificadas nas concentrações de 90 ng/µL em uma membrana de nitrocelulose (Hybond-C, Nitrocellulose, 0,45 Micron). O controle negativo foi realizado utilizando o tampão de fosfato de sódio 50 mM (pH 7,8). A membrana foi bloqueada utilizando tampão PBST (PBS (0,273% de NaH₂PO₄ e 0,426% de NaCl) com 0,1% de Tween-20) e 1% BSA durante a noite. Após o período de bloqueio, a membrana foi sondada com o anticorpo primário Anticorpo His-Tag (His-probe Antibody (H-15): sc-803 – Santa Cruz Biotechnology), na concentração de 1:5000, por 1 hora. Realizaram-se três lavagens de 20 minutos com o tampão PBST, e a membrana foi incubada com o anticorpo secundário HRP-conjugated Anti-Mouse IgG Concentrate (Sigma) (1:5000) por 20 minutos. Em seguida, foram realizadas mais três lavagens com o tampão PBST, durante 20 minutos cada lavagem, antes de se proceder ao desenvolvimento do sinal de quimioluminescência, utilizando o reagente "Amersham™ ECL Select™ Western blotting detection" da GE HealthCare. A imagem do blot foi capturada no aparelho ChemiDoc XRS+ System da Bio-Rad.

4.9 Testes de indução do florescimento

Os experimentos de indução de florescimento em plantas juvenis foram realizados em duas etapas, sendo uma com plantas *in vitro* e outra com plantas *ex vitro* de citros juvenis.

Sementes das citranges Carrizo (híbrido de *Citrus sinensis* (L.) e *Poncirus trifoliata*. (L.) Raf.) e Troyer (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.), laranjas doces Hamlin e Pêra (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG-CITROS), do Centro de Citricultura 'Sylvio Moreira', do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), em Cordeirópolis – SP, foram germinados *in vitro* e *ex vitro* para realização dos experimentos.

4.9.1 Testes *in vitro*

Nos testes *in vitro*, a indução do florescimento em plantas juvenis de citros foi realizada por meio da absorção de proteínas pelas raízes de plântulas de laranja doce Hamlin previamente germinadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura sólido MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). As plântulas, com tamanho de até 10 cm, foram colocadas em tubos falcon de 50 mL contendo a proteína diluída nas concentrações apropriadas para cada tratamento. Em seguida, foi aplicado vácuo por um período de 15 minutos. Após esse período, as plântulas foram transferidas para meio MS sólido. Foram realizados 4 experimentos independentes, considerando 2 tratamentos por proteína, com 9 repetições (plântulas) por tratamento. Foi testada a absorção de proteínas em plântulas com raízes e sem raízes. Nos experimentos com a proteína CiFT3, as concentrações aplicadas foram de 49 ng/μL nas plântulas com raízes e 73 ng/μL nas plântulas sem raízes. Já nos experimentos com a proteína SFT, as concentrações aplicadas foram de 30 ng/μL nas plântulas com raízes e 54 ng/μL nas plântulas sem raízes. A metodologia de infiltração a vácuo foi adaptada do trabalho de Xiao *et al.* (2003). Embora originalmente utilizada para a transformação genética de raízes cítricas, eles utilizaram o gene *FT* para validar o método. O método demonstrou-se simples, rápido e altamente eficiente na transformação. Além disso, essa técnica oferece uma abordagem eficaz para investigar funções gênicas, realizar engenharia genética em citros e validar interações de proteínas.

Além da metodologia mencionada acima, também foi testada a absorção pelas raízes sem a aplicação de vácuo. Para esse teste, plântulas com até 2 cm de tamanho foram colocadas em tubos Eppendorf de 2 mL contendo a proteína diluída em diferentes concentrações: 1 ng/μL, 5 ng/μL, 10 ng/μL, 40 ng/μL, 50 ng/μL, 94 ng/μL e 210 ng/μL. As plântulas foram mantidas por um período de 7 dias com as raízes submersas na solução da proteína. Após esse período, as plântulas foram transferidas para meio MS sólido para avaliar a indução do florescimento.

4.9.2 Testes *ex vitro*

Nos testes *ex vitro*, a indução do florescimento em plantas juvenis de citros foi realizada por meio da infiltração de proteínas nas folhas e no meristema apical. As aplicações foram realizadas utilizando agulhas com dimensões de 13x0,45 mm para criar pequenas perfurações no tecido vegetal, com o objetivo de minimizar danos, e

uma seringa de 1 mL para realizar a infiltração. Para a infiltração nos meristemas apicais, foram utilizadas micropipetas. Foram conduzidos 18 experimentos independentes, com 3 repetições em cada um, sendo 9 experimentos com a proteína CiFT3 e 9 com a proteína SFT.

Nos experimentos com a proteína CiFT3, as concentrações aplicadas foram: 15 ng/ μ L, 115 ng/ μ L, 210 ng/ μ L, 2.200 ng/ μ L, 3.500 ng/ μ L, 4.400 ng/ μ L, 7.000 ng/ μ L, 10.000 ng/ μ L e 20.000 ng/ μ L. Já nos experimentos com a proteína SFT, as concentrações aplicadas foram: 15 ng/ μ L, 112 ng/ μ L, 210 ng/ μ L, 3 μ g/ μ L, 3,5 μ g/ μ L, 7 μ g/ μ L, 11,5 μ g/ μ L, 17,25 μ g/ μ L e 33,6 μ g/ μ L.

As aplicações foram realizadas em folhas jovens e maduras, e o processo de indução do florescimento foi monitorado semanalmente, por três mês após a infiltração.

Além das aplicações em citros, também foram realizadas aplicações em tabaco e tomate, utilizando as concentrações de 25 ng/ μ L, 70 ng/ μ L, 140 ng/ μ L, 280 ng/ μ L e 5 μ g/ μ L.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As informações referentes às proteínas CiFT3 e SFT estão apresentadas na Tabela 2. Essa tabela apresenta dados relevantes, incluindo o ID atribuído a cada proteína, o código do gene no NCBI, o nome da proteína, o código de identificação na base de dados UNIPROT e o organismo de origem das sequências.

Tabela 2 – Identificação das sequências e proteínas CiFT3 e SFT.

ID	Código gene NCBI	PROTEÍNA	Código proteína UNIPROT	ORGANISMO
CiFT3	AB301935.1	<i>Flowering locus T</i> [Citrus unshiu]	A9ZND3	<i>Citrus unshiu</i> (Satsuma mandarin) (<i>Citrus nobilis</i> var. unshiu)
SFT	NM_001321152.1	<i>Protein single flower truss</i>	Q84XL0	<i>Solanum lycopersicum</i>

A base do conhecimento atual sobre os mecanismos moleculares envolvidos no processo de florescimento vem de estudos realizados com o gene *FT* (*FLOWERING LOCUS T*) de *Arabidopsis thaliana* (TAN; SWAIN, 2007; SOARES *et al.*, 2020). No entanto, genes ortólogos ao *FT* são amplamente distribuídos em todas as angiospermas e possuem funções conservadas relacionadas à indução da floração (PIN; NILSOON, 2012; WICKLAND; HANZAWA, 2015). Em citros, o gene ortólogo ao *FT* é o *CiFT*, enquanto no tomate é o gene *SFT* (*SINGLE FLOWER TRUSS*). Ambos os genes codificam uma pequena proteína de 20 kDa conhecida como florígeno (ZEEVAART, 2006; KAWAMOTO *et al.*, 2015). A Tabela 3 apresenta o alinhamento entre as sequências codificadoras dos genes mencionados anteriormente, enquanto a Tabela 4 mostra o alinhamento entre as proteínas codificadas por esses mesmos três genes, revelando a similaridade existente entre elas.

Tabela 3 – Alinhamento das sequências codificadoras dos genes *FT* de *Arabidopsis thaliana*, *CiFT3* de citros e *SFT* de tomate realizado na plataforma Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment

FT	ATGCTATAAATAAGAGACCCCTCTTATAGTAAGCAGAGTTGTTGGAGACGTTCTTGAT	60
SFT	---ATGCCTAGAGAACGTGATCCCTCTTGTGTTGGTCGTGTGGTAGGGGATGTATTGGAC	57
CiFT3	ATGCTAGCAGGGACAGAGATCCCTCTTATTCTTGGCCGCGTTGTTGGTGATGTTCTTGAC	60
	* * * * *	
FT	CCGTTAATAGATCAATCACTCTAAAGGTTACTTATGGCCAAAGAGAGGTGACTAATGGC	120
SFT	CCTTTCACAAGAATATTGGCCTAAGAGTTATATATAGAGATAGAGAAGTTAATAATGGA	117
CiFT3	AATTTTACAAGAACAATTCCTATGAGGATTACCTATTTAAACAAGGATGTTAATAATGGC	120
	** * * * * * * * * * *	
FT	TTGGATCTAAGGCCTTCTCAGGTTCAAAAACAAGCCAAGAGTTGAGATTGGTGGAGAAGAC	180
SFT	TGCGAGCTTAGGCCTTCCCAAGTTATTAACCAGCCAAGGTTGAAGTTGGAGGAGATGAC	177
CiFT3	CGTGAGCTCAAACCTTCTGAAGTTCTGAACCAGCCTAGGGTTGAAATTGGTGGTGATGAT	180
	* * * * * * * * * * *	
FT	CTCAGGAACCTTCTATACTTTGGTTATGGTGGATCCAGATGTTCCAAGTCTTAGCAACCCT	240
SFT	CTACGTACCTTTTTTCACTTTGGTTATGGTGGACCCTGATGCTCCAAGTCCGAGTGATCCA	237
CiFT3	CTTAGGACATTTTATACTTTGGTAATGGTTGATCCTGATGCACCGAGCCCAAGTGACCCC	240
	** * * * * * * * * * *	
FT	CACCTCCGAGAATATCTCCATTGGTTGGTGGACTGATATCCCTGCTACAACCTGGAACAACC	300
SFT	AATCTGAGAGAATACCTTCACTGGTTGGTCACCGATATTCAGCTACCACAGGTTCAAGT	297
CiFT3	AGCCTTAGGGAGTATTTGCATTGGTTGGTGGACTGATATTCAGCAACCACAGGGGCCAGC	300
	* * * * * * * * * * *	
FT	TTTGCCAATGAGATTGTGTGTTACGAAAATCCAAGTCCCCTGACAGGAATTCATCGTGTC	360
SFT	TTTGGGCAAGAAATAGTGAGCTATGAAAGTCCAAGACCATCAATGGGAATACATCGATTT	357
CiFT3	TTTGGCCAAGATATTTGGAACATGAAAGCCCTAGGCCAACGATGGGGATTACAGGTTT	360
	***** * * * * * * * * * *	
FT	GTGTTTATATTGTTTCGACAGCTTGGCAGGCAACAGTGTATGCACCAGGGTGGCGCCAG	420
SFT	GTATTTGTATTATTCAGACAATTAGGTCGGCAACAGTGTATGCTCCAGGATGGCGTCAG	417
CiFT3	GTCTTTGTGTTGTTCCGGCAACTTGAAGGCAGACTGTTTATGCACCGGGGTGGCGTCAG	420
	** * * * * * * * * * *	
FT	AACTTCAACTCGCGAGTTTGTGAGATCTACAATCTCGGCCTTCCCGTGGCCGCGAGTT	480
SFT	AAATTTCAACACAAGAGATTTTGCAGAACCTTATAATCTTGGTTTACCTGTTGCTGCTGTC	477
CiFT3	AACTTCAGCAGCGAGGATTTTGTGAGCTTTACAATCTGGGACCTCCGGTGGCCGCTGTC	480
	** * * * * * * * * * *	
FT	TTCTACAATTGTCAGAGGGAGAGTGGCTGCGGAGGAAGAAGACTTTAG-----	528
SFT	TATTTTAATTGTCAAAGAGAGAGTGGCAGTGGTGGACGTAGAAGATCTGCTGATTGA	534
CiFT3	TACTTCAACTGCCAGAGGGAGAGCGGATCCGGCGGAAGGACTATGACACGATGA---	534
	* * * * * * * * * * *	

Tabela 4 – Alinhamento das proteínas codificadas pelas sequências dos genes *FT* de *Arabidopsis thaliana*, *CiFT3* de citros e *SFT* de tomate realizado na plataforma Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment

FT	MSINIRDPLIVSRVVDVLDLDPFNRSITLKVYQGQREVNTNGLDLRPSQVQNKPRVEIGGED	60
CiFT3	MSSRRDRDPLILGRVVDVLDNFTRTIPMRITYLNKDVNNGRELKPSVNLNQRVEIGGDD	60
SFT	-MPRERDPLVVGRVVDVLDLDPFTRTIGLRVIYRDREVNNGCELRPSQVINQPRVEVGGDD	59
	. ****:.****** *.*: * :: * ::*:** *:**:* *:*****:**	
FT	LRNFYTLVMVDPDVPSPSNPHLREYLHLVTDIPATTGTTFGNEIVCYENPSPTAGIHRV	120
CiFT3	LRTFYTLVMVDPDAPSPDPSLREYLHLVTDIPATTGASFGQDIVNYESPRPTMGIHRF	120
SFT	LRTFYTLVMVDPDAPSPDNLREYLHLVTDIPATTGSSFGQEIIVSYESPRPSMGIHRF	119
	.*:***.****.* *****:***:.* **.* *:****.	
FT	VFILFRQLGRQTVYAPGWRQNFNTRFAEYINLGLPVAAVFYNCQRESGCGGRR--	175
CiFT3	VFVLFRLGRQTVYAPGWRQNFSTRDAEYINLGLPVAAVFYNCQRESGSGGRTMTR	177
SFT	VFVLFRLGRQTVYAPGWRQNFTRDAEYINLGLPVAAVFYNCQRESGSGGRR---	173
	.****.***:***:**** *****:*****.***	

5.1 Caracterização físico-química *in silico* das proteínas

A propriedade físico-química das proteínas é crítica para a sustentabilidade, eficiência e estabilidade de sistemas biológicos (GARG *et al.*, 2016). A partir das sequências de aminoácidos das proteínas CiFT3 e SFT foi realizada a estimação dos parâmetros físico-químicos por meio da ferramenta ProtParam. A Tabela 5 exibe os parâmetros de número de aminoácidos, peso molecular (em kDa), índice de instabilidade, índice alifático e média geral de hidropaticidade (GRAVY).

Tabela 5 – Caracterização físico-química (número de aminoácidos, peso molecular, índices de instabilidade e alifático e hidropaticidade) das proteínas obtida através da ferramenta ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>).

PROTEÍNA	Nº DE AA	PESO MOLECULAR	ÍNDICE DE INSTABILIDADE	ÍNDICE ALIFÁTICO	MÉDIA GERAL DE HIDROPATICIDADE (GRAVY)
CiFT3	177	20058,68	38.62 (estável)	77,01	-0,414
SFT	173	19646,23	42.23 (instável)	80,40	-0,357

O índice de instabilidade é uma estimativa da estabilidade de uma proteína em ensaios de bancada, sendo um indicador útil para caracterizar a estabilidade (ou instabilidade) das proteínas (GURUPRASAD; REDDY; PANDIT, 1990; VIEIRA, 2021). Índices menores que 40 são preditivos de estabilidade, enquanto índices maiores que 40 indicam que a proteína pode ser instável (RIBEIRO; BRANCO; CHOUPINA, 2021). Assim, observou-se que a proteína CiFT3 apresentou estabilidade, enquanto a proteína SFT demonstrou instabilidade.

O índice alifático é definido como o volume relativo ocupado pelas cadeias laterais alifáticas (alanina, valina, isoleucina e leucina) das proteínas e pode ser considerado um fator positivo para o aumento da termoestabilidade (IKAI, 1980). O índice alifático de ambas as proteínas foi superior a 70, indicando que as proteínas são termoestáveis (HASAN *et al.*, 2015; SAHAY; PIPRODHE; PISE, 2020).

A média geral de hidropaticidade (GRAVY) refere-se à capacidade de solubilidade de uma proteína, na qual valores positivos indicam hidrofobicidade, enquanto valores negativos indicam que a proteína é mais hidrofílica (VIEIRA, 2021). Os valores de GRAVY para as proteínas CiFT3 e SFT foram de -0,414 e -0,357, respectivamente. Valores baixos de GRAVY indicam uma melhor interação das proteínas com a água (VERMA; SINGH; GAURA, 2016).

5.2 Predição da localização sub-celular das proteínas

A identidade de uma proteína é determinada não apenas pela sua estrutura, mas também pela sua localização celular (ZHAO *et al.*, 2019). Os peptídeos-sinais são sequências curtas de aminoácidos que controlam a secreção e a translocação de proteínas em todos os organismos vivos. Nos procariotos, eles direcionam a proteína para a via secretora, enquanto nos eucariotos, facilitam a translocação através da membrana plasmática (TEUFEL *et al.*, 2022). A Tabela 6 mostra que ambas as proteínas não possuem peptídeos-sinais e são proteínas citoplasmáticas. Estudos anteriores confirmam a presença de proteínas homólogas a CiFT3 e SFT, como AtFT (*Arabidopsis thaliana*), Hd3a (arroz), DcFT (cenoura) e GhFT1 (*Gossypium hirsutum*), com localização citoplasmática (GUO *et al.*, 2014).

Tabela 6 – Localização sub-celular das proteínas, utilizando as ferramentas SignalP 5.0, UniProt e LOCTree3.

PROTEÍNA	SignalP	UniProt	LocTree3
CiFT3	Não	Citoplasma	89% citoplasma
SFT	Não	Citoplasma	91% citoplasma

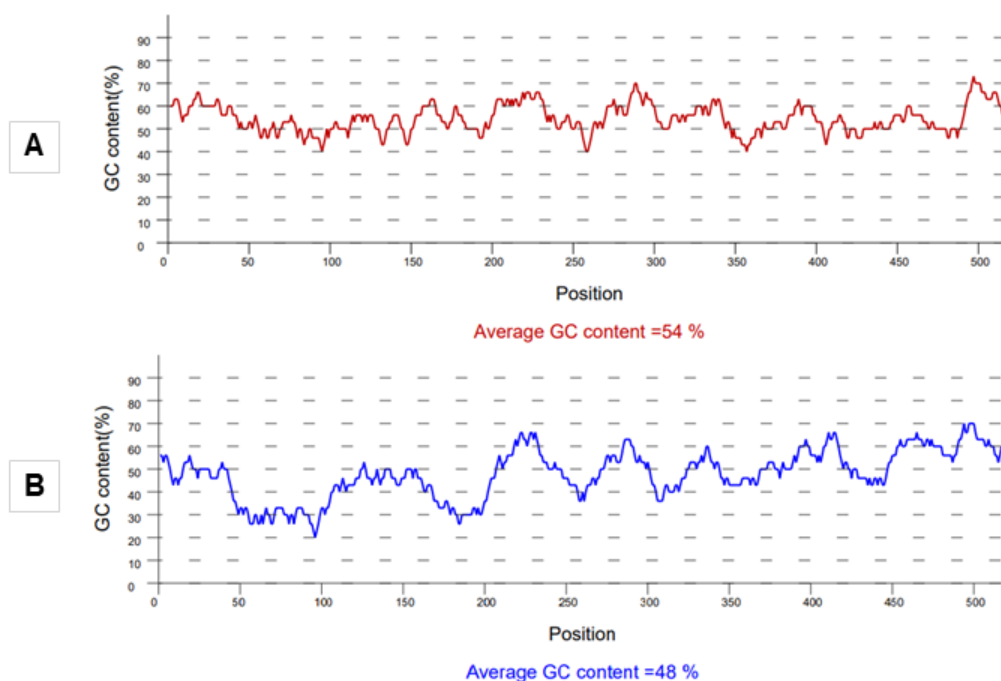
5.3 Clonagem

As ampliações das sequências gênicas *CiFT3* e *SFT* codificadoras das proteínas promotoras do florescimento foram realizadas utilizando primers específicos (Tabela 1). Inicialmente o intuito era realização da clonagem da sequência codificadora de *CiFT* a partir do cDNA. No entanto, não se obteve amplificação em várias tentativas. Dessa forma o gene *CiFT3* foi sintetizado pela empresa FastBio (<https://www.fastbio.com.br/>), sendo a sequência otimizada para expressão em *E. coli* (548 pb) (Tabela 7). A sequência *CiFT3* foi escolhida, pois Soares *et al.* (2020) demonstraram ser a mais eficiente na indução do florescimento precoce.

Tabela 7 – Sequência *CiFT3* (GenBank: BAF96645.1) e sequência códon-otimizada para *E. coli*.

Sequência <i>CiFT3</i> original	<pre> CCATGGGCATGTCTAGCAGGGACAGAGATCCTCTTATTCTTGGCCGCGTTGTTGGTGATGTTCTTGACAATTT TACAAGAACAATTCCCTATGAGGATTACCTATTTAAACAAGGATGTTAATAATGGCCGTGAGCTCAAACCTTCT GAAGTCTGAACCAGCCTAGGGTTGAAATGGTGGTGATGATCTTAGGACATTTTATACCTTTGGTAATGGTTG ATCCTGATGCACCGAGCCCAAGTGACCCAGCCTTAGGGAGTATTTGCATTGGTTGGTACTGATATTCAGC AACCACAGGGGCCAGCTTTGGCCAAGATATTGTGAACATGAAAGCCCTAGGCCAACGATGGGGATTCACAGG TTGTCTTTGTGTTGTTCCGGCAACTTGAAGGCAGACTGTTTATGCACCGGGTGGCGTCAGAACTTCAGCA CGAGGGATTTTGTCTGAGCTTTACAATCTGGGACCTCCGGTGGCCGCTGTCTACTTCAACTGCCAGAGGGAGAG CGGATCCGGCGGAAGACTATGACACGATGACTCGAG CCATGGGCATGAGTAGTCGCGATCGCGATCCGCTGATTCTGGGTGCGGTTGTTGGCGACGTTCTGGATAACTT CACCCGTACCATTCCGATCGGTATCACCTACCTGAACAAAGACGTCAACAACGGTGGCGAACTGAAACCGAGC GAAGTCTGAATCAACCGCGCTTGAATTTGGCGCGCAGCATCTGCGTACCTTTTACACCTGGTCATGGTTG ATCCGGACGCACCGAGTCCGCTGATCCGAGTCTGCGCGAATATCTGCATTGGCTGGTTACCGATATTCGGC AACCACCGCGCAAGTTTCGGCCAGGACATCGTCAACTACGAAAGTCCGCGTCCGACGATGGGCATTTCATCGC TTCGTTTTCGTTCTGTTTCGTCAGCTGGGTGCTCAAACCGTTTACGCACCGGGTTGGCGTCAAAATTTTAGCA CCCAGGACTTTGCGGAAGTGTATAATCTGGGTCCGCGGTTGCAGCGGTTATTTTAACTGCCAGCGCGAAAG CGGCTCTGGCGGTCGTACCATGACCCGTTAACTCGAG </pre>
Sequência códon-otimizada para <i>E. coli</i>	<pre> CCATGGGCATGAGTAGTCGCGATCGCGATCCGCTGATTCTGGGTGCGGTTGTTGGCGACGTTCTGGATAACTT CACCCGTACCATTCCGATCGGTATCACCTACCTGAACAAAGACGTCAACAACGGTGGCGAACTGAAACCGAGC GAAGTCTGAATCAACCGCGCTTGAATTTGGCGCGCAGCATCTGCGTACCTTTTACACCTGGTCATGGTTG ATCCGGACGCACCGAGTCCGCTGATCCGAGTCTGCGCGAATATCTGCATTGGCTGGTTACCGATATTCGGC AACCACCGCGCAAGTTTCGGCCAGGACATCGTCAACTACGAAAGTCCGCGTCCGACGATGGGCATTTCATCGC TTCGTTTTCGTTCTGTTTCGTCAGCTGGGTGCTCAAACCGTTTACGCACCGGGTTGGCGTCAAAATTTTAGCA CCCAGGACTTTGCGGAAGTGTATAATCTGGGTCCGCGGTTGCAGCGGTTATTTTAACTGCCAGCGCGAAAG CGGCTCTGGCGGTCGTACCATGACCCGTTAACTCGAG </pre>

Segundo informações enviadas pela empresa FastBio, na otimização do gene, a curva de variação do conteúdo de GC (conteúdo de guanina-citosina) foi suavizada, enquanto as estruturas de hairpin estáveis foram minimizadas (Figura 3A, B e C), além da eliminação das sequências nocivas. Com essas otimizações, espera-se que o gene otimizado não apenas apresente um alto nível de expressão, mas também seja mais fácil de manipular. Portanto, em comparação com o gene não otimizado, é esperado que o gene otimizado tenha um nível de expressão mais elevado no hospedeiro.



Hairpins analysis

C	<i>CiFT3</i> Optimized	<i>CiFT3</i> Not Optimized
Small Hairpins	0	7
Medium Hairpins	1	0
Large Hairpins	1	0

Figura 3 – Otimizações realizadas pela empresa FastBio (<https://www.fastbio.com.br/>) na sequência *CiFT3* para expressão heteróloga em *Escherichia coli*. A: Gráfico do conteúdo de GC do gene *CiFT3* otimizado. Os eixos Y e X representam o conteúdo de GC local (tamanho da janela = 30bp) e a posição da base, respectivamente. B: Gráfico do conteúdo de GC do gene *CiFT3* não otimizado. Os eixos Y e X representam o conteúdo de GC local (tamanho da janela = 30bp) e a posição da base, respectivamente. C: Otimização dos hairpins do gene *CiFT3*.

As proporções dos quatro nucleotídeos do DNA (A, T, G, C) podem variar significativamente em um organismo, sendo a composição de bases nitrogenadas convencionalmente expressa como a porcentagem de guanina (G) e citosina (C), chamada de conteúdo GC ou conteúdo de guanina-citosina (ŠMARDÁ; BUREŠ, 2012). Essa heterogeneidade do conteúdo GC em todo o genoma está diretamente relacionada com a funcionalidade do mesmo (BENJAMINI; VELOCIDADE, 2012).

Por outro lado, o RNA desempenha um papel fundamental na célula, desempenhando diferentes funções como a codificação sequências de aminoácidos para a síntese de proteínas (mRNA) (CRICK, 1970), atua como adaptador na

tradução (tRNA) (SHARP et al., 2008) e realiza a síntese de proteínas (rRNA) (CECH, 2000). Uma estrutura secundária essencial do RNA é o hairpin, que desempenha diversas funções importantes, incluindo a estabilização do mRNA e proteção contra degradação (SVOBODA; CARA, 2006). Na otimização realizada pela empresa FastBio, sete pequenos hairpins foram convertidos em um hairpin médio e um hairpin grande. Essa otimização foi justificada pelo fato de que, em comparação com os hairpins pequenos e médios, os hairpins grandes são mais estáveis e eficientes na tradução de genes.

O gene *SFT* foi obtido a partir do vetor pART27, contendo o gene *SINGLE FLOWER TRUSS* de tomate (*Solanum lycopersicum*). O gene *SFT* foi amplificado por PCR, sendo o amplicon de 534 pb verificado em gel de agarose a 2% (Figura 4A). O vetor pET28a e o amplicon foram clivados com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NdeI* (Figura 4B).

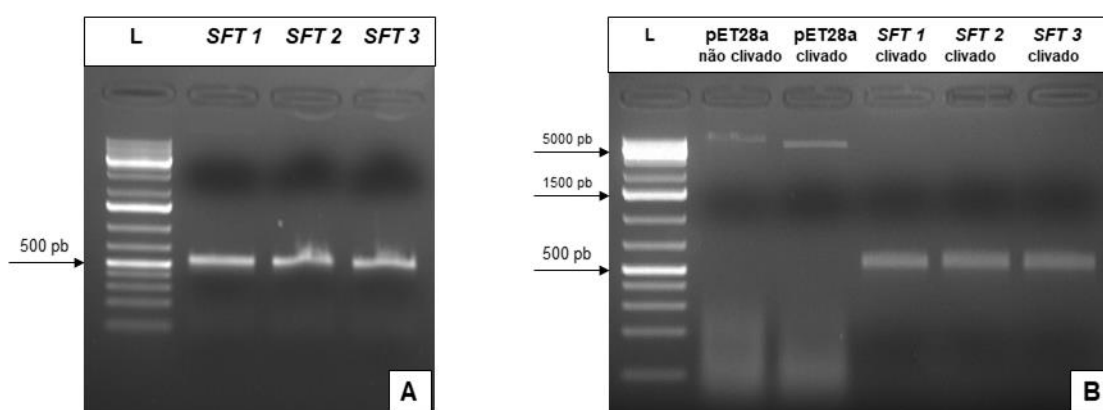


Figura 4 – A: Gel de agarose 2% com a amplificação do fragmento correspondente ao gene *SFT* (534 pb) por PCR. B: Gel de agarose a 2% do vetor pET28a (5369 pb), vetor pET28a e amplicon clivados com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NdeI*. L: Marcador de 1kb plus (Fermentas).

As digestões foram purificadas e posteriormente utilizadas na ligação gênica. Os plasmídeos recombinantes foram utilizados para a transformação das bactérias da linhagem DH5 α de *E. coli* por choque térmico e cultivadas em meio LB contendo o antibiótico canamicina (100 μ g/mL). A clonagem foi confirmada por PCR de colônias (Figura 5).

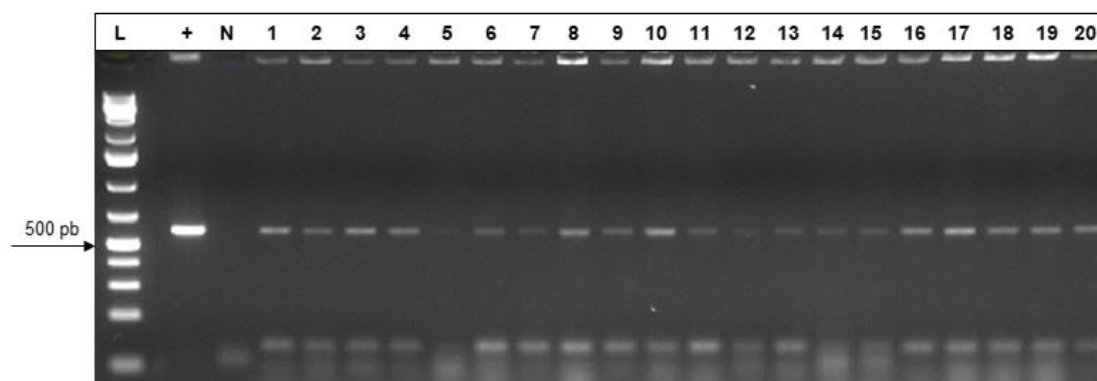


Figura 5 – Avaliação da clonagem do gene *SFT* em pET28a. Gel de agarose 2% da reação de PCR das colônias obtidas na transformação do plasmídeo recombinante em *E. coli* DH5α. L: marcador 1kb plus (Fermentas); N: controle negativo; +: controle positivo; 1-20: colônias testadas da transformação.

5.4 Sequenciamento do plasmídeo recombinante

O sequenciamento foi realizado após a clonagem do gene *SFT* no vetor pET28a. Plasmídeos provenientes das colônias de *E. coli* DH5α positivas no PCR foram utilizados no sequenciamento. As sequências obtidas foram analisadas no Blastx do NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), a fim de verificar a ausência de alterações na sequência da proteína promotora do florescimento (Figuras 6 e 7) e em seu respectivo gene codificador.

protein single flower truss [*Solanum lycopersicum*]

Sequence ID: [NP_001308081.1](#) Length: 177 Number of Matches: 1

[See 3 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)

Range 1: 1 to 173 [GenPept](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
316 bits(809)	1e-105	Compositional matrix adjust.	173/173(100%)	173/173(100%)	0/173(0%)	+3
Query 108	MPREndplvvgrvvgdvldpFTRTIGLRVIYRDREVNNGCELRPSQVINQPRVEVGGDDL				287	
Sbjct 1	MPRERDPLVVGRVVGDLDPFTRTIGLRVIYRDREVNNGCELRPSQVINQPRVEVGGDDL				60	
Query 288	RTFFTLVMVDPDAPSPSDPNLREYLHVLVTDIPATTGSSFGQEIVSYESPRPSMGIHRFV				467	
Sbjct 61	RTFFTLVMVDPDAPSPSDPNLREYLHVLVTDIPATTGSSFGQEIVSYESPRPSMGIHRFV				120	
Query 468	FVLFRLGRQTVYAPGWRQNFNTRDFAEYLNGLPVAAYVFNCQRESGSGGRR				626	
Sbjct 121	FVLFRLGRQTVYAPGWRQNFNTRDFAEYLNGLPVAAYVFNCQRESGSGGRR				173	

Figura 6 – Busca de similaridade no Blastx. A sequência obtida foi utilizada para busca por similaridade na base de dados do NCBI. Fonte: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.



Figura 7 – Sequência do plasmídeo recombinante pET28a_SFT com 100% de identidade com “*protein single flower truss*” de tomate (SFT). Em laranja o sítio de restrição da enzima *NdeI*; em amarelo o sítio de restrição da enzima *EcoRI* e, em verde, a cauda de histidina (6x His-Tag). Imagem gerada pelo Software SnapGene (<https://www.snapgene.com/>).

Os vetores de expressão foram utilizados para a transformação de *E. coli* BL21(DE3). A combinação de BL21(DE3) com plasmídeos pET é amplamente utilizada como um dos sistemas biológicos mais eficientes para a superexpressão de proteínas recombinantes (MIROUX; WALKER, 1996). Essa combinação envolve a utilização de IPTG como indutor para a expressão gênica (JEONG *et al.*, 2009). Portanto, quando as células BL21(DE3) são associadas com o plasmídeo pET28a e induzidas com IPTG, ocorre uma expressão significativa do gene de interesse, resultando na produção eficaz da proteína desejada (BESELIN, 2005; NELSON; COX, 2014).

5.5 Expressão heteróloga da proteína

A princípio, verificou-se em qual fração, solúvel ou insolúvel, as proteínas recombinantes estavam presentes. Os ensaios de verificação foram realizados utilizando IPTG na concentração de 1 mM a 37°C, sob agitação de 225 rpm. Amostras foram coletadas nos tempos T_0 (sem o indutor de expressão), T_2 (duas horas de indução) e T_4 (quatro horas de indução) e aplicadas em gel de SDS-PAGE a 12% corado com Coomassie Blue (Figura 8).

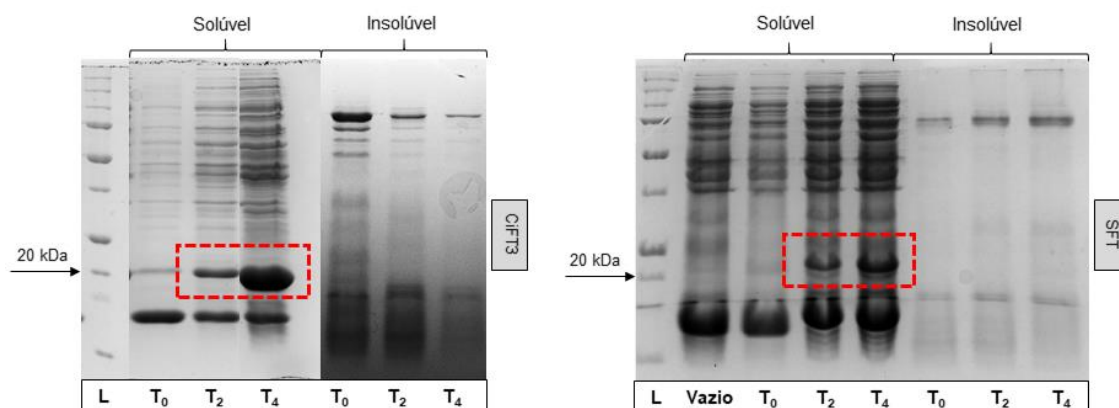


Figura 8 – Ensaio de expressão das proteínas codificadas pelos genes *CiFT3* e *SFT* a 37°C com 1 mM de IPTG nos tempos de indução T₀, T₂, T₄. As bandas das proteínas de interesse estão destacadas em vermelho. Gel de SDS-PAGE 12% corados com Coomassie Blue Ladder de 250 kDa (Bio-Rad). Vazio: plasmídeo pET28a sem o inserto *SFT*, utilizado como controle negativo.

A partir dos ensaios iniciais, verificou-se a presença de ambas as proteínas na fração solúvel, com bandas mais intensas nos tempos T₂ e principalmente T₄, ambas próximas à altura esperada para as proteínas promotoras do florescimento (aproximadamente 20 kDa).

Entre as condições avaliadas, a melhor condição para a indução da expressão de ambas as proteínas recombinantes foi 1 mM de IPTG a 37°C, sob agitação de 200 rpm, por 16 horas (T_{ov}). Apenas a fração solúvel foi aplicada no gel de SDS-PAGE (Figura 9).

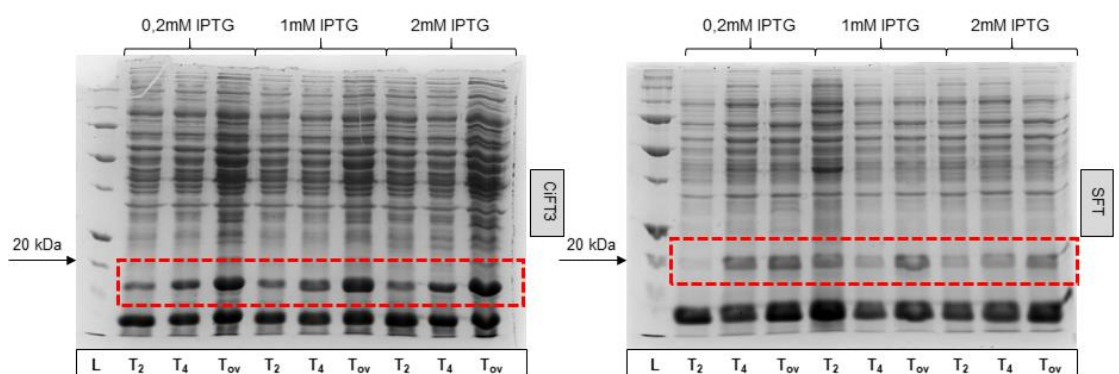


Figura 9 – Ensaio de expressão das proteínas codificadas pelos genes *CiFT3* e *SFT* a 37°C com diferentes concentrações do indutor de expressão IPTG (0,2 mM, 1 mM e 2 mM) em diferentes tempos de indução (T₂, T₄ e T_{ov}). SDS-PAGE a 12% corado com Coomassie Blue. As bandas das proteínas de interesse estão destacadas em vermelho. L: Ladder Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad).

Nesses ensaios, verificou-se que o tempo de indução T_{ov} foi mais eficiente na expressão da proteína de interesse para ambos os genes, sendo possível verificar bandas mais intensas nessas condições quando comparadas aos outros tempos de

indução (T₂ e T₄). Em relação ao indutor de expressão IPTG, para o gene *CiFT3*, não houve diferença significativa de expressão entre as três concentrações testadas. Já para o gene *SFT*, as concentrações de 0,2 mM e 1 mM mostraram-se mais eficientes na indução de expressão. Dessa forma, determinou-se a melhor condição de expressão dessas proteínas, e todos os ensaios subsequentes foram realizados nessa condição.

5.6 Purificação da proteína pelo método de cromatografia de afinidade a metal (níquel)

As purificações das proteínas recombinantes *CiFT3* e *SFT* estão apresentadas na Figura 10, onde é possível observar eluições mais intensas na fração contendo 500 mM de imidazol.

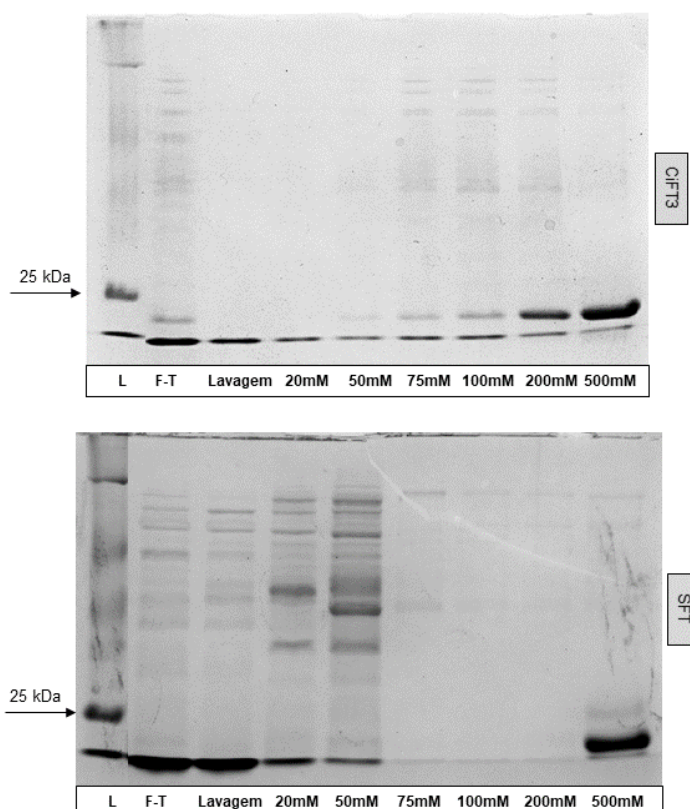


Figura 10 – Purificações das proteínas *CiFT3* e *SFT* em resina Ni-NTA Agarose, visualizadas em gel de SDS-PAGE a 12%. As proteínas recombinantes *CiFT3* e *SFT* foram observadas nas bandas mais evidentes (em seus respectivos géis) no tampão de fosfato de sódio 50 mM (pH 7,8), contendo 500 mM de imidazol. L: Ladder Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad). F-T: Flow-through, extrato bruto da proteína coletado após passagem em resina Ni-NTA Agarose. Lavagem: coleta do tampão de fosfato de sódio 50 mM (pH 7,8) após passagem em resina Ni-NTA Agarose para equilibrá-la. De 20-500 mM, encontram-se os eluatos obtidos após a lavagem com tampões de fosfato de sódio 50 mM (pH 7,8) com diferentes concentrações de imidazol.

5.7 Quantificação da proteína

As proteínas CiFT3 e SFT obtidas na purificação foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), utilizando o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 e a solução Protein Assay (Bio-Rad). Os resultados estão apresentados na tabela abaixo (Tabela 8). O método de Bradford, associado à utilização de um padrão de proteína para calibração, geralmente utilizando BSA (albumina sérica bovina), é um dos métodos mais comumente utilizados para a quantificação de proteínas (ZAGURI *et al.*, 2021).

Tabela 8 – Quantificações das proteínas CiFT3 e SFT pelo método de Bradford (1976).

		Quantificação das proteínas (µg/mL)												
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6	Exp. 7	Exp. 8	Exp. 9	Exp. 10	Exp. 11	Exp. 12	Exp. 13
CiFT3		61	90	83	129	22	25	14	49	20	153	73	94	-
SFT		115	35	54	26	94	61	112	33	60	18	65	88	30

5.8 Teste de estabilidade da proteína

A fim de verificar a estabilidade das proteínas CiFT3 e SFT, amostras armazenadas no freezer a -20°C foram aplicadas no gel SDS-PAGE 12% em diferentes tempos (1, 3 e 7 dias após o descongelamento e mantidas em temperatura ambiente) e logo após o descongelamento (Figura 11). Com esse experimento, foi possível verificar que a proteína se mantém estável em temperatura ambiente e aparentemente apresenta um baixo nível de degradação após o armazenamento, o que é interessante para os testes de indução de fluorescência.

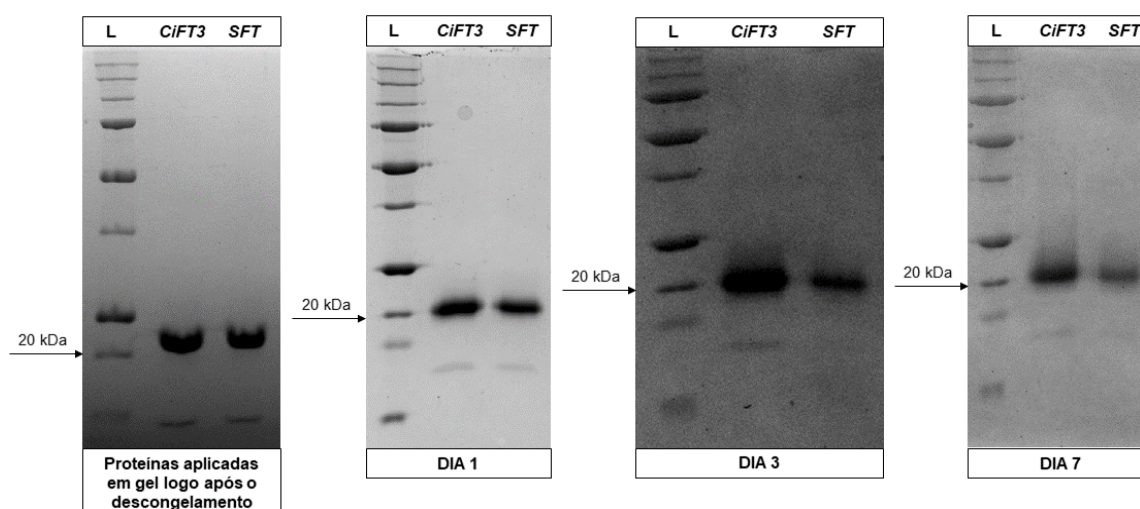


Figura 11 – Teste de degradação e estabilidade das proteínas CiFT3 e SFT armazenadas no freezer -20°C com amostras aplicadas no gel logo após o descongelamento, 1, 3 e 7 dias dia após descongelamento e mantidas em temperatura ambiente. Gel SDS-PAGE 12% corado com Coomassie Blue. L: Ladder Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad).

5.9 Ensaio de Dot-Blotting

O ensaio de Dot-Blotting foi realizado com o objetivo de confirmar a presença da proteína purificada após o processo de purificação. Esta técnica foi escolhida devido à presença de uma cauda de histidina (His-Tag) na extremidade N-terminal das proteínas em questão (CiFT3 e SFT), como ilustrado na Figura 15. O protocolo de dot-blotting é uma abordagem simples e eficaz para verificar rapidamente a presença de proteínas recombinantes, sendo uma excelente alternativa ao western blotting, uma técnica mais complexa e que demanda mais tempo para obtenção de resultados (MISHRA, 2022).

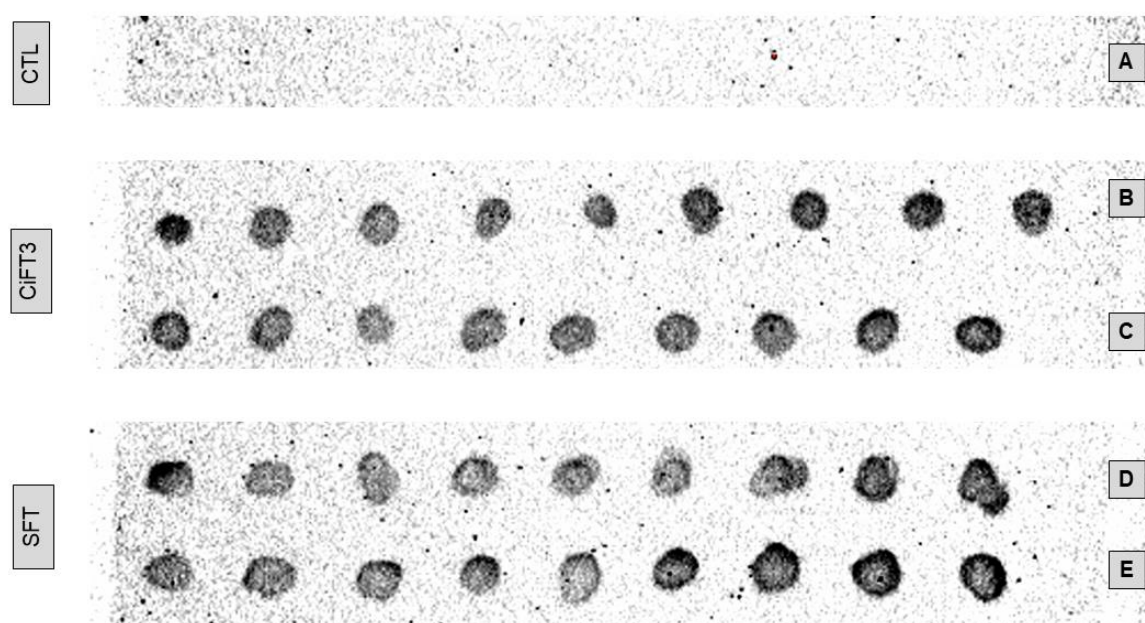


Figura 15 – Dot-blotting das proteínas recombinantes CiFT3 e SFT sondadas com o anticorpo primário Anticorpo His-Tag para confirmar a presença das proteínas pós-purificação. A: Controle (tampão de fosfato de sódio 50 mM (pH 7,8)). B: Proteína CiFT3 após diálise e armazenada em freezer a -20°C , sem imidazol e tampão de armazenamento (glicerol 20%). C: Proteína CiFT3 após purificação com imidazol 500 mM. D: Proteína SFT após diálise e armazenada em freezer a -20°C , sem imidazol e tampão de armazenamento (glicerol 20%). E: Proteína SFT após purificação com imidazol 500 mM.

A partir dos resultados obtidos, foi possível confirmar a presença das proteínas após a purificação. Além disso, a técnica de dot-blotting teoricamente permite a imunodeteção de proteínas em sua conformação principalmente nativa (DEBELJAK et al., 2006), ou seja, funcionais e não desnaturadas. Com esses indícios, sugere-se que as proteínas estejam funcionais. No entanto, é importante ressaltar que o uso exclusivo desta técnica não é suficiente para confirmar

completamente a funcionalidade das proteínas recombinantes. Outros ensaios e abordagens complementares são necessários para uma avaliação mais abrangente.

5.10 Testes de indução do florescimento

5.10.1 Testes *in vitro*

Nos testes *in vitro*, foi avaliada a indução do florescimento em plântulas juvenis de citros da variedade de laranja doce Hamlin por meio das proteínas CiFT3 e SFT pelas raízes, sendo as proteínas diluídas em tampão de fosfato de sódio 50 mM (pH 7,8). As plântulas foram submetidas à infiltração a vácuo das proteínas durante 15 minutos e, após esse período, foram transferidas para meio MS sólido (MURASHIGE; SKOOG, 1962). A metodologia de infiltração a vácuo foi adaptada do trabalho de Xiao *et al.* (2023), essa técnica oferece uma abordagem eficaz para investigar funções gênicas, realizar engenharia genética em citros e validar interações de proteínas. Nesta metodologia foram realizados 4 experimentos independentes, considerando 2 tratamentos por proteína, com 9 repetições (plântulas) por experimento. Portanto, foram utilizadas 36 plântulas nestes experimentos, e em nenhum deles ocorreu o florescimento (Figura 12) (Tabela 9).

Tabela 9 – Teste de indução do florescimento em plântulas juvenis de citros da variedade de laranja doce Hamlin por meio de infiltração a vácuo das proteínas CiFT3 e SFT pelas raízes.

	ng/ μ L da proteína por experimento		Total de plântulas	Florescimento
	Plântula com raiz	Plântula sem raiz		
CiFT3	49 ng/ μ L	73 ng/ μ L	18	0
SFT	30 ng/ μ L	54 ng/ μ L	18	0

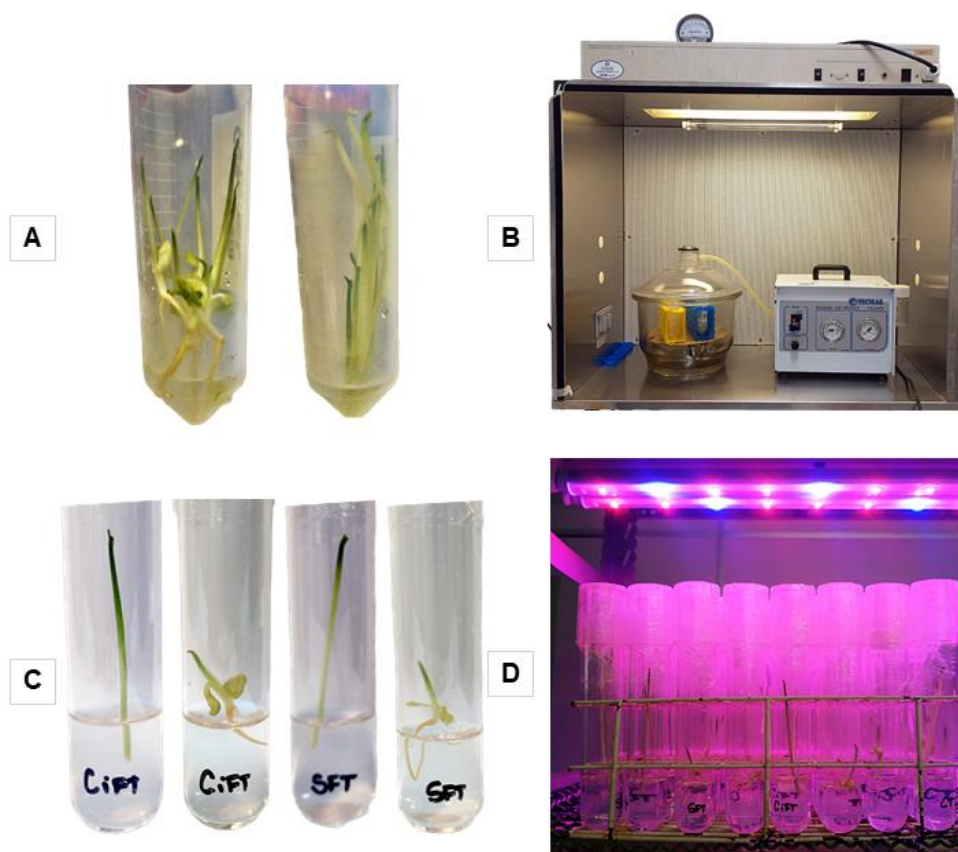


Figura 12 – Esquema do teste *in vitro* de infiltração a vácuo das proteínas CiFT3 e SFT pelas raízes. A: Plântulas de laranja doce Hamlin em tubo falcon de 50 mL com a proteína diluída em tampão de fosfato de sódio 50 mM (pH 7,8). B: Infiltração a vácuo por 15 minutos em fluxo laminar. C: Plântulas com e sem raízes em meio MS líquido para regeneração. D: Plântulas exposta a luz para regeneração.

Nos testes *in vitro*, avaliando a indução do florescimento em plantas jovens de citros das variedades de laranja doce Hamlin e Pera, através da absorção da proteína SFT pelas raízes, a proteína foi diluída em meio MS líquido (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com concentrações variando de 1 ng/ μ L até 210 ng/ μ L (Tabela 10). As plântulas foram mantidas em contato com a proteína por 7 dias (Figura 10A) e, após esse período, foram transferidas para meio MS sólido (Figura 13B). No total, foram utilizadas 36 plântulas nos experimentos, incluindo os controles, e em nenhum deles ocorreu o florescimento.

Tabela 10 – Teste de indução do florescimento em plantas juvenis de citros da variedade de laranja doce Hamlin e Pera por meio de absorção da proteína SFT pelas raízes.

Variedade	ng/ μ L da proteína por experimento	Nº de repetições	Florescimento
Pera	1	4	0
Pera	5	4	0
Pera	10	4	0
Pera	Controle	4	0
Hamlin	40	4	0
Hamlin	50	4	0
Hamlin	95	4	0
Hamlin	210	4	0
Hamlin	Controle	4	0
Total de plântulas		36	0

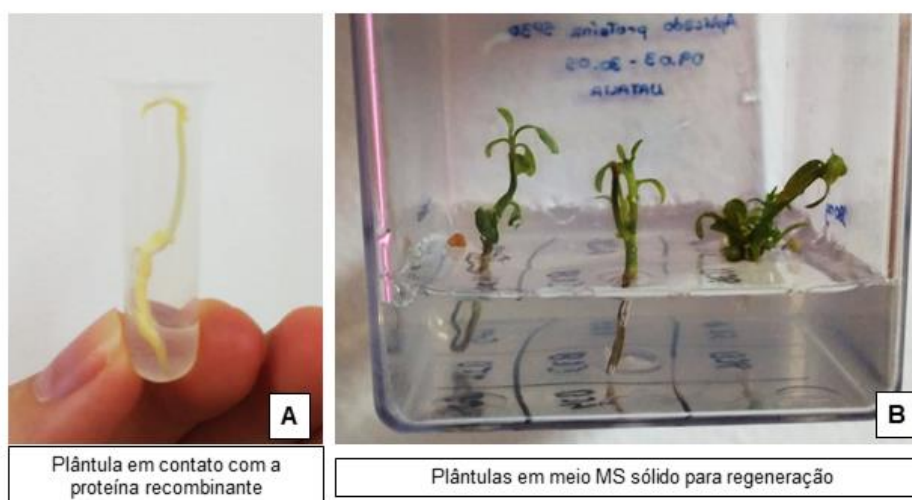


Figura 13 – Plântulas do teste de indução de florescimento *in vitro*. A: Plântula em contato com a proteína recombinante. B: Plântulas transferidas para meio MS sólido.

5.10.2 Testes *ex vitro*

Nos testes *ex vitro*, foram avaliadas a indução do florescimento em plantas juvenis das citranges Carrizo e Troyer e laranja doce Hamlin por meio da absorção das proteínas injetadas nas folhas e no meristema apical. Tais métodos de aplicação da proteína foram escolhidos porque sabe-se que o florigeno é transportado do seu local de produção, as folhas, para o seu local de ação, o meristema apical (CORBESIER *et al.*, 2007; MATHIEU *et al.*, 2007; NOTAGUCHI *et al.*, 2008; TAMAKI *et al.*, 2007), sendo, assim, pontos estratégicos.

Nas plantas em que a proteína foi aplicada diretamente no meristema apical, a concentração variou de 15 ng/ μ L até 112 ng/ μ L. Já nas plantas em que a proteína foi injetada nas folhas, a concentração apresentou uma variação maior, uma vez que em algumas o objetivo era injetar a menor quantidade possível, enquanto em outras

era saturar as folhas com a solução de proteína. Portanto, a concentração variou de 210 ng/ μ L até 33.600 ng/ μ L nas plantas em que a proteína foi injetada nas folhas (Observação: nestes experimentos, não é possível precisar a quantidades exata da proteína injetada, uma vez que a aplicação é feita com uma seringa de 1 mL e ocorre perda de quantidade durante a execução da técnica).

Logo nos primeiros experimentos, as folhas em que a proteína foi aplicada apresentaram necrose local (Figura 14A). Diante disso, foi necessário realizar testes para verificar qual fator causou essa necrose: a proteína, algum componente presente no tampão de eluição (tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, com imidazol) ou tampão de armazenamento (glicerol 20%) (Figura 14B).

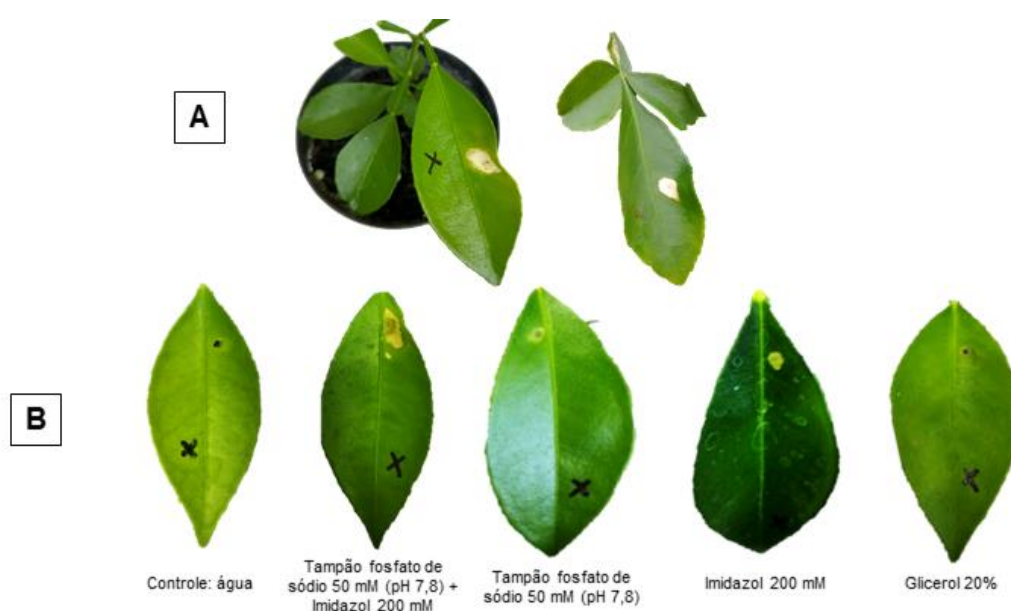


Figura 14 – A: Plantas juvenis de citrange Carrizo com necrose na folha e no pecíolo após aplicação da proteína por injeção com seringa. B: Testes para verificar qual tampão estava causando necrose nas folhas de citros juvenis.

A partir dos testes, foi possível verificar que o imidazol causava necrose nas folhas juvenis de citros, e assim, foi necessário que fosse realizada uma diálise para retirar do imidazol da solução. Para a diálise, foi utilizada a "*Dialysis Tubing: Cellulose membrane*" da Sigma, que retém proteínas maiores que 12 kDa. A proteína foi mantida em agitação em tampão de fosfato de sódio a 50 mM (pH 7,8) por 3 a 4 horas, com a troca de tampão a cada 1 hora para a remoção do imidazol. Após a remoção do imidazol, foram feitas novas aplicações da proteína e não se observou necrose. Num total, foram conduzidos 18 experimentos independentes, com 3 repetições em cada um, sendo 9 experimentos com a proteína CiFT3 e 9 com

a proteína SFT. No entanto, não houve florescimento precoce em nenhuma das plantas inoculadas.

Apesar dos testes principais terem sido concentrados em plantas cítricas, também foram avaliadas a indução do florescimento em plantas de tabaco e tomate, uma vez que se sabe que as proteínas FT, SFT e CiFT possuem função interespecífica. Esses testes foram conduzidos com base em trabalhos anteriores de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, onde o gene *SFT* foi inserido em citros, reduzindo a juvenilidade das plantas transformadas de alguns anos para apenas 45 a 100 dias, o que comprovou a funcionalidade da proteína SFT em sistema heterólogo (SOARES; SANTOS; BOSCARIOL-CAMARGO, 2018; SOARES *et al.*, 2018). Foram realizadas 10 aplicações de proteína SFT em plantas de tabaco e 10 aplicações em plantas de tomate, com concentrações de 25 ng/μL, 70 ng/μL, 140 ng/μL, 280 ng/μL e 5.000 ng/μL, em folhas e no meristema apical. As plantas foram avaliadas durante um mês e não foi observado florescimento precoce em nenhuma delas.

6 HIPÓTESES PARA O NÃO FLORESCIMENTO DAS PLANTAS DE CITROS, TABACO E TOMATE INOCULADAS COM AS PROTEÍNAS CiFT3 E SFT

Estudos anteriores confirmaram que a proteína FT, que desempenha um papel fundamental no processo de florescimento, é um sinal móvel sintetizado nas células companheiras do floema nas folhas e transportado até o meristema apical caulinar através do floema (TAMAKI *et al.*, 2007; WILKIE *et al.*, 2008; WICKLAND; HANZAWA, 2015; PUTTERILL; VARKONYI-GASIC, 2016). Apesar da importância da mobilidade da proteína FT, o mecanismo regulador ainda é pouco compreendido (WU *et al.*, 2022).

Com base nos resultados obtidos, há duas hipóteses para explicar o não florescimento das plantas juvenis de citros, tabaco e tomate inoculadas com as proteínas promotoras do florescimento. A primeira é a não translocação efetiva da proteína das folhas, onde foram injetadas, para o meristema apical. Sabe-se que existe uma concentração limite de proteína FT necessária para a indução do florescimento, e a falta de florescimento precoce nas plantas inoculadas pode ser resultado da diluição ou atenuação da proteína durante o transporte de longa distância. Wu *et al.* (2022) chegaram a uma conclusão semelhante em experimentos

de translocação do florigeno de porta-enxertos transgênicos para copa não transgênicas de plantas cítricas, que mesmo após detectarem a proteína FT nas copas não transgênicas, não ocorreu o florescimento precoce. Entretanto, é importante ressaltar que no estudo citado anteriormente, a proteína estava marcada, o que permitiu acompanhar sua translocação, mas as proteínas em estudo no nosso trabalho não possuem marcadores, impossibilitando comprovar essa hipótese.

A segunda é que não ocorreu o acúmulo de quantidades significativas das proteínas promotoras do florescimento nas plantas para induzir o florescimento. O acúmulo da proteína FT é uma etapa crítica e necessária para a ativação da via de sinalização que promove o florescimento nas plantas (SOARES *et al.*, 2020). A purificação das proteínas CiFT3 e SFT e sua avaliação através da injeção nas plantas para indução do florescimento é uma abordagem inovadora. No entanto, não há parâmetros estabelecidos na literatura para determinar a concentração limite dessas proteínas, necessária para desencadear o processo de florescimento nas plantas. Essa falta de informações prévias sobre os limites mínimos de concentração requeridos para a ação efetiva das proteínas tornou esse estudo desafiador. Wu *et al.* (2022) verificaram que a proteína FT exógena em *Poncirus trifoliata* L. Raf. causou diminuição da proteína FT endógena, resultando na falha de atingir o limite necessário para a indução da floração.

A partir dos resultados obtidos, verificou-se que as proteínas recombinantes CiFT3 e SFT, expressas em *E. coli* e purificadas, não foram capazes de induzir o florescimento precoce em plantas juvenis de citros, tabaco e tomate. Para compreender melhor os resultados obtidos, análises complementares são necessárias a fim de investigar as possíveis razões. Sugere-se verificar a estabilidade das proteínas no tampão utilizado durante o processo de purificação. Além disso, seria importante analisar a estrutura secundária das proteínas através de técnicas biofísicas, como o dicroísmo circular, para obter informações detalhadas sobre sua conformação. Essas abordagens adicionais permitirão um melhor entendimento do comportamento das proteínas recombinantes e podem auxiliar na identificação de fatores que influenciam sua atividade no processo de indução do florescimento em plantas.

7 CONCLUSÕES

Os genes CiFT3 de citros e SFT de tomate, responsáveis pela codificação de proteínas promotoras de florescimento, foram clonados em pET28a e utilizados para transformar *E. coli* BL21(DE3). A indução da expressão gênica demonstrou que a melhor condição para a produção de ambas as proteínas recombinantes foi utilizando 1 mM de IPTG a 37°C, com agitação de 200 rpm, durante 16 horas (T_{ov}). A purificação através do método de cromatografia de afinidade ao níquel foi possível com sucesso para ambas as proteínas.

Tanto a proteína CiFT3 quanto a proteína SFT possuem aproximadamente 20 kDa. A proteína CiFT3 mostrou-se estável, enquanto a proteína SFT apresentou instabilidade, conforme indicado pelo índice de estabilidade obtido através da ferramenta ProtParam. No entanto, na mesma avaliação, ambas as proteínas se mostraram termoestáveis e apresentam afinidade pela água (hidrofílicas). Além disso, ambas as proteínas são citoplasmáticas e não apresentam peptídeos-sinais, sequências curtas que controlam a secreção e translocação de proteínas.

Os testes de indução não obtiveram sucesso em promover o florescimento em plantas de citros, tabaco e tomate, tanto *in vitro* quanto *ex vitro*.

Para melhor compreender os resultados obtidos, são necessárias análises complementares para investigar possíveis razões. Dessa forma, será possível direcionar futuras estratégias para otimizar o processo de indução e, conseqüentemente, avançar na busca por resultados efetivos de florescimento nessas plantas.

8 LITERATURA CITADA

- AGUSTÍ, M.; MESEJO, C.; RAIG, C.; MARTÍNEZ-FUENTES, A. Citrus Production. *In: DIXON, G. R.; ALDOUS, D. E. Horticulture: Plants for People and Places. Springer*, v. 1, p. 159-196, 2014.
- AHN, J. H.; MILLER, D.; WINTER, V. J.; BANFIELD, M. J.; LEE, J. H.; YOO, S. Y.; HENZ, S. R.; BRADY, R. L.; WEIGEL, D. A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators *FT* and *TFL1*. **EMBO Journal**, v. 25, n. 3, p. 605–614, 2006.
- AMASINO, R. Seasonal and developmental timing of flowering. **Plant J.**, v. 61, p. 1001-1013, 2010.
- ANDRÉS, F.; COUPLAND, G. The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 9, p. 627-639, 2012.
- Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos (CitrusBR). **Radar de Comércio Internacional**: outubro de 2020. Disponível em: https://citrusbr.com/wp-content/uploads/2020/10/Relatorio_OUTUBRO_2020.pdf. Acesso em: 15 de maio de 2023.
- BÄURLE, I.; DEAN, C. The Timing of Developmental Transitions in Plants. **A Cell Press Journal**, v. 125, n. 4, 2006.
- BEGNA, T. Role of Recombinant DNA Technology in Agriculture. **International Journal of Research in Agriculture and Forestry**, v. 7, n. 12, p. 8-15, 2020.
- BENJAMINI, Y.; SPEED, T. P. Summarizing and correcting the GC content bias in high-throughput sequencing. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 10, p. 72, 2012.
- BLATTNER, F. R.; 3RD, G. P.; BLOCH, C. A.; PERNA, N. T.; BURLAND, V.; RILEY, M.; COLLADO-VIDES, J.; GLASNER, J. D.; RODE, C. K.; MAYHEW, G. F.; GREGOR, J.; DAVIS, N. W.; KIRKPATRICK, H. A.; GOEDEN, M. A.; ROSE, D. J.; MAU, B.; SHAO, Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**, v. 277, n. 5331, p. 1453-1462, 1997.
- BLÜMEL, M. DALLY, N.; JUNG, C. Flowering time regulation in crops—what did we learn from *Arabidopsis*? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 32, p. 121-129, 2015.

- BOSS, P.K.; BASTOW, R. M.; MYLNE, J. S.; Dean, C. Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting. **Plant Cell**, v. 16, p. 18-31, 2004.
- 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**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- CARRIER, T. A.; KEASLING, J. D. Controlling Messenger RNA Stability in Bacteria: Strategies for Engineering Gene Expression. **Biotechnology Progress**, v. 13, n. 6, p. 699-708, 2008.
- CASSIN, J.; BOURDEAUT, J.; FOUQUE, A.; FURON, V.; GAILLARD, J. P.; LEBOURDELLES, J.; MONTAGUT, G.; MOREUIL, C. The influence of climate upon the blooming of citrus in tropical areas. *In*: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM. **Proc. First Intl. Citrus Symp**, v. 1, p. 315-323, 1969.
- CAUSIER, B.; SCHWARZ-SOMMER, Z.; DAVIES, B. Floral organ identity: 20 years of ABCs. **Semin Cell Dev Biol**, v. 21, n. 1, p. 73-79, 2010.
- CECH, T. R. Ribosome Is a Ribozyme. **Science**, v. 289, n. 5481, 2000.
- Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA). **PIB do agronegócio de São Paulo**: 2019. Piracicaba, p. 1-11, 2020. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-de-sao-paulo.aspx>. Acesso em: 15 de maio de 2023.
- CHEN, R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 5, p. 1102-1107, 2012.
- CHICA, E. J.; ALBRIGO, L. G. Expression of Flower Promoting Genes in Sweet Orange during Floral Inductive Water Deficits. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 138, n. 2, p. 88-94, 2013.
- CHOU, K. C.; SHEN, H. B. New Method for Predicting the Subcellular Localization of Eukaryotic Proteins with Both Single and Multiple Sites: Euk-mPLOC 2.0. **PLoS ONE**, vol. 5, n. 4, e9931, 2010.
- COLLANI, S.; NEUMANN, M.; YANT, L.; SCHMID, M. FT Modulates Genome-Wide DNA-Binding of the bZIP Transcription Factor FD. **Plant Physiology**, v. 180, n. 1, p. 367-38, 2019.
- CORBESIER, L.; VINCENT, C.; JANG, S.; FORNARA, F. FAN, Q.; SEARLE, I.; GIAKOUNTIS, A.; FARRONA, S.; GISSOT, L.; TURNBULL, C.; COUPLAND,

- G. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. **Science**, v. 316, n. 5827, p. 1030-1033, 2007.
- CRICK, F. Central Dogma of Molecular Biology. *Nature*, v. 277, p. 561-563, 1970.
- CRONAN, J. E. *Escherichia coli* as an Experimental Organism. **eLS**, 2014.
- DEBELJAK, N.; FELDMAN, L.; DAVIS, K. L.; KOMEL, R.; SYTKOWSKI, A. J. Variability in the immunodetection of His-tagged recombinant proteins. **Anal. Biochem.**, v. 359, p. 216-223, 2006.
- DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 3, p. 297-306, 2009.
- EMANUELSSON, O.; BRUNAK, S.; HEIJNE, G. V.; NIELSEN, H. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. **Nature Protocols**, v. 2, p. 953-971, 2007.
- ENDO, T.; SHIMADA, T.; FUJII, H.; OMURA, M. Cloning and characterization of 5 MADS-box cDNAs isolated from citrus fruit tissue. **Scientia Horticulturae**, v. 109, n. 4, p. 315-321, 2006.
- ENDO, T.; SHIMADA, T.; FUJII, H.; KOBAYASHI, Y.; ARAKI, T.; OMURA, M. Ectopic Expression of an *FT* Homolog from *Citrus* Confers an Early Flowering Phenotype on Trifoliolate Orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.). **Transgenic Research**, v. 14, n. 5, p. 703-712, 2005.
- ENDO, T.; SHIMADA, T.; NAKATA, Y.; FUJII, H.; MATSUMOTO, H.; NAKAJIMA, N.; IKOMA, Y.; OMURA, M. Abscisic acid affects expression of citrus FT homologs upon floral induction by low temperature in Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). **Tree Physiology**, v. 38, n. 5, p. 755-771, 2018.
- FERRER-MIRALLES, N.; DOMINGO-ESPÍN, J.; CORCHERO, J. L.; VÁZQUEZ, E.; VILLAVARDE, A. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. **Microbial Cell Factories**, v. 8, n. 17, p. 1-8, 2009.
- FORNARA, F.; MONTAIGU, A.; COUPLAND, G. SnapShot: Control of Flowering in *Arabidopsis*. **Cell**, v. 141, n. 3, p. 550-550, 2010.
- GARCIA-LOR A.; CURK F.; SNOUSSI-TRIFA, H.; MORILLON, R.; ANCILLO, G.; LURO, F.; NAVARRO, L.; OLLITRAULT, P. A nuclear phylogenetic analysis: SNPs, indels and SSRs deliver new insights into the relationships in the 'true citrus fruit trees' group (*Citrinae*, *Rutaceae*) and the origin of cultivated species. **Annals of Botany**, v.111, n. 1, p. 1-19, 2013.

- GARG, V. K.; AVASHTHI, H.; TIWARI, A.; JAIN, P. A.; RAMKETE, P. W.; KAYASTHA, A. M.; SINGH, V. K. MFPPI – Multi FASTA ProtParam Interface. **Bioinformatics**, v. 12, n. 2, p. 74-77, 2016.
- GOLDBERG, T.; HAMP, T.; ROST, B. LocTree2 predicts localization for all domains of life. **Bioinformatics**, v. 28, n. 18, p. i458–i465, 2012.
- GROSSER, J. W.; GRIMMER JUNIOR, F. G. Protoplast fusion and citrus improvement. **Plant Breeding Reviews**, v. 8, p. 339-337, 1990.
- GUO, D.; LI, C.; DONG, R.; LI, X.; XIAO, X.; HUANG, X. Molecular cloning and functional analysis of the FLOWERING LOCUS T (FT) homolog GhFT1 from *Gossypium hirsutum*. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 57, n. 6, p. 522-533, 2014.
- GURUPRASAD, K.; REDDY, B. V. B.; PANDIT, M. W. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. **Protein Engineering**, v. 4, n. 2, p. 155-161, 1990.
- HA, T. M. A Review of Plants' Flowering Physiology: The Control of Floral Induction by Juvenility, Temperature and Photoperiod in Annual and Ornamental Crops. **Asian Journal of Agriculture and Food Sciences**, v. 2, n. 3, 2014.
- HAMMAMI, S. B. M.; LEÓN, L.; RAPOPORT, H. F.; ROSA, R. A new approach for early selection of short juvenile period in olive progenies. **Scientia Horticulturae**, v. 281, 2021.
- HANANO, S.; GOTO, K. *Arabidopsis* TERMINAL FLOWER1 Is Involved in the Regulation of Flowering Time and Inflorescence Development through Transcriptional Repression. **The Plant Cell**, v. 23, n. 9, p. 3172-3184, 2011.
- HANSEN, M. J.; CHEN, L.; FEJZO, M. L. S.; BEIASCO, J. G. The ompA 5' untranslated region impedes a major pathway for mRNA degradation in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 707-716, 1994.
- HANZAWA, Y.; MONEY, T.; BRADLEY, D. A single amino acid converts a repressor to an activator of flowering. **PNAS**, v. 102, n. 21, p. 7748-7753, 2005.
- HASAN, M.; HAKIM, A.; IQBAL, A.; BHUIYAN, F. R.; BEGUM, M. K.; SHARMIN, S.; ABIR, R. A. Computational Study and Homology Modeling of Phenol Hydroxylase: Key Enzyme for Phenol Degradation. **Int J Comput Bioinfo In Silico Model**, v. 4, n. 4, p. 691-698, 2015.

- HAYAT, S. M. G.; FARAHANI, N.; GOLICHENARI, B.; SAHEBKAR, A. Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli* (*E. coli*): What We Need to Know. **Curr Pharm Des.**, v. 24, n. 6, p.718-725, 2018.
- HECHT, V.; LAURIE, R. E.; SCHOOR, J. K. V.; RIDGE, S.; KNOWLES, C. L.; LIEW, L. C.; SUSSMILCH, F. C.; MURFET, I. C.; MACKNIGHT, R. C.; WELLERA, J. L. The Pea *GIGAS* Gene Is a *FLOWERING LOCUS T* Homolog Necessary for Graft-Transmissible Specification of Flowering but Not for Responsiveness to Photoperiod. **Plant Cell**, v. 23, n. 1, p. 147–161, 2011.
- HONG, Y.; JACKSON, S. Floral induction and flower formation—the role and potential applications of miRNAs. **Plant Biotechnology Journal**, v. 13, n. 3, p. 282–292, 2015.
- HUIJSER, P.; SCHMID, M. The control of developmental phase transitions in plants. **Development**, v. 138, n. 19, p. 4117-4129, 2011.
- IKAI, A. Thermostability and Aliphatic Index of Globular Proteins. **J. Biochem.**, v. 88, p. 1895-1898, 1980.
- IM, H.; SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. The Inoue Method for Preparation and Transformation of Competent *E. coli*: "Ultra Competent" Cells. **Bio-protocol**, v. 1, n. 20, 2011.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Produção de Laranja**: Brasil. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/laranja/br>. Acesso em: 15 de maio de 2023.
- ITO, A.; YAEGAKI, H.; HAYAMA, H.; KUSABA, S.; YAMAGUCHI, I.; YOSHIOKA, H. Bending Shoots Stimulates Flowering and Influences Hormone Levels in Lateral Buds of Japanese Pear. **HortScience HortSci**, v. 37, n. 7, p. 1224-1228, 1999.
- JACKSON, S.D. Plant responses to photoperiod. **New Phytol.**, v. 181, n.3, p. 517-531, 2008.
- JAEGER, K. E.; WIGGE, P. A. FT Protein Acts as a Long-Range Signal in *Arabidopsis*. **Current Biology**, v. 17, n. 12, p. 1050-1054, 2007.
- JEONG, H. *et al.* Genome sequences of *Escherichia coli* B strains *REL606* and *BL21(DE3)*. **J Mol Biol.**, v. 394, n. 4, p. 644-652, 2009.
- KAUR, J.; KUMAR, A.; KAUR, J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 803-822, 2018.

- KAWAMOTO, N.; SASABE, M.; ENDO, M.; MACHIDA, Y.; ARAKI, T. Calcium-dependent protein kinases responsible for the phosphorylation of a *bZIP* transcription factor *FD* crucial for the florigen complex formation. **Scientific Reports**, v. 5, p. 8341, 2015.
- KAZAN, K.; LYONS, R. The link between flowering time and stress tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 1, p. 47–60, 2015.
- KIM, J.J.; LEE, J. H.; KIM, W.; JUNG, H. S.; HUIJSER, P.; AHN, J. H. The *microRNA156-SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE3* module regulates ambient temperature-responsive flowering via *FLOWERING LOCUS T* in *Arabidopsis*. **Plant Physiol.**, v. 159, n. 1, p. 461–478, 2012.
- KOBAYASHI, Y.; KAYA, H.; GOTO, K.; IWABUCHI, M.; ARAKI, T. A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. **Science**, v. 286, n. 5446, p. 1960–1962, 1999.
- KOBAYASHI, Y.; WEIGEL, D. Move on up, it's time for change--mobile signals controlling photoperiod-dependent flowering. **Genes Dev**, v. 21, n. 19, p. 2371-2384, 2013.
- KOEHN, J.; HUNT, I. High-Throughput Protein Production (HTPP): A Review of Enabling Technologies to Expedite Protein Production. *In: High Throughput Protein Expression and Purification*. **Methods in Molecular Biology**, v. 498, 2009.
- KRUEGER R.R.; NAVARRO L Citrus germplasm resources. **Citrus genetics, breeding, and biotechnology**, p.45-140, 2007.
- LAURENS, F.; AUDERGON, J. M.; CLAVERIE, J.; DUVAL, H.; GERMAIN, E.; KERVELLA, J.; LEZEC, M.; LAURI, P.; LESPINASSE, J. M. Integration of architectural types in French programmes of ligneous fruit species genetic improvement. **Fruits**, v. 55, p. 141-152, 2000.
- LEE, J.; LEE, I. Regulation and function of *SOC1*, a flowering pathway integrator. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 9, p. 2247-2254, 2010.
- LI, J.; HOU, X.; ZHU, J.; ZHOU, J.; HUANG, H.; YUE, J.; GAO, J.; DU, Y.; HU, C.; ZHANG, J. Identification of Genes Associated with Lemon Floral Transition and Flower Development during Floral Inductive Water Deficits: A Hypothetical Model. **Front Plant Sci.**, v. 8, 2017.
- LIMA, H. H. C. D. **Estudo do efeito de adsorvente alternativo de casca de laranja pera rio (*Citrus sinensis* L. Osbeck) na adsorção de corante têxtil**

- vermelho reativo BF-4G.** Monografia (Bacharel em Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 57 p., 2014.
- LIU, C.; XI, W.; SHEN, L.; TAN, C.; YU, H. Regulation of Floral Patterning by Flowering Time Genes. **Developmental Cell**, v. 16, n. 5, p. 711-722, 2009.
- LIU, L.; ZHU, Y.; SHEN, L.; YU, H. Emerging insights into florigen transport. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, p. 1-7, 2013.
- LIU, Q.; SHI, X.; SONG, L.; LIU, H.; ZHOU, X.; WANG, Q.; ZHANG, Y.; CAI, M. CRISPR–Cas9-mediated genomic multiloci integration in *Pichia pastoris*. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 144, p. 1-11, 2019.
- LIU, Z.; ZHOU, J.; BRACHA-DRORI, K.; YALOVSKY, S.; ITO, T.; YU, H. Specification of *Arabidopsis* floral meristem identity by repression of flowering time genes. **Development**, v. 134, n. 10, p. 1901-1910, 2007.
- LOPES, J. M. S.; DÉO, T. F. G.; ANDRADE, B. J. M.; GIROTO, M.; FELIPE, A.L.S.; JÚNIOR, C. E. I.; BUENO, C. E. M. S.; SILVA, T. F.; LIMA, F. C. C. Importância econômica dos citros no Brasil. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v. 10, n. 20, p. 1-3, 2011.
- MA, G.; ZHANG, L.; SUGIURA, M.; KATO, M. Chapter 24 - Citrus and health. *In*: TALON, M.; CARUSO, M.; GMITTER, F. G. The Genus Citrus. 521 p. 2020.
- MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M. L.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast.**, v. 22, n. 4, p. 249-270, 2005.
- MAKRIDES, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **Microbiol Rev.**, v. 60, n.3, p. 512-538, 1996.
- MANUELA, D.; XU, M. Juvenile Leaves or Adult Leaves: Determinants for Vegetative Phase Change in Flowering Plants. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, n. 24, 2020.
- MARISCH, K.; BAYER, K.; CSERJAN-PUSCHMANN, M.; LUCHNER, M.; STRIEDNER, G. Evaluation of three industrial *Escherichia coli* strains in fed-batch cultivations during high-level SOD protein production. **Microb Cell Fact**, v. 12, n. 58, 2013.
- MATHIEU, J.; WARTHMAN, N.; KÜTTNER, F.; SCHMID, M. Export of FT protein from phloem companion cells is sufficient for floral induction in *Arabidopsis*. **Curr Biol**, v. 17, n. 12, p. 1055-1060, 2007.
- MATSOUKAS, I. G.; MASSIAH, A. J.; THOMAS, B. Florigenic and Antiflorigenic Signaling in Plants. **Plant Cell Physiol.**, v. 53, n. 11, p. 1827–1842, 2012.

- MCDONALD, M. B; KWONG, F. Y. Flower Seeds - Biology and Technology. **CABI Publishing**, 2005, 363p.
- MELZER, S.; LENS, F.; GENNEN, J.; VANNESTE, S.; ROHDE, A.; BEECKMAN, T. Flowering-time genes modulate meristem determinacy and growth form in *Arabidopsis thaliana*. **Nature Genetics**, v. 40, p. 1489-1492, 2008.
- MIROUX, B.; WALKER, J. E. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. **J Mol Biol.**, v. 260, n. 3, p. 289-298, 1996.
- MISHRA, V. Dot-Blotting: A Quick Method for Expression Analysis of Recombinant Proteins. **Current Protocols**, v. 9, n. 9, 2022.
- MORROW, J. F.; COHEN, S. N.; CHANG, A. C.; BOYER, H. W.; GOODMAN, H. M.; HELLING, R. B. Replication and transcription of eukaryotic DNA in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 71, n. 5, p. 1743–1747, 1974.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- NAG, N.; KHAN, H.; TRIPATHI, T. Strategies to improve the expression and solubility of recombinant proteins in *E. coli*. **Advances in Protein Molecular and Structural Biology Methods**, p. 1-12, 2022.
- NAKAMURA, Y.; LIN, Y.; WATANABE, S.; LIU, Y.; KATSUYAMA, K.; KANEHARA, K.; INABA, K. High-resolution crystal structure of *Arabidopsis FLOWERING LOCUS T* illuminates its phospholipid-binding site in flowering. **iScience**, v. 21, p. 577–586, 2019.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 6. ed. Porto Alegre: **Artmed Editora**, 2014.
- NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; & KALAKI, R. O retrato da citricultura brasileira. **CitrusBR**, 137 p., 2010.
- NISHIKAWA, F. Regulation of Floral Induction in Citrus. **J. Japan. Soc. Hort. Sci.**, v. 82, n. 4, p. 283-292, 2013.
- NISHIKAWA, F.; ENDO, T.; SHIMADA, T.; FUJII, H.; SHIMIZU, T.; OMURA, M.; IKOMA, Y. Increased CiFT abundance in the stem correlates with floral induction by low temperature in Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 14, p. 3915-3927, 2007.

- NOTAGUCHI, M.; ABE, M.; KIMURA, T.; DAIMON, Y.; KOBAYASHI, T.; YAMAGUCHI, A.; TOMITA, Y.; DOHI, K.; MORI, M.; ARAKI, T. Long-distance, graft-transmissible action of *Arabidopsis FLOWERING LOCUS T* protein to promote flowering. **Plant Cell Physiol**, v. 49, n. 11, p. 1645-1658, 2008.
- ODIPIO, J; GETU, B.; CHAUHAN, R. D.; ALICAI, T.; Bart, R.; NUSINOW, D. A.; TAYLOR, N. J. Transgenic overexpression of endogenous *FLOWERING LOCUS T*-like gene MeFT1 produces early flowering in cassava. **PLoS ONE**, v. 15, n. 3, p. 1-16, 2020.
- PALACIOS, J. L.; ZAROR, I.; MARTÍNEZ, P.; URIBE, F.; OPAZO, P.; SOCÍAS, T.; GIDEKEL, M.; VENEGAS, A. Subset of Hybrid Eukaryotic Proteins Is Exported by the Type I Secretion System of *Erwinia chrysanthemi*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 4, 2001.
- PEÑA, L.; MARTÍN-TRILLO, M.; JUÁREZ, J.; PINA, J. A.; NAVARRO, L.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J. M. Constitutive expression of *Arabidopsis LEAFY* or *APETALA1* genes in citrus reduces their generation time. **Nature Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 263–267, 2001.
- PILLITTERI, L. J.; LOVATT, C. J.; WALLING, L. L. Isolation and Characterization of *LEAFY* and *APETALA1* Homologues from *Citrus sinensis* L. Osbeck 'Washington'. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v. 129, n. 6, p. 846-856, 2004a.
- PILLITTERI, L. J.; LOVATT, C. J.; WALLING, L. L. Isolation and Characterization of a *TERMINAL FLOWER* Homolog and Its Correlation with Juvenility in Citrus. **Plant Physiology**, v. 135, n. 3, p. 1540-1551, 2004b.
- PIN, P. A.; NILSSON, O. The multifaceted roles of *FLOWERING LOCUS T* in plant development. **Plant, Cell & Environment**, v. 35, n. 10, p. 1742-1755, 2012.
- POETHIG, R. S. Phase change and the regulation of developmental timing in plants. **Science**, v. 301, n. 5631, p. 334-336, 2003.
- PUTTERILL, J.; ROBSON, F.; LEE, K.; SIMON, R.; COUPLAND, G. The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. **Cell**, v. 80, n. 6, p. 847-857, 1995.
- PUTTERILL, J.; VARKONYI-GASIC, E. FT and florigen long-distance flowering control in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 33. p. 77-82, 2016.
- RATZKIN, B.; CARBON, J. Functional expression of cloned yeast DNA in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 74, n. 2, p. 487–491, 1977.

- REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. The citrus industry. **Berkeley: University of California**, 611p, 1967.
- RIBEIRO, D.; BRANCO, I.; CHOUPINA, A. B. Fatores moleculares no metabolismo fundamental de *Phytophthora cinnamomi*. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 44, n. 2-3, p.203-214, 2021.
- ROUSE, D. T.; SHELDON, C. C.; BAGNALL, D. J.; PEACOCK, B. W. J.; DENNIS, E. S. FLC, a repressor of flowering, is regulated by genes in different inductive pathways. **The Plant Journal**, v. 29, n. 2, p. 183-191, 2002.
- SAHAY, A.; PIPRODHE, A.; PISE, M. In silico analysis and homology modeling of strictosidine synthase involved in alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnolog**, v. 18, n. 44, 2020.
- SAMACH, A. Congratulations, you have been carefully chosen to represent an important developmental regulator! **Ann Bot.**, v. 111, n. 3, p.329-333, 2013.
- SANTIAGO, R. T. **Cultivo in vitro em auxílio à obtenção de tangerineiras triploides e propagação de porta-enxertos de citros**. 2017. 55f. Dissertação (Mestre em Recursos Genéticos Vegetais) – Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, 2017.
- SAUVONNET, N.; POQUET, I.; PUGSLEY, A. P. Extracellular secretion of pullulanase is unaffected by minor sequence changes but is usually prevented by adding reporter proteins to its N- or C-terminal end. **J Bacteriol.**, v. 177, n. 18, p. 5238-5246, 1995.
- SEARLE, I.; HE, Y.; TURCK, F.; VINCENT, C.; FORNARA, F.; KRÖBER, S.; AMASINO, R. A.; COUPLAND, G. The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. **Genes Dev**, v. 20, n. 7, p. 898-912, 2006.
- SHARP, S. J.; SCHAACK, J.; COOLEY, L.; BURKE, D. J.; SOIL, D. Structure and Transcription of Eukaryotic tRNA Gene. **Critical Reviews in Biochemistr**, v. 19, n. 2, 1985.
- ŠMARDA, P.; BUREŠ, P. The Variation of Base Composition in Plant Genomes. **Plant Genome Diversity**, v. 1, p. 209-235, 2012.
- SOARES, J. M.; WEBER, K. C.; QIU, W.; STANTON, D.; MAHMOUD, L. M.; WU, H.; HUYCK, P.; ZALE, J.; JASIM K. A.; GROSSER, J. W.; DUTT, M. The vascular targeted citrus FLOWERING LOCUS T3 gene promotes non-inductive early

- flowering in transgenic Carrizo rootstocks and grafted juvenile scions. **Scientific Reports**, v. 10, n. 21404, 2020.
- SOARES, N. C.; MACHADO, M. A.; BOSCARIOL-CAMARGO, R. L. Overexpression of tomato *SFT* gene in citrus rootstock induces flowering in non-transgenic scion. *In: 67th Brazilian Congress of Genetics, 2022, Natal-RN. Anais do 67^o Congresso Brasileiro de Genética. Ribeirão Preto-SP: SBG, 2022.*
- SOARES, N. C.; SANTOS, G. M. R.; BOSCARIOL-CAMARGO, R. L. Early flowering in Swingle citrumelo by overexpression of tomato *SFT* gene. *In: 2nd Biotechnology Ibero-American Congress and 7th Brazilian Biotechnology Congress, 2018, Brasília. Anais do 7th Brazilian Biotechnology Congress, 2018.*
- SOARES, N. C.; SANTOS, G. M. R.; NADAI, F. B.; MACHADO, M. A.; BOSCARIOL-CAMARGO, R. L. Overexpression of the tomato *Single Flower Truss* gene induces early flowering in citrus rootstocks. *In: 12th Congress of the International Plant Molecular Biology, 2018, Montpellier, França. IPMB Program Abstracts, 2018.*
- SØRENSEN, H.P.; MORTENSEN K.K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **J Biotechnol.**, v. 115, n. 2, p. 113-128, 2005.
- SPIEGEL-ROY, P.; GOLDSCHMIDT, E.E. Biology of citrus. 2.ed. **Cambridge: Cambridge University**, 2008. 230p.
- SPREEN, T. H; GAO, Z.; JR. W. F.; ZANSLER, M. L. **Global economics and marketing of citrus products**. p. 471-493, 2020.
- SRIKANTH, A.; SCHMID, M. Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 68, n. 12, p. 2013–2037, 2011.
- SVOBODA, P.; CARA, A. D. Hairpin RNA: a secondary structure of primary importance. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 63, p. 901-908, 2006.
- TAMAKI, S.; MATSUO, S.; WONG, H. L.; YOKOI, S.; SHIMAMOTO, K. *Hd3a* protein is a mobile flowering signal in rice. **Science**, v. 316, n. 5827, p. 1033-1036, 2007.
- TAMAKI, S.; MATSUO, S.; WONG, H. L.; YOKOI, S.; SHIMAMOTO, K. Hd3a Protein Is a Mobile Flowering Signal in Rice. **Science**, v. 316, n. 5827, p. 1033-1036, 2007.

- TAN, F. C.; SWAIN, S. M. Functional characterization of *AP3*, *SOC1* and *WUS* homologues from citrus (*Citrus sinensis*). **Physiologia Plantarum**, v. 131, n. 3, p. 481-495, 2007.
- TAN, F. C.; SWAIN, S. M. Genetics of flower initiation and development in annual and perennial plants. **Physiologia Plantarum**, v. 128, n. 1, p. 8-17, 2006.
- TANG, L.; LOVATT, C. J. Effects of low temperature and gibberellic acid on floral gene expression and floral determinacy in 'Washington' navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Scientia Horticulturae**, v. 243, p. 91-100, 2019.
- TEUFEL, F.; ARMENTEROS, J. J. A.; JOHANSEN, A. R.; GÍSLASON, M. H.; PIHL, S. I.; TSIRIGOS, K. D.; WINTHER, O.; BRUNAK, S.; HEIJNE, G. V.; NIELSEN, H. SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. **Nature Biotechnology**, v. 40, p. 1023-1025, 2022.
- TURCK, F.; FORNARA, F.; COUPLAND, G. Regulation and identity of florigen: *FLOWERING LOCUS T* moves center stage. **Annu Rev Plant Biol**, v. 59, p. 573-594, 2008.
- United States Department of Agriculture (USDA). **Citrus**: World Markets and Trade. Disponível em: <https://usda.library.cornell.edu/concern/publications/w66343603?locale=en>. Acesso em: 04 de julho de 2022.
- United States Department of Agriculture (USDA). **Citrus**: World Markets and Trade. Disponível em: <https://usda.library.cornell.edu/concern/publications/w66343603?locale=en>. Acesso em: 15 de maio de 2023.
- VAPNEK, D.; *Hautala*, J. A.; *Jacobson*, J. W.; *Giles*, N. H.; *Kushner*, S. R. Expression in *Escherichia coli* K-12 of the structural gene for catabolic dehydroquinase of *Neurospora crassa*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 74, n. 8, p. 3508-3512, 1977.
- VERMA, A.; SINGH, V. K.; GAURA, S. Computational based functional analysis of *Bacillus* phytases. **Computational Biology and Chemistry**, v. 60, p. 53-58, 2016.
- VIEIRA, W. O. IDENTIFICAÇÃO, ANÁLISE IN SÍLICO DE GENES E PROTEÍNAS E ELABORAÇÃO DE ESTRATÉGIAS DE ISOLAMENTO DE GENES POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS NA BIOSÍNTESE E INATIVAÇÃO DE 20-HIDROXIECDISONA (20E) EM PLANTAS. Dissertação (Biotecnologia Aplicada

- à Agropecuária) – Universidade Federal Rural da Amazônia. Belém, 102 p., 2021.
- VISSER, T.; VERHAEGH, J. J.; VRIES, D. P. A comparison of apple and pear seedlings with reference to the juvenile period I. Seedling growth and yield. **Euphytica**, v. 25, p. 343-351, 1976.
- WEIGEL, D.; ALVAREZ, J.; SMYTH, D. R.; YANOFSKY, M. F.; MEYEROWITZ, E. M. *LEAFY* Controls Floral Meristem Identity in *Arabidopsis*. **Cell**, v. 69, p. 843-859, 1992.
- WICKLAND D. P.; HANZAWA, Y. The *FLOWERING LOCUS T/TERMINAL FLOWER 1* Gene Family: Functional Evolution and Molecular Mechanisms. **Molecular Plant**, v. 8, n. 7, p. 983-997, 2015.
- WICKLAND, D.; HANZAWA, Y. The *FLOWERING LOCUS T/TERMINAL FLOWER 1* Gene Family: Functional Evolution and Molecular Mechanisms. **Molecular Plant**, v. 8, p. 983-997, 2015.
- WIGGE, P. A.; KIM, M. C.; JAEGER, K. E.; BUSCH, W.; SCHMID, M.; LOHMANN, J. U.; WEIGEL, D. Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. **Science**, v. 309, n. 5737, p. 1056-1059, 2005.
- WILKIE, J. D.; SEDGLEY, M.; OLESEN, T. Regulation of floral initiation in horticultural trees. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 12, p. 3215-3228, 2008.
- WILKIE, J. D.; SEDGLEY, M.; OLESEN, T. Regulation of floral initiation in horticultural trees. **Journal of Experimental Botan**, v. 59, n. 12, p. 3215-3228, 2008.
- WU, G.; PROCHNIK, S.; JENKINS, J. *et al.* Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. **Nat Biotechnol**, v. 32, p. 656–662, 2014.
- WU, G.; TEROL, J.; IBANEZ, V. *et al.* Genomics of the origin and evolution of Citrus. **Nature**, v. 554, p. 311–316, 2018.
- WU, Y.; MA, Y.; WANG, M.; ZHOU, H.; GAN, Z.; ZENG, R.; YE, L.; ZHOU, J.; ZHANG, J.; HU, C. Mobility of *FLOWERING LOCUS T* protein as a systemic signal in trifoliolate orange and its low accumulation in grafted juvenile scions. **Horticulture Research**, v. 9, 2022.
- WU, Y.; MA, Y.; WANG, M.; ZHOU, H.; GAN, Z.; ZENG, R.; YE, L.; ZHOU, J.; ZHANG, J.; HU, C. Mobility of *FLOWERING LOCUS T* protein as a systemic

- signal in trifoliolate orange and its low accumulation in grafted juvenile scions. *Horticulture Research*, v. 9, 2022.
- XIAO, Y.; DUTT, M.; MA, H.; XIAO, C.; TONG, Z.; WANG, Z.; HE, X.; SUN, Z.; QIU, W. Establishment of an efficient root mediated genetic transformation method for gene function verification in citrus. *Scientia Horticulturae*, v. 321, 2023.
- YU, C. S.; CHEN, Y. C.; LU, C. H.; HWANG, J. K. Prediction of protein subcellular localization. *Proteins*, v. 64, n. 3, p. 643-651, 2006.
- ZAGURI, M.; KANDEL, S.; RINEHART, S. A.; TORSEKAR, V. R.; HAWLENA, D. Protein quantification in ecological studies: A literature review and empirical comparisons of standard methodologies. *Methods in Ecology and Evolution*, v. 12, n. 7, p. 1240-1251, 2021.
- ZEEVAART, J. A. D. Florigen coming of age after 70 years. *Plant Cell*, v. 18, n. 8, p. 1783–1789, 2006.
- ZHAO, L.; POSCHMANN, G.; WALDERA-LUPA, D.; RAFIEE, N.; KOLLMANN, M.; STÜHLER, K. OutCyte: a novel tool for predicting unconventional protein secretion. *Scientific Reports*, v. 9, n. 19448, 2019.
- ZIMMERMAN, R. H. Flowering in Crabapple Seedlings: Methods of Shortening the Juvenile Phase. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v. 96, n. 4, p. 404-411, 1971.